



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**METABOLITOS SECUNDARIOS DE NATURALEZA
FENÓLICA: PAPEL EN LA RESPUESTA
DEFENSIVA DE PLANTAS DE TOMATE**

**Laura Campos Beneyto
TESIS DOCTORAL**

**Directores:
Dra. M^a Purificación Lisón Párraga
Dr. Ismael Rodrigo Bravo**

Valencia, octubre 2014

ABSTRACT

In order to cope with pathogenic attacks of different nature, plants display constitutive natural barriers and accumulation of certain defensive compounds. In addition, plants have developed a series of inducible mechanisms such as the immune response and RNA silencing, which are activated after the pathogen entry.

Secondary metabolites of phenolic nature play a very important role in the defensive response. These metabolites can be classified into three major groups: *signal molecules*, which are able to activate the response, *phytoanticipins*, which are constitutively present or preformed in the plant, and *phytoalexins*, which are either synthesized *de novo* or their synthesis increase in response to microbial attack.

This work focuses on studying the role played by salicylic acid (SA), gentisic acid (GA) and hydroxycinnamic acid amides (HCAA) in the plant defensive response. Among these phenolics, SA and GA could be classified as *signal molecules*, whereas HCAA, considered *phytoalexins*, act directly on the pathogenic organism due to their antibacterial, anti-fungal and/or antioxidant properties.

To study the role of SA and GA in plant defence, exogenous treatments have been performed using these compounds on Gynura and tomato plants infected with the Citrus Exocortis Viroid (CEVd) and the tomato Mosaic Virus (ToMV), respectively. These treatments produced a delay in the onset of symptoms, thus emphasizing the ability of these metabolites to effectively activate the defensive response. Also, we have observed that the treatments produced the activation of RNA silencing mechanisms. Our results establish a correlation between SA or GA-mediated resistance and RNA gene silencing, and confirm the role of these phenolic compounds in the defensive response.

Transgenic plants showing altered levels of the studied metabolites have been obtained. Overexpression of GAGT, a GA-glycosyltransferase identified in tomato, in Arabidopsis and tomato plants has resulted in a metabolic phenotype for both species, which display a larger percentage of GA conjugation and, consequently, a lower accumulation of free GA, which is the active form of the compound. In Arabidopsis, the metabolic phenotype of the transgenic plants was accompanied by a phenotype of susceptibility to infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato Rpml* as compared to control plants. We focused our efforts to characterize the function of Twi1, a putative glycosyltransferase with a possible role in the defensive response. Overexpression of the protein has allowed the analysis of its enzymatic activity *in vitro*, which displays glucosyltransferase activity against the phenolics 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-DHBA) and 2,4,6-trihydroxybenzoic acid (2,4,6-THBA). Exogenous applications of these polyphenols to *Twi1*-silenced transgenic plants corroborated its enzymatic activity *in*

vivo, since these plants showed a reduced conjugation percentage of 2,4-DHBA and 2,4,6-THBA and, consequently, a larger accumulation of both metabolites in their free form. Finally, we have generated transgenic tomato plants overexpressing *THT* gene, which encodes a key enzyme in the HCAA biosynthesis. These transgenic plants presented an enhanced constitutive accumulation of amides in leaf, flower and fruit tissues as compared to control plants. In addition, the amount of HCAA found in leaves was also higher in these plants in response to wounding. Transgenic THT plants infected with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* showed a high accumulation of HCAA and SA, compared with control plants. As a result, these plants resulted to be more resistant to the bacterial infection, confirming the role of the HCAA in defence.

Both exogenous treatments with phenolic compounds and the generation of transgenic plants with altered levels of them have resulted to be very useful strategies in carrying out this work, allowing us to further study in greater depth on the function of these metabolites in the plant defensive response against pathogen attack.

RESUMEN

Con el fin de hacer frente a ataques patogénicos de diversa naturaleza, las plantas presentan, de manera constitutiva, barreras físicas naturales y acumulación de ciertos compuestos defensivos. En adición a esto, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de tipo inducible, como la respuesta inmune y el silenciamiento de RNA, que se activan tras la entrada del patógeno.

Los metabolitos secundarios de naturaleza fenólica juegan un papel muy importante en la respuesta defensiva. Estos metabolitos pueden clasificarse en tres grandes grupos: *moléculas señal*, capaces de activar dicha respuesta, *fitoanticipinas*, presentes en la planta de manera constitutiva o preformados, y *fitoalexinas*, que se sintetizan *de novo* o ven incrementada su síntesis en respuesta a un ataque microbiano. El presente trabajo se centra en el estudio de la función que desempeña el ácido salicílico (SA), el ácido gentísico (GA) y las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAA) en la respuesta defensiva de las plantas. De entre estos fenólicos, el SA y el GA podrían clasificarse dentro del grupo de *moléculas señal*, mientras las HCAA, consideradas *fitoalexinas*, actuarían directamente sobre el patógeno, debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y/o antioxidantes.

Para estudiar el papel del SA y del GA en la respuesta defensiva, se han realizado tratamientos exógenos con estos compuestos a plantas de Gynura y tomate infectadas con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) y el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV), respectivamente. Este hecho ha producido un retraso en la aparición de los síntomas, poniendo de manifiesto la capacidad de estos metabolitos de activar de manera eficaz la respuesta defensiva de las plantas. Asimismo, se ha observado que estos tratamientos producen la activación de mecanismos de silenciamiento de RNA. Nuestros resultados establecen relaciones entre la resistencia mediada por SA o GA y el silenciamiento génico de RNA, y confirman el papel de estos compuestos fenólicos en la respuesta defensiva.

Se han obtenido plantas transgénicas con niveles alterados de los metabolitos objeto de estudio. La sobreexpresión tanto en Arabidopsis como en tomate de GAGT, una glicosiltransferasa de GA identificada en tomate, ha dado lugar a un fenotipo metabólico en ambas especies, mostrando un mayor porcentaje de conjugación de GA y, en consecuencia, una menor acumulación de GA en forma libre, que es la forma activa del compuesto. En el caso de Arabidopsis, el fenotipo metabólico de las plantas transgénicas vino acompañado de un fenotipo de susceptibilidad frente a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato Rpml*, respecto a las plantas control. Se han centrado esfuerzos en caracterizar la función de Twi1, una supuesta glicosiltransferasa con una posible función en la respuesta defensiva. La

sobreexpresión de la proteína ha permitido el análisis de su actividad enzimática *in vitro*, mostrando actividad glucosiltransferasa frente a los ácidos 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA) y 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA). Aplicaciones exógenas con estos polifenoles a plantas transgénicas que silencian *Tw1* corroboraron su actividad *in vivo*, pues estas plantas mostraron un menor porcentaje de conjugación de 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA y, por consiguiente, una mayor acumulación de ambos metabolitos en su forma libre. Por último, se han generado plantas transgénicas de tomate con sobreexpresión del gen *THT*, que codifica un enzima clave en la biosíntesis de las HCAA. Estas plantas transgénicas han presentado una mayor acumulación de amidas en hojas, flores y frutos de forma constitutiva, respecto a plantas control. Además, en respuesta a herida, la cantidad de HCAA en hojas también resultó superior a la detectada en plantas control. Las plantas transgénicas THT infectadas con el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* presentaron una mayor acumulación de HCAA y SA, en comparación con plantas control. En consecuencia, estas plantas resultaron ser más resistentes a la infección bacteriana, confirmando el papel de las HCAA en defensa.

Tanto la realización de tratamientos exógenos con compuestos fenólicos como la obtención de plantas transgénicas con niveles alterados de los mismos han resultado estrategias de gran utilidad en la realización de este trabajo, permitiendo profundizar en el estudio de la función de estos metabolitos en la respuesta defensiva de las plantas frente a ataques patogénicos.

RESUM

Amb l'objectiu de fer front a atacs patogènics de diversa naturalesa, les plantes presenten, de manera constitutiva, barreres físiques naturals i acumulació de certs compostos defensius. Addicionalment, les plantes han desenvolupat una sèrie de mecanismes de tipus induïble, com ara la resposta immune i el silenciament de RNA, que s'activen després de l'entrada del patogen.

Els metabòlits secundaris de naturalesa fenòlica juguen un paper molt important en la resposta defensiva. Aquests metabòlits poden classificar-se en tres grans grups: *molècules senyal*, capaços d'activar aquesta resposta, *fitoanticipines*, presents de manera constitutiva en la planta o preformades, i *fitoalexines*, que se sintetitzen *de novo* o veuen incrementada la síntesi en resposta a un atac microbià.

El treball present se centra en l'estudi de la funció que exerceixen l'àcid salicílic (SA), l'àcid gentísic (GA) i les amides derivades de l'àcid hidroxicinàmic (HCAA) en la resposta defensiva de les plantes. D'entre aquests fenòlics, el SA i el GA podrien classificar-se dins del grup de *molècules senyal*, mentre que les HCAA, considerades *fitoalexines*, actuarien directament sobre l'organisme patogen, a causa de les propietats antibacterianes, antifúngiques i/o antioxidants que posseeixen aquestes.

Per estudiar el paper del SA i del GA en la resposta defensiva, s'han realitzat tractaments exògens amb aquests compostos a plantes de Gynura i tomaca infectades amb el Viroid de l'Exocortis dels Cítrics (CEVd) i el Virus del Mosaic de la Tomaca (ToMV), respectivament. Això ha produït un retard en l'aparició dels símptomes, fet que posa de manifest la capacitat d'aquests metabòlits d'activar de manera eficaç la resposta defensiva de les plantes. Així mateix, s'ha observat que aquests tractaments produeixen l'activació de mecanismes de silenciament de RNA. Els nostres resultats estableixen relacions entre la resistència intervinguda per SA o GA i el silenciament gènic de RNA, i confirmen el paper d'aquests compostos fenòlics en la resposta defensiva.

S'han obtingut plantes transgèniques amb nivells alterats dels metabòlits objecte d'estudi. La sobreexpressió tant en Arabidopsis com en tomaca de GAGT, una glicosiltransferasa de GA identificada en tomaca, ha donat lloc a un fenotip metabòlic en ambdues espècies, que presenten un major percentatge de conjugació de GA i, en conseqüència, una menor acumulació de GA en forma lliure, que és la forma activa del compost. En el cas d'Arabidopsis, el fenotip metabòlic de les plantes transgèniques va venir acompanyat d'un fenotip de susceptibilitat enfront de la infecció amb el bacteri *Pseudomonas syringae* pv. *tomato Rpml*, respecte a les plantes control. S'han centrat esforços a caracteritzar la funció de Twi1, una suposada glicosiltransferasa amb una possible funció en la resposta defensiva. La sobreexpressió de la proteïna ha permès

l'anàlisi de la seua activitat enzimàtica *in vitro*, mostrant activitat glucosiltransferasa davant dels àcids 2,4-dihidroxibenzoic (2,4-DHBA) i 2,4,6-trihidroxibenzoic (2,4,6-THBA). Aplicacions exògenes amb aquests polifenols a plantes transgèniques que silencien *Tw1* van corroborar l'activitat enzimàtica *in vivo*, ja que les plantes transgèniques van mostrar un menor percentatge de conjugació de 2,4-DHBA i 2,4,6-THBA i, consegüentment, una major acumulació de tots dos metabòlits en la forma lliure. Finalment, s'han generat plantes transgèniques de tomaca amb sobreexpressió del gen *THT*, el qual codifica un enzim clau en la biosíntesi de les HCAA. Aquestes plantes transgèniques han presentat una major acumulació d'amides en fulles, flors i fruits de forma constitutiva, respecte a plantes control. A més, en resposta a ferida la quantitat de HCAA en fulles també va resultar superior a la detectada en plantes control. Les plantes transgèniques THT infectades amb el bacteri *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* van presentar una major acumulació de HCAA i SA, en comparació amb les plantes control. En conseqüència, aquestes plantes van resultar ser més resistents a la infecció bacteriana, fet que confirma el paper de les HCAA en defensa.

Tant la realització de tractaments exògens amb compostos fenòlics com l'obtenció de plantes transgèniques amb nivells alterats d'aquests, han resultat estratègies de gran utilitat en la realització d'aquest treball, fet que ens ha permès aprofundir en l'estudi de la funció d'aquests metabòlits en la resposta defensiva de les plantes enfront d'atacs patològics.

ABREVIATURAS

2,4-DHBA: Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	HCAA: Amidas derivadas del ácido hidroxicinámico
2,4,6-THBA: Ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico	hpi: Horas post inoculación
AGO: Argonauta	HPLC: Cromatografía líquida de altas prestaciones
Avr: Avirulencia	HPLC-MS: Cromatografía líquida de altas prestaciones acoplada a espectrometría de masas
C4H: Cinnamato 4-Hydroxilasa	HR: Respuesta hipersensible
CD: <i>p</i> -Cumaroidopamina	JA: Ácido jasmónico
cDNA: DNA complementario	MeJA: Jasmonato de metilo
CEVd: Viroide de la Exocortis de los Cítricos	MeSA: Metil salicilato
CFU: Unidades Formadoras de Colonia	miRNA: MicroRNA
CNA: <i>p</i> -Cumaroilnoradrenalina	NahG: Gen de la salicilato hidroxilasa
CO: <i>p</i> -Cumariloctopamina	PDA: <i>Photodiode array detector</i>
CP: Proteína de la cápside viral	PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
CT: Cumaroitiramina	PAL: <i>Phenylalanine Ammonia Liase</i>
DAMPs: <i>Danger-Associated Molecular Patterns</i>	PAMPs: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
DCL: <i>Dicer-like</i>	pb: Pares de bases nucleotídicas
dNTPs: Desoxirribonucleótidos	PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
dpi: Días post inoculación	PR: <i>Pathogenesis-Related</i>
dsRNA: RNA de doble cadena	PRRs: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
ET: Etileno	PSPG: <i>Plant Secondary Product Glycosyltransferase</i>
ETI: <i>Effector-Triggered Immunity</i>	PTGS: <i>Post -Transcriptional Gene Silencing</i>
FD: Feruloildopamina	PTI: <i>PAMP-Triggered Immunity</i>
FNA: Feruloilnoradrenalina	RDR: RNA-polimerasa-RNA-dependiente
FO: Feruloiloctopamina	
FT: Feruloiltiramina	
GA: Ácido genticico	
GAGT: Glicosiltransferasa de ácido genticico	
GT: Glicosiltransferasa	

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RMN: Resonancia magnética nuclear

RNAi: RNA de interferencia

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPL2: Proteína ribosomal L2

RT-PCR: Transcripción reversa de RNA seguida de PCR

SA: Ácido salicílico

SAR: Resistencia sistémica adquirida

siRNAs: *Short interfering RNAs*

sRNAs: *Small RNAs*

ssRNAs: RNAs de simple cadena

THT: Tiramina hidroxicinamoil transferasa

TIC: *Total Ion Current*

ToF: *Time of Flight*

ToMV: Virus del Mosaico del Tomate

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

Twi1: Proteína de tomate inducida por herida

TYDC: Tiramina descarboxilasa

UV: Ultravioleta

var: Variedad

vdsiRNAs: *Viroid-small-interfering RNAs*

VIGS: *Virus Induced Gene Silencing*

vsRNAs: *Virus-small-interfering RNAs*

ÍNDICE

Introducción	1
1. La interacción planta-patógeno	1
1.1. <i>Respuesta inmune de las plantas</i>	2
1.1.1. <i>Percepción del patógeno</i>	3
El reconocimiento inespecífico: PAMPs	3
El reconocimiento específico: la interacción <i>gen-a-gen</i>	5
1.1.2. <i>Activación de la respuesta defensiva de las plantas</i>	6
1.1.3. <i>Señalización de la respuesta defensiva de las plantas</i>	8
El ácido salicílico como molécula señal	10
Otras moléculas señal implicadas en defensa	11
El ácido gentísico	12
1.2. <i>El silenciamiento génico como mecanismo de defensa de las plantas</i>	14
1.2.1. <i>El silenciamiento génico en plantas</i>	15
1.2.2. <i>El silenciamiento génico como defensa frente a virus</i>	17
1.2.3. <i>El silenciamiento génico como defensa frente a viroides</i>	19
1.2.4. <i>Relación entre silenciamiento de RNA y resistencia inducida por SA</i>	20
2. Los metabolitos secundarios en el sistema defensivo de las plantas.....	22
2.1. <i>Metabolitos secundarios de naturaleza fenólica</i>	23
2.1.1. <i>Ácidos salicílico y gentísico</i>	27
2.1.2. <i>Amidas derivadas del ácido hidroxicinámico</i>	28
2.2. <i>Modificaciones de los metabolitos secundarios</i>	33
2.2.1. <i>La glicosilación en plantas</i>	33
2.2.2. <i>Implicaciones fisiológicas de la glicosilación de metabolitos</i>	34
2.2.3. <i>La glicosilación en la respuesta defensiva</i>	36

Objetivos	43
Materiales y Métodos	45
1. Material vegetal y condiciones de cultivo	45
2. Tratamientos	45
2.1. <i>Tratamientos de plantas de tomate</i>	45
2.2. <i>Tratamientos de plantas de Gynura aurantiaca</i>	47
2.3. <i>Tratamientos de plantas de Arabidopsis thaliana</i>	47
2.4. <i>Tratamientos de herida en plantas de tomate</i>	47
3. Inoculación del material vegetal	48
3.1. <i>Inoculación de plantas de tomate con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV)</i>	48
3.2. <i>Inoculación de plantas de tomate con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd)</i>	48
3.3. <i>Inoculación de plantas de Gynura con CEVd</i>	49
3.4. <i>Inoculación de plantas de tomate con la bacteria Pseudomonas syringae pv. tomato y determinación del crecimiento bacteriano</i>	49
3.5. <i>Inoculación de plantas de Arabidopsis con la bacteria Pseudomonas syringae pv. tomato y determinación del crecimiento bacteriano</i>	51
4. Toma de muestras	51
5. Plásmidos y cepas bacterianas utilizados	52
6. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....	54
6.1. <i>Purificación de plásmidos bacterianos</i>	54
6.2. <i>Digestión de plásmidos con enzimas de restricción</i>	54
6.3. <i>Aislamiento y manipulación de DNA de plantas</i>	54
6.4. <i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</i>	54
6.5. <i>Extracción de RNA total de plantas</i>	55
6.6. <i>Reacciones de amplificación semicuantitativa (RT-PCR)</i>	55
6.7. <i>Reacciones de amplificación cuantitativa (qRT-PCR)</i>	56
6.8. <i>Secuenciación de DNA</i>	57
7. Diseño de las construcciones y técnicas de clonaje	58
7.1. <i>Construcciones para la sobreexpresión de los genes GAGT y Twi1</i>	58

7.2. Construcción para el silenciamiento del gen <i>Tw1</i>	60
7.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	61
8. Manipulación de proteínas	62
8.1. Electroforesis desnaturante de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)	62
8.2. Western blot	62
8.3. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana	63
8.4. Purificación de la proteína <i>Tw1</i> recombinante	64
8.5. Ensayo de actividad de la proteína <i>Tw1</i> recombinante	65
9. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos	66
9.1. Extracción de ácido salicílico (SA) y ácido genticónico (GA)	66
9.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales por HPLC	67
9.3. Extracción de HCAA.....	67
9.4. Cuantificación de HCAA por UPLC-PDA-QToF.....	68
10. Experimentos de expresión transitoria	69
11. Preparación y manipulación de plantas transgénicas	69
11.1. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	69
11.2. Transformación genética de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
11.3. Obtención de líneas puras transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
11.4. Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis</i> , germinación y aclimatación	71
11.5. Transformación de plantas de tomate.....	72
11.6. Obtención de semillas de tomate.....	72
11.7. Esterilización de semillas de tomate y germinación.....	73
12. Medida de la actividad β -glucuronidasa	73
13. Aplicaciones bioinformáticas	74
14. Tratamiento estadístico de datos	74

Resultados y discusión.....	77
CAPÍTULO 1. SA Y GA COMO ACTIVADORES DE LA RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS	77
Antecedentes	77
1. Estudio de la resistencia mediada por GA en plantas de <i>Gynura aurantiaca</i> infectadas con viroide	79
2. Estudio de la expresión de genes implicados en el silenciamiento viral y viroidal en tomate	82
2.1. <i>Expresión de genes implicados en el silenciamiento de RNA en plantas de tomate infectadas con ToMV.....</i>	<i>84</i>
2.2. <i>Expresión de genes implicados en el silenciamiento de RNA en plantas de tomate infectadas con CEVd.....</i>	<i>87</i>
3. Estudio de las bases moleculares de la resistencia mediada por SA y GA en tomate	90
CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LAS GLICOSILTRANSFERASAS GAGT Y Twi1	97
Antecedentes	97
1. Obtención y caracterización de plantas transgénicas GAGT.....	98
1.1. <i>Expresión transitoria de GAGT en plantas de Nicotiana benthamiana.....</i>	<i>98</i>
1.2. <i>Obtención y caracterización de plantas transgénicas de Arabidopsis GAGT</i>	<i>100</i>
1.2.1. <i>Transformación genética de Arabidopsis thaliana</i>	<i>101</i>
1.2.2. <i>Tratamiento exógeno con GA de plantas transgénicas de Arabidopsis GAGT</i>	<i>102</i>
1.2.3. <i>Infección de plantas transgénicas de Arabidopsis GAGT con la bacteria Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 AvrRpml</i>	<i>105</i>
Cuantificación de los niveles de ácido gentísico libre y conjugado	106
Cuantificación del crecimiento bacteriano	108
Cuantificación de la expresión del gen marcador de defensa <i>PR1</i>	109

1.3. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate GAGT.....	112
1.3.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'	113
1.3.2. Caracterización de las plantas transgénicas de tomate GAGT	113
1.3.3. Tratamiento exógeno con GA de plantas transgénicas de tomate GAGT.....	115
2. Estudio de la proteína de tomate inducida por herida Twi1	118
2.1. Inducción de Twi1 en respuesta a la infección por bacteria en tomate	118
2.2. Expresión transitoria de Twi1 en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	120
2.3. Purificación de la proteína recombinante Twi1	122
2.4. Ensayo de actividad de la proteína recombinante Twi1	123
2.5. Tratamiento exógeno de plantas de tomate con los sustratos de Twi1.....	125
2.5.1. Estudio de la inducción del gen Twi1	125
2.5.2. Estudio de la acumulación de la proteína de defensa PR1	127
2.6. Silenciamiento de Twi1 mediante expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> de la construcción pART27_Twi1	129
2.7. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1	131
2.7.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'	132
2.7.2. Caracterización de las plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1	132
2.7.3. Tratamiento exógeno con compuestos fenólicos de plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1	133
Estudio de la inducción de Twi1.....	133
Estudio de la conjugación de 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA	134
Estudio de la inducción de PR1.....	139
CAPÍTULO 3. IMPLICACIÓN DE LAS HCAA EN LA RESPUESTA DEFENSIVA	143
Antecedentes.....	143
1. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate THT.....	144
1.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'	144
1.2. Expresión génica de THT y acumulación de HCAA en hojas de tomate transgénico.....	145
1.3. Expresión génica de THT y acumulación de HCAA en flores de tomate transgénico.....	149

1.4. Expresión génica de THT y acumulación de HCAA en frutos de tomate transgénico	151
2. Infección de plantas transgénicas de tomate THT con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	153
2.1. Acumulación de HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	153
2.2. Crecimiento bacteriano en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	158
2.3. Acumulación de SA e inducción del gen PR-1 en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	160
Discusión general.....	165
Conclusiones	171
Bibliografía	175
Anexos	207
Anexo I. Campos L, Granell P, Tárraga S, López-Gresa MP, Conejero V, Bellés JM, Rodrigo I, Lisón P (2014a) Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. <i>Plant Physiol. Biochem.</i> 77: 35-43	
Anexo II. Campos L, Lisón P, López-Gresa MP, Rodrigo I, Zacarés L, Conejero V, Bellés JM (2014b) Transgenic tomato plants overexpressing tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase exhibit elevated hydroxycinnamic acid amide levels and enhanced resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> . <i>Mol. Plant Microbe Interact.</i> 27(10): 1159-1169	

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Introducción:

Figura 1. Modelo en 'zig-zag' ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas	4
Figura 2. Factores implicados en el silenciamiento en Arabidopsis	15
Figura 3. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos a partir del siquimato y derivados de la fenilalanina a través de la ruta de los fenilpropanoides	24
Figura 4. Ruta de los fenilpropanoides	26
Figura 5. Biosíntesis de HCAA	29
Figura 6. Secuencia consenso de las glicosiltransferasas (GTs).....	34
Figura 7. Conjugación del ácido salicílico y ácido gentísico en tomate	37

Materiales y Métodos:

Figura 8. Obtención de los clones de expresión para GAGT y <i>Tw1</i>	59
Figura 9. Obtención del clon para el silenciamiento de <i>Tw1</i>	61
Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa	56
Tabla 2. Secuencias de los cebadores empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa	57

Resultados y Discusión:

CAPÍTULO 1. SA Y GA COMO ACTIVADORES DE LA RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS

Figura 10. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas solubles de hojas de tomate infectadas con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV)	78
Figura 11. Desarrollo de la enfermedad en plantas de <i>Gynura aurantiaca</i> infectadas con CEVd	80
Figura 12. Niveles de expresión de los genes <i>DCL1</i> , <i>DCL2</i> , <i>DCL4</i> , <i>RDR1</i> , <i>RDR2</i> y <i>RDR6</i> de tomate en plantas infectadas con el virus del mosaico del tomate (ToMV), determinados por RT-PCR cuantitativa.....	86

Figura 13. Niveles de expresión de los genes <i>DCL1</i> , <i>DCL2</i> , <i>DCL4</i> , <i>RDR1</i> , <i>RDR2</i> y <i>RDR6</i> de tomate en plantas infectadas con CEVd, determinados por RT-PCR cuantitativa	88
Figura 14. Niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas pathogenesis-related <i>PR1</i> y <i>P23</i> en plantas de tomate tratadas con Tampón, ácido genticico (GA) y ácido salicílico (SA).....	91
Figura 15. Niveles de expresión de los genes <i>DCL1</i> , <i>DCL2</i> y <i>DCL4</i> en plantas de tomate tratadas con Tampón, ácido genticico (GA) y ácido salicílico (SA)	92
Figura 16. Niveles de expresión de los genes <i>RDR1</i> , <i>RDR2</i> y <i>RDR6</i> en plantas de tomate tratadas con Tampón, ácido genticico (GA) y ácido salicílico (SA)	94
Tabla 3. Test de Kruskal-Wallis para los índices de infectividad de plantas de <i>Gynura aurantiaca</i> infectadas con CEVd tratadas con tampón (Control), ácido genticico (GA) y ácido salicílico (SA).....	81
Tabla 4. Correspondencias entre genes implicados en el silenciamiento génico en <i>Arabidopsis</i> y sus posibles ortólogos en tomate	84
CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LAS GLICOSILTRANSFERASAS GAGT Y Twi1	
Figura 17. Expresión de <i>GAGT</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i>	100
Figura 18. Acumulación del mRNA de <i>GAGT</i> en las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	101
Figura 19. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> GAGT tras el tratamiento con ácido genticico.....	102
Figura 20. Niveles de expresión del gen <i>PR1</i> en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> Col-0 tratadas con agua (H ₂ O), ácido genticico (GA) y ácido salicílico (SA), a las 24 horas post-tratamiento	105
Figura 21. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> GAGT infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato AvrRpml</i>	106
Figura 22. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato AvrRpml</i> en hojas de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> GAGT.....	109
Figura 23. Niveles de expresión del gen <i>PR1</i> en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> GAGT infectadas con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato AvrRpml</i>	110
Figura 24. Nivel de expresión del gen <i>GAGT</i> en hojas de plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de <i>GAGT</i>	114
Figura 25. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de tomate GAGT tras el tratamiento con GA.....	115

Figura 26. Niveles de expresión del gen <i>Twi1</i> en plantas de tomate 'Rio Grande' infectadas con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>)	119
Figura 27. Estudio de la expresión del cDNA <i>Twi1</i> recombinante en plantas de <i>N. benthamiana</i>	121
Figura 28. Purificación de <i>Twi1</i> recombinante producida por expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	122
Figura 29. Niveles de expresión del gen <i>Twi1</i> en plantas de tomate 'Moneymaker' tratadas con ácido salicílico (SA), ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA) y ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6 THBA)	126
Figura 30. Estudio de la expresión de PR1 en plantas de tomate 'Moneymaker' tratadas con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA) y ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6 THBA)	128
Figura 31. Niveles de expresión del gen <i>Twi1</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i>	130
Figura 32. Niveles de expresión del gen <i>Twi1</i> en plantas transgénicas de tomate RNAi <i>Twi1</i> tratadas con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA).....	134
Figura 33. Acumulación de 2,4-DHBA libre y 2,4-DHBA total en plantas transgénicas de tomate RNAi <i>Twi1</i> tras el tratamiento con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA)	135
Figura 34. Acumulación de 2,4,6-DHBA libre y 2,4,6-DHBA total en plantas transgénicas de tomate RNAi <i>Twi1</i> tras el tratamiento con ácido 2,4,6-dihidroxibenzoico (2,4,6 DHBA)	138
Figura 35. Niveles de expresión del gen <i>PR1</i> en plantas transgénicas de tomate RNAi <i>Twi1</i> tratadas con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA).....	140
Tabla 5. Porcentaje de conjugación y acumulación de GA libre en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> GAGT (AtG 37 y AtG 43) y plantas control Col-0 tratadas con GA 1 mM, a las 24 horas post-tratamiento	103
Tabla 6. Porcentaje de conjugación y acumulación de GA libre en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> GAGT (AtG 37 y AtG 43) y plantas control Col-0 infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato AvrRpm1</i> , a las 24 horas post-inoculación	107
Tabla 7. Porcentaje de conjugación y acumulación de GA libre en plantas transgénicas de tomate GAGT 11 y plantas control (C) tratadas con GA 1 mM, a las 6 y 24 horas post-tratamiento	116
Tabla 8. Resultados cualitativos frente a diferentes hidroxibenzoatos en la caracterización de la actividad <i>in vitro</i> de la proteína recombinante <i>Twi1</i>	124

Tabla 9. Porcentaje de conjugación y acumulación de 2,4 DHBA libre en plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1 tras el tratamiento con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA)..... 136

Tabla 10. Porcentaje de conjugación y acumulación de 2,4,6-THBA libre en plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1 tras el tratamiento con ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA) 138

CAPÍTULO 3. IMPLICACIÓN DE LAS HCAA EN LA RESPUESTA DEFENSIVA

Figura 36. Nivel de expresión del gen *THT* y contenido de HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de THT 145

Figura 37. Acumulación de HCAA en plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de THT en respuesta a herida 148

Figura 38. Nivel de expresión del gen *THT* y contenido de HCAA en flores de plantas transgénicas de tomate THT 149

Figura 39. Nivel de expresión del gen *THT* y contenido de HCAA en frutos de plantas transgénicas de tomate THT 151

Figura 40. Acumulación de HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*..... 154

Figura 41. Acumulación de HCAA de octopamina y noradrenalina en hojas de plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*..... 156

Figura 42. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en hojas de plantas transgénicas de tomate THT 158

Figura 43. Acumulación de ácido salicílico y expresión del gen *PR1* en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 161

Introducción

1. La interacción planta-patógeno

La supervivencia de los seres vivos en la naturaleza depende, en gran medida, de su capacidad de adaptación al entorno. Debido a su condición sésil, las plantas se han visto obligadas a desarrollar a lo largo de la evolución estrategias muy diversas con el fin de hacer frente al estrés, tanto de tipo abiótico (causado por la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas o la contaminación) como de tipo biótico (provocado por mamíferos herbívoros, insectos y gran cantidad de microorganismos). En su ambiente natural, las plantas se enfrentan a un elevado número de microorganismos patógenos tales como hongos, bacterias, virus y viroides. Sin embargo, pocos son los que consiguen atacar y hacer enfermar a las mismas. Las plantas son capaces de protegerse frente a este tipo de ataques, consiguiendo así que la enfermedad sea más la excepción que la regla.

Los mecanismos de defensa de las plantas son muy variados y complejos, y se componen de múltiples barreras, muy eficaces frente a una amplia variedad de organismos patógenos. Estos mecanismos de defensa incluyen tanto barreras físicas y químicas existentes en la planta sin necesidad de producirse la infección (resistencia pasiva), como una serie de reacciones y mecanismos inducidos a causa de la invasión patogénica (resistencia activa).

La resistencia pasiva se compone de una serie de elementos constitutivos, unos de naturaleza estructural (topografía de la superficie foliar, composición y estructura de la cutícula, tricomas, estructura de los estomas, pared celular, etc.) y otros de naturaleza química. Los compuestos químicos pueden resultar directamente tóxicos para el patógeno (compuestos fenólicos, proteínas de defensa, lactonas no saturadas, etc.) o bien tratarse de precursores no tóxicos a partir de los cuáles se libera la forma tóxica como consecuencia de la infección, como es la liberación de ácido cianhídrico a partir de cianógenos. Como se indicará más adelante, en las plantas pueden encontrarse miles de compuestos químicos, denominados "secundarios", muchos de ellos de función defensiva (Baker *et al.*, 1997; Bednarek, 2012).

Por otro lado, la resistencia activa suele ser inducida de forma específica, gracias a ciertos mecanismos que poseen las plantas mediante los cuales son capaces de reconocer un inductor patogénico o *elicitor*. Los mecanismos de reconocimiento planta-patógeno han surgido y evolucionado con el paso del tiempo, debido a la necesidad del patógeno de emplear los recursos de la planta, y la necesidad de las plantas de defenderse. Históricamente, se ha considerado que las moléculas susceptibles de ser reconocidas por las plantas y actuar como inductores patogénicos deberían ser proteínas del patógeno, necesarias para su supervivencia o patogenicidad. Este reconocimiento, generalmente proteína-proteína, activa en las plantas lo que se conoce como la respuesta inmune, que actúa como defensa frente a diversos patógenos, incluyendo hongos, bacterias y virus. Por otra parte, en las plantas puede darse el reconocimiento no sólo de moléculas de naturaleza proteica, sino también de moléculas de RNA de origen patogénico. El RNA foráneo es reconocido por la planta como un *elicitor*, lo que activa el mecanismo de silenciamiento de RNA, que es el mecanismo de defensa frente a virus más eficaz que poseen las plantas (Nakahara y Masuta, 2014).

Como consecuencia del reconocimiento, en la planta se despliega una compleja y coordinada red de señalización interconectada, encargada de activar los mecanismos de defensa inducibles (Conejero *et al.*, 1990; Ebel y Cosio, 1994; Nürnberger, 1999). Estos mecanismos pueden ser activados por señales endógenas o exógenas, entre las que se establecen interacciones sinérgicas o antagónicas. El balance resultante que se obtiene como consecuencia de la activación de las diferentes vías de señalización es el que determina los cambios transcripcionales, proteicos y metabólicos que se producen en la planta, constituyendo una respuesta específica a un estímulo inicial concreto (Conejero *et al.*, 1990; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

1.1. Respuesta inmune de las plantas

La activación de la respuesta inmune se produce en la planta como consecuencia del reconocimiento de un inductor patogénico, generalmente de naturaleza proteica.

Como se ha mencionado anteriormente, este tipo de respuesta defensiva de la planta actúa frente a diferentes patógenos, fundamentalmente hongos y bacterias, y también algunos virus. La respuesta inmune integra tres procesos: la percepción del patógeno, la activación y la señalización de la respuesta defensiva. En los siguientes apartados se hará un estudio detallado de los mismos.

1.1.1. Percepción del patógeno

Para llevar a cabo con éxito la fase de infección, el patógeno debe en primer lugar superar las barreras físicas de defensa preexistentes en la planta y penetrar en su interior. Los organismos fitopatógenos son de naturaleza muy diversa, por lo cual también lo son las formas de entrada. En el caso de las bacterias, éstas penetran en el interior de la planta a través de estomas, poros o heridas y proliferan en los espacios intercelulares (apoplasto). En cambio, los hongos pueden entrar directamente a través de las células epidérmicas, o bien extender sus hifas por la superficie celular. Sin embargo y pese a sus diferencias, todos los patógenos poseen algo en común, que es la producción y liberación en el interior de las células vegetales de factores que ayudan a la creación de un ambiente favorable para la proliferación del patógeno en la planta (Jones y Dangl, 2006). Por su parte, la coevolución con los patógenos ha permitido que las plantas hayan desarrollado la capacidad de reconocer estos factores, lo que produce la activación de la respuesta defensiva, con el fin de limitar el avance de la infección patogénica.

El reconocimiento inespecífico: PAMPs

Los PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) son moléculas asociadas a un grupo de patógenos, reconocidas por una amplia variedad de huéspedes y capaces de inducir un primer nivel de respuesta defensiva conocido como PTI (*PAMP Triggered Immunity*, Jones y Dangl, 2006; Zipfel, 2014). Suele tratarse de motivos conservados entre un tipo de microorganismos, como por ejemplo la flagelina, una proteína

presente en el flagelo de las bacterias. Los PAMPs son reconocidos en las células vegetales por receptores transmembrana no específicos (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*), desencadenando la PTI (Figura 1). Los mecanismos de defensa de la planta activados por *elicitores* o PAMPs incluyen: el refuerzo de la pared celular mediante deposiciones de callosa y lignina (Hückelhoven, 2007), la producción de proteínas de defensa PR (*Pathogenesis-Related*), la expresión de genes que codifican las proteínas que participan en el establecimiento de barreras físicas que frenan la expansión del patógeno y la inducción de enzimas que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos (Broekaert *et al.*, 2006). Así pues, se considera que la inducción por PAMPs debe de preparar a la planta en la activación de respuestas defensivas adicionales, ya que acelera su respuesta ante posteriores *elicitores* patogénicos (Zipfel *et al.*, 2004).

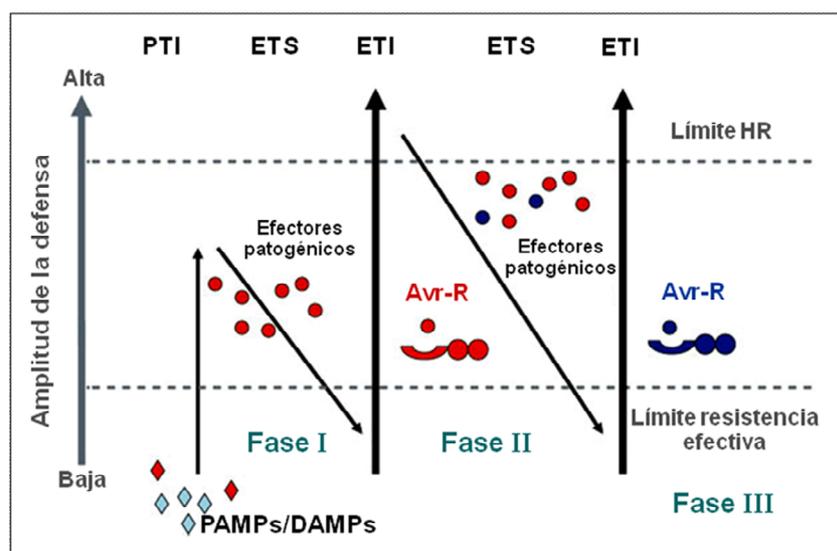


Figura 1. Modelo en 'zig-zag' ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas. En la *Fase I*, la planta detecta los PAMPs/DAMPs (*Pathogen-Associated Molecular patterns/Danger-Associated Molecular Patterns*) mediante receptores de membrana PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) inespecíficos, lo que establece mecanismos de defensa mediados por PAMPs (PTI, *PAMP Triggered Immunity*). En la *Fase II*, algunos efectores patogénicos pueden interferir con la PTI, estableciéndose una susceptibilidad ligada a dichos efectores (ETS, *Effector-triggered susceptibility*). En la *Fase III*, un determinado efector o factor de avirulencia (*Avr*) es reconocido específicamente por una proteína NB-LRR, activando la inmunidad ligada al efector (ETI, *Effector-triggered immunity*). Esto suele resultar en una respuesta hipersensible (HR), causando la muerte celular en el lugar de la infección (Adaptado de Jones y Dangl, 2006).

Las plantas también pueden detectar la presencia de un agente patogénico y originar la respuesta defensiva a través de los DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*), que son moléculas producidas como consecuencia del ataque patogénico durante el proceso de infección (Matzinger, 2007). Al igual que los PAMPs, el reconocimiento de las DAMPs también establece la PTI en la planta. Este tipo de respuesta se define como inmunidad mediada por toxina.

El reconocimiento específico: la interacción *gen-a-gen*

Un nivel superior de reconocimiento entre planta y patógeno implica la interacción específica entre los denominados *factores de avirulencia* (*Avr*) del patógeno y los productos de los genes de resistencia (*R*) de la planta, en lo que se denomina interacción *gen-a-gen* (Flor, 1971). Dicha interacción resulta en el establecimiento en la planta de un nuevo nivel defensivo, denominado ETI (*Effector Triggered Immunity*). En otras ocasiones la ETI se activa debido al reconocimiento, por parte de las proteínas R, de la modificación de otra proteína de la planta, producida por el patógeno. La proteína R actúa en este caso detectando la alteración de la proteína diana del efector patogénico y promoviendo la respuesta defensiva de la planta, lo que se conoce como *guard hypothesis* (Van der Biezen y Jones, 1998; Dangl y Jones, 2001; Jones y Dangl, 2006; van der Hoorn y Kamoun, 2008) (Figura 1).

En los casos en los que se produce el reconocimiento específico *gen-a-gen* entre la planta (portadora del gen *R*) y el patógeno (portador del gen *Avr*), tiene lugar una interacción de tipo *incompatible*. En este tipo de interacción se produce la muerte celular alrededor del punto de entrada, dando lugar a un rápido colapso del tejido infectado e impidiendo la posterior expansión del patógeno. Esta respuesta se conoce como "reacción hipersensible" (*Hypersensitive Reaction*, HR) y, en la mayoría de casos, va acompañada de la activación posterior de una resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR), no específica, a lo largo de toda la planta. Este mecanismo defensivo sitúa la planta en un estado de resistencia de amplio espectro

que la protege de posteriores infecciones (Ryals *et al.*, 1996; Beckers y Spoel, 2006; Kachoo y Robin, 2013).

Se han descrito interacciones de tipo *incompatible* en diferentes sistemas planta-patógeno. Así, por ejemplo, el ecotipo Col-0 de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* es capaz de reconocer a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* portadora del gen de avirulencia *AvrRpm1*, lo cual da lugar a una interacción de tipo incompatible (Debener *et al.*, 1991). La infección de plantas de tomate 'Rio Grande', variedad que posee el gen de resistencia *Pto*, con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* portadora del gen de avirulencia *AvrPto*, también se produce un reconocimiento entre genes y por tanto una interacción incompatible (Ronald *et al.*, 1992). Otro ejemplo de interacción incompatible viene mediado por los genes de resistencia *Tm-1*, *Tm-2*, y *Tm-2²*, que controlan la infección de plantas de tomate con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV) (Pelham, 1966; Hall, 1980).

Tanto la ausencia del gen de resistencia en la planta, como del gen de avirulencia en el patógeno, lleva consigo la falta de reconocimiento y da lugar al desarrollo de interacciones de tipo *compatible*, extendiéndose el patógeno por toda la planta. Por esta razón, nos referiremos a este tipo de infección como sistémica y, al no producirse HR, no necrotizante. Tal es el caso de cualquiera de las interacciones arriba mencionadas en las que no tenga lugar el reconocimiento *R-Avr*, u otras como la infección de plantas de tomate o de *Gynura aurantiaca* con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (Pallás y Flores, 1989).

1.1.2. Activación de la respuesta defensiva de las plantas

Tras producirse el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, tiene lugar la activación de la respuesta defensiva. Esta respuesta sucede en dos niveles espacio-temporales: local y sistémico. La respuesta defensiva local es la primera en activarse, aparece en la zona de entrada del patógeno e impide que la infección se extienda a toda la planta. La respuesta defensiva sistémica se pone en funcionamiento por

mediación de moléculas señal generadas en el lugar de entrada del patógeno, y su activación protege a la planta frente a ataques patogénicos posteriores de diversa naturaleza. Como se ha mencionado anteriormente, las respuestas local y sistémica se asocian con la "reacción hipersensible" (*Hypersensitive Reaction*, HR) y la resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR), respectivamente.

Uno de los acontecimientos más rápidos que tiene lugar a nivel local tras la percepción del patógeno es la despolarización de la membrana plasmática de la célula vegetal infectada. Esta despolarización va acompañada de variaciones en la concentración citosólica de calcio, lo que parece jugar un papel importante en el establecimiento de la respuesta defensiva (Ma y Berkowitz, 2007). También se produce la activación del complejo NADPH oxidasa, responsable de la aparición transitoria de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) como el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), fenómeno se conoce como "explosión oxidativa" (Xiang *et al.*, 1997). Las ROS resultan directamente tóxicas para el patógeno y contribuyen significativamente a los mecanismos de defensa de la planta (Torres *et al.*, 2006). Además, con la explosión oxidativa se activan algunos genes protectores, y la acción conjunta y coordinada de las ROS, del óxido nítrico y del ácido salicílico producidos localmente, activa el proceso de muerte celular programada en la respuesta hipersensible (Delledonne *et al.*, 1994; Romero-Puertas *et al.*, 2004).

Por otra parte, a nivel sistémico se observa la aparición de lo que se denomina resistencia sistémica adquirida (SAR), que se caracteriza por activarse después de la infección de la planta con un patógeno necrosante o tras la aparición de una HR. Este tipo de resistencia que adquiere la planta es duradera y actúa contra un amplio espectro de organismos patógenos (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Kachoo y Robin, 2013). La SAR conlleva la activación, tanto en tejidos locales como distales, de numerosos genes de defensa, entre los que se encuentran los correspondientes a las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, *Pathogenesis-Related*) (Ward *et al.*, 1991; Glazebrook, 1999, 2005; Maleck *et al.*, 2000). La presencia de proteínas de defensa PR ha sido ampliamente empleada como marcador de la activación de la respuesta defensiva de la planta (van Loon *et al.*, 2006).

La acumulación de proteínas PR se ha descrito en, al menos, 13 familias vegetales tras la infección con oomicetos, virus, viroides, hongos y bacterias o el ataque de nemátodos o insectos, indicando que estas proteínas ejercen un papel general en la adaptación a condiciones de estrés biótico (Conejero *et al.*, 1990; van Loon y van Strien, 1999; van Loon *et al.*, 2006). Estas proteínas han sido clasificadas en 17 familias (van Loon *et al.*, 1994), todas ellas con funciones relacionadas con la limitación del avance del patógeno (van Loon *et al.*, 2006). Entre estas funciones se ha descrito su actividad antibacteriana, antifúngica e incluso como inhibidores de proteasas digestivas de insectos. Sin embargo, su función como proteínas antivirales no parece estar muy clara (Cutt *et al.*, 1989, Linthorst *et al.*, 1989). La acumulación de proteínas PR responde de diferente manera a distintas señales patogénicas o combinaciones de ellas. Por su parte, distintos patógenos inducen la acumulación de diferentes tipos de PR, lo que confiere resistencia a microorganismos específicos. Esto explicaría el hecho de que plantas transgénicas que sobreexpresan una única o unas pocas de estas proteínas resulten sólo eficaces en generar resistencia frente a patógenos muy concretos (van Loon *et al.*, 2006).

La inducción de proteínas PR se ha descrito en interacciones de tipo tanto incompatible como compatible. Tal es el caso de la interacción compatible que se establece entre plantas de tomate y el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd), donde tiene lugar la acumulación de proteínas PR de carácter básico, como el marcador de senescencia PR-1b (p14), las proteínas antifúngicas P23, P32, P34 o la proteasa P69 (Vera y Conejero, 1988; Vera *et al.*, 1988; García-Breijo *et al.*, 1990; Rodrigo *et al.*, 1991, 1993; Domingo *et al.*, 1994).

1.1.3. Señalización de la respuesta defensiva de las plantas

Puesto que existe una respuesta sistémica, deben existir señales que se generen en el punto de infección y que se transmitan al resto de la planta, con el fin de activar la respuesta defensiva en tejidos distales. En este sentido, las fitohormonas juegan un papel esencial en la señalización de la respuesta frente a diferentes tipos de estrés. El

ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) son las principales hormonas implicadas en la regulación de la respuesta defensiva de las plantas frente a estrés, tanto abiótico como biótico. De hecho, se ha descrito que la infección de plantas con agentes patógenos de distinta naturaleza provoca importantes variaciones en el nivel de estas hormonas. Por otra parte, mutaciones que conllevan la menor producción o percepción de estas moléculas producen un aumento en la susceptibilidad a diversos agentes patógenos (Boatwright y Pajerowska-Mukhtar, 2013; Iqbal *et al.*, 2013; Wasternack *et al.*, 2014).

Asimismo, se han descrito numerosas interacciones entre las diferentes rutas de señalización hormonal implicadas en defensa (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Mientras las rutas de ET y JA parecen actuar conjuntamente, éstas se comportan como antagonistas de la ruta dependiente de SA (Broekaert *et al.*, 2006; Loake y Grant, 2007). Sin embargo, también se ha observado que bajos niveles de SA y JA actúan sinérgicamente, sugiriendo que unos niveles mínimos de ambas hormonas son necesarios para la planta (Spoel y Dong, 2008). Debido a la existencia de interacciones, una determinada molécula señal puede activar no sólo defensas específicas que dependan de ella, sino también producir cambios en la respuesta de la planta mediada por otras señales.

Es evidente que las plantas regulan los niveles de SA, JA y ET, modifican la expresión de genes de defensa y coordinan las complejas interacciones entre las diferentes rutas de señalización implicadas en la respuesta defensiva, todo ello con el fin de activar una respuesta eficaz frente al ataque de diversos organismos patógenos. No obstante, el modo mediante el cual la planta coordina este tipo de procesos, los mecanismos moleculares que ello implica y cómo, en última instancia, da prioridad a una respuesta frente a las otras, no está todavía esclarecido.

El ácido salicílico como molécula señal

El ácido salicílico (SA) es un compuesto de naturaleza fenólica que se acumula en una gran variedad de especies vegetales. En plantas, el SA está implicado en multitud de procesos, como la regulación del crecimiento celular, la apertura de estomas, la respiración, la germinación y el desarrollo de la semilla, así como la regulación de la expresión de genes de senescencia, entre otros. Sin embargo, su función fisiológica mejor caracterizada es la de actuar como molécula señal capaz de activar programas de defensa inducibles, confiriendo a la planta resistencia frente a patógenos (Boatwright y Pajeroska-Mukhtar, 2013). Por otra parte, el SA parece desempeñar una función primordial en la activación de HR y SAR, además de ser necesario para el desarrollo de los síntomas de enfermedad (O'Donnell *et al.*, 2003). El incremento en los niveles endógenos de SA y de sus conjugados en plantas infectadas lleva consigo la activación de genes que codifican proteínas PR y el establecimiento de la resistencia de la planta (Shah, 2003).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia del SA en el desarrollo de la resistencia local y sistémica. En este sentido, ha sido clave la obtención de plantas transgénicas incapaces de acumular ácido salicílico. Se trata de plantas que expresan constitutivamente el gen *NahG* de *Pseudomonas putida*, que codifica la enzima salicilato hidroxilasa. Dicho enzima transforma el SA en catecol. Como consecuencia de la falta de SA, estas plantas son incapaces de activar la SAR y, además, son más susceptibles al desarrollo de enfermedades que sus parentales (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995; Mur *et al.*, 1997).

Por otra parte, la aplicación exógena de SA, o de algún análogo funcional sintético, promueve en la planta dos fases de expresión génica. En la primera fase, a las 2-3 horas después del tratamiento, se expresan enzimas detoxificantes (glutación-S-transferasas, glicosiltransferasas, etc.) que ayudan a proteger las células del estrés oxidativo (Horvath y Chua, 1996). En la segunda fase, se produce la activación de genes codificantes de proteínas de defensa, entre las que destacan las proteínas PR, que tiene lugar entre 12-16 horas después de la aplicación del SA (Sticher *et al.*, 1997;

Uquillas *et al.*, 2004). Esta aplicación exógena de SA hace más resistente a la planta frente a un ataque patogénico (Spletzer *et al.*, 1999; Saikia *et al.*, 2003; Meher *et al.*, 2011; Wang y Liu, 2012). Concretamente, la proteína de defensa PR1 se emplea como marcador clásico de la respuesta a SA y de la activación de la respuesta defensiva de la planta (Metzler *et al.*, 1991; Tornero *et al.*, 1993, van Loon *et al.*, 2006).

Otras moléculas señal implicadas en defensa

El ácido jasmónico (JA), junto a sus precursores y derivados, conocidos como jasmonatos (JAs), son moléculas de naturaleza lipídica (oxipilinas) ampliamente distribuidas en el reino vegetal. El JA, producto final de la ruta de los octadecanoides (Vick y Zimmerman, 1983), así como el resto de JAs, participa en la respuesta de las plantas frente a una gran variedad de factores abióticos e intervienen en diversos procesos del desarrollo, siendo el (+)-7-iso-jasmonoil-L-isoleucina el jasmonato endógeno bioactivo en *Arabidopsis* (Fonseca *et al.*, 2009). Numerosos estudios han demostrado que la concentración de JA aumenta significativamente en respuesta a una infección patogénica o herida, y aplicaciones exógenas inducen la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta (Wasternack, 2007; Wasternack y Hause, 2013; Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014).

El etileno (ET) es también una hormona vegetal clave en la regulación de gran variedad de procesos fundamentales para el desarrollo de las plantas, tales como la maduración de los frutos, el desarrollo de las semillas, la respuesta a agentes ambientales estresantes o el ataque de patógenos (Abeles *et al.*, 1992; Iqbal *et al.*, 2013). En muchos casos, cuando un patógeno entra en contacto con una planta, se produce un aumento importante en los niveles de acumulación de ET (Penninckx *et al.*, 1998; Cohn y Martin, 2005). Dicho compuesto regula gran cantidad de genes relacionados con la respuesta defensiva, incluyendo aquellos que codifican proteínas PR (Deikman, 1997), enzimas encargadas de la síntesis de fitoalexinas (Ecker y Davis, 1987) y defensinas (Penninckx *et al.*, 1996) entre otras. Sin embargo, el papel que desempeña el ET en la defensa frente a patógenos es algo ambiguo: en algunos casos

está implicado en la resistencia, mientras en otros parece estar relacionado con el desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Diversos estudios han demostrado la implicación de otras fitohormonas como el ácido abscísico, las auxinas, el ácido giberélico, las citoquininas, los brasinoesteroides y las hormonas peptídicas en las rutas de señalización de la respuesta defensiva en plantas, menos conocidas en este contexto (Bari y Jones, 2009; Leon-Reyes *et al.*, 2010a, 2010b). Los estudios más recientes indican que la activación de la SAR no depende exclusivamente del SA, si bien esta molécula resulta esencial para dicho proceso, sino que conlleva una acción coordinada de diversos compuestos que actúan como señal, entre los cuales destacan el glicerol 3-fosfato y el ácido aceláico (Kachroo y Robin, 2013; Gao *et al.*, 2014).

En nuestro laboratorio fue identificado el ácido gentísico, un compuesto de naturaleza fenólica y de estructura similar a la del ácido salicílico, pero con un papel diferencial en lo que a la activación de la respuesta defensiva de las plantas frente a ataques patogénicos se refiere (Bellés *et al.*, 1999). En el siguiente apartado se desarrolla con más detalle el posible papel señalizador de este compuesto en la interacción planta-patógeno.

El ácido gentísico

Está ampliamente aceptado que el SA desempeña una función esencial en la activación de la respuesta defensiva de las plantas en las interacciones de tipo incompatible (Conejero *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1997; Durrant y Dong, 2004). Sin embargo, existen muchos menos estudios sobre la inducción de defensas en las interacciones de tipo compatible. En este caso, las defensas también se activan pero, al no ser reconocido el patógeno, la respuesta se produce tarde y no puede evitarse el desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado en algunos casos la implicación del SA en la activación de estas defensas (Grant y Loake, 2000; Loake y Grant, 2007), pero aún

son muchas las incógnitas que quedan por resolver en el mecanismo de señalización de este tipo de interacciones.

Hace unos años, se llevó a cabo en nuestro laboratorio un estudio de la acumulación de compuestos fenólicos presentes en plantas de tomate infectadas con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd), que da lugar a una interacción compatible. Como consecuencia de la infección se observó la acumulación de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico, GA), que alcanzaba niveles mucho mayores que los del propio SA (Bellés *et al.*, 1999). La acumulación de SA y GA comenzaba con la aparición de los síntomas y aumentaba paralelamente al desarrollo de la enfermedad. Los mismos resultados se obtuvieron en otra interacción compatible, la resultante de infectar plantas de tomate con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV). En cambio, no se observó acumulación de GA y sí de SA en la interacción de tipo incompatible entre tomate y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Otros estudios también han detectado la acumulación de GA en plantas de tomate cuyas raíces habían sido colonizadas por rizobacterias no patógenas (Schuhegger *et al.*, 2006), aunque a niveles inferiores a los producidos durante una infección. Al parecer, dicha acumulación promueve la activación de la respuesta sistémica en la planta, lo que la defiende frente al ataque posterior del hongo *Alternaria alternata*. Además, nuestro grupo ha observado que el GA también se acumula como consecuencia de infecciones no necrotizantes en otras especies vegetales, como *Gynura aurantiaca* y *Cucumis sativus* (pepino) (Bellés *et al.*, 2006; Fayos *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito que la infección de plantas de *Arabidopsis* con la bacteria *Pseudomonas syringae* también resulta en la acumulación de GA (Bartsch *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha visto que el tratamiento exógeno de plantas de tomate con GA es capaz de inducir proteínas de defensa PR (P23, P32 y P34) diferentes a las inducidas por SA (Bellés *et al.*, 1999), y que aplicaciones exógenas de GA o SA en pepino dan lugar a la inducción de actividades defensivas distintas (Bellés *et al.*, 2006). En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio se han analizado los cambios metabólicos globales implicados en la interacción tomate-CEVd. Esto ha permitido la identificación de diferentes metabolitos implicados en esta respuesta

sistémica, y ha puesto de manifiesto que el GA es el metabolito que más fuertemente se induce (López-Gresa *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que el GA posee una importante actividad antifúngica *per se* (Lattanzio *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2007).

Todos los datos expuestos sugieren que el GA podría actuar en plantas como una señal adicional y complementaria al SA en la activación de la respuesta defensiva en infecciones compatibles.

1.2. El silenciamiento génico como mecanismo de defensa de las plantas

Se han descrito dos estrategias principales existentes en las plantas con el fin de hacer frente a las diferentes infecciones patogénicas: la respuesta inmune, tratada en detalle en el apartado anterior, y el silenciamiento de RNA. La activación de este segundo mecanismo se debe a la capacidad de reconocer moléculas de RNA extrañas por parte de la planta y ha sido descrito como el sistema de defensa más eficaz frente a virus que poseen las plantas (Nakahara y Masuta, 2014).

En sentido amplio, se conoce como silenciamiento génico al complejo sistema que poseen los organismos eucariotas superiores para regular la expresión génica, tanto a nivel transcripcional, participando en procesos de metilación del DNA (RdDM, *RNA-directed DNA methylation*), como a nivel post-transcripcional (PTGS, *post-transcriptional gene silencing*), a través de mecanismos de RNA de interferencia mediados/a por pequeños RNAs. El PTGS implica la detección y eliminación selectiva de secuencias de RNA foráneas, aberrantes o sobreacumuladas. A diferencia de los animales, hay que destacar que en plantas el silenciamiento no está confinado a células individuales, sino que se propaga desde la célula inicialmente afectada a las células vecinas e incluso a largas distancias, extendiéndose por toda la planta.

1.2.1. El silenciamiento génico en plantas

El silenciamiento génico consiste en una serie de rutas interconectadas que limitan la síntesis, estabilidad y traducibilidad del RNA. Todas las rutas tienen en común tres etapas: (1) presencia o formación de RNA de doble cadena (dsRNA, *double-stranded RNA*), (2) corte de los dsRNA en pequeños fragmentos de RNA llamados sRNA (*small RNA*), y (3) incorporación del sRNA a un complejo que se asocia de manera específica a la molécula diana complementaria en secuencia. Como consecuencia se produce la regulación negativa del RNA diana, dando lugar al fenómeno de silenciamiento génico (Figura 2) (Carr *et al.*, 2010; Bologna y Voinnet, 2014).

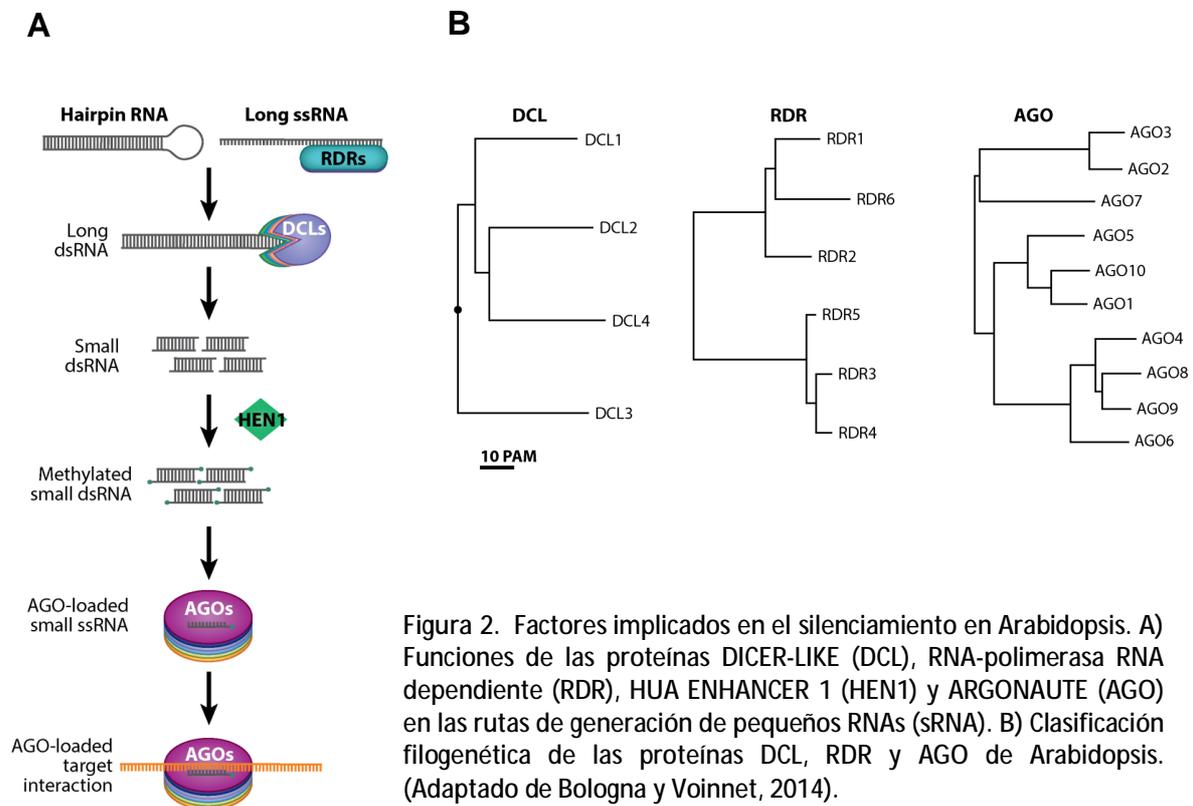


Figura 2. Factores implicados en el silenciamiento en Arabidopsis. A) Funciones de las proteínas DICER-LIKE (DCL), RNA-polimerasa RNA dependiente (RDR), HUA ENHANCER 1 (HEN1) y ARGONAUTE (AGO) en las rutas de generación de pequeños RNAs (sRNA). B) Clasificación filogenética de las proteínas DCL, RDR y AGO de Arabidopsis. (Adaptado de Bologna y Voinnet, 2014).

En la primera etapa (1), el RNA de doble cadena puede estar presente directamente o puede producirse a partir de un RNA de simple cadena (ssRNA, *single-stranded RNA*) por la acción de una RNA polimerasa-RNA dependiente (*RNA dependent-RNA polymerase*, RDR). En la segunda etapa (2), el corte del dsRNA tiene

lugar por la acción de endorribonucleasas tipo *Dicer-like* (DCL). Por último (3), los sRNA generados por los enzimas fragmentadores (DCLs) se incorporan al complejo denominado AGO-RISC, donde servirán como molde para dirigir el corte específico del RNA diana (Figura 2A) (Bologna y Voinnet, 2014).

Existen diferentes rutas de silenciamiento génico. Para cada una de estas rutas, el tamaño de los productos generados a partir del dsRNA es distinto, así como los enzimas que participan en cada una de las etapas. En los casos en los que se haya de formar el dsRNA a partir de un ssRNA, tiene lugar la participación de RNA polimerasas-RNA dependientes (RDRs). Esta actividad fue descrita por primera vez en plantas de tomate tras la infección con PSTVd (Schiebel *et al.*, 1998). En *Arabidopsis* existen 6 RDRs, aunque únicamente RDR1, RDR2 y RDR6 han sido implicadas en rutas de silenciamiento (Figura 2B). En cuanto a las endorribonucleasas *Dicer-like*, se han descrito cuatro tipos: DCL1 cataliza la formación de microRNAs de 18-21 nucleótidos. DCL2, DCL3 y DCL4 producen siRNAs de 22, 24 y 21 nucleótidos, respectivamente, todos ellos procedentes de distintos tipos de dsRNA precursores. La fragmentación del dsRNA es facilitada por proteínas de unión a dsRNA (DRB, *dsRNA-binding*) que interactúan de forma específica con las DCLs. Se conocen cinco proteínas de este tipo: HYL-1 y DRB 2, 3, 4 y 5. Los siRNAs producidos se estabilizan por la metilación de los mismos en el extremo 3'. Dicha metilación es llevada a cabo por una metiltransferasa denominada HEN1 (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009; Bologna y Voinnet, 2014).

Una vez estabilizados los siRNAs, pueden permanecer en la zona nuclear actuando sobre la cromatina, o ser transportados al citoplasma, donde intervendrán en el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Posteriormente a su desplazamiento, una hebra del siRNA se une a uno o varios complejos enzimáticos de silenciamiento inducido por RNA (RISC, *RNA-Induced Silencing Complexes*), que rastrean el citosol para encontrar fragmentos de RNA complementarios y actuar sobre ellos. En eucariotas, el complejo RISC consta de un dominio helicasa y una proteína denominada Argonaute (AGO). Esta proteína contiene un dominio de unión a siRNA denominado PAZ (*Piwi/Argonaut/Zwille*) y otro dominio llamado PIWI que confiere actividad endonucleolítica, lo que permite al RISC cortar el RNA. Se han descrito diez

tipos de AGO (AGO1 a 10), aunque únicamente se ha demostrado la actividad endonucleolítica de AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 y AGO10 (Figura 2B). El complejo AGO-RISC posee especificidad de secuencia, ya que solamente silencia fragmentos de RNA complementarios a la hebra de de siRNA que contiene (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009; Bologna y Voinnet, 2014).

Debido a que gran parte de los virus de plantas conocidos, así como los viroides, poseen genomas de RNA que se replican a través de intermediarios de doble cadena, el silenciamiento génico se ha considerado como parte del sistema defensivo de las plantas frente a este tipo de microorganismos patógenos. No obstante, también se ha descrito la participación de diversas rutas de silenciamiento en respuesta a bacterias y hongos (Katiyar-Agarwal y Jin, 2010). De igual manera a lo descrito con anterioridad para la mayoría de los virus, recientemente se ha descubierto que varias clases de microorganismos, incluyendo bacterias y oomicetos, producen también supresores de silenciamiento como parte de su arsenal de efectores de virulencia (Navarro *et al.*, 2008; Pumplin y Voinnet, 2013). Ello sugiere que la interrupción del silenciamiento génico es una estrategia de virulencia general, empleada por un gran número de microorganismos patógenos de naturaleza muy variada. Independientemente de estos recientes hallazgos, en el presente trabajo nos centraremos en el estudio del silenciamiento como mecanismo de defensa de las plantas frente a virus y viroides de RNA.

1.2.2. El silenciamiento génico como defensa frente a virus

En 1990 se observó, por vez primera, que en plantas transgénicas en las que se había introducido un transgén homólogo a un gen endógeno, se producía la inactivación de este último (Napoli *et al.*, 1990). Si el transgén poseía, además, un fragmento de secuencia viral, se comprobó que algunas plantas transgénicas que lo expresaban eran capaces de superar la enfermedad al poco tiempo de ser inoculadas con ese virus (Lindbo *et al.*, 1993). Casi una década más tarde, se observó que los virus también podían inducir el silenciamiento de genes endógenos de la planta o de

transgenes con similitud de secuencia, estableciéndose así la idea del mecanismo de silenciamiento génico como un sistema natural de defensa de las plantas frente a infecciones víricas (Ratcliff *et al.*, 1999). Esta hipótesis se reforzó con la observación de Hamilton y Baulcombe (1999), al detectar una acumulación de siRNAs de secuencia viral en plantas infectadas con virus. Además, este mecanismo podría explicar el fenómeno de “protección cruzada”, por el que aquellas plantas capaces de resistir y recuperarse de una infección vírica muestran resistencia a otros virus con secuencia similar (Ratcliff *et al.*, 1997; Baulcombe, 2003).

No obstante, aunque el silenciamiento génico se perfila como un mecanismo de defensa de las plantas frente a virus, éstos han coevolucionado hasta desarrollar sus propios métodos para superar o esquivar dicho silenciamiento. Prácticamente todos los virus de plantas codifican proteínas supresoras que inhiben el silenciamiento de RNA (Nakahara y Masuta, 2014). Entre las proteínas supresoras del silenciamiento viral, el modo de acción más común es el de inhibir la biogénesis de los siRNAs o secuestrar las moléculas de siRNAs para evitar su incorporación al complejo AGO-RISC. También pueden unirse a algunos componentes de la ruta de silenciamiento tales como AGO1 (Nakahara y Masuta, 2014).

Poniendo en juego los componentes de la ruta del silenciamiento mencionados en el apartado anterior, éstos actuarían contra virus de plantas según se explica a continuación de manera esquemática. Las regiones de dsRNA del virus de RNA son jerárquicamente procesadas por las ribonucleasas DCL4, DCL3 y DCL2 para dar lugar a pequeños RNA de interferencia (siRNAs) primarios. Los siRNAs generados se incorporan a los complejos AGO-RISC. El siRNA dirige la actividad endorribonucleasa del complejo AGO-RISC contra RNAs virales que contengan secuencias complementarias al siRNA primario. La actividad de las RNA polimerasas-RNA dependientes (RdRps o RDRs) del huésped, tales como RdRp1 ó RdRp6, podría generar más dsRNAs, que serían cortados por las DCLs 2 y 4 para producir siRNA secundarios, que podrían incorporarse de nuevo a los complejos AGO-RISC. Este fenómeno de amplificación del silenciamiento viral se conoce como transitividad (Carr *et al.*, 2010; Llave, 2010).

Podríamos concluir que el silenciamiento de RNA es un potente mecanismo de defensa frente a virus que presenta una notable especificidad y adaptabilidad. Los virus, por su parte, han desarrollado factores de supresión que interfieren con este silenciamiento de RNA (Ding y Voinnet, 2007).

1.2.3. El silenciamiento génico como defensa frente a viroides

Por sus peculiares características, los viroides han sido propuestos como “supervivientes” del denominado “mundo de RNA” (Flores *et al.*, 2014). Se trata de pequeñas moléculas de RNA de 250-400 pb de simple cadena, circulares, desnudos, con un elevado porcentaje de estructura secundaria y que se caracterizan por tener una secuencia nucleotídica que no codifica proteínas. Los viroides emplean características de su propia secuencia de RNA para alterar y posiblemente utilizar los mecanismos de silenciamiento de RNA (Gómez *et al.*, 2009). Estos patógenos pueden producir enfermedades en diferentes plantas y ser capaces de causar una gran variedad de síntomas que, en ocasiones, se asemejan a los producidos por infecciones virales (Conejero *et al.*, 1990; Agrios, 2005; Di Serio y Flores, 2008; Ding, 2009).

Al igual que ocurre con los virus, cuando una planta es infectada por moléculas viroidales, éstas pueden activar las rutas del silenciamiento génico, pudiéndose detectar una acumulación de sRNAs de secuencia viroidal en el tejido infectado. Este fenómeno ha sido descrito en numerosos sistemas viroide/planta huésped (Itaya *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002; Markarian *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2004; Gómez y Pallás, 2007; Carbonell *et al.*, 2008; St-Pierre *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010; Ivanova *et al.*, 2014).

Si el papel del silenciamiento génico en la infección viroidal fuera estrictamente el de defensa, sería de esperar que una mayor acumulación de los siRNAs de secuencia viroidal viniera acompañada de un descenso en la intensidad de síntomas producidos, o en una disminución de los niveles de RNA viroidal en la planta. Sin embargo, esta

correlación se ha encontrado sólo en algunos casos (Martínez de Alba *et al.*, 2002), mientras que en otros, o bien no se puede establecer relación alguna entre estos factores (Papaefthimiou *et al.*, 2001), o incluso una mayor presencia de siRNAs en la planta coincide con una mayor virulencia y acumulación de RNA del viroide (Itaya *et al.*, 2001). Por otra parte, la demostración de que las formas maduras del Viroide del Tubérculo Fusiforme de la Patata (*Potato Spindle Tuber Viroid*, PSTVd) y del Viroide del Enanismo del Lúpulo (*Hop Stunt Viroid*, HSVd) pueden simultáneamente inducir y resistir este mecanismo defensivo en tomate (Itaya *et al.*, 2007) y en *Nicotiana benthamiana* (Gómez y Pallás, 2007), indica que los viroides pueden ser al mismo tiempo inductores, dianas potenciales y evasores del silenciamiento de RNA. El elevado apareamiento entre sus bases les confiere una estructura de RNA de doble cadena y hace que puedan ser considerados por una parte como inductores del silenciamiento, puesto que sobre dicha estructura actuarían las DCLs, y por otra como evasores del mismo, puesto que no pueden ser diana de corte de los AGOs (Pumplin y Voinnet, 2013).

Así pues, aunque todavía no se dispone de datos suficientes para determinar si la activación de este mecanismo por parte del viroide corresponde a un intento de defensa de la planta, o si este hecho pertenece al propio desarrollo de la enfermedad viroidal (Conejero, 2003), la segunda hipótesis parece ser la más probable según varios autores (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Markarian *et al.*, 2004; Matousek *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2008, 2009; Martínez *et al.*, 2010). No obstante, el conjunto de procesos por los que los viroides producen síntomas en las plantas aún no está del todo esclarecido (Navarro *et al.*, 2012).

1.2.4. Relación entre silenciamiento de RNA y resistencia inducida por SA

Como se ha comentado anteriormente, el ácido salicílico (SA) juega un papel central en la señalización de SAR y es necesario para el desarrollo de HR en infecciones virales, entre otras (Álvarez, 2000; Hammerschmidt, 2009). Por otra parte, el silenciamiento génico es un potente y específico mecanismo de defensa frente a

patógenos de RNA (Ding y Voinnet, 2007). Numerosas pruebas apuntan a que existe cierta conexión y solapamiento entre la señalización mediada por SA y el silenciamiento de RNA (Carr *et al.*, 2010).

La relación entre la resistencia inducida por SA y RdRp1 se observó por primera vez en plantas de tabaco tratadas con SA, que mostraron tanto inducción del gen *NtRDR1* como un incremento en su actividad (Xie *et al.*, 2001). Se han caracterizado ortólogos del gen *NtRDR1* en otras especies, tales como *Nicotiana glutinosa* (*NgRDR1*), *N. benthamiana* (*NbRDR1m*), *A. thaliana* (*AtRDR1*), *Medicago truncatula* (*MtRDR1*) y arroz (*OsRDR1*), induciéndose en todas ellas tanto por infección vírica como por tratamientos con SA (Yu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Quilis *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). La inducción de la actividad RdRp1 no es el único mecanismo de resistencia viral regulado por SA que existe en plantas (Singh *et al.*, 2004). Recientemente, *RDR6* ha sido propuesto como un modulador de PTI y de ETI (Boccaro *et al.*, 2014), estando ambas respuestas reguladas por SA.

Otra prueba que sugiere que el silenciamiento de RNA y la resistencia inducida por SA están relacionados proviene de experimentos que muestran cómo ciertas proteínas supresoras del silenciamiento viral también suprimen la defensa mediada por SA. En este sentido, Ji y Ding (2001) observaron que la proteína supresora 2b del Virus del Mosaico del Pepino permitía al virus eludir la resistencia inducida por SA, permitiéndole replicarse y tener un movimiento local. Por su parte, la proteína supresora del silenciamiento P1/HCPPro del Virus del Grabado del Tabaco (*Tobacco Etch Virus*, TEV) también altera la señalización mediada por SA (Alamillo *et al.*, 2006). Asimismo, el supresor P6 del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) reprime la respuesta mediada por SA, provocando un aumento en la susceptibilidad a patógenos de tipo biótrofo (Love *et al.*, 2012).

Además de estas conexiones descritas entre la señalización mediada por SA y el silenciamiento de RNA, diversos autores establecen similitudes entre el modelo de *zig-zag* propuesto para la respuesta inmune (Figura 1) y el silenciamiento génico. Dichas similitudes se basan principalmente en que los supresores de silenciamiento descritos

no sólo para virus, sino también para bacterias, actuarían del mismo modo que los efectores producidos por las bacterias para limitar la PTI. Por su parte, las plantas desarrollarían sistemas de defensa contra la supresión del silenciamiento génico producido por los patógenos, aportando así nuevos ejemplos de la interminable carrera de armas moleculares entre el patógeno y la planta (Peláez y Sánchez, 2013; Pumplin y Voinnet, 2013; Nakahara y Masuta, 2014).

Así pues, la respuesta defensiva de las plantas integra un amplio abanico de procesos de reconocimiento, señalización y activación de las defensas protagonizados por factores de naturaleza peptídica y nucleotídica. Un componente fundamental de esta respuesta es la síntesis y acumulación de una gran variedad de metabolitos de muy diversa naturaleza química que, al igual que sucede con los factores antes mencionados, pueden mostrar actividad antipatogénica directa y, a su vez, participar en los procesos de señalización implicados en la interacción planta-patógeno. Por su extrema complejidad, el estudio de estos metabolitos y su relación con la respuesta defensiva de la plantas merece un capítulo aparte.

2. Los metabolitos secundarios en el sistema defensivo de las plantas

Las plantas producen gran cantidad de compuestos orgánicos, clasificados en metabolitos primarios y secundarios según sean o no esenciales para el organismo. Los primarios, tales como lípidos, nucleótidos, aminoácidos, fitoesteroles y ácidos orgánicos, se consideran indispensables para el mantenimiento de las funciones vitales de la planta, estando presentes en todas ellas, sin excepción. Los metabolitos denominados “secundarios”, a diferencia, se han considerado tradicionalmente como no esenciales y varían ampliamente según la especie. No obstante, los metabolitos secundarios presentan múltiples propiedades biológicas de tipo antibiótico, insecticida o herbicida, entre otras, resultando indispensables para la adaptación al entorno y la supervivencia de un elevado número de especies vegetales. Muchos de estos

compuestos son importantes en la planta a la hora de atraer insectos polinizadores, animales que dispersen las semillas y, de forma destacada, protegerla frente a posibles ataques e infecciones patogénicas (Buchanan *et al.*, 2002).

Atendiendo a su estructura química, pueden establecerse tres grandes grupos de compuestos que conforman el metabolismo secundario de las plantas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados, entre los que destacan los alcaloides (Korkina, 2007). El presente trabajo se centra en el estudio de compuestos de naturaleza fenólica y su papel en la interacción planta-patógeno. Por ello, esta familia de compuestos se trata en detalle en el siguiente apartado.

2.1. Metabolitos secundarios de naturaleza fenólica

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo extraordinariamente numeroso de metabolitos secundarios, muy variable en lo que a estructura y función biológica se refiere (Beggs *et al.*, 1987; Christie *et al.*, 1994; Dixon y Pavia, 1995). Se caracterizan por contener anillos aromáticos y presentar un origen biosintético común en la llamada *ruta del siquimato-corismato*. El ácido siquímico, que se obtiene a partir del fosfoenolpiruvato y la eritrosa 4-fosfato, da lugar al ácido corísmico (Figura 3). El ácido corísmico es el precursor de diferentes metabolitos y, particularmente, de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Weaver *et al.*, 1997). A su vez, la fenilalanina es el precursor central de la importante familia de los *fenilpropanoides*, que se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado del tipo C₆-C₃ (Iriti y Faoro, 2009; Cheynier *et al.*, 2013).

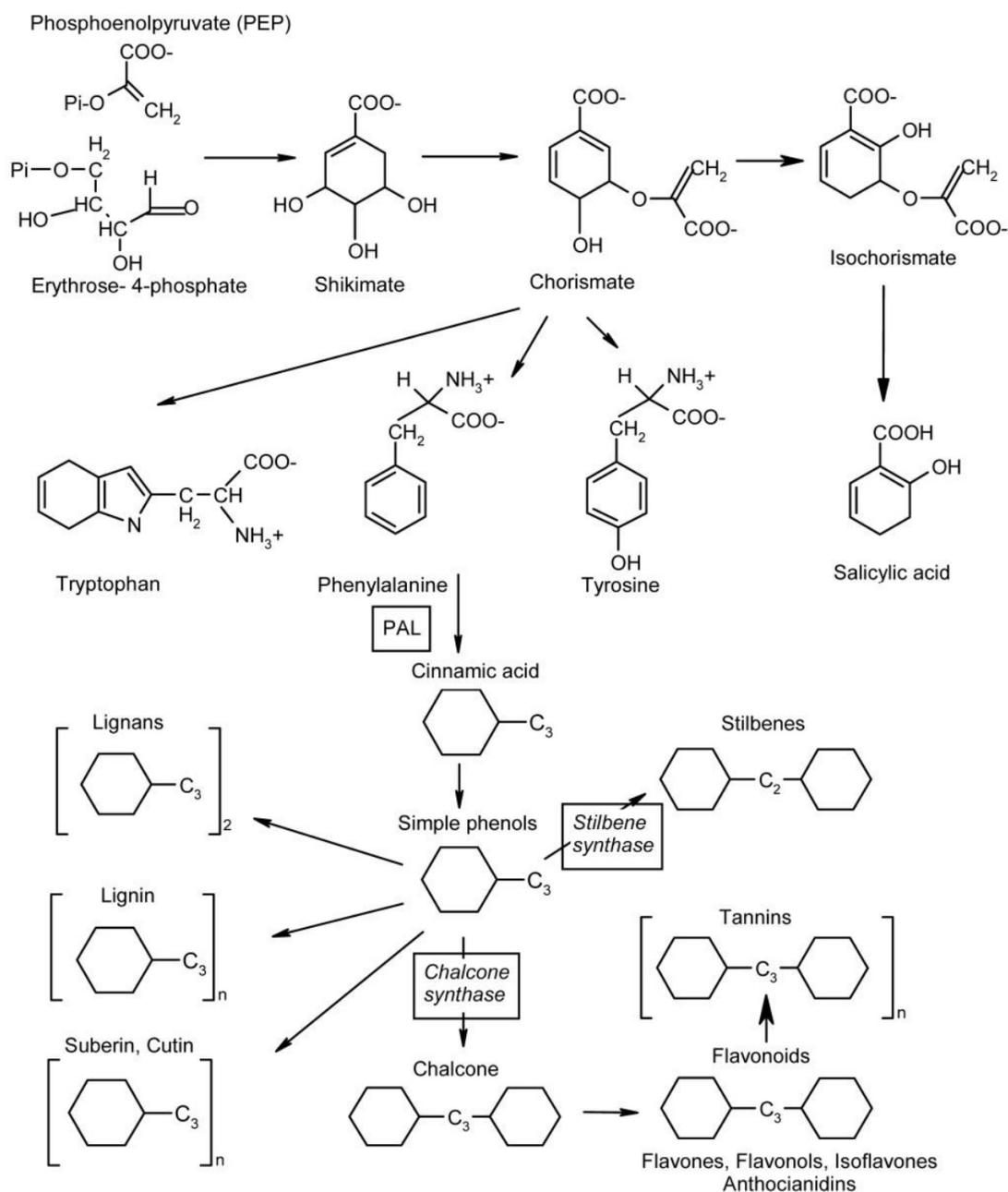


Figura 3. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos a partir del siquimato y derivados de la fenilalanina a través de la ruta de los fenilpropanoides (Adaptado de Iriti y Faoro, 2009).

La desaminación de la fenilalanina, paso que cataliza el enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL, Figura 3), da lugar al ácido cinámico que, a su vez, es el precursor de los hidroxicinamatos, obtenidos tras una serie de hidroxilaciones del anillo bencénico (Figura 4). Las Gramíneas son capaces de sintetizar el ácido cumárico a partir de Tyr mediante la tirosina amonio-liasa (TAL), mientras la inmensa mayoría de especies

vegetales sólo pueden sintetizarlo partiendo del ácido cinámico. A partir del ácido cumárico tiene lugar la síntesis de los ácidos cafeico, ferúlico y sinápico, mediante reacciones de hidroxilación y metilación. Todos estos ácidos raramente se acumulan en su forma libre en las células vegetales, sino que tienden a conjugarse con azúcares, glúcidos de la pared celular, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como sufrir otras modificaciones para dar lugar a nuevos compuestos. Por ejemplo, a partir de los ácidos cumárico, ferúlico y sinápico, que se reducen a los alcoholes correspondientes mediante intermediarios aldehído, se obtienen los denominados monolignoles. La dimerización o polimerización de los monolignoles da lugar a los lignanos y la lignina, respectivamente (Figura 4). Por ello se considera a dichos ácidos como precursores biosintéticos de la gran mayoría de los compuestos derivados de la ruta de los fenilpropanoides (Marco, 2006).

Los ácidos derivados del benzoico e hidroxibenzoico (C_6-C_1), tales como el ácido salicílico (SA), representan otro grupo de derivados del ácido cinámico, formados por el corte de un fragmento C_2 de la estructura del fenilpropano (Figura 4) (Hahlbrock y Scheel, 1989; Iriti y Faoro, 2004). Sin embargo, es importante destacar que, dependiendo de la especie vegetal y de la situación (ejemplo: durante el ataque de patógenos), el SA también puede ser sintetizado directamente a partir del corismato-isocorismato (Figura 3), por acción del enzima isocorismato sintasa (ICS) (Wildermuth *et al.*, 2001).

Entre sus muchas funciones, los compuestos fenólicos desempeñan un papel muy importante en la resistencia frente al ataque de patógenos (Dixon *et al.*, 2002). Los compuestos de defensa de las plantas pueden clasificarse en tres grupos principales: (i) moléculas señal, capaces de activar la respuesta defensiva, (ii) fitoanticipinas, presentes en la planta de manera constitutiva o preformados, y (iii) fitoalexinas, que se sintetizan *de novo* o ven aumentada su síntesis en respuesta a un ataque microbiano (van Etten *et al.*, 1994). Los compuestos de naturaleza fenólica se encuentran presentes en estos tres grupos.

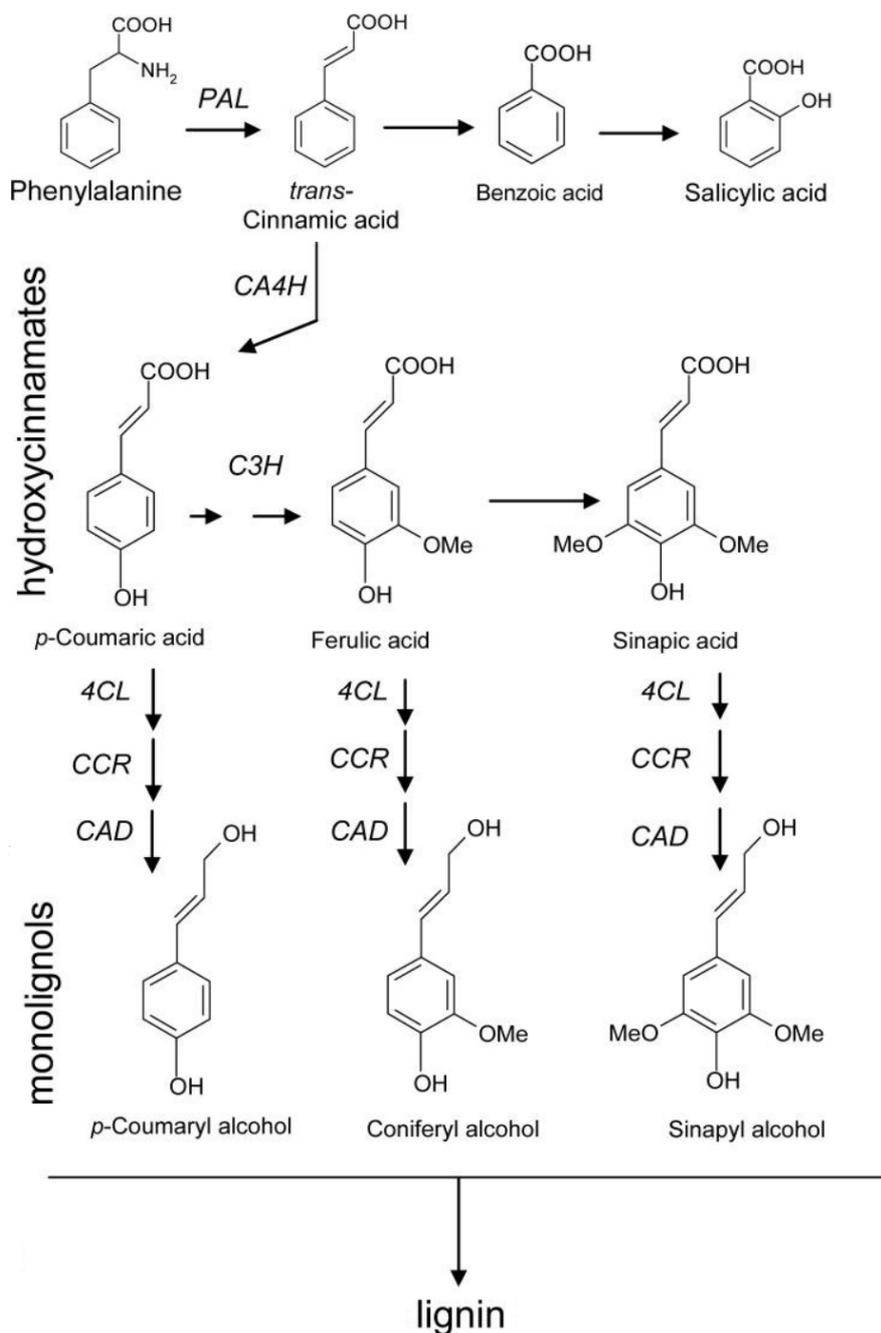


Figura 4. Ruta de los fenilpropanoides. Etapas principales para dar lugar a los ácidos benzoicos, los hidroxicinamatos (ácidos cumárico, ferúlico y sinápico) y la lignina. Abreviaturas de los enzimas: CA4H, cinamato-4-hidroxilasa; C3H, cumarato-3-hidroxilasa; CAD, cinamil alcohol deshidrogenasa; CCR, cinamil: CoA reductasa; CL, 4-cumarato: CoA ligasa; PAL, fenilalanina amonio-liasa (Adaptado de Iriti y Faoro, 2009).

Polímeros como la lignina o la suberina, considerados como fitoanticipinas, resultan de importancia fundamental para la planta, debido a que impermeabilizan y dan rigidez a la pared celular, además de proporcionar resistencia mecánica (Buchanan

et al., 2002). Otros fenólicos, como el ácido salicílico y su derivado metabólico el ácido gentísico, considerados como moléculas señal de la respuesta defensiva, así como las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico, enmarcadas dentro del grupo de las fitoalexinas, resultan de especial interés en el presente trabajo. Por ello, estos compuestos serán tratados de forma independiente y en detalle en los siguientes apartados.

2.1.1. Ácidos salicílico y gentísico

El ácido 2-hidroxibenzoico o ácido salicílico (SA), es un compuesto de naturaleza fenólica presente en una gran variedad de plantas. Este compuesto resulta de especial interés para la industria farmacéutica, debido a su efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético. El SA juega un papel central en la señalización de la respuesta defensiva de las plantas y la activación de programas de defensa inducibles, confiriendo a la planta resistencia frente a patógenos (apartado 1.1.3).

Como se ha mencionado en el apartado anterior, el SA se sintetiza en la planta a partir de la fenilalanina a través de la ruta de los fenilpropanoides (Figura 4), que tiene lugar en el cloroplasto (Sticher *et al.*, 1997), si bien es la ruta biosintética del isocorismato (Figura 3), que transcurre en el citosol, la fuente principal de SA durante la infección patogénica y el establecimiento de la SAR (Willdermuth *et al.*, 2001). La hidroxilación en C5 del SA da lugar al ácido 2,5-dihidroxibenzoico o ácido gentísico (GA). Este proceso fue descrito por primera vez en tejido animal (Lutwak-Mann, 1943), y posteriormente en microorganismos (Walker y Evans, 1952) y en plantas (Ibrahim y Towers, 1959). El GA podría actuar en plantas como una molécula señal adicional y complementaria al SA en la activación de la respuesta defensiva frente a diferentes infecciones (Bellés *et al.*, 1999, 2006; Schuegger *et al.*, 2006; López-Gresa *et al.*, 2010) (apartado 1.1.3).

Varios estudios han puesto de manifiesto que ciertas modificaciones del SA proporcionan respuestas defensivas específicas. Tal es el caso de la conjugación del SA

con aminoácidos, que tiene un importante papel en algunas respuestas defensivas (Nobuta *et al.*, 2007), o su metilación para dar metil-salicilato (MeSA), que ha sido descrito como la señal móvil implicada en la activación de la SAR en tabaco (Park *et al.*, 2007). Recientemente se han obtenido plantas transgénicas de tomate que silencian la metiltransferasa de SA (SAMT) (Ament *et al.*, 2010). Dichas plantas transgénicas resultaron ser menos susceptibles a la infección con el hongo *Fusarium oxysporum*, confirmando que la conversión del SA a MeSA influye en la respuesta defensiva de las plantas. Otra modificación muy común de los hidroxibenzoatos es la glicosilación o conjugación a una molécula de azúcar. De hecho, estos compuestos no suelen encontrarse en forma libre en las plantas, sino que se acumulan en forma de glicoconjugados. El SA aparece conjugado a una molécula de glucosa para formar SA-O- β -glucósido (Enyedi *et al.*, 1992; Malamy *et al.*, 1992), mientras el GA aparece conjugado tanto a glucosa en *Arabidopsis* (Dean y Delaney, 2008) como a xilosa en tomate y *Medicago truncatula* (Fayos *et al.*, 2006; Stochmal *et al.*, 2009). Debido a las implicaciones fisiológicas de la glicosilación y su relevancia en la respuesta defensiva de las plantas esta modificación de los metabolitos secundarios será tratada más adelante (apartado 2.2).

2.1.2. Amidas derivadas del ácido hidroxicinámico

Entre los compuestos de naturaleza fenólica caracterizados por la presencia de nitrógeno en su molécula se encuentran las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAA), presentes en una gran variedad de especies vegetales (Martin-Tanguy *et al.*, 1978). Las HCAA están formadas por la condensación de los ácidos hidroxicinámicos, procedentes de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, tales como el cumárico y el ferúlico, con diferentes aminas (Figura 5). Entre éstas, se han encontrado poliaminas alifáticas como la putrescina y la espermidina o aminas aromáticas β -feniletilaminas como la tiramina y la fentermina, formando parte de diferentes HCAA (Hahlbrock y Scheel, 1989; Strack, 1997).

Atendiendo a sus propiedades químicas, se distinguen dos grupos de HCAA. Por un lado están las amidas básicas, solubles en agua, que presentan aminas alifáticas en su molécula (putrescina, cadaverina, espermidina) y por otro las amidas neutras, insolubles en agua, que contienen aminas aromáticas, como la tiramina o la octopamina entre otras (Facchini *et al.*, 2002).

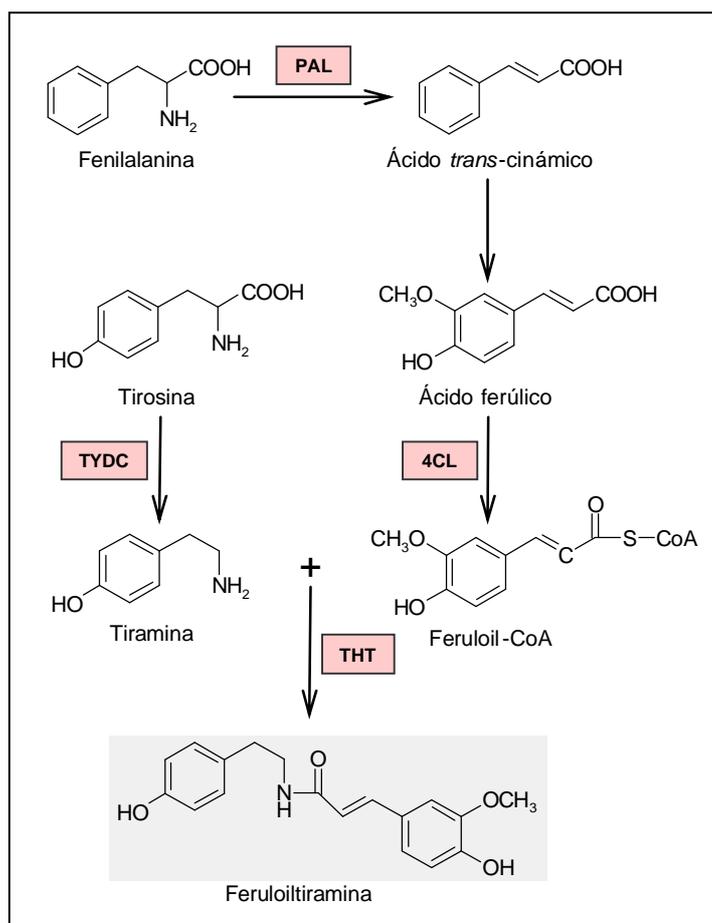


Figura 5. Biosíntesis de HCAA. Síntesis de feruloiltiramina a partir de tirosina. 4CL, 4-cumarato ligasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; THT, tiramina hidroxicinamoil transferasa; TYDC, tirosina descarboxilasa.

La presencia de HCAA ha sido descrita en todo el reino vegetal, generalmente como constituyentes fenólicos de flores, semillas y granos de polen (Bottcher *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009; Handrick *et al.*, 2010). Estas amidas se han visto implicadas en procesos de detoxificación de ciertos herbicidas y xenobióticos (Suzuki *et al.*, 1981), y

también en procesos fisiológicos, como la tuberización en patata (Paynot *et al.*, 1983). Sin embargo, la función fisiológica mejor caracterizada de las HCAA es la de participar en programas de defensa inducibles como componentes finales de la respuesta defensiva de la planta frente a diversos ataques patogénicos (Bassard *et al.*, 2010).

Se ha descrito la inducción de la síntesis de HCAA en diferentes tejidos de la planta en respuesta a varios tipos de estrés, incluyendo tratamiento con *elicitores*, herida o infecciones patogénicas (Hahlbrock y Scheel, 1989; Keller *et al.*, 1996; Pearce *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1998; Newman *et al.*, 2001). Diversos estudios han puesto de manifiesto la acumulación de amidas en plantas en respuesta a infecciones patogénicas, normalmente en interacciones de tipo incompatible (von Roepenack *et al.*, 1998; McClusky *et al.*, 1999). Por ejemplo, en el estudio de la interacción entre cebada (*Hordeum vulgare*) y el hongo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, que da lugar a una respuesta hipersensible (HR), se observó un aumento en los niveles de HCAA derivadas de putrescina, espermidina y espermina durante los cuatro días posteriores a la infección (Cowley y Walters, 2002a).

La acumulación de HCAA ha sido extensamente descrita en especies vegetales pertenecientes a la familia de las Solanáceas (Clarke, 1982; Keller *et al.*, 1996; Negrel y Javelle, 1997). Tal es el caso de amidas derivadas de tiramina y octopamina, que son sintetizadas e integradas en la pared celular de tubérculos de patata en respuesta a un ataque fúngico (Clarke, 1982), o la acumulación de cumaroil tiramina (CT) y feruloiltiramina (FT) en plantas de pimiento infectadas con la bacteria *Xanthomonas campestris* (Newman *et al.*, 2001). También durante la respuesta hipersensible (HR) de plantas de tabaco cultivar 'Xanthi-nc' frente a la infección con el virus del mosaico del tabaco (TMV), se observó la acumulación de gran cantidad de HCAA, incluyendo feruloilputrescina y feruloiltiramina. Se sugirió entonces que esos altos niveles de amidas eran requeridos para el desarrollo de las lesiones necróticas características de la HR, formadas con el fin de limitar el movimiento del virus y prevenir una infección sistémica (Martin-Tanguy *et al.*, 1973, 1976). También en el estudio de la interacción incompatible de plantas de tomate cultivar 'Rio Grande' infectadas con la bacteria

Pseudomonas syringae pv. *tomato* se detectó la acumulación de *p*-cumaroilactopamina y *p*-cumaroilnoradrenalina (von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003).

En nuestro laboratorio se llevó a cabo la infección de plantas de tomate 'Rutgers' con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, donde se detectó la acumulación de CT y FT, así como las HCAA de dopamina cumaroildopamina y feruloildopamina. Además de la acumulación de amidas, las plantas de tomate infectadas presentaron una rápida y fuerte acumulación de ácido salicílico (Zacarés *et al.*, 2007). Recientemente hemos detectado en esta misma interacción la acumulación de otras amidas, derivadas de la unión de octopamina y noradrenalina con los ácidos cumárico y ferúlico (López-Gresa *et al.*, 2011).

Se han propuesto dos funciones principales de las HCAA en la respuesta defensiva de la planta. Por un lado, pueden ser incorporadas a la pared celular con el fin de fortalecerla contra la degradación microbiana. Varios estudios han puesto de manifiesto que HCAA de tiramina son sintetizadas en el citosol y transportadas a la pared celular, donde son entrecruzadas mediante peroxidasas, en respuesta a herida o infección patogénica (Clarke, 1982; Negrel y Lherminier, 1987; Hagel y Facchini, 2005). Dicha acumulación, junto con otros compuestos fenólicos de la pared celular, crea una barrera contra los agentes patógenos, reduciendo la digestibilidad de la pared celular o, en el caso de los hongos, inhibiendo el crecimiento de las hifas (Grandmaison *et al.*, 1993). Por otro lado, las HCAA pueden actuar directamente como agentes antimicrobianos *per se*. Entre las diferentes amidas, la CT posee actividad antibacteriana *in vitro*, mientras la FT presenta actividad tanto antibacteriana como antifúngica (Fattorusso *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 2001). Las HCAA de dopamina también muestran una notable acción bactericida (Zacarés *et al.*, 2007), y la feruloilnoradrenalina presenta una elevada capacidad antioxidante (López-Gresa *et al.*, 2011).

De entre los enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de las HCAA (Figura 5), el enzima tiramina hidroxicinamoil transferasa (THT; EC 2.3.1.110) se considera clave en dicho proceso (Negrel y Martin, 1984; Negrel y Javelle, 1997; Schmidt *et al.*,

1999; Facchini *et al.*, 2002). Se ha descrito la inducción del gen *THT* en respuesta a herida, tratamiento con *elicitores* e infección con patógenos (Villegas y Brodelius, 1990; Negrel *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1998), lo cual sugiere un papel general para THT en la respuesta defensiva de la planta. Este enzima fue aislado por primera vez en tabaco (Negrel y Martin, 1984), y ha sido purificado de ésta y otras especies, como patata y adormidera. Estudios de especificidad con enzimas purificados frente a diferentes aceptores, indican que THT presenta mayor afinidad por la tiramina, seguida de la octopamina y la dopamina (Hohlfeld *et al.*, 1996; Negrel y Javelle, 1997; Yu y Facchini, 1999). En tomate, THT está codificado por una familia multigénica. Concretamente, se han identificado cuatro genes que codifican THT, de entre los cuales *tomTHT1-3* es el que más se induce en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003).

Con el fin de estudiar la función de THT en la biosíntesis de HCAA, se han obtenido plantas transgénicas de sobreexpresión del gen *THT* en diferentes especies. Se encontró que plantas transgénicas de tabaco con un aumento en la actividad THT no mostraron diferencias constitutivas en el contenido en HCAA respecto a plantas control. Sin embargo, en respuesta a herida las plantas transgénicas mostraron elevados niveles de CT y FT, muy superiores a los detectados en las plantas control (Hagel y Facchini, 2005). Del mismo modo, la sobreexpresión del gen *THT* de pimiento en plantas transgénicas de arroz, aunque no produjo un incremento en el contenido de HCAA, aumentó notablemente la cantidad de amidas en plantas transgénicas suplementadas con tiramina, respecto a plantas control (Lee *et al.*, 2007). Estos autores propusieron que la falta de acumulación de HCAA en las plantas transgénicas de arroz no suplementadas podía deberse a una limitación de sustrato en esta especie, es decir, a los bajos niveles basales de tiramina disponible para la formación de HCAA. La sobreexpresión de *THT* en especies vegetales que presenten mayores niveles basales de aminas, como es el caso del tomate, que contiene elevados niveles de tiramina y serotonina (Feldman y Lee, 1985; Kang *et al.*, 2009), podría confirmar esta hipótesis. Sin la limitación de sustrato, estas plantas transgénicas podrían acumular HCAA de manera constitutiva. Además, permitirían llevar a cabo estudios sobre la

función de THT en la biosíntesis de HCAA y acerca del papel que juegan estos compuestos en la respuesta defensiva de la planta.

2.2. Modificaciones de los metabolitos secundarios

A través del metabolismo secundario, las plantas producen una gran diversidad de compuestos de bajo peso molecular. Además de por la enorme cantidad de rutas metabólicas implicadas, la variedad de estos compuestos es aún mayor gracias a reacciones adicionales de hidroxilación, metilación, acilación o conjugación (Gachon *et al.*, 2005). La glicosilación o conjugación a una molécula de azúcar es una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios relacionada con la regulación y la llevan a cabo unos enzimas denominados glicosiltransferasas (GTs).

2.2.1. La glicosilación en plantas

Las plantas poseen más genes codificantes de GTs que ningún otro organismo secuenciado hasta la fecha. Ello se atribuye a la compleja red de polisacáridos que forma la pared celular y que requiere multitud de GTs para su biosíntesis, pero también a la enorme cantidad de metabolitos secundarios glicosilados que existen en las plantas (Lim y Bowles, 2004; Roychoudhury y Pohl, 2010). Según su secuencia y plegamiento, así como por la estereoquímica de la reacción que catalizan, las glicosiltransferasas se clasifican en un total de 96 familias. La mayoría de las GTs son codificadas por grandes familias multigénicas, que en algunos casos comprenden cientos de genes. Por ejemplo, la familia 1, que engloba las GTs implicadas en la glicosilación de metabolitos secundarios, está compuesta por 122 genes en *Arabidopsis thaliana*, mientras que en *Oryza sativa Japonica* se han identificado hasta la fecha 202 (Hansen *et al.*, 2010; base de datos CAZy, www.cazy.org). En la actualidad se conoce la secuencia de miles de GTs, pero en pocos casos se ha llevado a cabo su caracterización biológica.

La especificidad de sustrato de las GTs suele ser mayor hacia el donante del azúcar que hacia la molécula aceptora. En general, el sustrato más empleado por las GTs como donante de azúcar suele ser la glucosa uridinilada (UDPG), aunque existen GTs que emplean otros azúcares activados con UDP (Vogt y Jones, 2000).

Las GTs implicadas en la glicosilación de metabolitos secundarios en plantas son enzimas citosólicos (Hart *et al.*, 2007). Estas glicosiltransferasas presentan un motivo, de aproximadamente 40 aminoácidos, altamente conservado (entre un 60 y un 80% de similitud), denominado PSPG (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase*) (Hughes y Hughes, 1994) (Figura 6). Este motivo incluye también una secuencia, de unos 25 aminoácidos, que suele estar presente en todas las GTs. Dicha secuencia, localizada en la región C-terminal de la proteína, parece ser el sitio de unión del UDP. Varios estudios han demostrado que ciertas mutaciones en los aminoácidos de estas secuencias conservadas afectan a la interacción proteína-UDP (Kubo *et al.*, 2004; Hans *et al.*, 2004). Exceptuando el motivo PSPG, la similitud de secuencia entre las GTs es, por lo general, muy baja (en torno al 10%). En cuanto al extremo N-terminal, parece que éste podría ser el encargado de interactuar con el sustrato aceptor del azúcar (Moehs *et al.*, 1997; Lim y Bowles, 2004).



Figura 6. Secuencia consenso de las glicosiltransferasas (GTs). Los aminoácidos destacados en rojo tienen un porcentaje de conservación superior al 80%, los destacados en azul, >50% y los señalados en negro, <50% (Adaptado de Vogt y Jones, 2000; Gachon *et al.*, 2005).

2.2.2. Implicaciones fisiológicas de la glicosilación de metabolitos

Desde un punto de vista químico, la conjugación a un azúcar puede aumentar la estabilidad y solubilidad en agua de ciertos compuestos (Jones y Vogt, 2001). Tal es el

caso de las antocianinas, cuya glicosilación es crucial para la estabilidad del anillo aromático. Concretamente, el patrón de glicosilación de antocianinas o flavonoides afecta al color de flores y frutos (Kroon *et al.*, 1994; Brugliera *et al.*, 1999; Fukuchi-Mizutani *et al.*, 2003). Las GTs también aumentan la estabilidad de compuestos fenólicos y terpenos volátiles, asociados con el sabor de los frutos (Frydman *et al.*, 2004; Kita *et al.*, 2000; Wang, 2009).

Por otra parte, las GTs intervienen en la compartimentación y almacenamiento de metabolitos (Bowles *et al.*, 2005). Se han descrito numerosos compuestos que, al glicosilarse, son acumulados en las vacuolas (Werner y Matile, 1985; Taguchi *et al.*, 2000a; Dean *et al.*, 2005). Esta es una de las razones por las que las GTs son responsables de la inactivación y detoxificación de ciertos compuestos xenobióticos. Algunas sustancias cianogénicas, como la amigdalina, presente en semillas de almendra, al estar glicosiladas, permanecen inactivas en la vacuola. Cuando el tejido es atacado por algún herbívoro, comienza la degradación celular y, como consecuencia, la liberación del glicósido de amigdalina al medio. A continuación, las β -glicosidasas actúan sobre el conjugado, dando lugar al compuesto cianogénico tóxico (Poulton, 1988). También se ha visto que determinados compuestos xenobióticos, como ciertas anilinas o triclorofenoles, pierden su toxicidad al ser conjugados a un azúcar (Messner *et al.*, 2003).

La glicosilación juega también un papel importante en la regulación de los niveles activos de algunas hormonas, como auxinas, citoquininas o ácido abscísico. Dependiendo de la posición del azúcar en la molécula, los conjugados pueden actuar como productos catabólicos finales inactivos, o bien como formas transitorias de almacenamiento, que podrían movilizarse tras la acción de ciertas β -glicosidasas (Xu *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2004). Sin embargo, la conjugación no es sólo un mecanismo de inactivación. Se ha comprobado que, para algunos compuestos, es necesario unirse a una molécula de azúcar con el fin de ejercer su función. Por ejemplo, la glicosilación de los triterpenos que da lugar a las saponinas en avena es necesaria para adquirir su propiedad antifúngica (Armah *et al.*, 1999). También se ha comprobado que el glucósido del resveratrol tiene mayor actividad antimicrobiana que el propio aglicón

(Schulze *et al.*, 2005). Todas estas funciones enlazan con otro de los papeles fisiológicos relevantes de las GTs: su implicación en la respuesta defensiva de la planta.

2.2.3. La glicosilación en la respuesta defensiva

Como se ha indicado anteriormente, el SA juega un papel fundamental en la señalización de la respuesta defensiva de las plantas. Diferentes estudios han constatado que el SA acumulado en la planta tras su aplicación exógena o producido como consecuencia de una infección incompatible, es rápidamente glicoconjugado. Generalmente, el SA aparece unido a una molécula de glucosa para dar lugar a SA-O- β -glucósido (Figura 7A). Este compuesto queda recluido en el interior de la vacuola, evitando así su posible efecto tóxico (Métraux *et al.*, 1990; Malamy *et al.*, 1992; Enyedi *et al.*, 1992; Edwards, 1994; Lee y Raskin, 1998). Una de las cuestiones que cabía resolver era si el conjugado del SA actuaba o no como molécula activa en el establecimiento de la respuesta defensiva de la planta. En un inicio se pensó que sí, puesto que al infiltrar hojas de tabaco con 2-O- β -glucósido de SA, se observaba una clara inducción de *PR1* (Hennig *et al.*, 1993). Sin embargo, pronto se tuvo conocimiento de que el conjugado infiltrado era rápidamente hidrolizado al entrar en la planta, por acción de una β -glucosidasa, y que en realidad era el SA en forma libre el verdadero responsable de la inducción de los genes de proteínas PR (Chen *et al.*, 1995).

Estos datos conducen a la hipótesis de que la glicosilación del SA podría ser un mecanismo de detoxificación empleado por la planta cuando se ven aumentados sus niveles tras una infección. Una vez conjugado en el citosol por acción de una glicosiltransferasa, el glucósido del SA pasaría a ser acumulado, inactivo, en la vacuola. Pero esta conjugación no sería irreversible. Cuando la planta precisara el SA libre para activar la repuesta defensiva, el glicoconjugado saldría de la vacuola para ser hidrolizado por una β -glucosidasa. Por lo tanto, la GT responsable de la glicosilación del SA estaría regulando los niveles activos de esta molécula señal de la respuesta defensiva (Dean *et al.*, 2005).

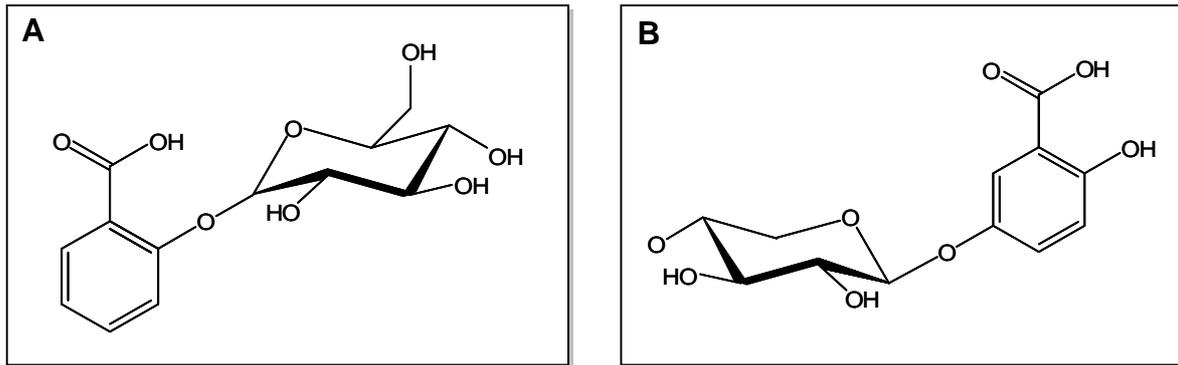


Figura 7. Conjugación del ácido salicílico y ácido gálico en tomate. A) Estructura del SA 2-O- β glucósido. B) Estructura del GA 5-O- β xilósido.

Del mismo modo, el ácido gálico (GA) que se acumula en plantas tras su aplicación exógena o como consecuencia de una infección no lo hace en forma libre, sino que aparece en gran medida unido a una molécula de azúcar. En la mayoría de especies el SA se encuentra conjugado a glucosa, mientras que el GA se ha detectado conjugado a glucosa en *Arabidopsis* (Dean y Delaney, 2008), pero en otras especies, como tomate o *Medicago truncatula*, se ha observado la acumulación de GA unido a xilosa (Figura 7B) (Fayos *et al.*, 2006; Stochmal *et al.*, 2009).

Existe un gran número de GTs que presentan inducción por tratamientos exógenos con SA, lo que sugiere un posible papel de las mismas en la respuesta defensiva de las plantas. En 1998, O'Donnell y colaboradores identificaron un gen en tomate denominado *Twi1* (*Tomato wound induced 1*) que se inducía por herida, tratamientos con SA y otros compuestos de naturaleza fenólica, así como por interacciones patogénicas de tipo incompatible. No respondía, sin embargo, a aplicaciones exógenas de JA o ET. Se consideró entonces que este gen debía codificar una GT, debido a la homología que presentaba con las proteínas de esta familia. Sin embargo, la caracterización de esta GT, así como el estudio de su posible papel en la respuesta defensiva de la planta, no ha sido realizada hasta la fecha. Por otra parte, en tabaco se había clonado y caracterizado otra GT, homóloga a *Twi1*, denominada TOGT, inducida por SA, infección con TMV y β -megaspermina (un compuesto que desencadena una HR en la planta). Se observó que, a pesar de ser inductor, el SA no era el mejor sustrato

para este enzima, sino los ácidos hidroxicinámicos. La finalidad de estos conjugados podría ser el reforzamiento de la pared celular en el caso de infección (Whetten y Sederoff, 1995; Fraissinet-Tachet *et al.*, 1998). Finalmente se comprobó que TOGT presentaba una elevada afinidad por el sustrato escopoletina (Chong *et al.*, 1999). En 1999, Lee y Raskin clonaron y caracterizaron una GT en tabaco que sí conjugaba SA. La expresión de esta glicosiltransferasa era inducida tanto por la aplicación exógena de SA como por infecciones de tipo incompatible, causadas por el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) o la bacteria *Pseudomonas*.

Posteriormente se han clonado y caracterizado otras GTs inducibles por SA, algunas de ellas conjugadoras de fitoalexinas, como la NTGT de tabaco (Taguchi *et al.*, 2001), o la flavonoide-GT de *Scutellaria baicalensis* (Hirotsani *et al.*, 2000). En *Arabidopsis*, las glicosiltransferasas UGT73B3 y UGT73B5, implicadas en la respuesta defensiva frente a la infección con *P. syringae*, también mostraron inducción por SA (Langlois-Meurinne *et al.*, 2005).

En nuestro laboratorio hemos aislado y caracterizado una glicosiltransferasa de tomate que también se induce por SA. De nuevo, y a pesar de ser inductor, resultó que esta GT no era activa frente a ácido salicílico, sino que presentaba una elevada actividad frente a ácido gentísico (GA), por lo que fue denominada GAGT (*Gentisic Acid Glycosyl-Transferase*). En plantas de tomate, GAGT mostró inducción por tratamientos con SA, GA, e interacciones de tipo compatible, como la infección con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) o con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV). Los ensayos de actividad a partir de la proteína producida en *Pichia pastoris* mostraron que esta glicosiltransferasa empleaba UDP-xilosa como sustrato donante del azúcar, a diferencia de la mayoría de GTs caracterizadas, que suelen emplear UDP-glucosa (Tárraga *et al.*, 2010).

Con el fin de caracterizar la actividad de las glicosiltransferasas y estudiar su papel en la respuesta defensiva, se han obtenido diferentes plantas transgénicas de sobreexpresión o silenciamiento. Hace unos años, se generaron líneas anti-sentido de TOGT en tabaco (Chong *et al.*, 2002). Dichas plantas, tras ser inoculadas con TMV,

mostraron bajos niveles del enzima, así como de su producto esculetina (conjugado de la escopoletina), y resultaron ser más sensibles frente a la infección con patógenos que las plantas control. Del mismo modo, se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco con sobreexpresión de TOGT. Estas plantas resultaron ser más resistentes a la infección del virus Y de la patata que las plantas control ya que, a pesar de que las áreas necróticas eran de tamaño similar en ambos tipos de plantas, los ejemplares transgénicos presentaban en dichas zonas una menor acumulación de la proteína de la cápside viral (Matros y Mock, 2004). Más tarde fue identificada en patata otra GT, conjugadora de antocianinas (5-UGT). Su sobreexpresión en tubérculo aumentó la resistencia frente a la bacteria *Erwinia carotovora*, causante de una infección de tipo compatible, debido a que la conjugación de antocianinas aumenta su estabilidad y favorece su acción en la planta (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005). También se identificó una GT de *Arabidopsis thaliana* (DOGT1) implicada en la resistencia a una micotoxina, el desoxinivalenol, producida por *Fusarium*. La sobreexpresión de esta GT aumentaba la tolerancia al hongo, puesto que se produce una mayor conjugación de la micotoxina, que causa su inactivación (Poppenberger *et al.*, 2003). Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* mostraron que mutaciones en las glicosiltransferasas UGT73B3 y UGT73B5 provocan en la planta una mayor susceptibilidad a *Pseudomonas syringae* (Langlois-Meurinne *et al.*, 2005). Asimismo, se ha visto que el silenciamiento inducido por virus (VIGS) de una glicosiltransferasa de pimiento provoca un retraso en la aparición de HR en respuesta a TMV (Lee *et al.*, 2009).

Según estos estudios, podría considerarse que la sobreexpresión de una GT daría lugar a un aumento de la resistencia frente a infecciones patogénicas, mientras su silenciamiento iría asociado a un fenotipo de susceptibilidad. Sin embargo, esta asociación no es tan sencilla y no ocurre siempre así. En 2008, Song y colaboradores pusieron de manifiesto que la sobreexpresión en *Arabidopsis* de *AtSGT1*, una glicosiltransferasa que conjuga SA, daba lugar a un aumento de la susceptibilidad frente a la infección con *Pseudomonas syringae*. Estos autores defienden que es la reducción en la cantidad de SA en forma libre, que es la forma activa del compuesto, la responsable de la menor resistencia de estas plantas transgénicas frente a la infección.

Otro trabajo mostraba cómo la pérdida de función de UGT76B1 en *Arabidopsis*, que actúa sobre el ácido isoleucínico, mejoraba la resistencia frente a la bacteria *Pseudomonas syringae*, si bien ello también implicaba una mayor susceptibilidad frente al hongo *Alternaria brassicicola*. El efecto contrario se observó en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con sobreexpresión de UGT76B1 (von Saint Paul *et al.*, 2011). Un estudio publicado recientemente demostró que la inhibición de la acción de dos glicosiltransferasas de SA en *Arabidopsis* daba lugar a una mayor resistencia frente a la infección con *Pseudomonas syringae*, debido a un aumento en la cantidad de SA en forma libre (Noutoshi *et al.*, 2012). Así pues, teniendo en cuenta el metabolito sobre el que actúan, la sobreexpresión o el silenciamiento de glicosiltransferasas puede dar lugar a la aparición de resistencia o susceptibilidad frente a una infección patogénica, dependiendo de la función del metabolito en cuestión y de cómo afecta la conjugación a dicha función.

Todas estas GTs que parecen estar implicadas en la respuesta defensiva de las plantas tienen propiedades bioquímicas, estructurales y fisiológicas comunes. Presentan una masa molecular de unos 50 kDa, poseen un punto isoeléctrico alrededor de 5 y un pH óptimo en torno a 7. La mayoría muestra una baja especificidad de sustrato en cuanto a la molécula aceptora del azúcar y una alta especificidad respecto al donante del azúcar, que suele ser UDPG, aunque GAGT es una excepción al mostrar una elevada selectividad hacia UDP-xilosa. Además, todas estas proteínas contienen el motivo PSPG en su extremo C-terminal. En general, la expresión de este tipo de GTs implicadas en defensa se induce rápidamente y de forma transitoria por SA, HR y/o herida. De entre las glicosiltransferasas que se han visto implicadas en defensa, algunas regulan los niveles activos de SA, que es la molécula señal implicada en el establecimiento de HR y SAR, mientras otras regulan los niveles activos de ciertas fitoalexinas y moléculas antioxidantes, compuestos que intervienen en la defensa de la planta en el momento de la entrada del patógeno y en la subsiguiente explosión oxidativa. Todo esto parece indicar que las GTs juegan un papel relevante en la respuesta defensiva de las plantas, modulando los niveles de ciertas moléculas que intervienen en dicha respuesta.

El llamado *metabolismo secundario* de las plantas es fuente de una vastísima variedad de compuestos de extraordinario interés biotecnológico. Sin embargo, ha sido tradicionalmente considerado como biológicamente insignificante al englobar moléculas en apariencia no esenciales para la planta, aunque con estructuras muy complejas, producidas mediante sofisticados procesos biosintéticos que suponen un importante consumo de recursos metabólicos. La visión actual ha supuesto una reevaluación de su posible papel biológico, considerando que estos compuestos desempeñan, en efecto, un importante papel ecológico en la adaptación de las plantas a su entorno. En este contexto, muchos compuestos naturales de plantas son de importancia capital en la interacción planta-patógeno, tanto en los procesos de señalización como de respuesta. Por su variedad e importancia, destacan dentro de esta categoría los metabolitos de naturaleza fenólica.

Con el fin de estudiar la función que dichos metabolitos pueden desempeñar en la respuesta defensiva de las plantas, es interesante llevar a cabo tratamientos exógenos. Por ejemplo, se ha observado que tratamientos exógenos con SA inducen en la planta la síntesis de un grupo de proteínas de defensa (PR) con propiedades antimicrobianas, y son muchos los estudios que han demostrado que tratamientos con SA inducen resistencia frente a diferentes patógenos en tomate (Spletzer *et al.*, 1999; Meher *et al.*, 2011) y otras especies vegetales (Saikia *et al.*, 2003; Wang y Liu, 2012).

Por otra parte, la obtención de plantas transgénicas que presenten niveles alterados del metabolito objeto de estudio también constituye una importante herramienta a la hora de profundizar en el conocimiento del papel que juega dicho compuesto en el sistema defensivo de las plantas (Chong *et al.*, 2002; Poppenberger *et al.*, 2003; Niggeweg *et al.*, 2004; Guillet y de Luca, 2005; Hagel y Facchini, 2005; Lorenc-Kukula *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2014; Kim y Hwang, 2014). Al mismo tiempo, dicha estrategia puede constituir un medio de obtención de plantas más resistentes frente a ataques patogénicos de diversa naturaleza. Todo ello pone de manifiesto la importancia de estos compuestos en el

sistema defensivo de las plantas, y apoya el hecho de que su metabolismo sea un importante foco de estudio en la actualidad y una posible diana de manipulación genética.

Objetivos

Los metabolitos secundarios de naturaleza fenólica desempeñan un papel muy importante en la resistencia de las plantas frente al ataque patogénico. Algunos de ellos, como los ácidos salicílico y gentísico (SA y GA), actúan como moléculas señal, siendo capaces de activar la respuesta defensiva. Otros, por su parte, pueden actuar directamente sobre el patógeno, considerándose componentes finales de la respuesta, como es el caso de las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAA). El objetivo general de este trabajo es profundizar en el estudio del papel que juegan estos compuestos fenólicos en la respuesta defensiva de las plantas, desde diferentes aproximaciones. Por un lado, se llevarán a cabo tratamientos exógenos con dichos compuestos y, por otro, se obtendrán plantas transgénicas que presenten niveles alterados de los metabolitos objeto de estudio.

Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

- I. Estudiar el papel de SA y GA como activadores del mecanismo de silenciamiento génico y de la resistencia de las plantas a patógenos de RNA.
- II. Profundizar en el estudio del papel del GA en defensa y confirmar la actividad *in vivo* de GAGT, mediante la obtención de plantas transgénicas con sobreexpresión de esta glicosiltransferasa de GA.
- III. Caracterizar la posible función de la glicosiltransferasa *Tw1* en la respuesta defensiva, mediante el estudio de actividad de la proteína recombinante y la obtención de plantas transgénicas que silencien *Tw1*.
- IV. Ampliar el conocimiento sobre la implicación de las HCAA en la defensa de las plantas frente a ataques patogénicos, por medio de la generación de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresen el gen de la tiramina hidroxicinamoil transferasa (THT).

Materiales

 y Métodos

1. Material vegetal y condiciones de cultivo

En la realización del presente trabajo se han empleado plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de los cultivares 'Moneymaker' $Tm2^2$ y $tm2^2$ (cedidas amablemente por el Dr. Jonathan Jones, The Sainsbury Laboratory, Norwich, Reino Unido), resistentes y susceptibles al virus ToMV, respectivamente, y de los cultivares 'Rutgers' y 'Rio Grande'. A su vez, se han empleado plantas de *Gynura aurantiaca* y *Nicotiana benthamiana* mantenidas y propagadas en las instalaciones del IBMCP. Todas estas plantas fueron cultivadas en invernadero a una temperatura que oscilaba entre los 25 y los 30 °C, con una humedad relativa entre el 50 y el 70% y con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Para el cultivo de las plantas de tomate y *N. benthamiana*, se prepararon semilleros en vermiculita y, aproximadamente una semana después de la siembra, las plantas se trasplantaron a macetas (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro interior) que contenían turba y vermiculita al 50 %. Se trasplantó una planta por maceta. Las plantas se sometieron a riego a manta automatizado dos veces al día en solución de Hoagland, tal y como se describe en Naranjo *et al.* (2003). En cuanto a las plantas de *Gynura*, éstas se propagaron mediante esquejes procedentes de plantas madre.

Por otra parte, se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0), que fueron cultivadas en cámara bajo condiciones de alta intensidad lumínica (22.000 lux), con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h de oscuridad y 22 °C de temperatura.

2. Tratamientos

2.1. Tratamientos de plantas de tomate

Los tratamientos de las plantas de tomate 'Rutgers' con ácido salicílico (SA) y ácido genticónico (GA) se llevaron a cabo mediante imbibición de explantes o "stem

feeding", según Gu *et al.* (2000). Para ello, se emplearon plantas de 4 ó 5 semanas, cortadas en bisel a la altura de los cotiledones. Los explantes se sumergieron por el tallo en tubos de plástico de 50 mL que contenían tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.4 (plantas control), SA 1 mM en tampón fosfato o GA 2 mM preparado en el mismo tampón. La tercera y cuarta hojas de los explantes fueron recogidas en nitrógeno líquido a los tiempos indicados (0, 4, 8, 12 y 48 horas después de iniciar el tratamiento) y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Los tratamientos con ácido salicílico (SA), ácido gentísico (GA), ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA) o ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA), especificados para cada caso, de plantas de tomate 'Moneymaker', plantas transgénicas GAGT y plantas transgénicas RNAi *Tw1* se realizaron también mediante *stem-feeding* (Gu *et al.*, 2000). Plantas de 4 ó 5 semanas, cortadas en bisel a la altura de los cotiledones, se sumergieron por el tallo en tubos de plástico de 50 mL que contenían: H₂O (plantas control) o disoluciones 1 mM de SA, GA, 2,4-DHBA o 2,4,6-THBA, según fuera el caso. La tercera y cuarta hojas de los explantes fueron tomadas como muestra a los tiempos indicados.

Por otra parte, para estudiar la inducción del gen *Tw1* en plantas de tomate 'Moneymaker' se realizaron tratamientos con SA, 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA como se describe en O'Donell *et al.* (1998). Al igual que en los casos anteriores, se emplearon plantas de 4 ó 5 semanas cortadas en bisel a la altura de los cotiledones. A continuación, los tallos de los explantes se sumergieron en disoluciones 2 mM de SA, 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA y H₂O. Transcurridos 30 min, los explantes se transfirieron a agua destilada, momento en el que se inició el estudio de la cinética de inducción. La tercera y cuarta hojas de los explantes fueron tomadas como muestra a los tiempos indicados (0, 30 min, 1, 4, 8 y 24 horas después de transferir los explantes a agua).

2.2. Tratamientos de plantas de *Gynura aurantiaca*

Los tratamientos de plantas de *Gynura aurantiaca* se realizaron mediante pulverización con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.4 (plantas control), una disolución de SA 1 mM en tampón fosfato o una disolución de GA 2 mM preparado en el mismo tampón. Se añadió como humectante un 0.05% (v/v) de Tween 20 para mejorar la absorción foliar de los compuestos aplicados. El lote de plantas de *Gynura* a tratar se dividió en tres grupos equivalentes que se rociaron con soluciones de SA, GA o tampón. Los tratamientos se repitieron cada dos días hasta el final del experimento.

2.3. Tratamientos de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Los tratamientos con SA y GA de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 control y transgénicas GAGT se llevaron a cabo rociando y regando plantas de un mes de edad, en estado de roseta, con disoluciones 1 mM de SA y GA. Transcurridas 24 horas desde el inicio del tratamiento tuvo lugar la recogida de muestras, que se realizó tomando plantas enteras, a excepción de la raíz.

2.4. Tratamientos de herida en plantas de tomate

Los tratamientos de herida en plantas de tomate 'Moneymaker' fueron realizados con plantas de 3 a 4 semanas de edad, hiriendo los folíolos de la tercera y cuarta hoja de cada planta con ayuda de unas pinzas, según se describe en Lisón *et al.* (2006). Las muestras se recogieron a los tiempos indicados (0, 4, 12 y 24 horas) después de producirse la herida.

3. Inoculación del material vegetal

3.1. Inoculación de plantas de tomate con el virus del Mosaico del Tomate (ToMV)

Las inoculaciones de plantas de tomate 'Rutgers' con ToMV se llevaron a cabo como se describe en Bellés *et al.* (1999). Para la preparación del inóculo, se homogeneizó 0.5 g de tejido foliar de tomate infectado y liofilizado, en 10 mL de tampón de inoculación (tampón fosfato 10 mM pH 7.2, ácido dietilditiocarbámico al 0.2% (p/v), 2-mercaptoetanol 2 mM). El homogeneizado se filtró a través de Miracloth y se empleó directamente como solución de inoculación. La mitad de las plantas fueron inoculadas con ToMV mientras la otra mitad se utilizaron como plantas control de la infección. Después de espolvorear con carborundum el haz de la primera hoja verdadera de cada una de las plantas que iban a ser infectadas, se aplicó la solución de inoculación con la ayuda de un pincel suave, realizando así pequeñas abrasiones que permiten la entrada del virus. Las plantas control se trataron de igual modo, empleando únicamente tampón de inoculación. Tras la infección con ToMV, las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones controladas, a una temperatura de 24 °C, con una humedad relativa del 50-70% y un fotoperiodo de 12 horas de luz (550-750 luxes) y 12 horas de oscuridad.

Las muestras, tanto de las plantas infectadas como de las plantas control, fueron tomadas a los tiempos indicados en cada caso, recogiendo por separado las hojas inoculadas (muestras locales) y las hojas inmediatamente superiores a éstas (muestras distales).

3.2. Inoculación de plantas de tomate con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd)

Para la inoculación de plantas de tomate 'Rutgers' con CEVd se emplearon plántulas de 10 días de edad, a las que se inyectó 50 ng de viroide en el punto de inserción de los cotiledones, previamente obtenido a partir de material infectado, tal y como se describe en Granell *et al.* (1987).

3.3. Inoculación de plantas de *Gynura* con CEVd

Para el estudio del efecto de la aplicación exógena de SA y GA sobre la infección con CEVd, se partió de plantas de *Gynura* previamente tratadas, como se detalla en el apartado 2.2. A los dos días de tratamiento, se efectuó la inoculación de las plantas con CEVd, dejando una planta de cada tratamiento como control sin infectar. La inoculación se realizó en esquejes enraizados de 4 semanas de edad, mediante dos pequeños cortes en la parte superior del tallo con una cuchilla conteniendo aproximadamente 50 ng de viroide, tal y como se describe en Conejero y Granell (1986). Las plantas control de la infección se trataron de igual modo, exceptuando la adición de inóculo de CEVd a la cuchilla.

Se realizó un seguimiento de la aparición de síntomas de infección viroidal, como son la epinastia y la reducción del crecimiento (Conejero y Granell, 1986).

3.4. Inoculación de plantas de tomate con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y determinación del crecimiento bacteriano

Se emplearon dos cepas bacterianas: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) *AvrPto*, portadora del gen de avirulencia *Pto*, y *Pst* DC3000 Δ *AvrPto*, que carece de dicho gen, para inocular plantas de tomate variedad 'Rio Grande' *Pto*, de aproximadamente un mes de edad, en estado de 4-5 hojas verdaderas. Para la preparación del inóculo, las bacterias crecieron durante la noche a 28 °C en placas Petri de 20 mL que contenían medio King B (*Pseudomonas* F agar) (Pronadisa) preparado según las recomendaciones del fabricante, suplementado con 100 μ L de rifampicina (50 mg/mL). A continuación, una colonia aislada fue transferida a 15 mL de medio King B líquido (por cada 1000 mL de medio KB: 40 g de proteosa de peptona, 20 g de glicerol, 980 mL de agua, 10 mL de K_2HPO_4 al 10 % y 10 mL de $MgSO_4$ al 10 %) y crecida durante la noche en agitación a 28 °C. El cultivo bacteriano resultante fue sedimentado por centrifugación y resuspendido en $MgCl_2$ 10 mM hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1 a 600 nm. Se realizó un contaje de la suspensión mediante

diluciones seriadas en placa con el fin de determinar la concentración del inóculo final, correspondiente a una densidad de aproximadamente 1×10^7 unidades formadoras de colonia por mL (CFU/mL). Se preparó 1 L de suspensión bacteriana para llevar a cabo la infección de las plantas de tomate mediante inmersión (adaptado de Scalschi *et al.*, 2013). Para ello las plantas se sumergían individualmente en la suspensión bacteriana hasta la base del tallo y durante 30 segundos. Las plantas empleadas como control se sumergieron en una solución estéril de MgCl_2 10 mM. La tercera y cuarta hojas de cada planta fueron tomadas como muestra a las 0, 10, 18, 24, 36 y 48 horas desde el momento de la inoculación.

Plantas de tomate variedad 'Moneymaker' así como plantas transgénicas THT de un mes de edad se inocularon con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ΔAvrPto de forma similar a como se indica en el párrafo anterior, salvo que en este caso la infección se llevó a cabo con una concentración bacteriana de 1×10^5 CFU/mL. Se infiltró 100 μL de la suspensión bacteriana en el lado abaxial de los folíolos de la tercera y cuarta hoja de cada planta empleando una jeringa de plástico estéril de 1 mL sin la aguja, como se describe en Collinge *et al.* (1987). Los folíolos equivalentes de las plantas empleadas como control fueron infiltrados con una solución estéril de MgCl_2 10 mM. La toma de muestras tuvo lugar a las 0, 24 y 48 horas desde el momento de la inoculación.

Para la determinación del crecimiento bacteriano *in planta*, se tomaron 3 discos (1 cm^2 cada uno) de hoja infectada de cada planta, de un total de cinco plantas por línea y por tiempo, a las 24 y 48 horas después de la infección (adaptado de Coego *et al.*, 2005). Los tres discos se maceraron en MgCl_2 10 mM y a continuación se realizaron diluciones seriadas, que fueron sembradas en placa de cultivo con medio King B suplementado con rifampicina (50 mg/mL) y se mantuvieron a 28 °C durante 2 días. La densidad de las poblaciones bacterianas para cada planta se determinó por conteo de las unidades formadoras de colonias (CFU) en placa.

3.5. Inoculación de plantas de *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y determinación del crecimiento bacteriano

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 control y plantas transgénicas NahG y GAGT, de aproximadamente un mes de edad, fueron infectadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 portadora del gen de avirulencia *AvrRpmI*, reconocido por la planta. La preparación del inóculo se realizó de igual modo a como se detalla en el apartado anterior, si bien esta vez la infección se llevó a cabo con una concentración bacteriana de 5×10^7 CFU/mL. Alícuotas de la suspensión bacteriana fueron inyectadas en el lado abaxial de las hojas con una jeringa de plástico estéril de 1 mL. Se infiltraron un total de 4 hojas/planta, con 4-6 plantas por línea y por tiempo. La recogida de muestras tuvo lugar a las 0, 4 y 24 horas post-inoculación (hpi).

Para la determinación del crecimiento bacteriano *in planta*, se infiltraron 4 hojas/planta de un total de 5 plantas/línea, esta vez con una concentración bacteriana de 5×10^5 CFU/mL. La recogida de muestras se realizó tomando de cada planta 4 discos (0.5 cm^2 cada uno) de las hojas infectadas, a los 3 días post-inoculación. Transcurridos 2-3 días se cuantificó el crecimiento bacteriano que se había producido en cada planta, mediante conteo de unidades formadoras de colonias en placa con medio KB suplementado con rifampicina (50 mg/mL) a 28 °C.

4. Toma de muestras

En general, la toma de muestras del material vegetal se realizó recogiendo entre 0.3 y 0.5 g de tejido por planta, a los tiempos indicados en cada caso. El material se recogió sobre nitrógeno líquido, fue inmediatamente pulverizado en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y almacenado a -80 °C hasta el momento de realizar los distintos ensayos.

En el caso de plantas de tomate, se han analizado tres tipos de material vegetal: hojas, flores y frutos. Para tejidos de hoja, se tomaron como muestra la tercera y cuarta hoja de plantas de 3 a 4 semanas de edad, en el estadio de cinco a seis hojas. En cuanto a las flores, éstas fueron recogidas en el estadio de antesis, desde el pedúnculo de la flor. La toma de muestras de frutos se realizó cuando el tomate estaba maduro (rojo). Cada fruto fue lavado y cortado para extraer las semillas y las placentas, consistiendo la muestra de la parte carnosa del fruto (mesocarpio y endocarpio) exclusivamente.

Para llevar a cabo los experimentos de expresión transitoria se emplearon plantas de *Nicotiana benthamiana*, de aproximadamente un mes de edad. La recogida de muestras se realizó tomando las 4 hojas que habían sido agroinfiltradas en cada planta.

En este trabajo también se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana*, de un mes de edad, en estadio de roseta. Se recogieron un total de 4 hojas por planta, salvo en el caso de tratamientos de *Arabidopsis* con GA y SA, en el que se tomaron plantas enteras, exceptuando la raíz.

5. Plásmidos y cepas bacterianas utilizados

En la realización del presente trabajo se ha empleado el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen), que presenta como factor de selección la resistencia a espectinomicina, junto al plásmido destino pGWB8 (Nakagawa *et al.*, 2007). El plásmido pGWB8, que tiene como factor de selección la resistencia a kanamicina posee, por un lado, el promotor constitutivo 35S del virus CaMV (CaMV 35S) para la sobreexpresión del gen y, por otro, un *tag* o "cola" de histidinas (His₆). Su traducción da lugar a una proteína recombinante con una extensión de seis residuos de histidina en su extremo C-terminal, lo que permite su inmunodetección con un anticuerpo anti-His, así como su purificación por cromatografía de afinidad en columna de níquel.

Por otra parte, se ha empleado el vector pGEM-T Easy, que confiere resistencia a ampicilina, junto con los plásmidos pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001) y pART27 (Gleave, 1992). El plásmido pHANNIBAL (pHAN), que también otorga resistencia a ampicilina y contiene el promotor constitutivo CaMV 35S, fue diseñado para que un fragmento de cDNA de un determinado gen a silenciar pudiera ser insertado en orientación sentido y antisentido en los sitios de clonaje múltiple *XhoI.EcoRI.KpnI* y *Clal.HindIII.BamHI.XbaI*, respectivamente. La construcción resultante da lugar a una horquilla o *hairpin* (hpRNA), con un *lazo* de entre 30-50 pares de bases (pb), dependiendo de los sitios de restricción seleccionados para insertar los fragmentos. Empleando construcciones hpRNA que contienen fragmentos en sentido/antisentido de 100 a 800 pb, separadas por un intrón, se ha obtenido un silenciamiento génico muy eficaz en gran variedad de especies, como se describe en Wesley *et al.* (2001). Por último, las construcciones obtenidas en pHAN se subclonaron en el vector binario pART27, con el fin de llevar a cabo la transformación de la especie vegetal sobre la que se pretende estudiar el fenómeno de silenciamiento. El plásmido pART27 presenta como factor de selección la resistencia a espectinomicina y como marcador selectivo el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPT II), que confiere resistencia a kanamicina.

Asimismo, en este trabajo se ha empleado el vector pBI121 portador del isogen *THT1-3* de tomate, pBI_*THT*, generado con anterioridad en nuestro laboratorio (Zacarés, 2008).

Por último, para llevar a cabo los experimentos de expresión transitoria se utilizó el plásmido p19 (cedido amablemente por el Dr. Diego Orzáez, IBMCP), que codifica la proteína supresora del silenciamiento p19 (Lakatos *et al.*, 2004).

Las cepas bacterianas empleadas fueron: quimiocompetentes de *Escherichia coli* *One Shot* TOP10 (Invitrogen) así como *E. coli* DH5 α , para manipulaciones rutinarias de DNA; *E. coli* DB3.1 (Invitrogen), para la propagación de los vectores destino que contienen el gen *ccdB*, resistente a los efectos de la proteína CcdB; *Agrobacterium tumefaciens* ElectroMAX LBA4404 (Invitrogen), para la transformación de tomate, y,

por último, *A. tumefaciens* C58, para los experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* y la transformación genética de *A. thaliana*.

6. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

6.1. Purificación de plásmidos bacterianos

Para la extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (*mini-preps*) se siguió el procedimiento de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). Alternativamente, se empleó el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche), en el caso de que las muestras fueran destinadas a secuenciación.

6.2. Digestión de plásmidos con enzimas de restricción

Las digestiones de plásmidos con enzimas de restricción se realizaron atendiendo a las recomendaciones de los respectivos proveedores. Se digirió 1 µg de DNA en presencia de 10 U de enzima, empleando el tampón específico para cada endonucleasa, en un volumen final de 30 µL, incubando durante 2-3 horas a 37 °C.

6.3. Aislamiento y manipulación de DNA de plantas

El DNA total de plantas fue extraído empleando el método Rogers y Bendrich (1998), siendo cuantificado por la medida de la absorbancia a 260 nm y posterior confirmación en gel de agarosa.

6.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Como patrón de la longitud en pares de bases de las secuencias de DNA se utilizó el marcador Lambda DNA/*EcoR* I+*Hind* III (Fermentas). La electroforesis

se desarrolló a 80-100 V, dependiendo del tamaño del gel, durante el tiempo necesario para el avance de las muestras. Una vez finalizada la separación, tras haber recorrido el colorante unas 3/4 partes del gel, se visualizó el DNA por exposición a luz UV y se fotografió.

La elución del DNA de estos geles de agarosa para su clonaje en los distintos vectores se realizó utilizando el kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN).

6.5. Extracción de RNA total de plantas

La extracción de RNA de diferentes tejidos de la planta se llevó a cabo empleando el reactivo TRIzol (Gibco BRL Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evitar la degradación del RNA, las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso y las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. En los análisis de transcripción reversa se utilizaron 5 µg de RNA total, cuantificado por A₂₆₀. Se empleó para ello un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000.

6.6. Reacciones de amplificación semicuantitativa (RT-PCR)

Para llevar a cabo la transcripción reversa acoplada a amplificación específica de secuencias (RT-PCR), se partió de 5 µg de RNA total en un volumen final de reacción de 50 µL. Se añadió 2 µg del oligonucleótido dT₁₈, 10 µL de tampón de reacción 5X y agua tratada con DEPC hasta un volumen de 44 µL. La solución se mantuvo durante 10 min a 65 °C para desnaturalizar los ácidos nucleicos, pasando inmediatamente después los tubos a hielo otros 10 min. A continuación, se añadió una mezcla equimolar de desoxirribonucleótidos (dNTPs) a una concentración de 2.5 mM cada uno y 200 unidades (1 µL) del enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega). Después de agitar, se incubó la solución a 42 °C durante 1 h y posteriormente se inactivó el enzima calentando a 70 °C durante 10 min. La reacción se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L, empleando en cada reacción 5 μ L de la reacción de RT, 1 μ L de cada cebador, 5 μ L de dNTPs 2.5 mM, 5 μ L de tampón de reacción 10X y 2 unidades de DNA polimerasa (Netzyme, NEED). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 min de desnaturalización a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de apareamiento a 55 °C y 1 min de extensión a 72 °C, terminando con un paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Se utilizó para ello un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 1.

Nombre del gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>GAGT-His</i>	ATGACTACTCACAAAGCTCATTGC	ATGATGATGATGATGATG
<i>RPL2</i>	GGTGACCGTGGTGTCTTTGC	ACCAACGTTTTGTCCAGGAGGT
<i>GAGT</i>	TGCCATATCCAGTCCAAGGT	CGAATTTGAAATCCAGGAA
<i>Tw1-His</i>	ATGGGTCAGCTACATTTTTTC	ATGATGATGATGATGATG

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa.

6.7. Reacciones de amplificación cuantitativa (qRT-PCR)

Posteriormente a su extracción, el RNA se precipitó mediante la adición de un volumen de LiCl 6 M. Transcurridas 2-3 horas, el sedimento fue lavado con LiCl 3 M y disuelto en agua libre de RNasa. Finalmente, para eliminar posibles contaminantes de DNA genómico, se añadieron 2 unidades de TURBO DNasa (Ambion) por cada μ L de preparación de RNA. El análisis de RT-PCR cuantitativa se realizó como se describe en Campos *et al.* (2014a). Se empleó 1 μ g de RNA total para obtener el correspondiente cDNA, haciendo uso de oligo dT18 y el kit de reactivos PrimeScript RT (*Perfect Real Time*, Takara), según el protocolo del fabricante. El ensayo de PCR cuantitativa se llevó

a cabo en presencia de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y la amplificación fue monitorizada en tiempo real con el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Life Technologies). En el caso de muestras procedentes de tomate, el gen *Factor de elongación 1 alfa* (eEF1 α) se utilizó como referencia interna del experimento. Cuando las muestras analizadas eran de *Arabidopsis*, se empleó como control interno un gen de la familia *SAND* (*At2g28390*). Los cebadores empleados para PCR cuantitativa se muestran en la Tabla 2.

Nombre del gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>ToDCL1</i>	CAGCACATGCAAAGAGGTTT	CGGAATCCTTGGCTTTCTTT
<i>ToDCL2</i>	CAAGGCACTTTCCCATGAAT	TTAGCGCTTCAACAAGCAGA
<i>ToDCL4</i>	TCATTTGAACCCGACCACTT	CTGTTCCGCTACCACACAGA
<i>ToRDR1</i>	CCATGAGTGATCCATGCAAA	ATTCTTTAGGGCGCAACTGA
<i>ToRDR2</i>	TTCATTCAATGGCTGTGGAC	TCCCACCTCTCCATGAAATC
<i>ToRDR6</i>	AGGGAGTGACCTTGATGGTG	ACTGTTTGGCTTCTGCAGGT
<i>ToPR-1</i>	ACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCA	AGTAAGGACGTTGTCCGATCCAGT
<i>ToP23</i>	TTCGAGGTACGCAACAACCTG	TGCATTGATGACCCATGTTT
<i>Toactina</i>	CTAGGCTGGGTTGCGAGGAGATGATGC	GTCTTTTTGACCCATACCCACCATCACAC
<i>ToTHT</i>	CCCCTTTTGACGAACCTAAA	TTTGGATCGGAATTCCTCAA
<i>ToeEF1α</i>	CCACCTCGAGATCCTAATGG	ACCCTCACGTATGCTTCCAG
<i>AtPR1</i>	GGAGCTACGCAGAACAACTAAGA	CCCACGAGGATCATAGTTGCAACTGA
<i>At2g28390</i>	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
<i>ToGAGT</i>	TACGATCCAAACGCGTTAAA	AGCCATCAGATATGGCCTCA
<i>ToTwi1</i>	GGATGCGAAGAGCTATGGAG	CGGACCAATAGCCCAATTTT

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa. *To*: genes de tomate; *At*: genes de *Arabidopsis*.

6.8. Secuenciación de DNA

La secuenciación de los diferentes clones se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación del IBMCP, utilizando didesoxinucleótidos (terminadores) marcados con compuestos fluorescentes (Prober *et al.*, 1987). Los productos marcados se resolvieron en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Los datos proporcionados por el secuenciador se refinaron mediante el programa CHROMAS (<http://www.technelysium.com.au>) para la resolución de posibles indeterminaciones.

7. Diseño de las construcciones y técnicas de clonaje

7.1. Construcciones para la sobreexpresión de los genes *GAGT* y *Tw1*

Para la obtención de las construcciones correspondientes a la sobreexpresión de distintas proteínas de fusión se empleó el sistema Gateway de Invitrogen. Concretamente, se utilizó la reacción LR catalizada por el enzima LR Clonase, que facilita la recombinación de un sustrato *attL* (clon de entrada) con un sustrato *attR* (vector de destino), para crear un clon de expresión conteniendo sitios *attB*.

En primer lugar, se realizó una amplificación mediante PCR, en un volumen final de 50 μ L, de las secuencias a insertar. La mezcla de reacción estaba compuesta por 5 μ L de Ex Taq Buffer, 4 μ L de dNTPs (2.5 mM), 2 μ L de cada uno de los cebadores directo y reverso (1 μ g/ μ L), 2 μ L de TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase (Takara) y, como molde, 5 μ L de cDNA obtenido por retrotranscripción (apartado 6.6) de mRNA de hojas de tomate embebidas en SA o infectadas con CEVd. En cuanto al enzima empleado, se trata de una DNA polimerasa de alta fidelidad que presenta la particularidad de añadir un nucleótido extra de adenina en ambos extremos, 5' y 3', del cDNA que se está copiando y que resulta imprescindible para el siguiente paso del clonaje. Los cebadores específicos empleados para amplificar el cDNA correspondiente a la glicosiltransferasa de ácido gentísico (*GAGT*) fueron: directo (5'-ATGACTACTCACAAAGCTCATTGC-3') y reverso (5'-GGAAATAGTAACCAACTTGG-3') (Tárraga *et al.*, 2010). Los utilizados para amplificar el cDNA de la proteína de tomate inducida por herida (*Tw1*) fueron: directo (5'-ATGGGTCAGCTACATTTTTTC-3') y reverso (5'-TTAACGATATGAAGTTATGTC-3'). Por lo que respecta a las condiciones de PCR, ésta consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 10 min a 94 °C, seguida de 33 ciclos de amplificación compuestos por una primera etapa de desnaturalización de 30 s a 94 °C, una segunda etapa de hibridación de 45 s a 55 °C, y una tercera etapa de elongación de 1.5 min a 72 °C. Tras el último ciclo se finalizó la reacción con una etapa de extensión de 5 min a 72 °C.

A continuación, los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen), generándose así lo que se denomina un *clon de entrada*. La reacción se llevó a cabo incubando 4 μ L del producto de PCR con 1 μ L del

vector TOPO y 1 μL de solución salina (NaCl 1.2 M y MgCl_2 0.06 M), debido a que las células a transformar son *E. coli* químicamente competentes. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la reacción se mantuvo en hielo hasta el momento de la transformación bacteriana. Alternativamente, ésta puede almacenarse a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. La comprobación de que el cDNA de interés se había insertado en el plásmido se realizó mediante digestión con el enzima *EcoRI*, que libera el inserto completo.

Una vez obtenido el clon de entrada (pCR8/GW/TOPO_*GAGT* y pCR8/GW/TOPO_*Twi1*) se procedió a la reacción de recombinación LR para transferir el inserto del vector de entrada al vector destino. Para producir la reacción LR entre los vectores TOPO recombinantes, portadores de los diferentes cDNAs, y los vectores destino, se realizaron las siguientes mezclas de reacción: 3 μL de vector TOPO (*GAGT* o *Twi1*) en TE (50 ng/ μL), 3 μL del vector destino pGWB8 en tampón TE (50 ng/ μL) previamente linearizado con el enzima de restricción *XhoI* para mejorar la eficiencia en el clonaje, 2 μL de 5X LR Clonase Reaction Buffer y 2 μL del enzima LR Clonase. Las distintas mezclas de reacción se incubaron toda la noche a $25\text{ }^\circ\text{C}$, y posteriormente se añadió 1 μL de Proteinasa K (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para terminar la reacción. Finalmente, las muestras se incubaron 10 min a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y se procedió a la transformación de *E. coli*. De esta forma se obtuvieron las construcciones pGWB8_*GAGT* y pGWB8_*Twi1*, que se esquematizan en la Figura 8.

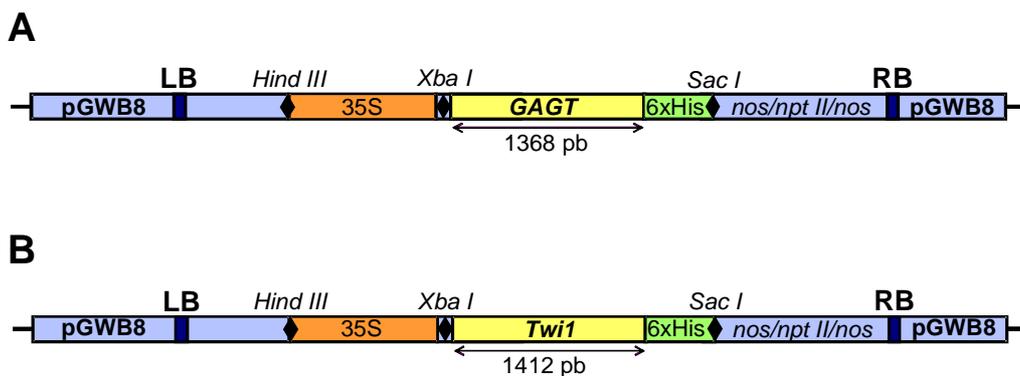


Figura 8. Obtención de los clones de expresión para *GAGT* y *Twi1*. A) Construcción de pGWB8_*GAGT* y pGWB8_*Twi1*. El promotor 35S dirige la expresión del cDNA de los genes *GAGT* y *Twi1*. Se señala la longitud de los distintos cDNAs clonados. LB: borde izquierdo del plásmido binario; RB: borde derecho del plásmido binario.

7.2. Construcción para el silenciamiento del gen *Tw1*

Para llevar a cabo el silenciamiento de *Tw1* en planta, se emplearon los plásmidos pGEM-T easy, pHANNIBAL (pHAN) y pART27. El clonaje se realizó mediante el método clásico, basado en el corte con enzimas de restricción y posterior ligación.

Partiendo de la secuencia completa de cDNA de *Tw1*, se seleccionó un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases. Se eligió una secuencia incluida en la región consenso PSPG, y a continuación se llevó a cabo el diseño de cebadores.

Los cebadores fueron diseñados de forma que en una sola reacción de PCR se introdujeran 2 sitios de restricción por cada oligonucleótido empleado. Dichos sitios de restricción no deben estar presentes en la secuencia del gen seleccionada para amplificar. Los cebadores diseñados para la amplificación de *Tw1* fueron: oligo directo: 5' GGCTCGAGTCTAGAGAAATCAAGTTCATTGTTTAT 3' y oligo reverso: 5' CCGAATTCGGATCCACTTCTCATTGAAAAAC 3'. A continuación se realizó una amplificación por PCR con este par de oligonucleótidos, como se describe en el apartado 6.6. Como molde se empleó 1 µL del producto de PCR obtenido en el apartado anterior. Los nuevos productos de PCR fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy (pGEM_*Tw1*).

En la primera etapa del clonaje, el plásmido pGEM_*Tw1* y el plásmido pHAN fueron digeridos con los enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*. A continuación, los productos de ambas digestiones fueron separados en geles de agarosa al 1%. Una vez purificados, se clonó el fragmento de *Tw1* flanqueado por los extremos *XbaI* y *BamHI* en el vector pHAN digerido con estos mismos enzimas, obteniéndose el vector al que denominamos pHAN_*Tw1* A. En una segunda etapa, el plásmido pGEM_*Tw1* fue digerido con los enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*. A su vez, el vector pHAN_*Tw1* A fue linearizado con los enzimas *XhoI* y *EcoRI*. Del mismo modo a como se produjo en la primera etapa, el fragmento *XhoI-EcoRI* de *Tw1* fue clonado en el vector pHAN_*Tw1* A, dando lugar al vector pHAN_*Tw1* B. La construcción obtenida en el vector pHAN_*Tw1* B dará lugar a una horquilla o *hairpin* (hpRNA) que contiene fragmentos en

sentido/antisentido de aproximadamente 300 pb separadas por un intrón, y que desencadenará el silenciamiento de *Twil* *in planta*.

En la tercera y última etapa del clonaje, la construcción obtenida en pHAN, pHAN_*Twil* B, se subclonó como un fragmento *SacI-SpeI* (*SpeI=BcuI*) en el vector binario pART27 linearizado con estas mismas enzimas, dando lugar al vector binario pART27_*Twil*.

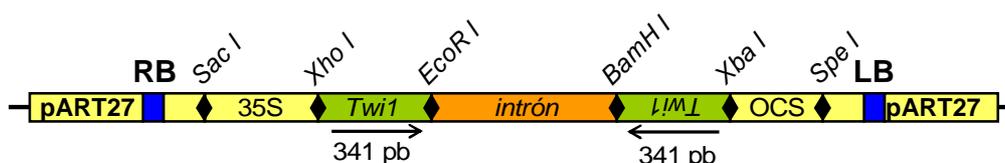


Figura 9. Obtención del clon para el silenciamiento de *Twil*. Construcción de pART27_*Twil*. El promotor 35S dirige la expresión de los fragmentos del cDNA del gen *Twil*, clonados en sentido y antisentido. Se señala la longitud de los distintos fragmentos de cDNA clonados. LB: borde izquierdo del plásmido binario; RB: borde derecho del plásmido binario.

7.3. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de las células competentes *E. coli One Shot TOP10* (Invitrogen) se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. Se mezclaron 10 μL de cada una de las recombinaciones Gateway con 50 μL de una suspensión concentrada de células TOP10. Las mezclas se incubaron durante 30 min en hielo. A continuación se sometieron a un choque térmico de 30 s a 42 $^{\circ}\text{C}$ y se pasaron a hielo durante 2 min. Seguidamente se añadió 1 mL de medio LB (1% de bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura bacteriológico y 1% de NaCl) para su incubación durante 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Transcurrido ese tiempo, las mezclas de transformación se centrifugaron durante 5 min a 8000 rpm. Los precipitados celulares fueron resuspendidos en 100 μL y se sembraron en medio LB-agar conteniendo el antibiótico de selección adecuado (espectinomicina a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las distintas placas de cultivo se incubaron toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Por otra parte, la obtención de células competentes de *Escherichia coli* (*DH5 α*) se realizó mediante tratamiento con metales divalentes y su transformación se llevó a

cabo mediante un choque térmico a 42 °C, según el método descrito por Hanahan (1986) y modificado por Ausubel *et al.* (1995).

8. Manipulación de proteínas

8.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

La separación electroforética de proteínas se realizó según el sistema discontinuo descrito por Conejero y Semancik (1977) empleando geles de poliacrilamida al 14%. Típicamente, el material de partida era medio tubo Eppendorf de tejido foliar congelado a - 80°C y pulverizado. El tejido se homogeneizó con ayuda de una varilla de punta cónica en 500 µL de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 15 mM. Tras centrifugar durante 10 min a 12.000 rpm y 4 °C, se tomaron 300 µL del sobrenadante a los que se añadieron 150 µL de tampón de carga de electroforesis 3X y 20 µL de mercaptoetanol. La mezcla se calentó a 95 °C durante 5 min para provocar la desnaturalización de las proteínas, y se aplicaron 50 µL de muestra por carrera. Se cargó, además, un marcador de peso molecular (PageRuler, Fermentas) para la posterior identificación de las bandas proteicas. La electroforesis se desarrolló a 30 mA durante 2-3 horas en tampón TrisHCl 25 mM, glicina 250 mM y SDS al 0.1%.

Finalizado el proceso, los geles se tiñeron con una solución colorante (Azul Coomassie 0.05%, en ácido acético 10% e isopropanol 20%) durante varias horas y se destiñó con solución decolorante (ácido acético 10%, isopropanol 10%), manteniendo en agitación durante varias horas hasta eliminar la tinción de fondo.

8.2. Western blot

Para llevar a cabo la transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa (OPTITRAN, Schleicher & Schuell), se siguió una variante "semi-seca" del método de Towbin *et al.* (1979). Para ello, tanto el papel Whatman

como los geles de poliacrilamida y las membranas de nitrocelulosa se humedecieron previamente en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 186 mM, SDS 0.02% y metanol al 20%). El montaje se realizó de forma sumergida, procurando evitar la formación de burbujas. La transferencia se llevó a cabo en el seno del mismo tampón, a temperatura ambiente, haciendo uso de una célula de electrotransferencia (Hoefer Semiphor) y aplicando el miliamperaje especificado en las instrucciones del fabricante ($I \text{ (mA)} = 0.8 \times \text{área del gel en cm}^2$) durante 1.5 h. Para comprobar la correcta transferencia de las proteínas, se tiñeron éstas de manera reversible con una solución de Ponceau S (Sigma) al 0.1% en 5% de ácido acético durante 1-2 min a temperatura ambiente. Para desteñir las proteínas se realizaron 2 lavados con tampón de transferencia.

Los centros de unión libres de las membranas de nitrocelulosa se saturaron mediante incubación con una solución bloqueante (TBS 1X, Tween 20 al 0.05% y 2% de leche en polvo desnatada) durante toda la noche a 4 °C en agitación suave.

8.3. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana

Para llevar a cabo la detección inmunológica de la proteína recombinante GAGT, se incubó en primer lugar la membrana durante 1 h en agitación suave con una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal de ratón Anti-His (Novagen) en TBS-L (TBS 1X y 5% de leche en polvo desnatada). Dicho anticuerpo es capaz de reconocer aquellas proteínas recombinantes que presenten una extensión de 6 residuos de histidina. A continuación se realizaron 4 lavados de 10 min con TBS y se procedió a la incubación de la membrana con una dilución 1:7500 del anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón (Promega) conjugado a fosfatasa alcalina, en TBS-L durante 1 h y agitación suave. Tras 4 lavados de 10 min con TBS, la membrana se equilibró durante unos minutos en tampón de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 60 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM y MgCl_2 5 mM, a un pH final de 9.0) y, seguidamente se procedió a la visualización del anticuerpo empleando NBT (nitroblue tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) como sustratos de la fosfatasa alcalina.

Para llevar a cabo la detección inmunológica de la proteína de defensa PR1 de tomate, se procedió del mismo modo que en el párrafo anterior, empleando en este caso un antisuero preparado en nuestro laboratorio contra la proteína PR1 de tomate, y como anticuerpo secundario el antisuero Anti-IgG de conejo de Promega conjugado a fosfatasa alcalina.

8.4. Purificación de la proteína Twi1 recombinante

Para llevar a cabo la purificación de Twi1 partimos de aproximadamente 4 g de tejido foliar de *N. benthamiana*, inoculado con el *Agrobacterium* portador de la construcción pGWB8_*Twi1* para la sobreexpresión de este gen en plantas, así como plantas control agroinoculadas con el plásmido pGWB8Ø. El material vegetal, congelado a -80 °C, se homogeneizó con mortero a 4 °C en presencia de tampón de extracción (fosfato de sodio 20 mM, 0.5 M de NaCl y 40 mM de imidazol, a pH 7.4, al que se añadieron 10 µL/mL de PMSF 1 mM y β-mercaptoetanol 0.2% (v/v)), a una relación de 2 mL de tampón por gramo de material. El homogeneizado se filtró a través de Miracloth (Calbiochem) y se clarificó por centrifugación a 10000 x *g*, a 4 °C durante 15 min. A continuación el sobrenadante se ultracentrifugó durante 5 min a 20000 x *g*. Por último, la muestra se pasó a través de un filtro de nylon de 4 mm y 0.45 µm de poro (Waters), obteniéndose así el extracto enzimático crudo.

El sobrenadante recuperado se sometió a purificación mediante FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) en el Servicio de Proteómica del IBMCP. La muestra se aplicó a una columna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences) y posteriormente se lavó con 2 mL de tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, 0.5 M de NaCl y 40 mM de imidazol, a pH 7.4) a un flujo de 1 mL/min. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente lineal de imidazol (40-500 mM en 30 mL del mismo tampón), midiendo la A_{280} a la salida de la columna y recogiendo fracciones de 500 µL en un colector automático RediFrac-1 (Amersham Pharmacia Biotech).

Se realizó un análisis electroforético (apartado 8.1) de todas las fracciones. Para ello, fracciones consecutivas fueron reunidas de tres en tres, se les añadió un volumen de ácido tricloroacético al 20% y se dejó precipitar las proteínas en hielo durante 1 hora. Tras recuperar el sedimento por centrifugación y lavar dos veces con acetona, las proteínas se resuspendieron en el volumen apropiado de tampón de muestras para SDS/PAGE.

Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos de actividad de aquellas fracciones en las que la absorbancia era significativa y diferencial frente a la muestra control. Previo a la realización del ensayo, estas fracciones fueron reunidas y filtradas por columnas PD-10 (Amersham Biosciences) equilibradas en el tampón de ensayo, con el fin de eliminar las sales y el imidazol presentes en la muestra.

8.5. Ensayo de actividad de la proteína Twi1 recombinante

Para llevar a cabo la reacción de conjugación se partió de 200 μ L del extracto proteico purificado, al que se añadió 2.5 μ L de una disolución 10 mM del hidroxibenzoato correspondiente y 4 μ L de una disolución 100 mM de uridín difosfato glucosa (UDP-Glc, Fluka) o uridín difosfato xilosa (UDP-Xyl, adquirida de CarboSource Services, Complex Carbohydrate Research Centre, University of Georgia, U.S.A.), según el sustrato donante de azúcar que se empleara. Los hidroxibenzoatos utilizados en el ensayo de actividad fueron: ácido benzoico, ácido 2 hidroxibenzoico (ácido salicílico), ácido 2,5 dihidroxibenzoico (ácido genticóico), ácido 2,4 dihidroxibenzoico, ácido 2,6 dihidroxibenzoico, ácido 2,4,6 trihidroxibenzoico, ácido 3,4 dihidroxibenzoico, ácido 3,5 dihidroxibenzoico y ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico (Sigma-Aldrich).

La reacción se incubó a 37 °C durante la noche, y se detuvo añadiendo un volumen de metanol al 100%. Posteriormente la muestra se pasó por un filtro de nylon de 4 mm y 0.45 μ m de poro (Waters). Se aplicaron 40 μ L para el análisis por HPLC o 5 μ L para el análisis por qToF.

9. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

9.1. Extracción de ácido salicílico (SA) y ácido gentísico (GA)

Cada muestra de tejido (0.3 - 0.5 g) se trituró en un mortero con nitrógeno líquido para facilitar su homogeneización, macerando después en 1.5 mL de metanol. A continuación, la muestra se trasvasó a tubos Eppendorf de 2 mL y se sometió a ultrasonidos durante 10 min para terminar de romper el tejido vegetal, facilitando así la extracción. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a viales de vidrio de 4 mL. El sedimento que quedó en el tubo Eppendorf fue resuspendido en 500 µL de metanol con ayuda de un *vortex*, para proceder a una segunda extracción y centrifugación en las mismas condiciones que la anterior. Se recuperó de nuevo el sobrenadante recogido de la segunda extracción juntándolo con el de la extracción anterior. El volumen total recuperado de ambas extracciones fue dividido en dos partes iguales en viales de vidrio de 4 mL, y secado en corriente de nitrógeno a una temperatura de 37°C. Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 900 µL del tampón enzimático acetato sódico 0.1 M, pH 4.5. A continuación, se añadió a la mitad de las muestras 100 µL de una disolución del enzima β-glucosidasa (Fluka) preparada a 10 mg/mL en este mismo tampón, con el fin de liberar el SA y GA que se encontrasen conjugados en forma de β-glucósidos. A la otra mitad de las muestras, destinadas a la extracción de SA y GA en forma libre, se añadió únicamente 100 µL de acetato sódico, sin el enzima. Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante la noche. Posteriormente, se adicionaron 77 µL de ácido perclórico (70% v/v) para alcanzar una concentración final del 5%, y a continuación se añadió 2.5 mL de una mezcla de acetato de etilo y ciclopentano (1:1, v/v), formándose dos fases inmiscibles. Los compuestos fenólicos de interés se concentraron en la fase orgánica superior, que se recogió y se secó con corriente de N₂ seco en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las muestras secas se resuspendieron en 300 µL de metanol y se filtraron con ayuda de una jeringa de 1 mL a la que se le acopló un filtro de nylon de 13 mm y 0.45 µm de poro (Waters). De este modo, las muestras quedaron preparadas para el análisis por HPLC de fluorescencia.

9.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales por HPLC

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los extractos metanólicos se hicieron siguiendo los protocolos descritos en Yalpani *et al.* (1993) y Bellés *et al.* (1999). De los 300 μL de metanol en los que se resuspendió el extracto metanólico final, se inyectaron 30 μL en una columna de fase reversa Sunfire C18 (5 μm , 4.6 x 150 mm; Waters, Mildford, MA) equilibrada con ácido acético al 1% (J. T. Baker). Se aplicó un gradiente de metanol (0 a 100%) durante 20 min, con un flujo constante de 1 mL/min. Los compuestos fenólicos se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una λ de excitación de 313 nm y un λ de emisión de 405 nm. Para su cuantificación se elaboraron curvas patrón con distintas muestras de concentración conocida. De forma sistemática se empleaba el ácido ortoanísico como patrón interno, añadiendo una cantidad conocida a ciertas muestras (100 μL de una disolución 0.0625 mM) al inicio de la extracción, con el fin de determinar el porcentaje de pérdida de muestra durante todo el proceso.

9.3. Extracción de HCAA

Cada muestra de tejido (0.5 g) se trituró en un mortero con nitrógeno líquido, para facilitar su homogeneización, macerando después en 1.5 mL de metanol. A continuación, la muestra se trasvasó a tubos Eppendorf de 2 mL y se sometió a ultrasonidos durante 10 min para terminar de romper el tejido, facilitando así la extracción. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min y a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a viales de vidrio de 4 mL. El sedimento que quedó en el tubo Eppendorf fue resuspendido en 500 μL de metanol con ayuda de un *vortex*, para proceder a una segunda extracción y centrifugación en las mismas condiciones que la anterior. Se recuperó de nuevo el sobrenadante recogido de la segunda extracción juntándolo con el de la extracción anterior. Las muestras se secaron en corriente de nitrógeno a una temperatura de 37°C. Las muestras secas se resuspendieron en 300 μL de metanol y se filtraron con ayuda de una jeringa de 1 mL a la que se le acopló un filtro de nylon de 13 mm y 0.45

μm de poro (Waters). Se procedió a otro secado y se resuspendió la muestra en un volumen final de 200 μL de metanol. De este modo, las muestras quedaron preparadas para el análisis por UPLC-PDA-QToF.

9.4. Cuantificación de HCAA por UPLC-PDA-QToF

De los 200 μL de muestra final, se inyectó una alícuota de 5 μL en una columna analítica de fase inversa Acquity BEH C18 Waters (2.1 mm \times 150 mm, Waters) equilibrada en ácido fórmico al 0.1% a 40 °C. Los eluyentes fueron ácido fórmico al 0.1% (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B). Se aplicó el siguiente gradiente: de 95% a 90% de A en 14 min, de 90% a 80% de A en 15 min, de 80% a 65% de A en 10 min, de 65% a 57% de A en 1 min, de 57% hasta 0% de A en 1 min. La columna se limpia con 100% de B durante 3 min, se vuelve a las condiciones iniciales de 95% de A en 1 min y se equilibra la columna 4 min antes de la siguiente inyección. La velocidad de flujo fue de 0.4 mL/min, aplicado con un sistema Acquity UPLC-PDA acoplado a Micromass Q-ToF mediante una interfaz de transferencia de datos ESI. Los parámetros de la fuente del espectrómetro de masas para ESI en modo negativo fueron los siguientes: fuente de tensión capilar 3000 V, tensión de cono 45 eV, temperatura de bloque 120 °C y 300 °C de temperatura del gas de desolvatación. El gas de desolvatación y cono utilizado fue nitrógeno, con un caudal de 50 L y 500 L/h, respectivamente. La energía de colisión fue fijada en 5 eV. La adquisición de datos se realizó en modo centroide en una gama de escaneo completo de masa para cargar un cociente m/z de 50 a 1500 con 0.52 s por escaneo. El espectrómetro de masas se calibró usando una mezcla de formiato de sodio (10 ng/ μL in 90:10 isopropanol:agua) para un intervalo de masas de 100 a 1500 Da. Todos los datos fueron adquiridos utilizando el software de Masslynx NT 4.1 (Waters Corp Mildford Corp., MA, USA).

10. Experimentos de expresión transitoria

Para llevar a cabo el análisis funcional *in planta* de las construcciones obtenidas, se realizaron experimentos de expresión transitoria por agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana*, siguiendo el método descrito en Yang *et al.* (2000). Para ello, dichas construcciones se introdujeron en la cepa C58 de *A. tumefaciens*, como se detalla en el siguiente apartado (11.1). Se creció un inóculo de 50 mL a 28 °C durante toda una noche. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en el medio de inducción (MES 10 mM a pH 5.6; MgCl₂ 10 mM y 150 µM de acetosiringona) llevándolas a una densidad óptica A₆₀₀ de 0.5. Finalmente, la suspensión de células se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 2 horas y se infiltró con una jeringa sin aguja en las 4 primeras hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* de aproximadamente un mes de edad. Transcurridos tres días desde la inoculación se procedió a la recogida de muestras del material agroinfiltrado de cada planta para llevar a cabo los ensayos correspondientes.

11. Preparación y manipulación de plantas transgénicas

11.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* (renombrado *Rhizobium radiobacter*) de la cepa C58 se llevó a cabo mediante choque térmico, siguiendo el método descrito por Bevan (1984). Las construcciones introducidas en C58 fueron: pGWB8_GAGT, pGWB8_Twi1, y pART27_Twi1 así como los plásmidos pGWB8, pART27 y p19.

Las células de *A. tumefaciens* ElectroMAX LBA4404 de Invitrogen se transformaron según las instrucciones del fabricante, mediante un electroporador Eppendorf 2510, aplicando 2.0 kV, 25 µF y 200 Ohm. Este procedimiento se empleó

para las construcciones *pBI_THT*, *pGWB8_GAGT* y *pART27_Twi1* así como los plásmidos *pBI*, *pGWB8* y *pART27*.

11.2. Transformación genética de plantas de Arabidopsis thaliana

La transformación estable de *Arabidopsis thaliana* con la construcción *pGWB8_GAGT* se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Clough y Bent (1998), mediante el cual se sumergen las flores y botones florales en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* C58 portador de la construcción de interés. A continuación, se cubren las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de la transformación. Después de 2 días de cocultivo, se realizan cortes en la bolsa para disminuir la humedad. Al día siguiente se retiran las bolsas y se mantienen las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas.

11.3. Obtención de líneas puras transgénicas de Arabidopsis thaliana

La selección de los transformantes se realizó mediante el protocolo propuesto por Harrison *et al.* (2006). Las plantas empleadas en la transformación se denominan plantas T_0 . Una vez obtenida la población de semillas transgénicas T_1 se esterilizan y se siembran en medio MS con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. Tras un periodo de estratificación las placas se transfieren a una cámara de crecimiento durante unas 2 semanas. Las plantas que no poseen el gen de resistencia, es decir, que no han sido transformadas, sufren un retraso en el crecimiento (debido a la presencia de antibióticos en el medio). Los transformantes (T_1) resistentes se desarrollan normalmente y se trasplantan, y entre 40 y 45 días después se recogen las semillas de cada línea (T_2), y se siembran del mismo modo que la generación T_1 . La selección de las líneas con una sola integración del transgén se fundamenta en la elección de la descendencia (población T_2) que se ajuste a una segregación con ratio 3:1 (3 resistentes: 1 sensible, que según las leyes mendelianas sería indicativo de tener una inserción). Una vez elegidas las líneas con

una inserción, se trasplantan para cada línea entre 5 y 15 plántulas resistentes a tierra, para obtener la siguiente generación (T_3), y así aislar de la misma forma individuos homocigotos para el transgén, que serían aquellos cuyas semillas fueran 100% resistentes al antibiótico de selección. Una vez seleccionadas las líneas T_3 se realizan los estudios fenotípicos y moleculares correspondientes.

11.4. Esterilización de semillas de Arabidopsis, germinación y aclimatación

Para esterilizar semillas de Arabidopsis se pesaron muestras de 40 mg de semillas (aproximadamente 2000 semillas) en tubos Eppendorf de 1.5 mL, que se introdujeron abiertos en un desecador. En el interior del desecador se colocó también un vaso de precipitado con 100 mL de lejía comercial al que se añadieron 3 mL de HCl 12 N. Se producen así vapores de cloro dentro del desecador que esterilizan las semillas.

Tras 4 horas de esterilizado, las semillas se sembraron en placas que contenían medio de germinación (Para 1 L: 2.2 g MS + vitaminas, 0.9 g de MES a pH 5.7 y 10 g de sacarosa, más 8 g de agar como gelificante) y en su caso el antibiótico de selección, kanamicina, a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Seguidamente las placas se dejaron en oscuridad a 4 °C durante 2 días, y a continuación se trasladaron a la cámara de cultivo, donde permanecieron de 7 a 10 días.

Transcurrido este tiempo, las plantas resistentes a kanamicina se trasplantaron a tabletas de turba prensada Jiffy-7 dispuestas en bandejas. En estas bandejas se añadió agua hasta formar una lámina de aproximadamente 1 cm de altura, y se cubrió con film transparente, con el fin de mantener una elevada humedad relativa. Este film se va retirando progresivamente, hasta que transcurridos 4-5 días se retira totalmente, cuando las plantas ya están aclimatadas.

11.5. Transformación de plantas de tomate

La transformación genética de tomate cultivar 'Moneymaker' (Tm2² ó tm2², resistente o susceptible a ToMV, respectivamente) con las diferentes construcciones utilizadas en este trabajo se llevó a cabo mediante cocultivo de explantes de cotiledón con *A. tumefaciens* LBA4404, según el método desarrollado por Ellul *et al.* (2003). Brevemente, el cultivo de explantes en medio con presión de selección dio lugar a la aparición de yemas. Tras subcultivos sucesivos, las yemas dieron lugar a callos. El subcultivo de los mismos se realizó mensualmente en el medio IKZ404010. El enraizamiento de los ápices obtenidos a partir de los callos se llevó a cabo en el medio de enraizamiento. Estos ápices fueron subcultivados y clonados en el mismo medio una vez al mes.

11.6. Obtención de semillas de tomate

Una vez se dispuso de varios clones enraizados de cada línea transgénica de tomate, se llevó a cabo el trasplante y aclimatación de los mismos al invernadero (T₀). Para ello, se pasaron éstos a maceta con una mezcla de vermiculita y turba, se les aplicó un riego abundante con solución nutritiva y se les colocó un vaso de plástico transparente invertido sobre cada uno de ellos. Transcurridos 2 días, se inclinó el vaso dejando un hueco que permitiera la disminución progresiva de la humedad relativa. A los cuatro días desde su trasplante se retiró el vaso, quedando la planta aclimatada.

Aproximadamente 4 meses después de pasarlas al invernadero, las plantas comienzan a fructificar, permitiendo la recogida de las semillas de la primera generación de cada una de las líneas (T₁). Los tomates se recolectan una vez están bien formados, dejando el cáliz en la mata. Las semillas se extraen y se dejan en agitación 1 día con agua y lejía al 10%. Una vez transcurrido este periodo, se pasan las semillas a una placa Petri y se dejan secar en estufa a 50 °C durante dos días. Una vez secas, las semillas se guardan en oscuridad, almacenadas en tubos Falcon con cristales de silicagel en una cámara refrigerada a 10 °C.

11.7. Esterilización de semillas de tomate y germinación

La esterilización de semillas de tomate se lleva a cabo mediante lavados en serie. Las semillas se envuelven en una tela de muselina o Miracloth. Se realizan un total de cuatro lavados en botes de vidrio autoclavados. El primero de ellos contiene una mezcla 1:1 de lejía y agua, a la que se le añade un 0.05% (v/v) de Tween-20 para romper la tensión superficial del líquido. Las semillas, dentro de su envoltorio, se mantienen 30 min en este medio, agitando suavemente cada 5 min. Los tres lavados siguientes son con agua, manteniendo sumergidas las semillas 5, 10 y 15 min, respectivamente, para eliminar gradualmente los restos de lejía del primer lavado.

Una vez esterilizadas, las semillas se siembran en botes de vidrio que contienen medio de germinación (Para 1 L: 4.3 g de sales minerales y 10 g de sacarosa en H₂O a pH 5.7, al que se añaden 8 g de agar). En el caso de tener que seleccionar plantas transgénicas que expresen el gen de resistencia a kanamicina en planta (NPT II), a este medio de germinación previamente autoclavado se le añade kanamicina estéril en una proporción de 50 mg/L.

Transcurridos entre 10-15 días desde la siembra, momento en el que ya se diferencian claramente las plántulas resistentes a kanamicina, éstas fueron trasplantadas y aclimatadas en el invernadero, de igual modo a como se ha descrito en el apartado 11.6.

12. Medida de la actividad b-glucuronidasa

El estudio *in situ* de la actividad β -glucuronidasa en plantas transgénicas de tomate se realizó según se describe en Jefferson (1987). Para ello, los tejidos frescos fueron infiltrados a vacío durante 25 minutos en una solución conteniendo 0.5 mg/ml de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónico) y 0.1% de Tritón X-100 en

tampón fosfato 50 mM a pH 7.2, e incubados a 37 °C de 10 a 16 horas. A continuación, las muestras se destiñeron con sucesivos lavados de etanol al 70%.

13. Aplicaciones bioinformáticas

Se empleó el algoritmo BLAST para rastrear las bases de datos EMBL/GenBank, a través de los formularios *en línea* que se encuentran en la URL del National Centre for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov). Para el diseño de los cebadores específicos de las diferentes secuencias estudiadas utilizados para la RT-PCR semicuantitativa se utilizó el servicio Primer3 (biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). En cuanto al diseño de cebadores para PCR cuantitativa, se empleó el *software* pcrEfficiency (srvgen.upct.es/efficiency.html) (Mallona *et al.*, 2011).

Los rastreos de secuencia se efectuaron empleando las herramientas disponibles en las bases de datos del TAIR (The Arabidopsis Information Resource, www.arabidopsis.org) y del Proyecto Internacional de Secuenciación del Genoma de Tomate (solgenomics.net/tomato). Los análisis de secuencia se realizaron empleando la aplicación MegAlign de la *suite* informática DNASTar Lasergene. El mismo programa se empleó también para la elaboración de los árboles filogenéticos. Para destacar las zonas homólogas de los alineamientos producidos por MegAlign se utilizó el programa GENEDOC (www.nrbsc.org/gfx/genedoc).

14. Tratamiento estadístico de datos

El análisis estadístico utilizado para comparar dos tipos de muestras se llevó a cabo mediante una prueba *t* de Student para diferencia de medias de muestras independientes, utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS-

Excel de la *suite* Microsoft Office. Los análisis estadísticos en los que se efectúan comparaciones entre múltiples grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el programa SPSS v.19 (IBM). En ambos tipos de análisis, un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

En cuanto al análisis estadístico del *Capítulo 1* de Resultados y Discusión, apartado 1, el parámetro empleado es el "índice de infectividad" por planta. Este índice consiste en el número total de días en los que cada planta presenta síntomas, lo que da una medida del retraso en la aparición de los mismos. Los datos correspondientes a un total de 122 plantas, procedentes de 3 experimentos independientes, fueron empleados para realizar el test de *Kruskal-Wallis* (test no paramétrico equivalente a ANOVA) con el programa SPSS v.19 (IBM).

Resultados

y Discusión

Capítulo 1

SA Y GA COMO ACTIVADORES DE LA RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS

Antecedentes

En nuestro laboratorio se ha descrito la acumulación de ácido salicílico (SA) y ácido gentísico (GA) en plantas de tomate infectadas con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV) (Bellés *et al.*, 1999), así como en plantas de *Gynura aurantiaca* infectadas con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) (Bellés *et al.*, 2006). Numerosos estudios han demostrado que tratamientos exógenos con SA inducen resistencia a diferentes patógenos en tomate (Spletzer y Enyedi, 1999; Mandal *et al.*, 2009; Meher *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2011) y otras especies vegetales (Saikia *et al.*, 2003; Edgar *et al.*, 2006; Wang y Liu, 2012), confirmando el papel señalizador del SA en la respuesta defensiva de las plantas. Sin embargo, se sabe muy poco acerca del papel que el GA podría jugar en la resistencia de las plantas frente a patógenos. Nuestro grupo propone que, siendo el SA crucial para el establecimiento de la HR y la SAR en interacciones planta-patógeno de tipo incompatible, el GA podría estar implicado en interacciones de tipo compatible, en donde el patógeno se disemina de forma sistémica por la planta (Bellés *et al.*, 2006). De esta forma, el GA sería una molécula señalizadora adicional y complementaria al SA en la activación de defensas y el establecimiento de la resistencia a patógenos.

Con el fin de realizar un estudio comparativo de la posible resistencia mediada por GA en relación con lo que estaba descrito para SA, se llevaron a cabo tratamientos con ambos compuestos y se estudió su posible efecto sobre la resistencia a ToMV y CEVd, en plantas de tomate y *Gynura*, respectivamente (Granell, 2011).

Para estudiar el efecto de los tratamientos con GA o SA sobre la resistencia frente al virus, se emplearon ápices de plantas de tomate de un mes de edad cortados por encima de los cotiledones, que se dejaron embeber en disoluciones de GA, SA o tampón durante 48 horas para ser luego transferidos a agua e infectados con ToMV. A continuación, se realizó un seguimiento de la acumulación de la proteína de la cápside viral en los tejidos infectados a lo largo del tiempo. Todas las hojas locales (Figura 10A),

es decir, las inoculadas con el virus, presentaron acumulación de dicha proteína, sin embargo, las plantas tratadas con SA acumularon una menor cantidad que plantas control o plantas tratadas con GA. En el caso de las hojas distales (Figura 10B), transcurridos 9 días desde la infección, la acumulación de la proteína de la cápside fue muy notable en plantas control, mientras los niveles observados en plantas tratadas con GA y SA fueron inferiores, siendo la menor acumulación la presentada por las plantas tratadas con SA. Estos resultados indicaban que los tratamientos con SA y GA inducían resistencia sistémica en plantas de tomate infectadas con ToMV (publicado en Campos *et al.*, 2014a; Anexo I).

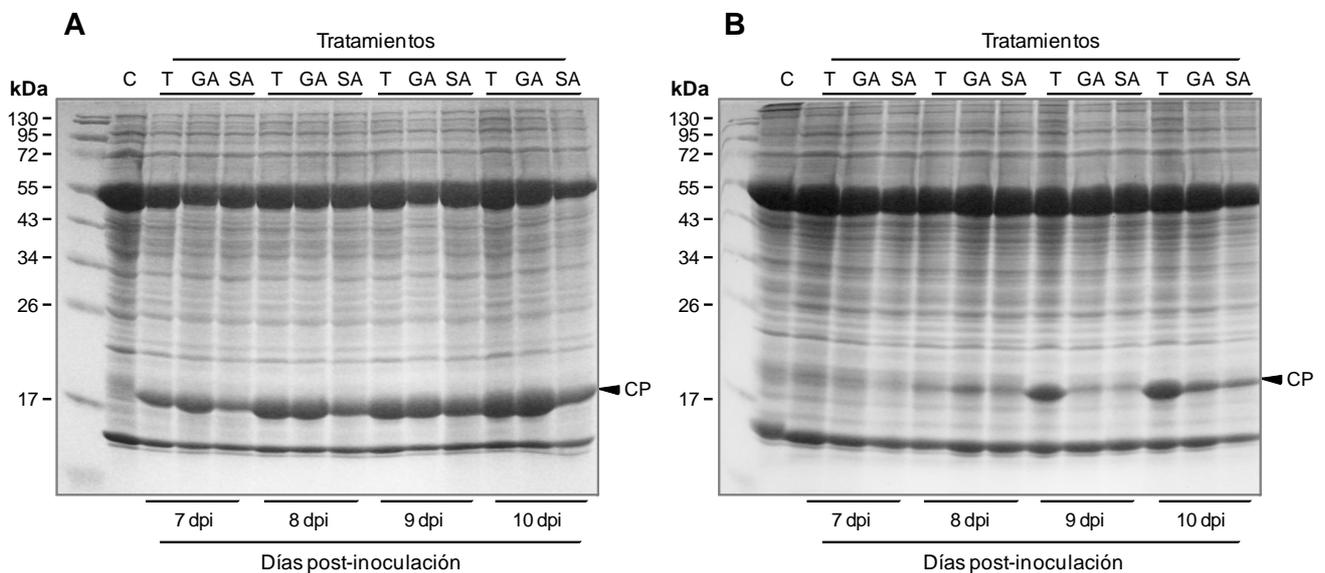


Figura 10. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas solubles de hojas de tomate infectadas con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV). Previamente a la inoculación, las plantas fueron pre-tratadas con tampón (T), ácido gentísico (GA) o ácido salicílico (SA). A la izquierda de cada panel se muestra el marcador de masa molecular de proteínas (kDa). La flecha indica la proteína de la cápside (CP) del ToMV. A) Perfil proteico de hojas infectadas (locales). B) Perfil proteico de hojas sistémicas (distales).

Por otra parte, se llevó a cabo un primer ensayo con plantas de *Gynura* tratadas con GA, SA y tampón e infectadas con CEVd. Tras un seguimiento de la evolución de los síntomas viroidales, como son la epinastia foliar y la reducción en el crecimiento, se observó que los tratamientos con SA y GA parecían producir un retraso en la aparición

de dichos síntomas. Como se había observado para tomate-ToMV, la resistencia inducida por SA parecía más efectiva que la producida por GA. Por lo tanto, nuestros primeros resultados parecían indicar que tratamientos con SA o GA inducían cierta resistencia a las dos infecciones estudiadas (Granell, 2011).

1. Estudio de la resistencia mediada por GA en plantas de *Gynura aurantiaca* infectadas con viroide

A la vista de los resultados obtenidos en plantas de tomate infectadas con ToMV y los resultados preliminares observados en el caso de *Gynura*, decidimos profundizar en el estudio del fenómeno de resistencia mediada por SA o GA en esta especie vegetal. Para ello, se amplió el trabajo previo realizando tratamientos con SA, GA o tampón a plantas de *Gynura aurantiaca* antes de ser infectadas con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd). Los tratamientos se repitieron a lo largo de todo el ensayo, según se describe en Materiales y Métodos. Como ya se ha mencionado anteriormente, en esta interacción *Gynura*-CEVd también tiene lugar la acumulación de SA y GA (Bellés *et al.*, 2006).

La Figura 11A muestra tres plantas representativas de los tratamientos con SA, GA o tampón a los 20 días después de la inoculación con CEVd, observándose el retraso en la infección y la atenuación de síntomas que presentan las plantas tratadas con GA o SA con respecto a las plantas tratadas con tampón.

Se llevó a cabo un seguimiento de la aparición de síntomas (epinastia de las hojas y reducción del crecimiento) a lo largo del desarrollo de la infección. En la Figura 11B se muestra la evolución de la infección a lo largo del experimento. Como se puede observar, las plantas tratadas con GA y SA presentan un retraso en la aparición de los síntomas con respecto a las plantas control tratadas con tampón. Al igual que se observó en la infección vírica, la resistencia inducida por el SA resulta más eficaz que la promovida por el GA.

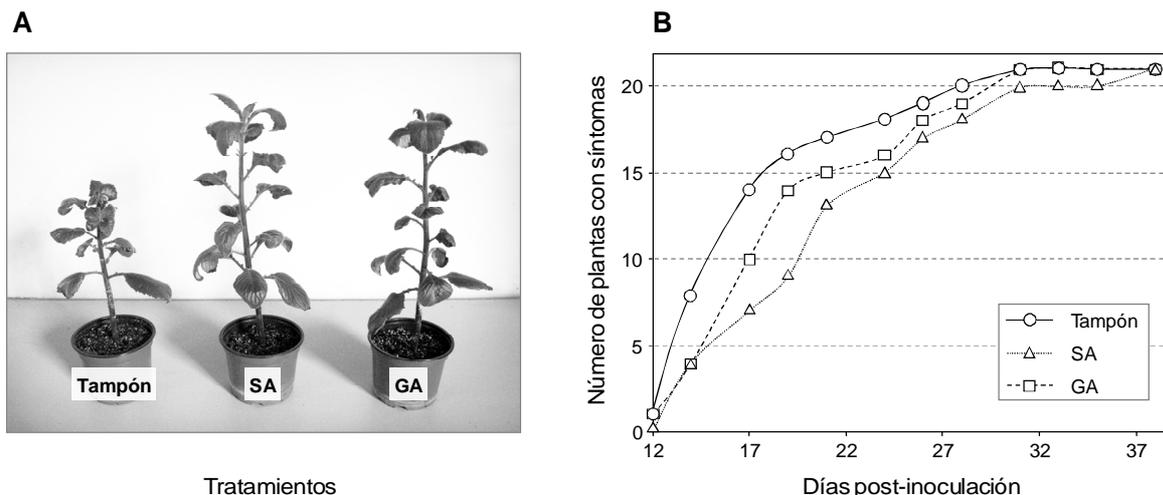


Figura 11. Desarrollo de la enfermedad en plantas de *Gynura aurantiaca* infectadas con CEVd. Las plantas fueron tratadas con Tampón, ácido gentísico (GA) y ácido salicílico (SA). A) Comparación de los síntomas de la infección con CEVd (enanismo, epinastia foliar y rugosidad) en plantas de *Gynura aurantiaca* tratadas con Tampón, SA o GA. B) Evolución del número de plantas de *Gynura aurantiaca* que muestran síntomas de infección con CEVd a los días post-inoculación indicados.

Para comprobar si las diferencias mostradas en la Figura 11B resultaban ser estadísticamente significativas, se empleó el "índice de infectividad" como medida del retraso en la aparición de los síntomas. Este parámetro consiste en el número total de días que cada planta presenta síntomas, de tal manera que, cuanto menor sea este número, mayor será el retraso en la aparición de los síntomas. Se utilizaron los índices de infectividad de las plantas correspondientes a 3 experimentos independientes para llevar a cabo un análisis estadístico (ver Materiales y Métodos).

En primer lugar, observamos que existían diferencias estadísticamente significativas (valor $p = 0.018$) entre los índices de infectividad de los tres grupos: plantas Control tratadas con tampón, plantas tratadas con GA y plantas tratadas con SA (Tabla 3A). Al comparar los grupos por parejas, (Control-GA y Control-SA), las diferencias resultaron estadísticamente significativas (valor $p = 0.046$ y valor $p = 0.008$, respectivamente), indicando así que ambos tratamientos provocan un retraso significativo en la aparición de los síntomas con respecto a las plantas Control tratadas con tampón. Por otra parte, resultó no haber diferencia significativa entre el índice de infectividad de plantas tratadas con GA y plantas tratadas con SA (valor $p = 0.403$)

(Tabla 3B). Por lo tanto, estos resultados indican que los tratamientos con GA inducen resistencia a CEVd en plantas de *Gynura aurantiaca* de manera similar a los tratamientos con SA.

A

Grupo	N	Rangos medios	Chi-cuadrado	Grados de libertad	Valor p
Control	42	73.12	7.847	2	0.018
GA	42	58.36			
SA	38	52.13			

B

Grupos por parejas	Valor p
Control - GA	0.046
Control - SA	0.008
GA - SA	0.403

Tabla 3. Test de Kruskal-Wallis para los índices de infectividad de plantas de *Gynura aurantiaca* infectadas con CEVd tratadas con tampón (Control), ácido gentísico (GA) y ácido salicílico (SA). A) Parámetros estadísticos del test de Kruskal-Wallis para los índices de infectividad de plantas de *Gynura aurantiaca* infectadas con CEVd tratadas con tampón (Control), GA o SA. N = número de plantas. B) Valor p del test de Kruskal-Wallis para los índices de infectividad cuando los grupos son comparados por parejas.

Los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio con la interacción tomate-ToMV, así como los ahora obtenidos con la interacción *Gynura*-CEVd, parecen indicar que, de manera similar a lo descrito para el SA, que induce resistencia a patógenos en plantas y participa en el establecimiento de SAR (Vlot *et al.*, 2009; Boatwright y Pajerowska-Mukhtar, 2013), el GA podría estar también implicado en la respuesta de las plantas a patógenos en interacciones de tipo compatible. Concretamente, en este tipo de infecciones se ha descrito que también tiene lugar la activación de mecanismos de defensa que reducen el daño que sufre la planta a posteriores ataques patogénicos. Tal es el caso de plantas de tomate infectadas con una cepa virulenta de *Xanthomonas campestris*, en las que se observa una reducción del daño producido en el tejido cuando se someten a una segunda infección (Block *et*

al., 2005), constituyendo lo que los autores denominan una Tolerancia Sistémica Adquirida (SAT; *Systemic Acquired Tolerance*). Nuestros resultados complementan estos estudios y sugieren que el papel de la acumulación de GA en las interacciones compatibles podría ser el de activar defensas que pudieran limitar de alguna manera el avance de la infección primaria, lo que podría contribuir, además, a reducir el daño en posteriores infecciones.

A la vista de nuestros resultados, decidimos estudiar las bases moleculares que subyacen a la resistencia mediada por la aplicación exógena de SA y GA. Para ello se emplearon plantas de tomate, por las ventajas que supone trabajar con esta especie con respecto a *Gynura*. La técnica del *stem-feeding* permite realizar tratamientos efectivos previos a la inoculación con el patógeno, así como analizar por separado las hojas inoculadas y las distales. Por otra parte, el tomate es una planta modelo dentro de las especies de interés agronómico y la secuencia de su genoma está progresivamente mejor anotada, lo que posibilita la búsqueda de factores de interés.

2. Estudio de la expresión de genes implicados en el silenciamiento viral y viroidal en tomate

Una vez observado que el tratamiento con GA inducía resistencia en plantas frente a patógenos basados en RNA para dos interacciones compatibles diferentes, decidimos estudiar las bases moleculares de dicho fenómeno.

Está bien admitido que la resistencia que las plantas muestran tras el tratamiento con SA se debe en parte a la inducción de proteínas PR (Bowles, 1990; Hammerschmidt, 1999a; van Loon y van Strien, 1999). Muchas PRs presentan actividades antifúngicas o antibacterianas (van Loon y van Strien, 1999). Si bien las proteínas PR descritas hasta la fecha no parecen tener actividad antiviral (Cutt *et al.*, 1989; Linthorst *et al.*, 1989), algunas como la PR-10 muestran actividad RNasa (Agarwal y Agarwal, 2014; Xu *et al.*, 2014) pero no parece dirigida hacia resistencia a

virus. Por otra parte, se ha descrito recientemente que tratamientos exógenos con ácido jasmónico (JA) y SA en tomate mejoran la resistencia de las plantas a diferentes virus de RNA, no pareciendo estar relacionadas las proteínas PR con dicho efecto (Shang *et al.*, 2011). Resulta interesante, por tanto, explorar las bases moleculares de la resistencia a virus mediada por SA o GA considerando la inducción de otros genes no relacionados con defensa frente a herbívoros, hongos o bacterias, sino específicamente orientados a patógenos basados en RNA.

El silenciamiento de RNA es un potente mecanismo de defensa frente a virus, con una gran especificidad y adaptabilidad (Pumplin y Voinnet, 2013). Asimismo, varios estudios indican que existe algún tipo de “diálogo” entre las defensas mediadas por SA y el silenciamiento de RNA en distintas especies, tales como tabaco, *Arabidopsis thaliana* o *Nicotiana benthamiana*, entre otras (Xie *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; revisado en Carr *et al.*, 2010). El fenómeno de resistencia que se muestra en este trabajo, dada la naturaleza de los patógenos empleados (virus y viroides, cuyo genoma está formado por RNA), es una buena oportunidad para estudiar la posible relación entre SA y GA con las rutas de silenciamiento de RNA en infecciones de tipo sistémico. Por ello, decidimos estudiar la expresión de distintos genes de tomate implicados en la ruta de silenciamiento de RNA y su relación con la resistencia mediada por SA o GA.

Para llevar a cabo este estudio, se realizó una prospección en la base de datos Sol Genomics (<http://solgenomics.net/>) en busca de genes de tomate que fueran posibles ortólogos a los implicados en el silenciamiento génico viral en *Arabidopsis*, fundamentalmente actividades tipo RNA-polimerasa-RNA-dependiente (RdRp o RDR) y RNasas tipo *Dicer* (DCL). El resultado de la búsqueda dio lugar a un conjunto de secuencias de tomate (unigenes) que se muestra en la Tabla 4. Dichas secuencias resultaron coincidentes con otras recientemente publicadas (Bai *et al.*, 2012).

Diferentes autores han mostrado que la expresión de las RdRps se activa como consecuencia de infecciones virales y viroidales (Schiebel *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2003; revisado en Carr *et al.*, 2010). Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente,

las DCLs también han sido implicadas en el silenciamiento viral y viroidal (Tsagris *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2010).

Gen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Solanum lycopersicon</i> "Sol Genomics database"	
		Unigen	Bai <i>et al.</i> (2012)
<i>DCL1</i>	<i>At1G01040</i>	SGN-U603587	Solyc10g005130
<i>DCL2</i>	<i>At3g03300</i>	SGN-U577527	Solyc11g008540
<i>DCL4</i>	<i>At5g20320</i>	SGN-U582677	Solyc07g005030
<i>RDR1</i>	<i>At1g14790</i>	SGN-U577143 (*)	Solyc05g007510
<i>RDR2</i>	<i>At4g11130</i>	SGN-U583558	Solyc03g114140
<i>RDR6</i>	<i>At3g49500</i>	SGN-U567398	Solyc04g014870

Tabla 4. Correspondencias entre genes implicados en el silenciamiento génico en *Arabidopsis* y sus posibles ortólogos en tomate. Se muestran los números de acceso para los diferentes factores de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), sus posibles análogos funcionales de tomate según su similitud de secuencia (*Solanum lycopersicon* "Sol Genomics database"), así como los publicados en Bai *et al.* (2012). (*) La secuencia SGN-U577143 se corresponde con *RdRP*, previamente publicada en Schiebel *et al.* (1998).

Así pues, decidimos estudiar si la expresión de aquellos genes de tomate obtenidos por rastreo de secuencias se veía alterada como consecuencia de una infección viral o viroidal. De esta forma, podríamos confirmar su posible implicación en el silenciamiento de RNA. Para ello, utilizamos dos sistemas planta-patógeno diferentes: plantas de tomate infectadas con ToMV y plantas de tomate infectadas con CEVd. En ambos casos, llevamos a cabo el estudio de la expresión de dichos genes tomando muestras a diferentes tiempos y analizándolas mediante RT-PCR cuantitativa.

2.1. Expresión de genes implicados en el silenciamiento de RNA en plantas de tomate infectadas con ToMV

Con el fin de estudiar la variación del patrón de transcripción de los genes posiblemente implicados en la vía de silenciamiento génico en tomate a lo largo de la

infección con ToMV, se realizó un experimento de infección de plantas de tomate con este virus, tomándose muestras de las plantas infectadas 7 días después de la inoculación, así como de sus correspondientes plantas control (ver Materiales y Métodos). Este tiempo se eligió en base a los resultados obtenidos en el estudio del retraso que generan los tratamientos con SA y GA en la aparición de la proteína de la cápside del ToMV, ya que a los 7 días post-inoculación es cuando se observa el retraso. Una vez comprobado mediante SDS-PAGE que la infección por ToMV había tenido lugar, el siguiente paso fue analizar la acumulación de mRNA de los posibles genes de la vía de silenciamiento génico en tomate como consecuencia de dicha infección. Para ello, se realizó una extracción de RNA y posterior RT-PCR cuantitativa para las secuencias RDR y DCL de tomate, a partir de las muestras obtenidas.

Como se observa en la Figura 12, la infección por ToMV produce una inducción estadísticamente significativa de todas las endorribonucleasas *Dicer-like* (DCL). Concretamente, *ToDCL2* presenta la inducción más fuerte, alcanzando un nivel hasta 40 veces superior al que se encuentra en las plantas control. A partir de las mismas muestras, se llevaron a cabo estudios de inducción de las RNA polimerasas RNA-dependientes (RDR). De nuevo, se produce una inducción estadísticamente significativa de todos estos genes como consecuencia de la infección con el virus asintomático, a excepción de *ToRDR2*, la cual presenta un aumento menor en su expresión que resulta estadísticamente no significativo.

Por lo que respecta a las DCLs, estudios genéticos realizados en *Arabidopsis thaliana* han puesto de manifiesto el acceso jerárquico de DCL4 y DCL2 al RNA de doble cadena (dsRNA) viral. Se ha descrito que la endonucleasa DCL4 es responsable de la fragmentación en siRNAs de 21 nucleótidos a partir de virus de RNA y DNA. En ausencia de DCL4, DCL2 actúa como sustituto de DCL4 para generar vsiRNAs de 22 nt (Deleris *et al.*, 2006; Llave, 2010). Sin embargo, hemos observado en tomate que la inducción de *ToDCL2* por ToMV es mayor que la de *ToDCL4*. En consonancia con nuestros resultados, se ha descrito que la infección de plantas de tomate con el Virus del Mosaico del Pepino (PepMV) produce una inducción significativa del gen *DCL2*, siendo la inducción de *DCL4* por PepMV mucho menor (Hanssen *et al.*, 2011). Además,

estos autores afirman que la notable inducción de *DCL2* podría ser indicativa de la presencia de un supresor de silenciamiento codificado en el virus que podría interferir con la actividad de *DCL4*. Por último, aunque se ha descrito que *DCL1* contribuye en menor medida a la formación de vsiRNA en plantas infectadas con virus de RNA (Llave, 2010), parece que *DCL1* actuaría suprimiendo las estructuras tipo *hairpin* (horquilla) de los transcritos primarios en plantas infectadas con el Virus del Mosaico de la Coliflor, un virus de DNA de doble cadena, facilitando así el acceso a las otras DCLs (Moissiard y Voinnet, 2006). De acuerdo con esta idea, también hemos observado una leve inducción de *ToDCL1* en tomate infectado con ToMV.

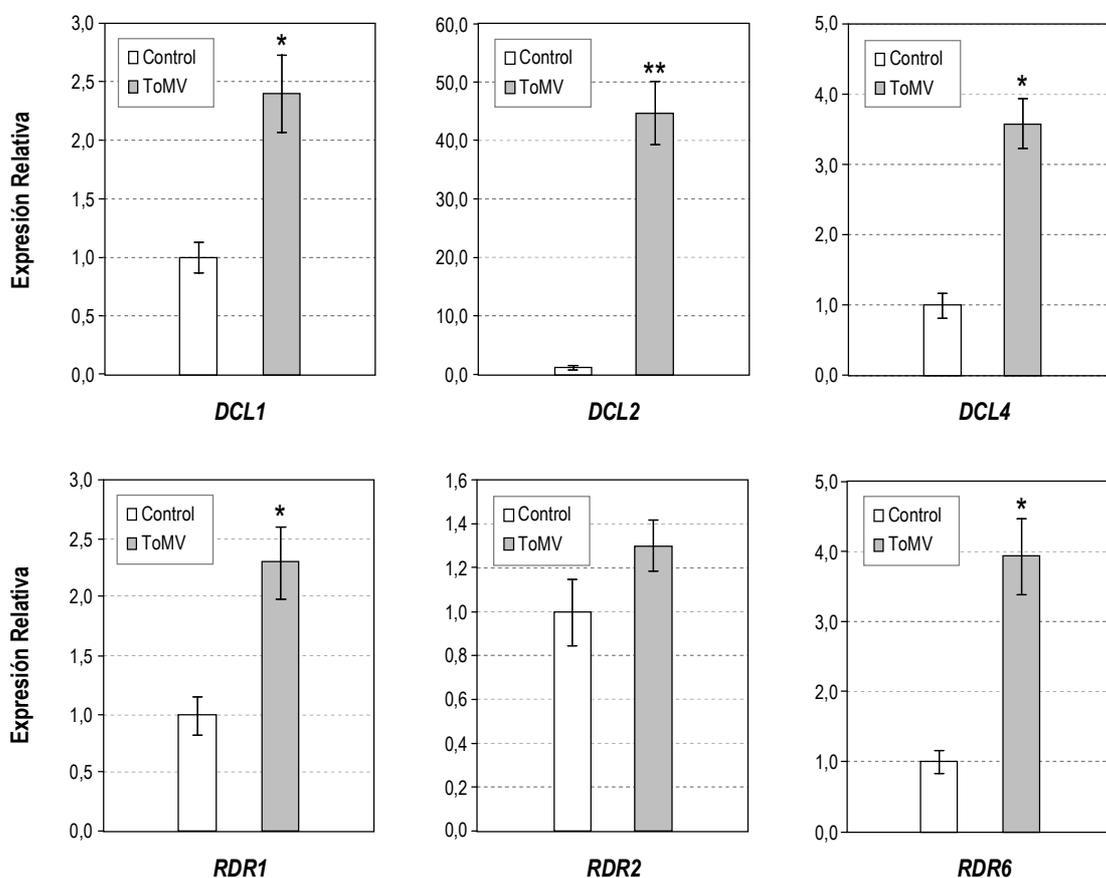


Figura 12. Niveles de expresión de los genes *DCL1*, *DCL2*, *DCL4*, *RDR1*, *RDR2* y *RDR6* de tomate en plantas infectadas con el virus del mosaico del tomate (ToMV), determinados por RT-PCR cuantitativa. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión de la actina, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas no infectadas (Control). Se realizaron tres réplicas biológicas. Los niveles de expresión se expresan como la media \pm el error estándar. Se llevó a cabo un análisis estadístico de *t* de Student. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$. El asterisco doble (**) indica que existe significación estadística con valor $p < 0.01$.

Numerosos estudios indican que las RDRs están también implicadas en el silenciamiento antiviral, pues plantas que presentan alteraciones en la actividad de estas proteínas muestran una mayor susceptibilidad a virus de RNA y DNA (Bologna y Voinnet, 2014). Aunque pueden actuar de manera complementaria y coordinada, parece que las distintas RDRs presentan diferentes sensibilidades hacia los distintos virus (Llave, 2010). Ello podría explicar el hecho de que los genes *ToRDR1* y *ToRDR6* de tomate se induzcan de manera significativa como consecuencia de la infección con ToMV, mientras que *ToRDR2* apenas varíe sus niveles de acumulación de transcrito. Por otra parte, la inducción del gen *RDR1* ya ha sido descrita en otros sistemas planta-virus, tales como *Arabidopsis thaliana* infectada con el Virus del Mosaico del Tabaco, cepa crucífera (TMV-cg) (Yu *et al.*, 2003), plantas de maíz infectadas con el Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar (SCMV) (He *et al.*, 2010) o plantas de tabaco infectadas con el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) (Xie *et al.*, 2001), con el Virus de la Sharka (PPV) (Alamillo *et al.*, 2006) o con el Virus del Manchado Anular (ToRSV) (Jovel *et al.*, 2011). De acuerdo con lo que se había descrito en plantas de tomate infectadas con PepMV (Hanssen *et al.*, 2011), también hemos observado inducción del gen *ToRDR6* en plantas de tomate infectadas por ToMV.

2.2. Inducción de genes implicados en el silenciamiento de RNA en plantas de tomate infectadas con CEVd

Con el objeto de determinar la posible implicación de los genes de tomate mencionados previamente en el silenciamiento viroidal, realizamos un estudio de la inducción de los mismos a lo largo del desarrollo de la enfermedad ocasionada por el viroide. Para ello, se inocularon plántulas de tomate con CEVd y se recogieron muestras a los 20 días post-inoculación (dpi), momento en el que las plantas presentaban claros síntomas de epinastia foliar y reducción del crecimiento como consecuencia de la infección. Se comprobó la presencia del viroide mediante RT-PCR convencional con cebadores específicos para CEVd. Dichas muestras, así como las muestras correspondientes a plantas control, fueron analizadas por PCR cuantitativa

con oligonucleótidos específicos para los diferentes genes relacionados con el silenciamiento de RNA (ver Materiales y Métodos).

La Figura 13 muestra que la infección con CEVd induce significativamente todos los genes analizados, a excepción de la polimerasa *ToRDR6*, que apenas varía sus niveles de expresión con la infección y cuya diferencia entre plantas infectadas y plantas control resultó estadísticamente no significativa. Nuestros resultados indican, tal y como ha sido descrito (Schiebel *et al.*, 1998), que *ToRDR1* se induce en tomate como consecuencia de la infección viroidal y que, a diferencia de lo ocurrido en la infección viral, la inducción de *ToDCL4* es la más destacada en plantas infectadas con viroide. Al igual que hemos razonado para la infección con ToMV, estos resultados permiten considerar que dichos genes podrían estar implicados en el silenciamiento génico viroidal.

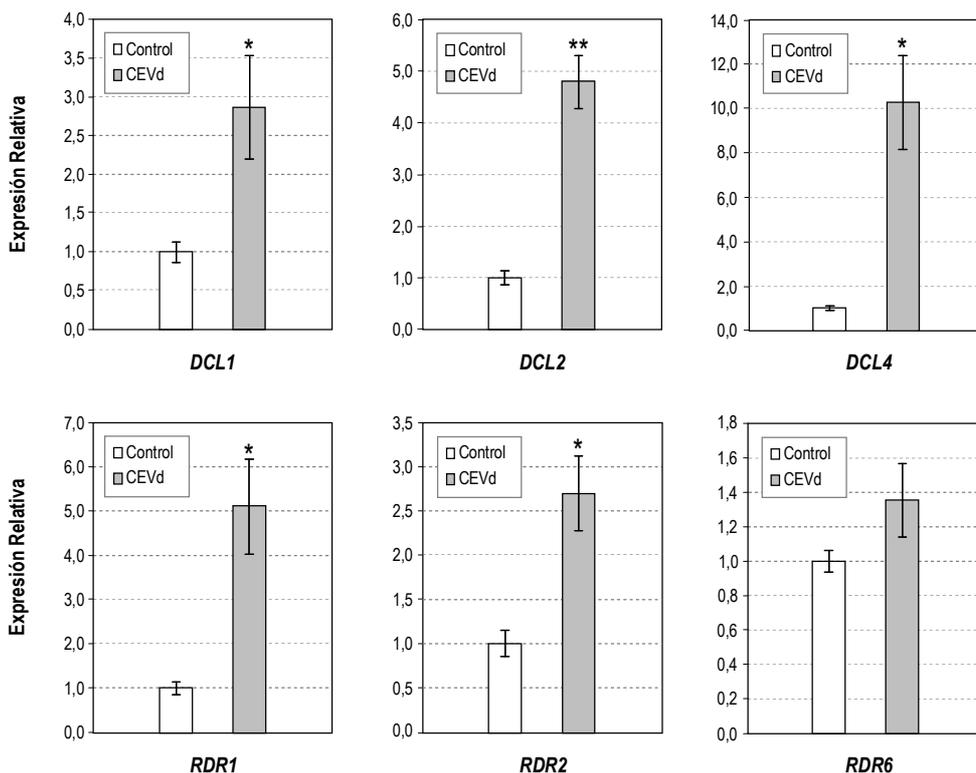


Figura 13. Niveles de expresión de los genes *DCL1*, *DCL2*, *DCL4*, *RDR1*, *RDR2* y *RDR6* de tomate en plantas infectadas con CEVd, determinados por RT-PCR cuantitativa. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión de la actina, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas no infectadas (Control). Se realizaron tres réplicas biológicas. Los niveles de expresión se expresan como la media \pm el error estándar. Se llevó a cabo un análisis estadístico de *t* de Student. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$. El asterisco doble (**) indica que existe significación estadística con valor $p < 0.01$.

Se ha descrito que la endonucleasa DCL1 está implicada en el corte de las moléculas de RNA derivadas de virus de DNA y también en la formación de microRNAs (Brodersen y Voinnet, 2006). Puesto que los viroides son moléculas de RNA, la inducción de *DCL1* estaría más relacionada con la posible formación de microRNAs que pudieran actuar sobre mRNAs vegetales. Así pues, la inducción que observamos de *DCL1* podría apoyar la hipótesis, defendida por muchos autores, de que la activación de los mecanismos de silenciamiento por parte del viroide formaría parte del propio desarrollo de la enfermedad viroidal, y no de un mecanismo de defensa de las plantas (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Matousek *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2012). Por lo que respecta a *DCL2* y *DCL4*, el estudio de su inducción por infección viroidal no se había realizado hasta el momento, si bien se asumía la actividad de ambas endonucleasas frente a partículas de RNA viroidal, puesto que la acumulación de VdsRNAs sí ha sido descrita en varias ocasiones (Navarro *et al.*, 2009).

En cuanto a las RDRs, la inducción de *ToRDR1* también se ha descrito en plantas de tomate infectadas por el Viroide del Tubérculo Fusiforme de la Patata (PSTVd) (Schiebel *et al.*, 1998). Por su parte, se ha relacionado la inducción de *RDR6* con la aparición de síntomas en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con el Viroide del Enanismo del Lúpulo (HSVd) (Gómez *et al.*, 2008). También se ha descrito una correlación entre *RDR6* y la acumulación de PSTVd en *N. benthamiana*, puesto que plantas transgénicas de esta especie con *RDR6* silenciada presentan una mayor acumulación de viroide (Di Serio *et al.*, 2010). En nuestro caso, plantas de tomate infectadas con CEVd mostraron una cierta inducción de *ToRDR6*, cuyos niveles de expresión fueron superiores a los de las plantas control. Por último, algunos autores han propuesto que *RDR2*, cuya inducción hemos detectado en plantas de tomate infectadas con CEVd, podría estar implicado en el reconocimiento de RNAs viroidales de polaridad positiva (Navarro *et al.*, 2009). Al igual que ocurre con las infecciones virales, parece que la participación de las RDRs podría ser distinta según la interacción de la que se trate. De hecho, el patrón de expresión observado para la infección con ToMV (Figura 12) difiere del obtenido con CEVd (Figura 13). La obtención de plantas de

tomate que silencien estas RDRs, por separado y de manera conjunta, podría esclarecer el papel que éstas tienen en las distintas infecciones patogénicas.

Nuestros resultados del estudio de la inducción de genes de tomate implicados en el silenciamiento génico en infecciones virales y viroidales confirman su posible implicación en mecanismos de silenciamiento de RNA. Así pues, nos planteamos analizar la relación que puede existir entre las moléculas señal GA y SA y la expresión de dichos genes en tomate, con objeto de estudiar las bases moleculares de la resistencia inducida que hemos observado.

3. Estudio de las bases moleculares de la resistencia mediada por GA y SA en tomate

Habíamos observado previamente que, al tratar plantas de tomate con SA o GA, se inducía en éstas resistencia a ToMV y que, del mismo modo, tratando plantas de *Gynura aurantiaca* con SA o GA se inducía resistencia a CEVd. Así pues, decidimos estudiar las bases moleculares de dicha resistencia mediada por SA y GA, utilizando el sistema tomate-ToMV, por las ventajas que supone trabajar con esta especie con respecto a *Gynura*.

Como se ha comentado previamente, la inducción de PRs mediada por SA parece no estar implicada en la resistencia a virus (Cutt *et al.*, 1989; Linthorst *et al.*, 1989; Shang *et al.*, 2011) y además, existen datos que relacionan la resistencia inducida por SA y los mecanismos de silenciamiento de RNA (revisado en Carr *et al.*, 2010). Así pues, decidimos estudiar las bases moleculares de la resistencia mediada por SA o GA en tomate, en relación con la posible implicación de genes que participan en el silenciamiento de RNA en dicha resistencia. Para ello empleamos las secuencias de RDRs y DCLs de tomate indicadas anteriormente, realizando un seguimiento de su expresión a lo largo de tratamientos exógenos con SA o GA, en ausencia de infección viral o viroidal.

Así pues, se llevó a cabo un experimento equivalente al que se realizó para estudiar la resistencia mediada por SA o GA de plantas de tomate a ToMV, centrándonos esta vez en el tratamiento de los explantes previo a la inoculación. Para ello se tomaron muestras a 0, 4, 8, 12 y 48 horas de incubación con SA, GA o tampón (ver Materiales y Métodos). A partir de estas muestras (SA, GA o Tp) se realizó extracción de RNA y posterior análisis por PCR cuantitativa para estudiar la expresión de los genes de tomate implicados en el silenciamiento previamente estudiados. Para confirmar la efectividad del tratamiento, se llevó a cabo un estudio de la expresión de *PR1*, que responde a tratamientos con SA, y de *P23*, como control del tratamiento con GA, y que responde peor a SA (Bellés *et al.*, 1999). En la Figura 14 se observa que el transcrito de *PR1* se acumuló de manera significativa en las plantas tratadas con SA, siendo mucho menor en las plantas tratadas con GA. En el caso de *P23*, su inducción es más fuerte como consecuencia del tratamiento con GA, aunque también se alcanzan niveles elevados tras el tratamiento con SA. Por tanto, los tratamientos fueron efectivos y estábamos en disposición de estudiar qué genes relacionados con el silenciamiento respondían a SA, GA o Tampón.

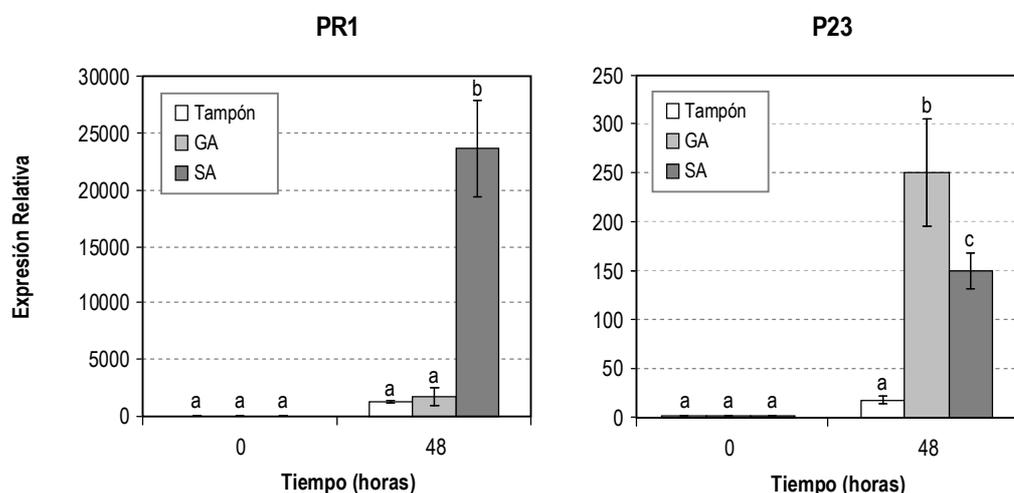


Figura 14. Niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas *pathogenesis-related* PR1 y P23 en plantas de tomate tratadas con Tampón, ácido gentísico (GA) y ácido salicílico (SA). Los niveles de mRNA se determinaron por RT-PCR cuantitativa. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión de la actina, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de plantas control no tratadas. Se realizaron tres réplicas biológicas. Los niveles de expresión se expresan como la media \pm el error estándar. Las comparaciones entre grupos múltiples (plantas tratadas con SA, GA y Tampón) se realizaron mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA) para cada tiempo. Las mismas letras indican que no existe diferencia significativa, letras distintas valor $p < 0.05$.

Como se observa en la Figura 15, los tratamientos con SA indujeron de manera significativa la expresión de las endonucleasas *ToDCL1* y *ToDCL2*, mostrando un máximo a 12 h y 8 h, respectivamente. En cuanto al tratamiento con GA, se observó una inducción estadísticamente significativa de *ToDCL2*, con un valor máximo a las 4 horas. Por tanto, la inducción de *ToDCL2* por GA parecía ser más rápida que el efecto causado por SA, aunque menos intensa.

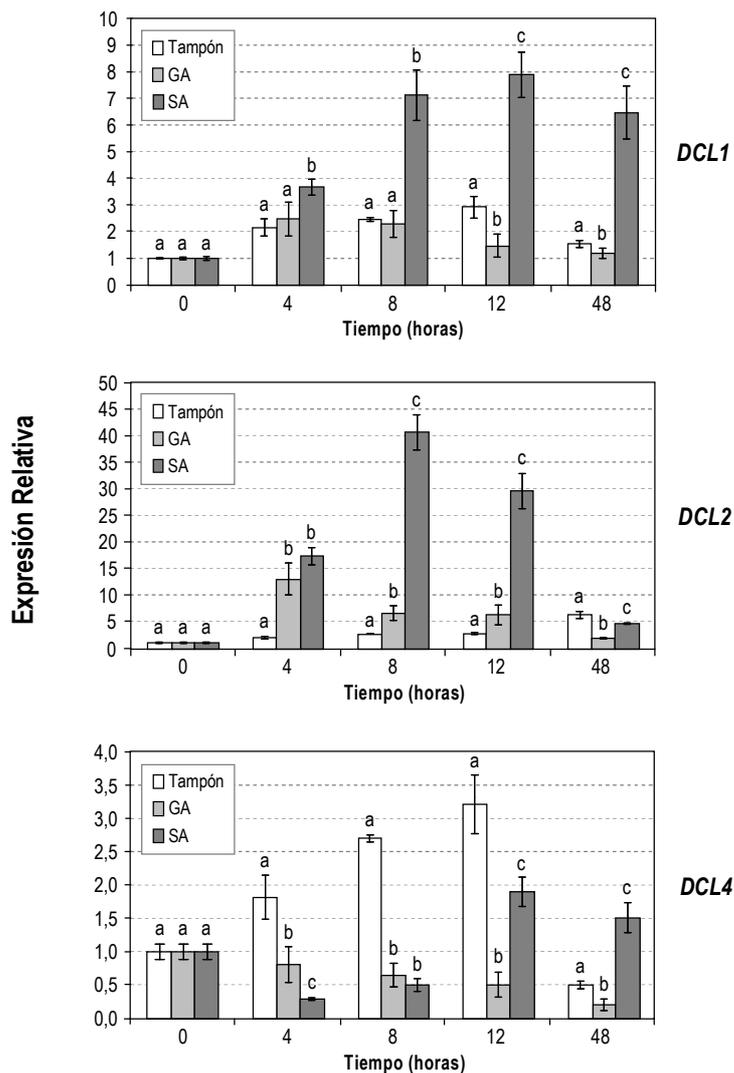


Figura 15. Niveles de expresión de los genes *DCL1*, *DCL2* y *DCL4* en plantas de tomate tratadas con Tampón, ácido gálico (GA) y ácido salicílico (SA). Los niveles de mRNA se determinaron por RT-PCR cuantitativa. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión de la actina, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de plantas control no tratadas. Se realizaron tres réplicas biológicas. Los niveles de expresión se expresan como la media \pm el error estándar. Las comparaciones entre grupos múltiples (plantas tratadas con SA, GA y Tampón) se realizaron mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA) para cada tiempo. Las mismas letras indican que no existe diferencia significativa, letras distintas valor $p < 0.05$.

También se observó una leve inducción de las tres DCLs de tomate en las plantas tratadas con tampón, que podría deberse a la herida producida en el tallo a causa de la técnica empleada, el *stem-feeding* (ver Materiales y Métodos). Por otro lado, se detectó una fuerte y significativa represión de *ToDCL4* en tratamientos con SA o GA.

En cuanto a las polimerasas RDR de tomate (Figura 16), *ToRDR1* y *ToRDR2* presentaron una fuerte inducción por SA, mostrando un máximo a las 8 y 12 horas de tratamiento, respectivamente. Curiosamente, el tratamiento con SA produjo un aumento de 100 veces en la expresión de *ToRDR1*. Por otro lado, pudimos detectar una inducción significativa de *ToRDR1* y *ToRDR2* por GA después de 4 horas de tratamiento. De igual modo a lo observado para *ToDCL4*, no se detectó ninguna inducción de *ToRDR6* por tratamientos con SA o GA. De nuevo se observó una leve inducción de la tres RDRs de tomate en las plantas control, que podría deberse a la herida causada por el tratamiento. De manera similar al resultado obtenido para *ToDCL4*, se observó una represión de *ToRDR6* en las plantas tratadas con SA o GA.

Estos resultados indican que la aparición de resistencia observada con tratamientos con GA o SA podría estar relacionada con la inducción de los genes implicados en el silenciamiento génico como parte de la respuesta defensiva en tomate. La mayor eficiencia de la resistencia inducida por SA se correlaciona con una activación más intensa de la DCLs y RDRs, en relación con el efecto producido por GA.

Como se ha comentado anteriormente, existen distintas pruebas que relacionan la respuesta inducida por SA y la ruta de silenciamiento de RNA (revisado en Carr *et al.*, 2010). Entre éstas, se ha descrito que *RDR1* se induce como consecuencia de tratamientos con SA en distintas especies vegetales (Xie *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Quilis *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Los resultados que mostramos en este trabajo se suman a los ya descritos, pues indican que, efectivamente, *ToRDR1* se induce en tomate como consecuencia de tratamientos exógenos con SA. Del mismo modo ocurre con *ToDCL1*, *ToDCL2* y *ToRDR2*, confirmando la relación existente entre el SA y el silenciamiento de RNA.

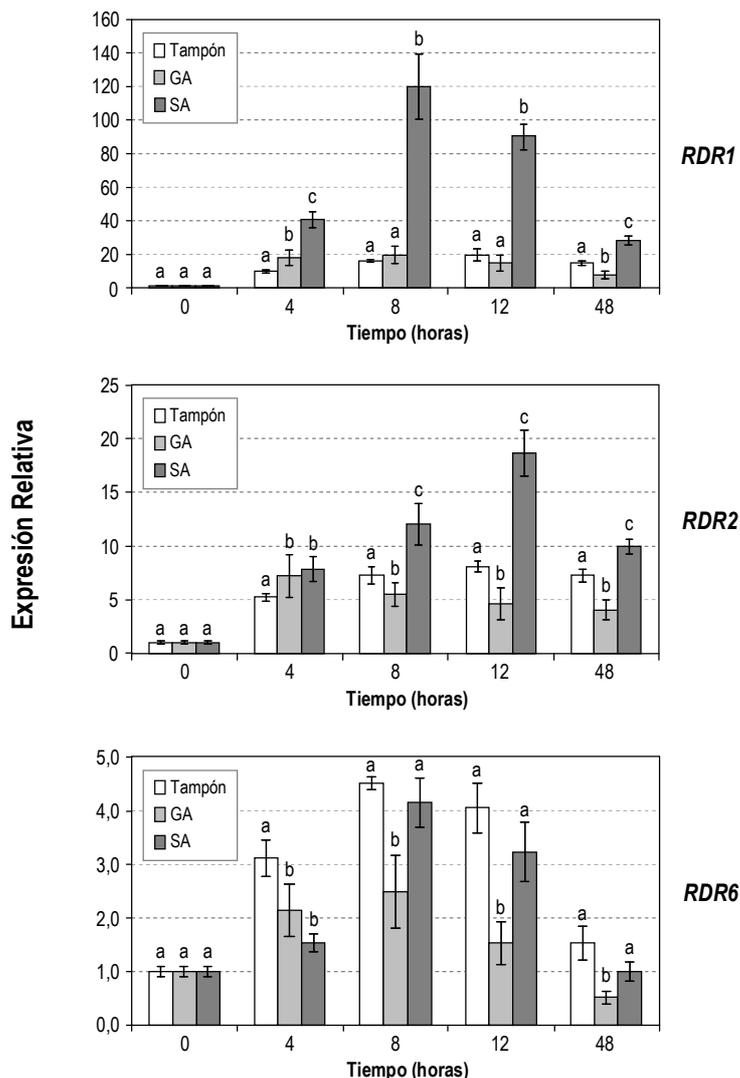


Figura 16. Niveles de expresión de los genes *RDR1*, *RDR2* y *RDR6* en plantas de tomate tratadas con Tampón, ácido gálico (GA) y ácido salicílico (SA). Los niveles de mRNA se determinaron por RT-PCR cuantitativa. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión de la actina, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de plantas control no tratadas. Se realizaron tres réplicas biológicas. Los niveles de expresión se expresan como la media \pm el error estándar. Las comparaciones entre grupos múltiples (plantas tratadas con SA, GA y Tampón) se realizaron mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA) para cada tiempo. Las mismas letras indican que no existe diferencia significativa, letras distintas valor $p < 0.05$.

Asimismo, hemos observado que tratamientos exógenos con GA también inducen genes de la ruta de silenciamiento de RNA en tomate, tales como *ToRDR1* y *ToDCL2*, aunque dicha inducción parece menos notable. Estos resultados podrían explicar el hecho de que tenga lugar un aumento de la expresión génica y de la actividad RdRp en infecciones sistémicas producidas por una cepa compatible de TMV (Xie *et al.*, 2001), a

pesar de que la acumulación de SA no tenga lugar en las plantas infectadas (Malamy *et al.*, 1990). En este tipo de infección de naturaleza sistémica podría tener lugar la acumulación de GA, a través de la cual se produciría la inducción observada de RdRp. La medida de los niveles de GA en este tipo de interacción podría ayudar a confirmar dicha hipótesis.

Por otra parte, nuestros resultados parecen indicar que la herida podría de alguna manera ser un activador de DCLs y RDRs en tomate. Existen diversas pruebas que correlacionan la respuesta a herida y el silenciamiento génico. Por ejemplo, se ha descrito que RDR1 media en la resistencia de *Nicotiana attenuata* frente al ataque de herbívoros en la naturaleza (Pandey y Baldwin, 2007) y se ha propuesto que DCL2 y DCL4 participan también en las defensas frente a herbívoros (Bozorov *et al.*, 2012). Por nuestra parte, mostramos en este trabajo una represión de *ToDCL4* y *ToRDR6* en el tratamiento con SA y GA, en comparación con las plantas tratadas con tampón. Esto podría deberse a un efecto antagónico entre los tratamientos con SA o GA y la respuesta a herida. El antagonismo entre el ácido salicílico y el ácido jasmónico, la molécula señal implicada en la respuesta a herida, está bien establecido en la literatura (revisado en Thaler *et al.*, 2012; Derksen *et al.*, 2013).

En resumen, hemos observado que tanto los tratamientos con SA como con GA son capaces, por un lado, de inducir resistencia a distintos patógenos de RNA y, por otro, de inducir los genes de la ruta de silenciamiento de RNA en tomate. Los tratamientos que implican una inducción más intensa de estos genes se correlacionan con una mayor resistencia. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la resistencia observada podría deberse a la inducción de mecanismos de silenciamiento de RNA, reforzando así las conexiones entre el silenciamiento génico y la defensa de las plantas frente a patógenos.

Capítulo 2

ESTUDIO DE LAS GLICOSILTRANSFERASAS GAGT Y Twi1

Antecedentes

Con el objetivo de contribuir a esclarecer el papel señalizador del ácido genticico (GA) en la respuesta defensiva de las plantas, se pretende obtener plantas transgénicas que presenten alteraciones en los niveles de dicho metabolito, tanto en su forma libre como conjugada. Para ello, se llevará a cabo la sobreexpresión de la glicosiltransferasa de tomate GAGT, previamente caracterizada en nuestro grupo, la cual presenta una elevada especificidad tanto hacia la molécula donante del azúcar, la UDP-xilosa, como por el sustrato aceptor, el GA (Tárraga *et al.*, 2010). Estas plantas podrían mostrar un desequilibrio en los niveles de GA libre y conjugado y, como consecuencia de ello, exhibir diferencias de susceptibilidad y/o resistencia ante infecciones donde la acumulación de GA ha sido previamente descrita (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2006).

Por otra parte, se pretende abordar en este capítulo la caracterización de la actividad de la proteína de tomate inducida por herida Twi1. Dicha proteína fue identificada como posible glicosiltransferasa debido a su homología con proteínas pertenecientes a esta clase (O'Donnell *et al.*, 1998), aunque no se han llevado a cabo estudios de actividad enzimática hasta la fecha. Su secuencia completa fue obtenida en nuestro grupo junto con la de GAGT, mediante el rastreo de una genoteca de expresión en tomate (Tárraga, 2006). El gen que codifica Twi1 se induce en tomate en respuesta a herida, interacciones de tipo incompatible y tratamientos con compuestos de naturaleza fenólica, tales como el ácido salicílico (SA) y el ácido 2,6-dihidroxibenzoico entre otros (O'Donnell *et al.*, 1998). Las funciones de ambas glicosiltransferasas podrían estar relacionadas y, por tanto, la caracterización de Twi1 puede resultar de gran interés en el estudio de la respuesta defensiva de las plantas de tomate frente a ataques patogénicos.

1. Obtención y caracterización de plantas transgénicas GAGT

Con el fin de estudiar la actividad de GAGT *in vivo*, así como su función en la respuesta defensiva de las plantas, decidimos preparar una construcción génica para llevar a cabo su sobreexpresión en plantas. Nos propusimos comprobar la construcción obtenida mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, para posteriormente utilizarla en la generación y caracterización de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y de tomate que sobreexpresen GAGT.

1.1. Expresión transitoria de GAGT en plantas de *Nicotiana benthamiana*

Previamente, en nuestro laboratorio se había caracterizado la actividad bioquímica de GAGT mediante su expresión en *Pichia pastoris*. La proteína recombinante expresada en levadura mostró actividad glicosiltransferasa, catalizando la conjugación de ácido gentsico (GA) a una molécula de azúcar, en este caso la xilosa, pasando el GA de forma libre a forma conjugada (Tárraga *et al.*, 2010).

A continuación nos propusimos obtener una construcción que permitiera llevar a cabo la sobreexpresión y el estudio de GAGT en plantas. Para ello, el cDNA completo de GAGT fue clonado en el plásmido binario pGWB8, obteniéndose la construcción pGWB8_GAGT, tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado 7.1). Dicha construcción permite la sobreexpresión de GAGT fusionada a una cola de 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal, lo que posibilita la detección inmunológica de la proteína recombinante con un anticuerpo monoclonal Anti-His, así como su purificación por afinidad.

Previamente a la obtención de plantas transgénicas estables, se llevó a cabo un experimento de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, con el fin de comprobar si la construcción obtenida permite la sobreexpresión de la proteína activa

en plantas. Para llevar a cabo el experimento se partió de bacterias de la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las siguientes construcciones: el plásmido binario pGWB8 utilizado como control, la construcción pGWB8_GAGT objeto de estudio, y el plásmido p19, que codifica el supresor viral de silenciamiento del mismo nombre. Esta construcción fue amablemente cedida por el Dr. Diego Orzáez (IBMCP, UPV-CSIC, Valencia, España).

El experimento se realizó con plantas de 4 semanas de edad. Las plantas consideradas como control fueron infiltradas con una mezcla 1:1 de cultivos de *Agrobacterium* que contenían los plásmidos pGWB8 y p19. Las plantas restantes, a las que denominamos plantas GAGT, se infiltraron con una mezcla 1:1 de cultivos de *Agrobacterium* que contenían la construcción pGWB8_GAGT y el plásmido p19. El empleo del plásmido p19 mejora la eficiencia de la sobreexpresión, ya que evita el silenciamiento génico posttranscripcional (Voinnet *et al.*, 2003). Las muestras fueron recogidas a los 3 días de haber realizado la agroinoculación.

A partir de las hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinoculadas con las diferentes construcciones, se procedió al estudio de la expresión del cDNA recombinante de GAGT mediante RT-PCR, utilizando cebadores específicos de GAGT y de cola de histidinas (His₆), según se detalla en Materiales y Métodos. Como control se realizaron amplificaciones empleando oligonucleótidos del gen constitutivo RPL2 (Fleming *et al.*, 1993). Como se muestra en la Figura 17A, el cDNA recombinante de GAGT se transcribe en todas las plantas agroinfiltradas con la construcción pGWB8_GAGT.

Tras comprobar la presencia del mRNA recombinante GAGT, se procedió a la detección de la proteína en los tejidos agroinoculados. Para ello se realizó una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) y posterior *Western blot*, a partir de extractos proteicos de hojas de plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas. Se empleó el anticuerpo primario monoclonal Anti-His, que reconoce específicamente la extensión de histidinas. Como se muestra en la Figura 17B, el anticuerpo reveló la presencia de la proteína recombinante GAGT en los tejidos agroinfiltrados con la construcción pGWB8_GAGT.

Estos resultados indican que la construcción binaria pGWB8_GAGT obtenida permite la expresión de la proteína GAGT en plantas y por tanto es apta para llevar a cabo la generación de plantas transgénicas GAGT.

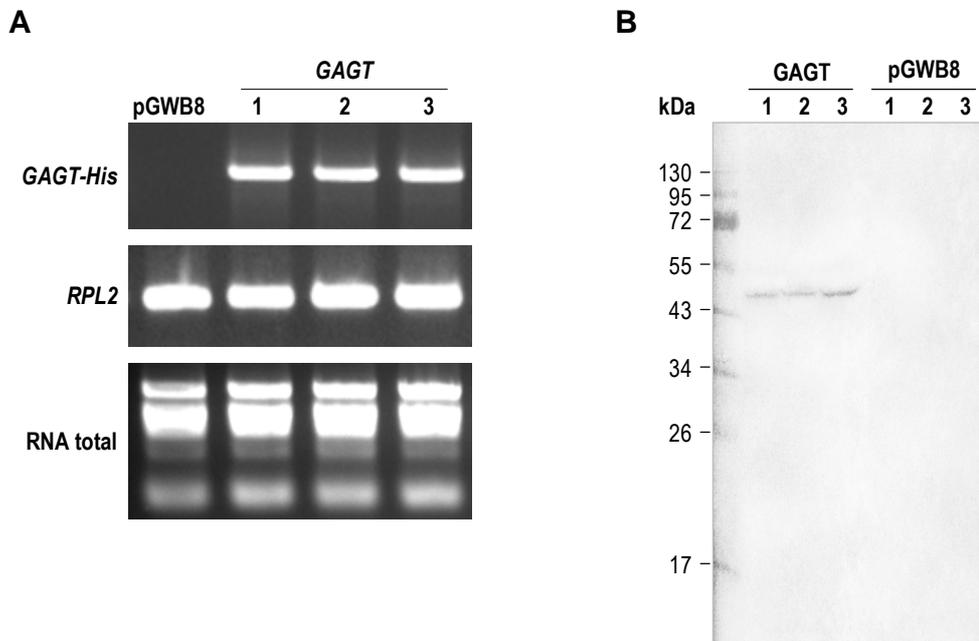


Figura 17. Expresión de GAGT en plantas de *N. benthamiana*. A) Acumulación del transcrito de GAGT-His en las plantas agroinoculadas. Se muestra el análisis electroforético del resultado de la amplificación del transcrito de GAGT-His mediante RT-PCR a partir de RNAs de plantas control pGWB8 y plantas transgénicas pGWB8_GAGT. Carrera pGWB8: plantas de tabaco control; carreras GAGT 1, 2 y 3: líneas de expresión transitoria pGWB8_GAGT. El panel superior muestra los resultados de la amplificación empleando cebadores específicos de GAGT y cola de histidinas (His₆). El siguiente panel corresponde a la amplificación del transcrito del gen RPL2, utilizado como control. El panel inferior presenta la integridad del RNA empleado (RNA total). B) Detección mediante Western blot de la proteína recombinante GAGT en plantas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. GAGT 1, 2 y 3: líneas de expresión transitoria pGWB8_GAGT. La detección de la proteína sobreexpresada se realizó con el anticuerpo primario Anti-His₆ y el anticuerpo secundario Anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina.

1.2. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de Arabidopsis GAGT

Una vez comprobado que la construcción pGWB8_GAGT obtenida resultaba en la acumulación de proteína en plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas, decidimos llevar a cabo la obtención de plantas transgénicas estables, con el fin de estudiar la actividad de GAGT *in vivo*, así como su función en la respuesta defensiva. En una primera aproximación, se utilizó la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, en la que se

ha descrito la acumulación de GA como consecuencia de una infección patogénica (Bartsch *et al.*, 2010) y por las ventajas que presenta respecto a tomate.

1.2.1. Transformación genética de *Arabidopsis thaliana*

La transformación de plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia con la construcción pGWB8_ *GAGT* se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Como resultado de la transformación, se obtuvo finalmente cinco líneas de *Arabidopsis* resistentes a kanamicina. Para comprobar la sobreexpresión del transgén, se realizó una amplificación del transcrito de *GAGT* mediante RT-PCR para cada una de las líneas. Como puede verse en la Figura 18, todas las líneas analizadas mostraron expresión constitutiva del gen *GAGT*. De entre ellas, se seleccionaron las líneas AtG 37 y AtG 43, debido a la buena expresión de *GAGT*. Además, se comprobó que ambas líneas presentaban una segregación correspondiente a la integración de una única copia. Partiendo de la generación T₀ se llevaron a cabo los estudios de segregación del transgén para obtener plantas transgénicas homocigotas (ver Materiales y Métodos), con las que se realizaron los ensayos posteriores.

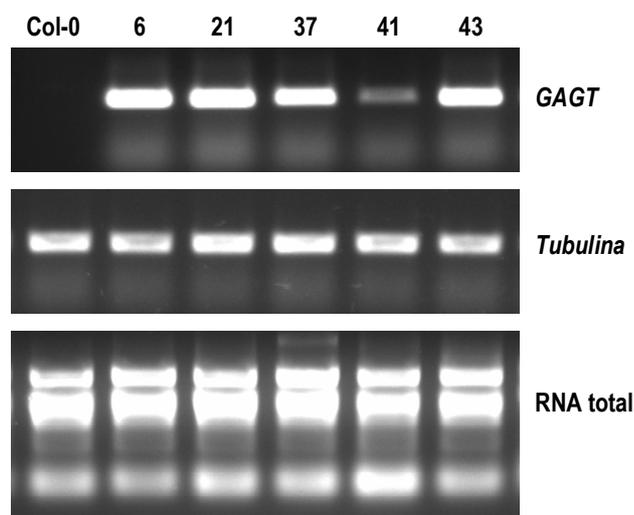


Figura 18. Acumulación del mRNA de *GAGT* en las líneas transgénicas de *Arabidopsis*. Se muestra el análisis mediante RT-PCR de la expresión del transcrito de *GAGT* en hojas de las cinco líneas transgénicas (6, 21, 37, 41 y 43) comparadas con el control (Col-0). La expresión del transcrito de *Tubulina* en hojas se ha empleado como control interno. El panel inferior representa la integridad del RNA extraído de las muestras analizadas (RNA total).

1.2.2. Tratamiento exógeno con GA de plantas transgénicas de *Arabidopsis* GAGT

Para llevar a cabo el estudio de la actividad de GAGT en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, se realizó un tratamiento exógeno con GA, con el fin de proporcionar el sustrato necesario para analizar la actividad del enzima. Las plantas se rociaron y regaron con una disolución 1 mM de GA (ver Materiales y Métodos). La recogida de muestras tuvo lugar a las 24 horas desde el inicio del tratamiento. A continuación se realizó una extracción metanólica del material vegetal y se analizó mediante HPLC. Los resultados correspondientes a los niveles de GA libre y GA total (GA libre + GA conjugado) para Col-0, AtG 37 y AtG 43 se muestran en la Figura 19.

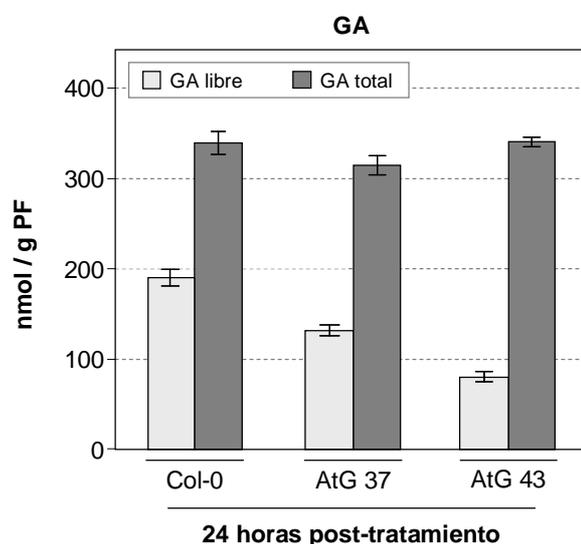


Figura 19. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de *A. thaliana* GAGT tras el tratamiento con ácido genticico. Se extrajeron compuestos fenólicos de hojas de las líneas transgénicas GAGT (AtG 37 y AtG 43) y plantas control Col-0, tratadas con una disolución de GA 1 mM, a las 24 horas post-tratamiento. Los extractos fueron analizados mediante HPLC de fluorescencia. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes.

Se observa que, como consecuencia del tratamiento, todas las plantas acumularon niveles similares de GA total (en torno a los 300 nmol/g peso fresco). Los niveles de GA previos al tratamiento han resultado indetectables o despreciables. Puesto que se produce una considerable conjugación de GA en las plantas control Col-0, se deduce que *Arabidopsis* posee actividad glicosiltransferasa capaz de actuar

frente a GA. De hecho, se ha detectado la acumulación de GA en plantas de *Arabidopsis* en forma conjugada (Dean y Delaney, 2008; Bartsch *et al.*, 2010), pero la proteína o proteínas que llevan a cabo dicha conjugación en esta especie no han sido identificadas hasta la fecha. Puede verse en la Figura 19 que la conjugación de GA es mayor en el caso de ambas líneas transgénicas GAGT respecto a Col-0, ya que para unos niveles de acumulación de GA total muy similares en todas ellas, los niveles de GA en forma libre son inferiores en las plantas transgénicas.

Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, en la Tabla 5 se muestran los porcentajes de conjugación y los niveles de GA libre para cada una de las líneas transgénicas, así como para las plantas control. Se observa un mayor porcentaje de conjugación y, consecuentemente, niveles inferiores de GA libre en ambas líneas transgénicas, con respecto a las plantas control. Dichas diferencias son más acusadas para el caso de la línea AtG 43, resultando estadísticamente significativas con respecto a las plantas control.

	conjugación (%)	valor <i>p</i>	GA libre (nmol / g PF)	valor <i>p</i>
Col-0	47.66	--	171.77	--
AtG 37	61.5	< 0.05	125.04	0.168
AtG 43	73.93	< 0.01	80.88	< 0.05

Tabla 5. Porcentaje de conjugación y acumulación de GA libre en plantas transgénicas de *A. thaliana* GAGT (AtG 37 y AtG 43) y plantas control Col-0 tratadas con GA 1 mM, a las 24 horas post-tratamiento. El valor *p* se obtuvo mediante un análisis estadístico *t* de Student de los datos correspondientes a tres experimentos independientes.

Hemos, por tanto, obtenido un sistema binario para la sobreexpresión de *GAGT* en plantas, dando lugar a una proteína activa frente a GA aplicado exógenamente, confirmando la actividad de *GAGT in vivo* en un sistema heterólogo. La sobreexpresión de *GAGT* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* da lugar a un fenotipo metabólico, puesto que estas plantas presentan un mayor porcentaje de conjugación de GA, lo que provoca un descenso en la cantidad de GA libre. Este mismo efecto se ha

observado al llevar a cabo la sobreexpresión en *Arabidopsis* de UGT73C6, una proteína que presenta actividad glicosiltransferasa frente a brasinoesteroides (BRs) (Husar *et al.*, 2011). El brasinólido, aplicado exógenamente, es rápidamente asimilado por las plantas transgénicas y glicosilado, lo que causa la reducción en los niveles libres de BRs, que resultan ser los niveles activos. Puesto que los BRs son moléculas señal con un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, dichas plantas transgénicas presentan defectos en el crecimiento en comparación con las plantas control, debidas a la deficiencia en BRs.

Hasta la fecha no se ha estudiado en profundidad si el GA desempeña alguna función en *A. thaliana*. Sin embargo, se ha observado la acumulación de GA en plantas de *Arabidopsis* infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst AvrRpm1*), predominantemente en forma conjugada, aunque también se ha detectado en forma libre (Bartsch *et al.*, 2010). Esto abre una nueva vía para el estudio del posible papel del GA en la respuesta defensiva de las plantas, empleando *Arabidopsis* como sistema modelo.

Por tanto, llevamos a cabo el estudio de la inducción del gen de defensa *PR1* en plantas de *Arabidopsis* tratadas con GA. Plantas Col-0 rociadas y regadas con una disolución 1 mM de GA (ver Materiales y Métodos) fueron analizadas por PCR cuantitativa transcurridas 24 horas desde el inicio del tratamiento. Se emplearon plantas tratadas con una disolución 1 mM de SA como control positivo del experimento. En la Figura 20 se muestra cómo, efectivamente, tratamientos exógenos con SA producen una fuerte inducción de *PR1*. Se observa que los tratamientos con GA también inducen la acumulación del mensajero de *PR1*, alcanzando niveles 10 veces superiores a los detectados en las plantas control tratadas con H₂O. Esto pone de manifiesto que tratamientos con GA producen la activación de la respuesta defensiva en *Arabidopsis*, de igual modo a como ocurre en tomate, *Gynura* o pepino (Bellés *et al.*, 1999, 2006), lo que sugiere que el GA podría también jugar un papel en la respuesta defensiva en *A. thaliana*.

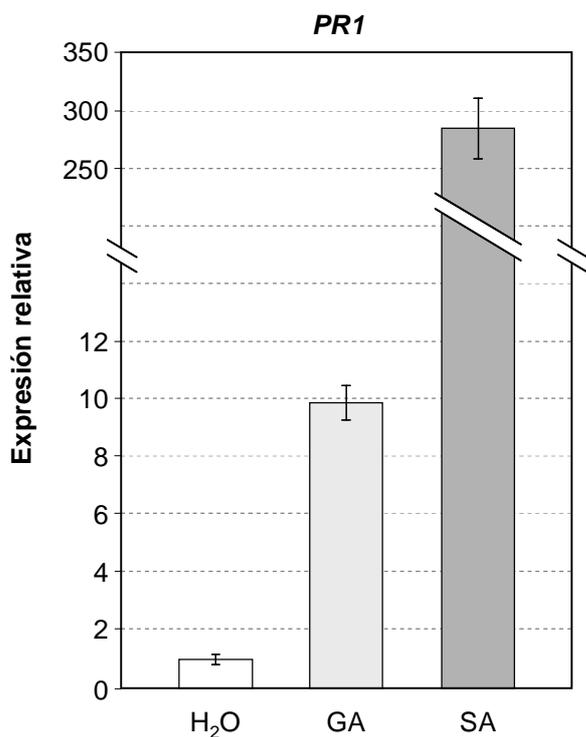


Figura 20. Niveles de expresión del gen *PR1* en plantas de *Arabidopsis Col-0* tratadas con agua (H₂O), ácido genticico (GA) y ácido salicílico (SA), a las 24 horas post-tratamiento. Los niveles de mRNA se determinaron por RT-PCR cuantitativa. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen de la familia *SAND* (*At2g28390*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas control no tratadas. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

1.2.3. Infección de plantas transgénicas de *Arabidopsis GAGT* con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000 AvrRpmI*

Se ha observado la acumulación de GA en plantas de tomate, *Gynura aurantiaca* o pepino como consecuencia de infecciones no necrotizantes (Bellés *et al.*, 1999, 2006). En el caso de *Arabidopsis*, esta acumulación de GA frente a una infección patológica, así como el papel que este compuesto desempeña en la respuesta defensiva, no han sido estudiados.

Con el fin de analizar el papel del GA en la respuesta defensiva en *A. thaliana*, se llevó a cabo la infección de plantas transgénicas de *Arabidopsis GAGT* con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000 AvrRpmI*, y se estudió la posible implicación de la sobreexpresión de *GAGT* sobre el crecimiento bacteriano¹. Asimismo, se analizaron los niveles de acumulación de GA libre y conjugado como consecuencia de la infección.

¹ Estos estudios fueron llevados a cabo durante una estancia de tres meses en el laboratorio de la Dra. Susana Rivas (LIPM, Toulouse, Francia).

Cuantificación de los niveles de ácido gálico libre y conjugado

Se llevó a cabo la infección con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *AvrRpm1* de plantas transgénicas de *A. thaliana* GAGT, plantas control Col-0 y plantas NahG, incapaces de acumular SA (Delaney *et al.*, 1994; Rairdan y Delaney, 2002). Dicha infección se realizó según se describe en Materiales y Métodos y la recogida de muestras se llevó a cabo a las 24 horas post-inoculación (hpi). Con el fin de estudiar la acumulación de GA en plantas de *Arabidopsis* a causa de la infección, se realizó la cuantificación del contenido en GA libre y GA total mediante HPLC. La Figura 21 muestra los resultados de dichas medidas correspondientes a Col-0, NahG, y las líneas transgénicas de *Arabidopsis* AtG 37 y AtG 43.

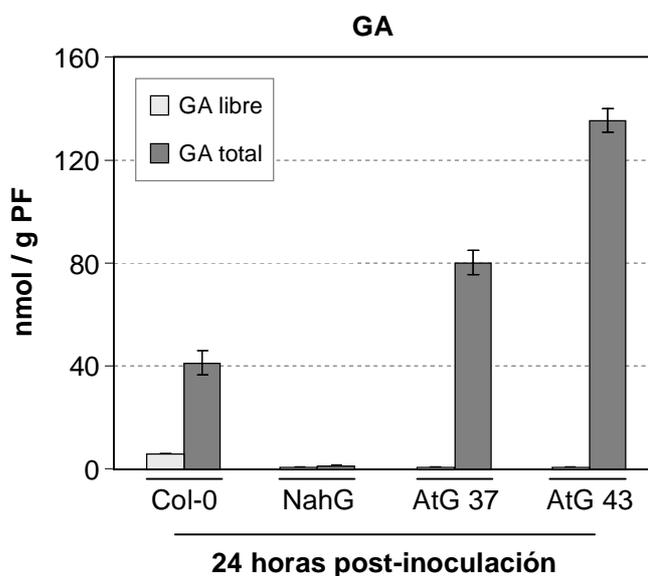


Figura 21. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de *A. thaliana* GAGT infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *AvrRpm1*. Análisis mediante HPLC de fluorescencia de extractos fenólicos de hojas de las líneas transgénicas GAGT (AtG 37 y AtG 43), NahG y plantas control Col-0, a las 24 horas post-inoculación. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes.

Las plantas control Col-0 acumularon GA como consecuencia de la infección con la bacteria *Pst AvrRpm1*, corroborando lo descrito anteriormente por Bartsch y colaboradores (2010). Tal y como cabía esperar, no se detectaron niveles de GA en las plantas NahG, puesto que estas plantas son incapaces de acumular SA, que es el

precursor del GA. Ambas líneas transgénicas GAGT acumularon una mayor cantidad de GA total, respecto al control Col-0. De igual modo a como habíamos observado en el caso de los tratamientos exógenos, las plantas transgénicas GAGT presentaron una mayor cantidad de GA en forma conjugada, respecto a plantas control. De hecho, parece que el GA acumulado durante la infección en AtG 37 y AtG 43 está conjugado en su totalidad, ya que no se detectó GA en forma libre en plantas de ninguna de las dos líneas transgénicas. A diferencia, detectamos una pequeña acumulación de GA en forma libre en las plantas control Col-0.

En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de conjugación y la cantidad de GA libre para cada línea. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para los tratamientos de GA, aunque el porcentaje de conjugación en caso de infección es superior. Esto podría deberse a que los niveles de GA total acumulados a causa de la infección (en torno a 100 nmol/g PF) son muy inferiores a los alcanzados con el tratamiento y ello haga que la conjugación sea más efectiva con una menor cantidad de sustrato. Las diferencias entre las líneas transgénicas y Col-0 en cuanto a porcentaje de conjugación y cantidad de GA libre resultaron estadísticamente significativas en ambos casos y para ambas líneas AtG 37 y AtG 43.

	conjugación (%)	valor <i>p</i>	GA libre (nmol / g PF)	valor <i>p</i>
Col-0	88.67	--	4.62 ± 0.38	--
AtG 37	100	< 0.01	0	< 0.05
AtG 43	100	< 0.01	0	< 0.05

Tabla 6. Porcentaje de conjugación y acumulación de GA libre en plantas transgénicas de *A. thaliana* GAGT (AtG 37 y AtG 43) y plantas control Col-0 infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato AvrRpm1*, a las 24 horas post-inoculación. El valor *p* se obtuvo mediante un análisis estadístico *t* de Student de los datos correspondientes a tres experimentos independientes.

Dado que el GA acumulado durante una infección procede del SA, en las plantas transgénicas GAGT que acumulan más GA cabría esperar una reducción en los niveles

de SA, en comparación con las plantas control. Sin embargo, en el caso de las líneas transgénicas AtG 37 y AtG 43, no hemos detectado diferencias notables en los niveles de SA, libre o conjugado, en muestras recogidas a las 24 horas post-inoculación, respecto a Col-0 (datos no mostrados). Estos resultados coinciden con los recientemente publicados por Bartsch y colaboradores (2010), puesto que plantas de *Arabidopsis*, tanto Col-0 como el mutante *eds1*, no mostraron una correlación clara entre el contenido en SA y el contenido en GA cuando se produjo la acumulación de ambos en respuesta a la infección con *P. syringae*. A las 24 hpi, la acumulación de GA era casi el doble en Col-0 en comparación con *eds1*, sin embargo, los niveles de SA resultaron ser prácticamente iguales en ambos genotipos.

Cuantificación del crecimiento bacteriano

Con el fin de estudiar el efecto de la sobreexpresión de GAGT sobre el crecimiento bacteriano, se llevó a cabo la infección de plantas transgénicas de *A. thaliana* GAGT, plantas control Col-0 y plantas NahG con la bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000 *AvrRpm1* según se detalla en Materiales y Métodos. La cuantificación del crecimiento bacteriano se llevó a cabo a los 3 días post-inoculación, mediante conteo de colonias en placa sobre medio selectivo.

En la Figura 22 se observa cómo las plantas NahG, incapaces de acumular SA y por tanto más susceptibles a la infección (Delaney *et al.*, 1994; Rairdan y Delaney, 2002), presentan un mayor crecimiento bacteriano respecto a las plantas control Col-0. Asimismo, se observa que las líneas AtG 37 y AtG 43 presentan valores de crecimiento bacteriano superiores a Col-0, aproximándose a los valores alcanzados en plantas NahG. Ello indica que las plantas transgénicas GAGT son más susceptibles a la infección con *Pst AvrRpm1* que las plantas control Col-0. Este aumento en la susceptibilidad podría estar relacionado con la menor presencia de GA en forma libre en estas líneas transgénicas.

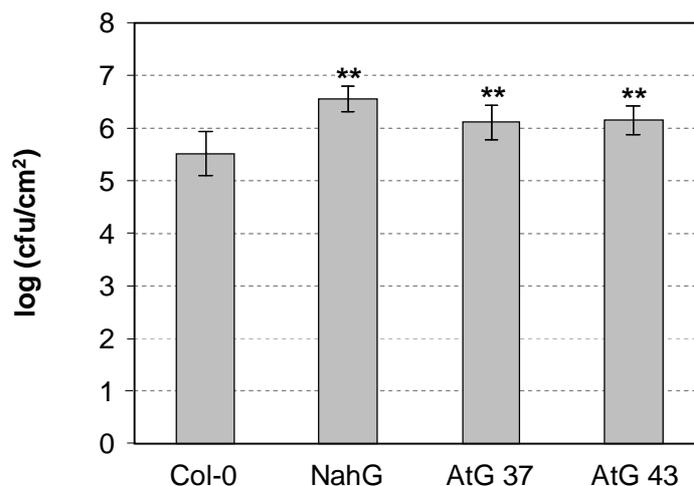


Figura 22. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato AvrRpm1* en hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* GAGT. Las unidades formadoras de colonias (cfu) bacterianas en plantas transgénicas AtG 37 y AtG 43, NahG y plantas control (Col-0) se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. El crecimiento bacteriano se cuantificó a los 3 días después de la inoculación. La media y el error estándar mostrados corresponden a cinco plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

Cuantificación de la expresión del gen marcador de defensa *PR1*

El gen *PR1* es un marcador clásico de defensa en plantas (Metzler *et al.*, 1991; van Loon *et al.*, 2006), por lo cual resulta interesante estudiar su expresión en esta infección. Para ello, plantas transgénicas de *A. thaliana* GAGT y NahG, y plantas control Col-0 fueron infectadas con la bacteria fitopatógena *Pst AvrRpm1*. A continuación se tomaron muestras a las 24 hpi que fueron analizadas por PCR cuantitativa para estudiar la expresión del gen *PR1*. Los resultados obtenidos de la inducción de *PR1* en las diferentes líneas estudiadas se muestran en la Figura 23.

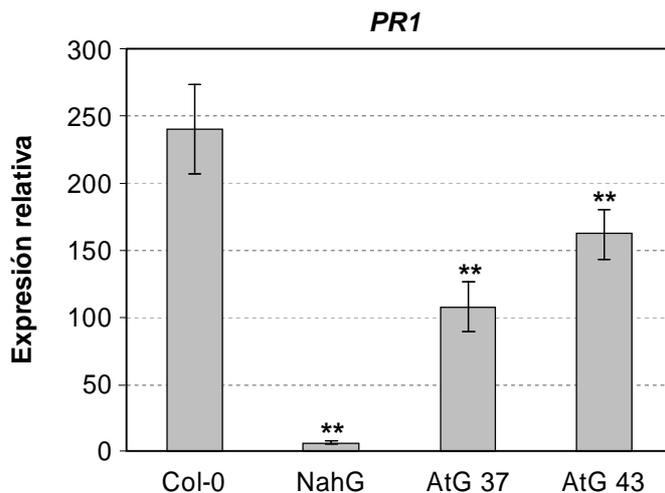


Figura 23. Niveles de expresión del gen *PR1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* *GAGT* infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato AvrRpm1*. Los niveles de mRNA de hojas de las líneas transgénicas *GAGT* (AtG 37 y AtG 43), NahG y plantas control Col-0 se determinaron a las 24 horas post-inoculación por RT-PCR cuantitativa. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen de la familia *SAND* (*At2g28390*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas control no infectadas. La media y el error estándar mostrados corresponden a cuatro plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. La significación estadística se muestra para plantas transgénicas infectadas frente a plantas control infectadas. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

Como cabía esperar, *PR1* presentó una clara inducción en Col-0 como consecuencia de la infección bacteriana a las 24 horas post-infección, mientras que las plantas NahG, incapaces de acumular SA, presentaron unos niveles de acumulación de *PR1* muy bajos, respecto a las plantas Col-0. Las líneas transgénicas AtG 37 y AtG 43 presentaron valores de expresión de *PR1* inferiores a los detectados en Col-0. Los resultados de *PR1* correlacionan con los resultados del crecimiento bacteriano, puesto que plantas con menor inducción de *PR1* son más susceptibles a la infección.

Hemos obtenido, por tanto, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *GAGT*, una glicosiltransferasa de tomate que conjuga GA. Dichas plantas transgénicas sometidas a una infección bacteriana, presentan una menor acumulación de GA en forma libre, una disminución en la inducción de *PR1* y una mayor susceptibilidad frente a la bacteria *P. syringae*, en comparación con las plantas

control. Estos resultados refuerzan el papel propuesto para GA en la respuesta defensiva.

Se han descrito resultados muy similares al sobreexpresar en *Arabidopsis AtSGT1*, una glicosiltransferasa de ácido salicílico (Song *et al.*, 2008). La sobreexpresión de *AtSGT1* da lugar a un fenotipo de susceptibilidad frente a la infección con *P. syringae*. Las plantas transgénicas mostraron una reducción en la acumulación de SA en forma libre, lo que explica el fenotipo de susceptibilidad, según los autores de este trabajo. Además, este fenotipo concuerda con la expresión de *PR1* durante la infección, que está retrasada y reducida en las plantas transgénicas de sobreexpresión de *AtSGT1*, respecto a las plantas control. Recientemente se ha descrito que mutantes de *Arabidopsis* en la expresión de *UGT74F1* y *UGT74F2*, afectados en la producción de los conjugados de SA, presentan una alteración en la resistencia frente a *Pseudomonas*. Concretamente, el mutante *ugt74f2* infectado con *P. syringae* presentó una mayor acumulación de SA libre y por tanto una mayor resistencia frente a la infección bacteriana, en comparación con las plantas Col-0 (Boachon *et al.*, 2014).

Diversos estudios realizados en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto que al modificar la expresión de diferentes glicosiltransferasas de plantas, su resistencia o susceptibilidad frente a una infección patogénica puede verse alterada. La expresión de las glicosiltransferasas *UGT73B3* y *UGT73B5*, que se inducen en respuesta al ataque patogénico, es necesaria para la resistencia de *Arabidopsis* frente a *Pseudomonas syringae* (*Pst AvrRpm1*), puesto que los mutantes *ugt73b3* y *ugt73b5* son incapaces de desarrollar la HR y por tanto son más susceptibles a la infección (Langlois-Meurinne *et al.*, 2005). También se ha descrito que la sobreexpresión de una UDP-glucosiltransferasa de cebada en *Arabidopsis* da lugar a la aparición de resistencia frente a la micotoxina deoxinivalenol (Shin *et al.*, 2012). Además, la sobreexpresión de esta GT no conlleva cambios morfológicos drásticos, a diferencia de su homóloga en *Arabidopsis DOGT1* (Poppenberger *et al.*, 2003), por lo que esta glucosiltransferasa se perfila como un buen candidato a la hora de desarrollar cultivos transgénicos resistentes a *Fusarium*, sin efectos colaterales indeseables. Por otra parte, la glucosiltransferasa *UGT76B1* de *Arabidopsis*, que conjuga ácido isoleucínico, es capaz

de modular procesos tan importantes como la respuesta defensiva de la planta o la senescencia (von Saint Paul *et al.*, 2011). La pérdida de función de UGT76B1 aumenta la resistencia al patógeno biótrofo *Pseudomonas syringae*, pero incrementa la susceptibilidad frente al hongo necrótrofo *Alternaria brassicicola*, mientras la sobreexpresión de esta GT produce el efecto contrario. Recientemente se ha descrito que UGT73B3 y UGT73B5 son componentes del 'status redox' que se establece en la resistencia de *Arabidopsis* frente a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Simon *et al.*, 2014). Al parecer, ambas glicosiltransferasas participan en la regulación de este 'status' y en la detoxificación general de las ROS durante la HR, puesto que los mutantes *ugt* presentan una menor resistencia frente a la infección con *Pst AvrRpm1* y una evidente perturbación del sistema redox. Todos estos estudios realizados en *Arabidopsis* han demostrado que las glicosiltransferasas juegan un papel importante en la respuesta defensiva de las plantas frente a diferentes infecciones patogénicas. Por tanto, las GTs pueden ser una diana de manipulación genética interesante a la hora de obtener plantas transgénicas más resistentes a enfermedades en especies de interés agronómico.

Con el fin de profundizar en el estudio del papel señalizador del GA en la respuesta defensiva, resulta de especial interés la obtención de plantas transgénicas en otras especies donde previamente se observó la acumulación de GA como consecuencia de una infección, esto es, tomate, *Gynura aurantiaca* o pepino (Bellés *et al.*, 1999, 2006). Además, hay que recordar que GAGT es una glicosiltransferasa de ácido gentísico descrita en tomate. Por tanto, la sobreexpresión en su especie original podría aportar nueva información acerca de su función.

1.3. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate GAGT

Posteriormente a la utilización de *Arabidopsis thaliana*, se abordó la obtención de plantas de tomate que sobreexpresaran GAGT. Debido a su elevada eficiencia de transformación, se seleccionó la variedad 'MoneyMaker'. Por otra parte, resultados previos de nuestro laboratorio indicaban que esta variedad también acumula GA

como consecuencia de infecciones sistémicas, tales como las causadas por ToMV o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Concretamente, observamos que el máximo de acumulación en dicho cultivar tuvo lugar como consecuencia de la infección con ToMV, alcanzando unos niveles comparables a los descritos en infecciones de pepino con PNSRV o de *Gynura aurantiaca* con CEVd (Bellés *et al.*, 2006). Por este motivo se decidió transformar la variedad 'Moneymaker' en un fondo *tm2²*, esto es, susceptible a la infección con ToMV, con el fin de poder llevar a cabo en el futuro ensayos de resistencia frente a este virus utilizando las plantas transgénicas obtenidas.

1.3.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'

Así pues, con la construcción pGWB8_GAGT empleada previamente para la transformación de *Arabidopsis*, se llevó a cabo la transformación genética de tomate 'Moneymaker' mediante co-cultivo de explantes de cotiledón, como se detalla en Materiales y Métodos. De dicha transformación se obtuvieron 6 líneas transgénicas de tomate resistentes a kanamicina. Para comprobar que el transgén se estaba sobreexpresando se realizó una purificación de RNA total y una posterior RT-PCR para cada una de las líneas. Este análisis se efectuó sobre plantas T₀, tanto en el caso de las transgénicas como en los controles, después de un periodo de un mes de aclimatación en el invernadero. Todas las líneas transgénicas mostraron expresión constitutiva del gen *GAGT*, siendo las líneas transgénicas 5, 8 y 11 las que presentaron una mayor acumulación de mRNA de *GAGT*, mientras que no se detectó acumulación de transcrito en las plantas control. Dichas líneas transgénicas se emplearon para los posteriores estudios.

1.3.2. Caracterización de las plantas transgénicas de tomate *GAGT*

Las líneas *GAGT* 5, *GAGT* 8 y *GAGT* 11 fueron analizadas por PCR cuantitativa para determinar el nivel de acumulación de mRNA de *GAGT*. Para ello, se empleó material vegetal de las líneas transgénicas *GAGT* y control para realizar RT-PCR cuantitativa

según se detalla en Materiales y Métodos, con cebadores específicos de *GAGT* (Figura 24). Las tres líneas analizadas presentaron niveles de expresión de *GAGT* superiores al control.

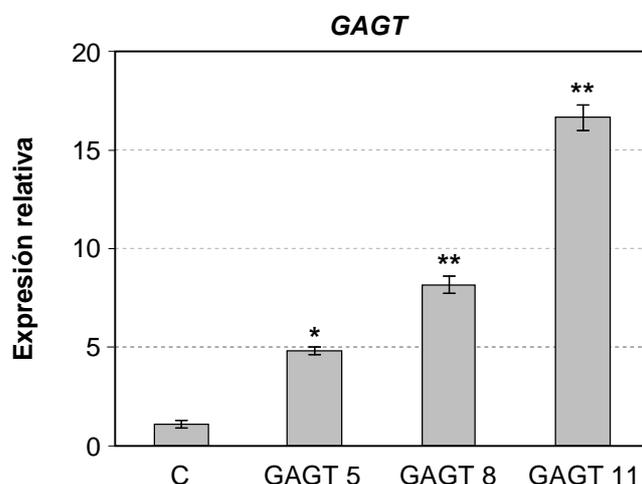


Figura 24. Nivel de expresión del gen *GAGT* en hojas de plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de *GAGT*. Se empleó tejido foliar de diferentes líneas transgénicas de tomate *GAGT* (5, 8 y 11) para analizar mediante RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *GAGT* en hojas de tomate y plantas control (C). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1 α)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas control. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$, respecto a las plantas control. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

Los niveles de expresión génica de *GAGT* variaron significativamente entre las diferentes líneas transgénicas, siendo la línea *GAGT* 5 la que presentaba los niveles más bajos y la línea *GAGT* 11 los más altos. Por ello, la línea transgénica *GAGT* 11 fue seleccionada para continuar con el estudio de *GAGT* en tomate. Plantas de esta línea fueron aclimatadas en el invernadero y cultivadas para obtener semillas de la generación T_1 . Estas semillas fueron crecidas en presencia de kanamicina, tal y como se describe en Materiales y Métodos, para llevar a cabo los ensayos que se presentan a continuación.

1.3.3. Tratamiento exógeno con GA de plantas transgénicas de tomate GAGT

De igual modo a como se había realizado con anterioridad en *Arabidopsis* para estudiar la actividad de GAGT, se realizó un tratamiento exógeno con GA a las plantas transgénicas de tomate con el fin de proporcionar el sustrato necesario. En este caso, la incubación con el sustrato se realizó mediante la técnica del *stem-feeding*. Brevemente, plantas de tomate 'MoneyMaker' y transgénicas GAGT 11 de un mes de edad se cortaron por el tallo y se embebieron en disoluciones de GA 1 mM durante 24 horas (ver Materiales y Métodos). La recogida de muestras tuvo lugar a las 0, 6 y 24 horas del inicio del tratamiento. A continuación se realizó una extracción de compuestos fenólicos del material vegetal que se analizaron mediante HPLC. La Figura 25 muestra los resultados de acumulación de GA libre y GA total en plantas de tomate control y plantas GAGT 11, a las 6 y 24 horas desde el inicio del tratamiento. Los niveles de GA existentes en las plantas, previos al tratamiento, fueron indetectables o despreciables.

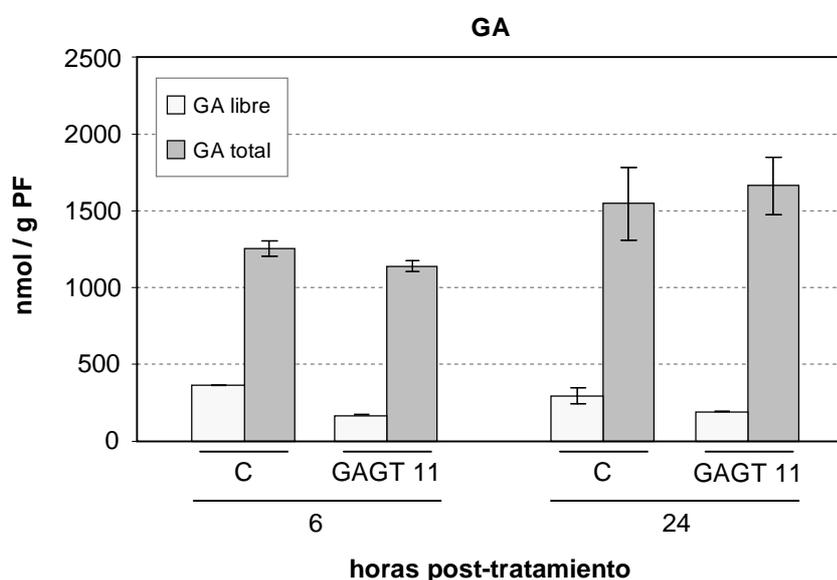


Figura 25. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de tomate GAGT tras el tratamiento con GA. Se extrajeron compuestos fenólicos de plantas GAGT 11 y control (C) tratadas con GA 1 mM, a las 6 y 24 horas post-tratamiento y se analizaron mediante HPLC de fluorescencia de extractos fenólicos. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

Respecto a los niveles de GA total, se observa que son similares en plantas transgénicas frente a plantas control para cada uno de los tiempos, alcanzando una acumulación mayor a las 24 horas, con valores que superan los 1500 nmol/ g peso fresco. Sin embargo, se observan diferencias en los niveles de GA libre, resultando ser inferiores en el caso de las plantas transgénicas GAGT, tanto a 6 como 24 horas, en comparación con las plantas control.

Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, en la Tabla 7 se muestra el porcentaje de conjugación, que es superior en las plantas transgénicas GAGT, y la cantidad de GA libre, que es menor en el caso de las plantas transgénicas frente a las plantas control.

6 horas post-tratamiento	GA libre (nmol / g PF)	conjugación (%)	24 horas post-tratamiento	GA libre (nmol / g PF)	conjugación (%)
Money Maker	366.63 ± 26.46	70.86	Money Maker	308.95 ± 11.53	80.06
GAGT 11.1	163.56 ± 5.03	85.63	GAGT 11.1	205.70 ± 6.11	87.68

Tabla 7. Porcentaje de conjugación y acumulación de GA libre en plantas transgénicas de tomate GAGT 11 y plantas control (C) tratadas con GA 1 mM, a las 6 y 24 horas post-tratamiento.

Los resultados en tomate concuerdan con los anteriormente obtenidos en Arabidopsis, ya que la sobreexpresión de *GAGT* en ambas especies da lugar a un aumento del porcentaje de conjugación y, en consecuencia, a una disminución en los niveles de GA libre, respecto a las plantas control. No obstante, las diferencias son más acusadas en el caso de Arabidopsis, donde los niveles de GA total alcanzados como consecuencia del tratamiento son menores (300 nmol frente a 1500 nmol), por lo que la conjugación podría resultar más eficaz para una menor cantidad de sustrato. Este efecto de la dosis de sustrato se observa también al comparar los porcentajes de conjugación en Arabidopsis como consecuencia de los tratamientos y de la infección, siendo mayores en el segundo caso, donde los niveles totales de GA son menores. En el futuro sería interesante llevar a cabo tratamientos de las plantas transgénicas de tomate GAGT con una dosis menor de GA, lo que podría ayudar a esclarecer este

hecho. También resultaría de especial interés estudiar si el fenotipo metabólico observado en tomate conlleva un fenotipo de susceptibilidad frente a una infección patogénica, donde la acumulación de GA será menor que la producida por los tratamientos, como hemos comprobado en el caso de plantas transgénicas de *Arabidopsis* GAGT infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Este tipo de estudios sobre la implicación de la sobreexpresión de GTs en la respuesta defensiva se han realizado en diferentes especies vegetales. En tabaco, la sobreexpresión de TOGT, identificada como una glicosiltransferasa de escopoletina, dio lugar a la formación precoz de lesiones durante la HR (Gachon *et al.*, 2004) y un aumento de la resistencia frente a la infección con TMV (Matros y Mock, 2004). Plantas transgénicas de patata con sobreexpresión de la glicosiltransferasa de antocianinos denominada 5-UGT, perteneciente a la especie *Solanum soganandinum*, mejoraron la resistencia frente a la infección con la bacteria *Erwinia carotovora* (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005). En otra especie de interés agronómico, el lino, se obtuvieron plantas transgénicas que sobreexpresaban SsGT1 y que mostraron una mayor resistencia frente a la infección del hongo *Fusarium* (Lorenc-Kukula *et al.*, 2009). Esta glicosiltransferasa es en realidad la 5-UGT, que presenta actividad frente a antocianinos y también frente a flavonoides. Teniendo en cuenta las propiedades de los flavonoides, y que la glicosilación aumenta su estabilidad, la mayor acumulación de estos compuestos en forma conjugada en plantas transgénicas se considera la responsable del fenotipo de resistencia observado. Recientemente se ha identificado un gen en la especie *Withania somnifera*, denominado *WsSGTL1*. La sobreexpresión de este gen en tabaco da lugar a una proteína con actividad glicosiltransferasa frente a esteroides. La mayor abundancia de estos compuestos en forma conjugada produce en la planta transgénica un incremento en la resistencia al estrés biótico y una mayor tolerancia al estrés salino (Pandey *et al.*, 2014).

2. Estudio de la proteína de tomate inducida por herida *Twi1*

Por su perfil de expresión, las funciones de las glicosiltransferasas de tomate GAGT y *Twi1* podrían estar relacionadas y la caracterización de *Twi1* puede resultar de gran interés en el estudio de la respuesta defensiva de las plantas de tomate frente a ataques patogénicos. Por ello, en este apartado se pretende abordar la caracterización de la actividad *in vitro* e *in vivo* de esta proteína de tomate descrita como "inducida por herida" (*Twi1*). En primer lugar, nos propusimos estudiar la inducción de *Twi1* en respuesta a infección bacteriana. A continuación, decidimos clonar el cDNA completo de *Twi1* en un plásmido binario que permitiera su sobreexpresión y purificación de plantas, con el fin de llevar a cabo la caracterización de su actividad *in vitro*. Con el fin de entender su función, decidimos generar plantas transgénicas de tomate que presentaran silenciamiento de *Twi1*.

2.1. Inducción de *Twi1* en respuesta a la infección por bacteria en tomate

La inducción del gen denominado *Twi1* (*Tomato wound-induced 1*) fue descrita en tomate en respuesta a herida, interacción de tipo incompatible con el hongo *C. fulvum* y tratamientos con compuestos de naturaleza fenólica, tales como el ácido salicílico (SA), por O'Donnell y colaboradores (1998). Estos autores propusieron que dicho gen codificaba una proteína de tipo glicosiltransferasa, debido a la similitud de secuencia que presentaba con las proteínas pertenecientes a esta clase.

Con el fin de estudiar la expresión de *Twi1* en respuesta a infección bacteriana, se emplearon plantas de tomate variedad 'Rio Grande' como hospedador y la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 como patógeno. La variedad de tomate 'Rio Grande' posee el gen de resistencia *Pto*, que es capaz de reconocer el correspondiente gen de avirulencia bacteriano (*AvrPto*). La interacción puede resultar, por tanto, de tipo incompatible o compatible según la bacteria empleada en la

infección sea portadora (*AvrPto*) o no (Δ *AvrPto*) del gen de avirulencia, manteniendo el mismo hospedador.

La infección se realizó en plantas de un mes de edad mediante inmersión en diluciones de una y otra bacteria, según se detalla en Materiales y Métodos. Se recogieron muestras a las 0, 10, 18, 24, 36 y 48 horas post-inoculación y se analizaron por RT-PCR cuantitativa para estudiar la inducción de *Twi1* a lo largo de la infección. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 26.

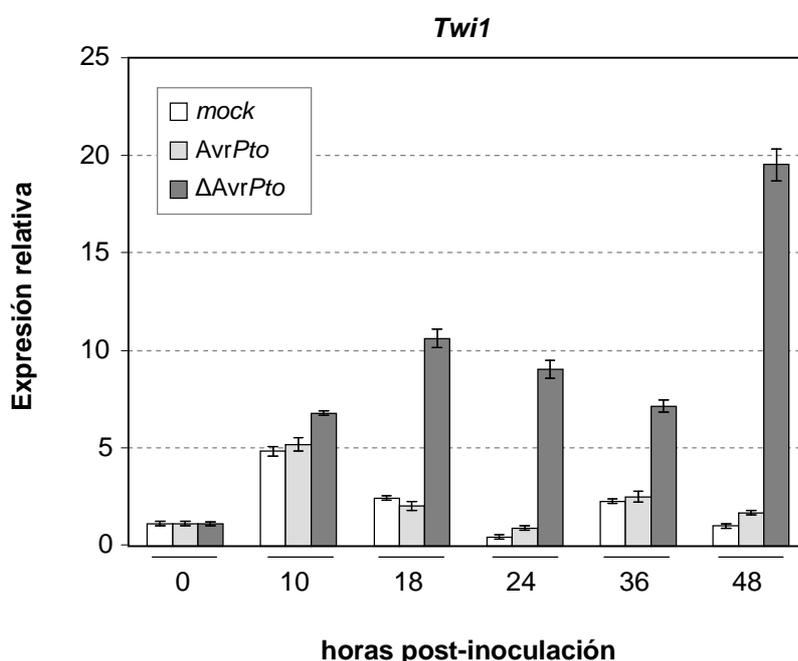


Figura 26. Niveles de expresión del gen *Twi1* en plantas de tomate 'Rio Grande' infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Twi1* en hojas de plantas embebidas en suspensiones bacterianas de *P. syringae AvrPto* o *P. syringae* Δ *AvrPto*, y embebidas en tampón (*mock*), a las 0, 10, 18, 24, 36 y 48 horas post-inoculación. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas a tiempo 0. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

Se observa una fuerte inducción de *Twi1* como consecuencia de la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto*, que produce una interacción compatible y que da lugar, por tanto, al desarrollo de la enfermedad en la planta. En el caso de la interacción incompatible, la inducción de *Twi1* es comparable a la que se

observa en las plantas *mock*, lo que indica que esta inducción se debe más a la propia herida producida en la planta como consecuencia de la técnica empleada que a la infección. Esto contrasta con los resultados obtenidos previamente en la infección de plantas de tomate con *C. fulvum*, donde se observó inducción de *Tw1* en una interacción de tipo incompatible (O'Donnell *et al.*, 1998).

2.2. Expresión transitoria de *Tw1* en plantas de *Nicotiana benthamiana*

Previamente en nuestro laboratorio se había obtenido el cDNA completo que codificaba la proteína *Tw1* de tomate (Tárraga, 2006). Puesto que la actividad de esta proteína no había sido estudiada previamente, se procedió a la obtención de una construcción que permitiera llevar a cabo la sobreexpresión y el estudio de *Tw1* en plantas. Para ello, el cDNA completo de *Tw1* fue clonado en el plásmido binario pGWB8, obteniéndose la construcción pGWB8_*Tw1* tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado 7.1). Este plásmido posee la característica de fusionar una secuencia nucleotídica que codifica 6 histidinas (His) en el extremo 3' del cDNA clonado, lo que posibilita la detección inmunológica de la proteína recombinante con un anticuerpo monoclonal Anti-His, así como su purificación empleando cromatografía de afinidad.

Del mismo modo a como se hizo para GAGT, se llevó a cabo un experimento de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, esta vez con el doble objetivo de comprobar si la construcción obtenida permite la sobreexpresión de la proteína *Tw1* en plantas, así como de purificarla a partir de los tejidos agroinoculados y proceder a su caracterización bioquímica.

Se transformaron bacterias de la cepa C58 de *A. tumefaciens* con el plásmido binario pGWB8 utilizado como control, la construcción pGWB8_*Tw1* y el plásmido p19, que codifica el supresor viral de silenciamiento del mismo nombre, construcción cedida por el Dr. Diego Orzáez (IBMCP, UPV-CSIC, Valencia, España). Dichas bacterias fueron utilizadas para agroinocular plantas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas

de edad, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las consideradas como control fueron infiltradas con una mezcla 1:1 de suspensión de *Agrobacterium* que contenían los plásmidos pGWB8 y p19. Las plantas restantes se infiltraron con una mezcla 1:1 de suspensión de *Agrobacterium* que contenían la construcción pGWB8_*Twi1* y el plásmido p19, de manera análoga a como se hizo para GAGT. Las muestras fueron recogidas a los 3 días de haber realizado la agroinoculación.

A partir de las hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinoculadas con las diferentes construcciones, se procedió al estudio de la expresión del cDNA recombinante de *Twi1* mediante RT-PCR, utilizando cebadores específicos de *Twi1* y cola de histidinas, según se detalla en Materiales y Métodos. Como control se realizaron ampliificaciones empleando oligonucleótidos del gen constitutivo *RPL2* (Fleming *et al.*, 1993).

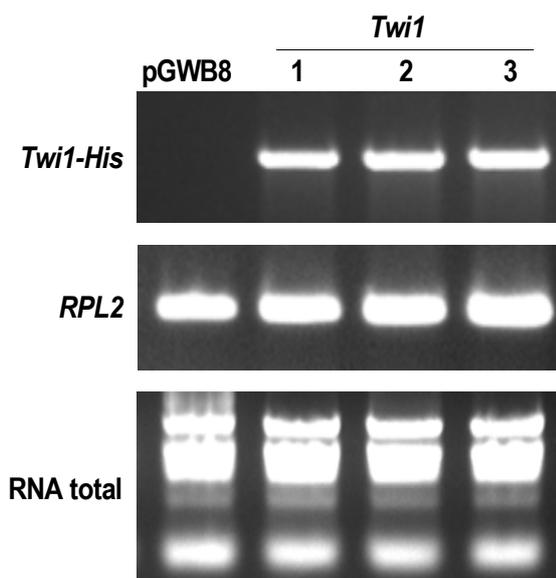


Figura 27. Estudio de la expresión del cDNA *Twi1* recombinante en plantas de *N. benthamiana*. Se muestra el análisis electroforético del resultado de la amplificación de la secuencia de *Twi1* por RT-PCRs realizadas a partir de RNAs de plantas control pGWB8 y plantas transgénicas pGWB8_*Twi1*. Carrera pGWB8: plantas de tabaco control; carreras *Twi1* 1, 2 y 3: líneas de expresión transitoria pGWB8_*Twi1*. *Twi1-His*: PCRs realizadas con cebadores específicos de *Twi1* y de extensión de histidinas. *RPL2*: Amplificaciones realizadas con cebadores específicos del gen *RPL2* utilizado como control. Panel inferior: integridad del RNA empleado (RNA total).

Como se muestra en la Figura 27, el cDNA recombinante de *Twi1* se transcribió en todas las plantas agroinfiltradas con la construcción pGWB8_*Twi1*.

2.3. Purificación de la proteína recombinante *Twi1*

Partiendo del material vegetal agroinoculado con la construcción pGWB8_ *Twi1*, se procedió a la extracción y purificación de la proteína recombinante *Twi1*. Esta proteína presenta en su extremo C-terminal una secuencia de 6 histidinas que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad basada en interacción con níquel, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en la purificación de la proteína recombinante *Twi1* se muestran en la Figura 28.

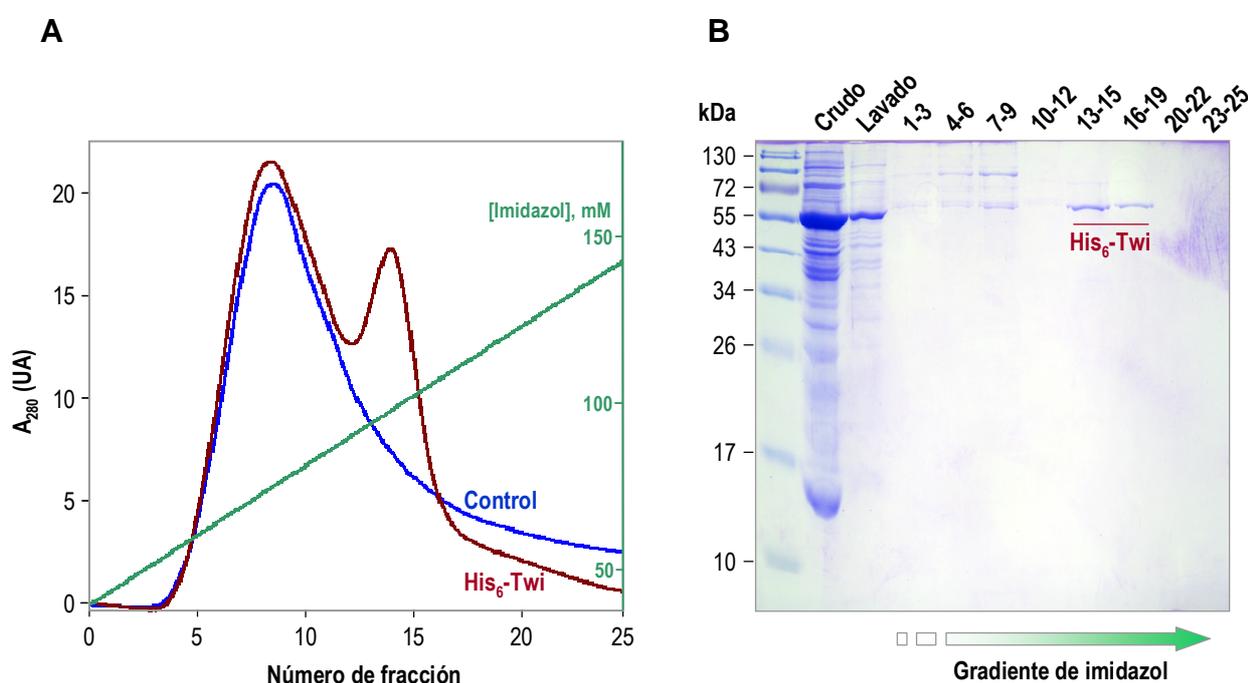


Figura 28. Purificación de *Twi1* recombinante producida por expresión transitoria en *N. benthamiana*. El panel izquierdo (A) muestra el perfil de elución de extractos crudos procedentes de plantas control (en azul) y plantas agroinoculadas con la construcción pGWB8_ *Twi1* (en rojo) al aplicar un gradiente de imidazol según se detalla en Materiales y Métodos. Las fracciones recogidas se analizaron por SDS/PAGE. El panel de la derecha (B) muestra el patrón electroforético correspondiente a la elución mostrada en A.

Como se puede observar, tras la aplicación de un gradiente de imidazol, se pudo recuperar la proteína *Twi1* (de aproximadamente 55 kDa) a partir de las fracciones 13 a 19 (Figura 28B). Dicha proteína purificada fue utilizada para llevar a cabo los estudios de actividad bioquímica.

2.4. Ensayo de actividad de la proteína recombinante *Twi1*

El gen *Twi1* había mostrado inducción por tratamientos con ácido salicílico y análogos estructurales, correspondiendo los mejores resultados a los tratamientos con el propio SA, acetil SA (ASA) y ácido 2,6-dihidroxibenzoico. En su trabajo inicial (1998), O'Donnell y colaboradores describieron a *Twi1* como una posible glicosiltransferasa, debido a la homología de secuencia que presentaba con proteínas de esta familia. Con el fin de caracterizar su posible actividad glicosiltransferasa y si los compuestos que inducían la acumulación de su transcrito podían ser además sustratos de la proteína, llevamos a cabo un ensayo de actividad frente a diferentes hidroxibenzoatos de la proteína recombinante *Twi1* purificada, como se describe en Materiales y Métodos. Se decidió emplear UDP-glucosa como molécula donante del azúcar debido a que es el sustrato más utilizado por las glicosiltransferasas (Lee y Raskin, 1999; Jackson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Seto *et al.*, 2009). En el ensayo de actividad frente a ácido gentísico (2,5-dihidroxibenzoico) utilizamos también UDP-xilosa como donante del azúcar, puesto que este compuesto fenólico se ha detectado conjugado a xilosa en varias especies vegetales (Fayos *et al.*, 2006; Stochmal *et al.*, 2009).

Transcurrido el tiempo del ensayo, las muestras fueron analizadas por HPLC y qToF, según se detalla en Materiales y Métodos, para observar si se había producido una reducción de la cantidad de compuesto en su forma libre, así como la aparición de su forma conjugada. La mayoría de los compuestos ensayados, cuya estructura aparece representada en la Tabla 8, no mostraron diferencias respecto a la cantidad inicial de compuesto libre. Sin embargo, dos muestras, correspondientes al ensayo de actividad frente a ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA) y ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA), presentaron una disminución en la cantidad de compuesto libre inicial, además de observarse la aparición de un nuevo compuesto, correspondiente a la forma conjugada.

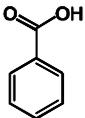
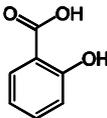
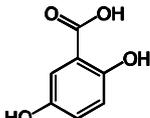
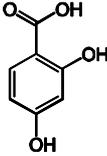
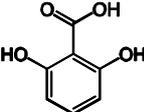
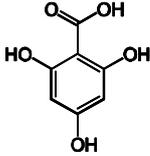
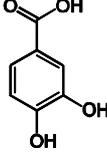
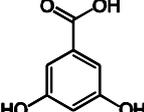
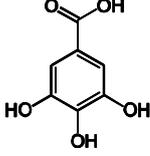
  BA (Benzoico)	  2-HBA (Salicílico)	  2,5-DHBA (Gentísico)*
  2,4-DHBA (β-Resorcílico)	  2,6-DHBA (γ-Resorcílico)	  2,4,6-THBA (Floroglucínico)
  3,4-DHBA (Protocatéquico)	  3,5-DHBA (α-Resorcílico)	  3,4,5-THBA (Gálico)

Tabla 8. Resultados cualitativos frente a diferentes hidroxibenzoatos en la caracterización de la actividad *in vitro* de la proteína recombinante Twi1. El ensayo de actividad se llevó a cabo utilizando como sustratos cada uno de estos compuestos y el donante de azúcar UDP-glucosa (UDP-Glc). Con el ácido gentísico (*) se empleó UDP-glucosa y UDP-xilosa.

Estos resultados ponen de manifiesto que, en efecto, Twi1 es una proteína de tipo glicosiltransferasa, que presenta actividad *in vitro* frente a los ácidos 2,4-dihidroxibenzoico y 2,4,6-trihidroxibenzoico, y que emplea UDP-glucosa como molécula donante del azúcar para estos sustratos. La mayoría de las GTs descritas hasta el momento parecen ser específicas en cuanto al sustrato donante del azúcar empleado (Warnecke y Heinz, 1994; Lee y Raskin, 1999; Vogt y Jones, 2000; Kurosawa *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2004; Seto *et al.*, 2009; Tárraga *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014), por lo que podríamos considerar que Twi1 es específica de UDP-glucosa. Futuros

ensayos de actividad empleando 2,4 DHBA ó 2,4,6 THBA con otras moléculas donantes del azúcar ayudarían a demostrar esta consideración.

Gran parte de las GTs purificadas y caracterizadas por diferentes autores presentan una baja especificidad en cuanto al sustrato aceptor de la molécula de azúcar (Warnecke y Heinz, 1994; Parry y Edwards, 1994; Fraissinet-Tachet *et al.*, 1998; Lee y Raskin, 1999; Taguchi *et al.*, 2000b; Jackson *et al.*, 2001; Seto *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014), mientras otras han resultado ser muy específicas (Yamane *et al.*, 2002; Tárraga *et al.*, 2010). En nuestro caso, *Tw1* parece mostrar actividad frente a dos sustratos aceptores (2,4-DHBA y 2,4,6-THBA), ambos derivados del ácido benzoico y de gran similitud estructural. No obstante con otros hidroxibenzoatos, también muy similares, no se ha producido la reacción de conjugación.

A la vista de estos resultados, nos planteamos comprobar si tratamientos exógenos con estos compuestos fenólicos sustrato *in vitro* de *Tw1* eran capaces de inducir la acumulación del transcrito de esta proteína en plantas de tomate.

2.5. Tratamiento exógeno de plantas de tomate con los sustratos de *Tw1*

2.5.1. Estudio de la inducción del gen *Tw1*

Con el fin de estudiar si los compuestos que actuaban como sustrato de *Tw1* *in vitro* tenían capacidad de inducir el gen *Tw1* *in vivo*, plantas de tomate 'Moneymaker' fueron embebidas mediante la técnica del *stem-feeding* en disoluciones 2 mM de ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA), ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA) y ácido salicílico (SA) como control positivo, de la forma en que se detalla en Materiales y Métodos. Transcurridos 30 minutos, las plantas se transfirieron a agua para iniciar el seguimiento a lo largo del tiempo. Se recogieron muestras a las 0, 0.5, 1, 4, 8 y 24 horas después del tratamiento (hpt), para llevar a cabo el estudio de la inducción de *Tw1* mediante PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29.

Se observa que la inducción de *Tw1* es muy temprana, como ya habíamos detectado previamente, presentando valores máximos durante la primera hora

después del tratamiento (0, 0.5 y 1 hpt), que disminuyen paulatinamente a las 4, 8 y 24 hpt. Tal y como se había descrito previamente, *Twi1* es inducido por SA. No obstante, la inducción producida por los tratamientos con 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA es mucho mayor, resultando ser en torno a tres veces superior a la producida por el SA. Concretamente, la inducción más elevada se produce a las 0.5 horas después del tratamiento con 2,4-DHBA.

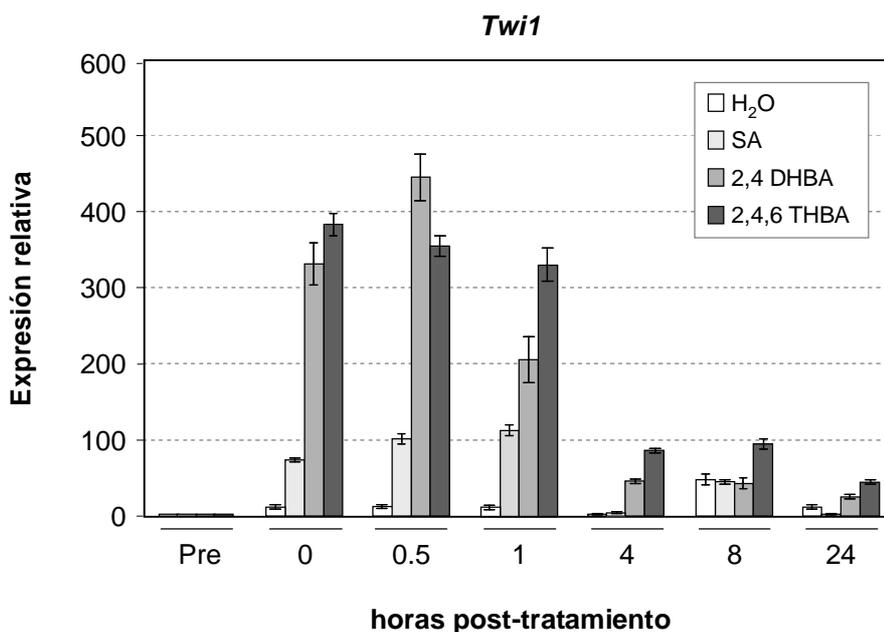


Figura 29. Niveles de expresión del gen *Twi1* en plantas de tomate 'Moneymaker' tratadas con ácido salicílico (SA), ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA) y ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6 THBA). Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Twi1* en explantes embebidos en disoluciones 2 mM de SA, 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA. Pre: hace referencia al estado de la planta antes de iniciar el tratamiento. Transcurridos 30 minutos de tratamiento las plantas fueron transferidas a H₂O (0). Se recogieron muestras a las 0, 0.5, 1, 4, 8 y 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar el tratamiento (Pre). La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

Los resultados de inducción de *Twi1* con 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA corroboran los obtenidos en el ensayo de actividad *in vitro* y refuerzan la idea de que estos compuestos son posibles sustratos *in vivo*, o bien posibles análogos funcionales de

otros sustratos fenólicos del enzima, por lo que su presencia induce la expresión del gen que codifica la glicosiltransferasa *Tw1*.

2.5.2. Estudio de la acumulación de la proteína de defensa PR1

Los compuestos conocidos como hidroxibenzoatos tienen funciones muy importantes en la respuesta defensiva de la planta. De entre ellos, el SA es el más ampliamente estudiado. No obstante, a lo largo de este trabajo hemos observado que otros compuestos, como el GA, también juegan un papel en la activación de la respuesta defensiva de las plantas. Como hemos visto, *Tw1* se induce en tomate como consecuencia de infecciones patogénicas, y presenta actividad glicosiltransferasa frente a 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA *in vitro*. Por ello, es posible que estos compuestos se acumulen en la plantas y tengan una función a la hora de hacer frente a diferentes infecciones patogénicas, como pueden ser las infecciones en las que se ha observado la inducción de *Tw1*.

Como un primer abordaje para el estudio del papel defensivo del 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA, decidimos analizar la acumulación de la proteína de defensa PR1 en tomate por tratamientos exógenos con dichos compuestos fenólicos. Los tratamientos cortos a elevada concentración resultan interesantes a la hora de estudiar genes que presentan una rápida inducción, como es el caso de *Tw1*. Sin embargo, en el caso de PR1 es preferible la realización de un tratamiento a menor concentración de compuesto y más prolongado en el tiempo, puesto que se ha descrito que en tomate PR1 se induce tras 24h de tratamiento con SA 1 mM (Bellés *et al.*, 1999). Por ello, se embebieron plantas de tomate 'Moneymaker' en disoluciones 1 mM de 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA mediante la técnica del *stem-feeding*, durante 48 horas. La recogida de muestras tuvo lugar a las 24 y 48 horas post-tratamiento. A continuación se realizó una extracción de proteínas, seguida de SDS-PAGE y *Western blot* empleando un anticuerpo específico de la proteína PR1 de tomate. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30.

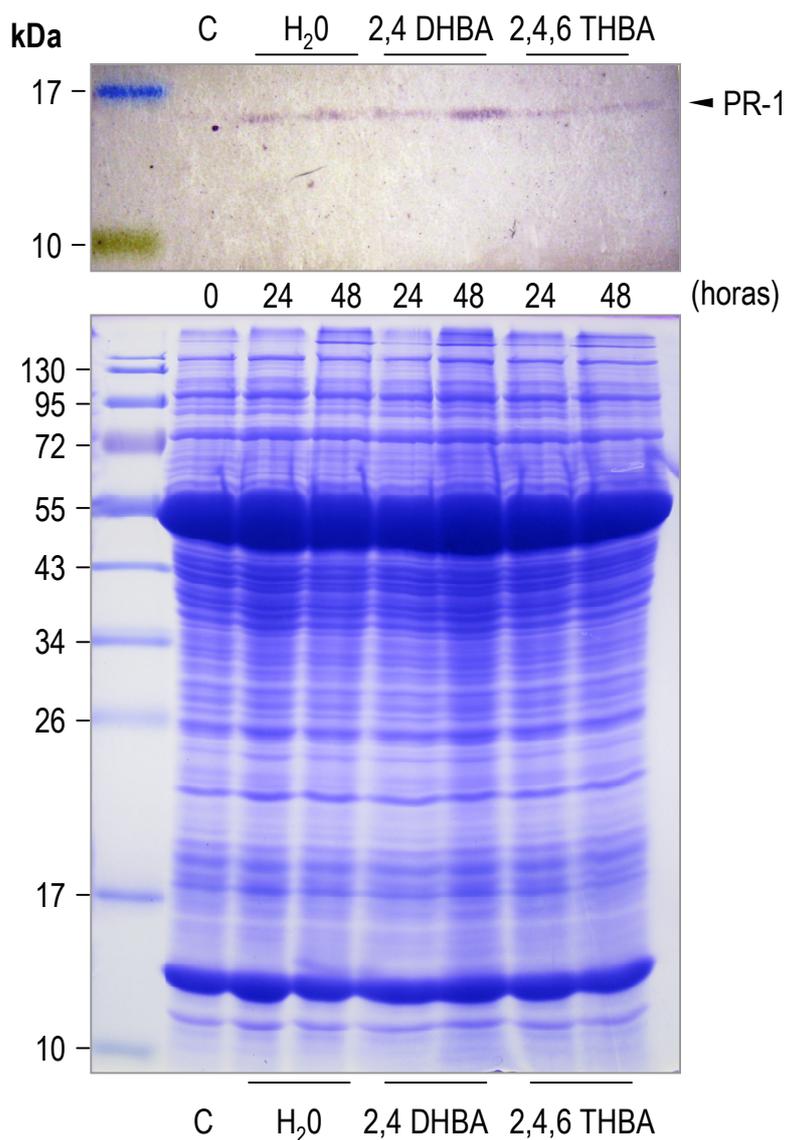


Figura 30. Estudio de la expresión de PR1 en plantas de tomate 'MoneyMaker' tratadas con ácido 2,4-dihidroxi benzoico (2,4 DHBA) y ácido 2,4,6-trihidroxi benzoico (2,4,6 THBA). Panel superior: detección de la proteína PR1 en plantas de tomate tratadas con 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA a las 24 y 48 horas post-tratamiento. La detección de la proteína se realizó con el anticuerpo primario Anti-PR1, y el anticuerpo secundario Anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina. Panel inferior: análisis por SDS-PAGE de las proteínas solubles de hojas de tomate tratadas con H₂O, 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA, a las 24 y 48 horas post-tratamiento. A la izquierda se muestra el marcador de masa molecular de proteínas (kDa). Se realizaron dos experimentos independientes con similares resultados.

Se produce una acumulación basal de PR1 en los explantes como consecuencia de la propia metodología del *stem-feeding*, por lo que se observa un cierto nivel de esta proteína en las plantas control embebidas en H₂O. Este nivel es muy similar al observado en el caso del tratamiento con 2,4,6-THBA, por lo que parece que

tratamientos con este compuesto, a la concentración y durante el tiempo de ensayo, no dan lugar a la acumulación de PR1 en plantas de tomate 'Moneymaker'. Sin embargo, en el caso de tratamientos con 2,4-DHBA, se observa una mayor acumulación de PR1 a las 48 horas post-tratamiento. Esta acumulación de PR1, aunque sutil, podría estar indicando una cierta activación de la respuesta defensiva de la planta debido al tratamiento con 2,4 DHBA. También hay que considerar el hecho de que *in vivo* la acumulación de este compuesto puede ir acompañada de la acumulación de otros señalizadores, como SA o GA, por lo que no puede descartarse un efecto sinérgico en presencia de otras moléculas señal.

Así pues, los estudios de actividad *in vitro* a partir de la proteína recombinante Twi1 han revelado que esta glicosiltransferasa es capaz de conjugar glucosa a los ácidos 2,4-dihidroxibenzoico y 2,4,6-trihidroxibenzoico. Asimismo, hemos observado por qRTPCR que tratamientos con estos compuestos inducen fuertemente el gen *Twi1* y producen la acumulación de la proteína *PR1* en el caso del 2,4-DHBA, indicando que estos fenólicos podrían jugar un papel en la respuesta defensiva de la planta. Para profundizar en el estudio de *Twi1*, nos propusimos analizar la relevancia de su presencia *in vivo*. Para ello, decidimos obtener plantas transgénicas estables de tomate que mostraran niveles alterados de expresión de *Twi1*. En este caso, nos planteamos llevar a cabo el silenciamiento de *Twi1* en plantas de tomate mediante la técnica de RNA de interferencia (RNAi).

2.6. Silenciamiento de *Twi1* mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* de la construcción *pART27_Twi1*

Con el fin de llevar a cabo el silenciamiento de *Twi1* en planta, se obtuvo la construcción *pART27_Twi1*, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Dicha construcción en horquilla o *hairpin* (hpRNA), una vez introducida en la planta, desencadena un mecanismo de silenciamiento génico posttranscripcional contra el mensajero diana. Partiendo del cDNA completo de *Twi1*, se seleccionó un fragmento

de aproximadamente 300 pares de bases (pb) situado en la secuencia consenso PSPG (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase*).

Para comprobar que la construcción obtenida funcionaba correctamente produciendo el fenómeno de silenciamiento, se realizó un experimento de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Se hizo uso de bacterias de la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con la construcción pGWB8_*Twi1* y la construcción pART27_*Twi1*. El experimento se realizó con plantas de 4 semanas de edad, en el que las plantas control fueron infiltradas con una suspensión que contenía un 50% de bacterias portadoras del plásmido pGWB8_*Twi1*, para la expresión de *Twi1* de tomate en *N. benthamiana*. A estas plantas las denominamos *35S Twi1*. Las plantas restantes se infiltraron con una suspensión que contenía un 50% de *Agrobacterium* portador del plásmido pGWB8_*Twi1*, y el 50% restante de bacterias portadoras del plásmido pART27_*Twi1*. En estas plantas, denominadas *35S + RNAi Twi1* se estaría produciendo, por un lado, la sobreexpresión de *Twi1* y por el otro, su silenciamiento. Las muestras fueron recogidas a los 3 días de haber realizado la agroinoculación.

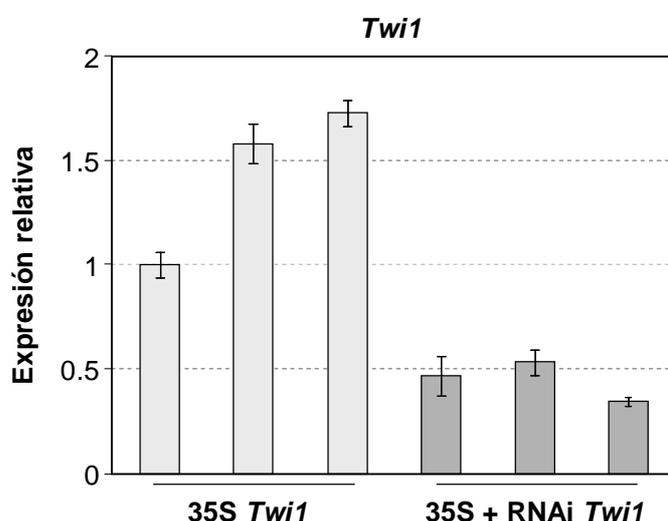


Figura 31. Niveles de expresión del gen *Twi1* en plantas de *N. benthamiana*. Se estudió por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Twi1* en hojas agroinoculadas con la construcción pGWB8_*Twi1* (*35S Twi1*) y en hojas agroinoculadas con las construcciones pGWB8_*Twi1* y pART27_*Twi1* (*35S + RNAi Twi1*). Se recogieron muestras a los 3 días post-inoculación. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas a tiempo 0. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

Las muestras de plantas *35S Twi1* y plantas *35S + RNAi Twi1* fueron analizadas por PCR cuantitativa según se detalla en Materiales y Métodos, para determinar el nivel de acumulación del mensajero de *Twi1* en cada caso. Como se observa en la Figura 31, los niveles de cDNA de *Twi1* son superiores en plantas *35S Twi1* respecto a plantas *35S + RNAi Twi1*, indicando que en estas últimas está teniendo lugar el fenómeno de silenciamiento génico. Estos resultados confirman que la construcción pART27_*Twi1* obtenida es apta a la hora de llevar a cabo el silenciamiento de *Twi1* en plantas.

Nos propusimos, además, estudiar si el silenciamiento de *Twi1* afectaba también a la expresión de *GAGT*, puesto que la secuencia de 300 pb seleccionada para llevar a cabo el silenciamiento se encontraba dentro de la secuencia consenso PSPG, la zona con mayor grado de homología entre ambas glicosiltransferasas. Para ello, realizamos un nuevo ensayo de expresión transitoria en *N. benthamiana*, esta vez con el plásmido pGWB8_*GAGT*, para la sobreexpresión de *GAGT* (apartado 1.1), y el plásmido pART27_*Twi1*. Mediante PCR cuantitativa, se comprobó que la expresión de *GAGT* no variaba sustancialmente en plantas agroinoculadas con los plásmidos pGWB8_*GAGT* y pART27_*Twi1* respecto a plantas inoculadas únicamente con pGWB8_*GAGT* (resultados no mostrados).

2.7. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1*

Una vez comprobado que la construcción obtenida funcionaba correctamente y que el silenciamiento génico no afectaba a otra glicosiltransferasa de secuencia similar como es *GAGT*, se decidió llevar a cabo la transformación estable de tomate para obtener plantas que presentaran silenciamiento de *Twi1*. Debido a su eficiencia de transformación, se seleccionó esta vez la variedad de tomate 'Moneymaker' *Tm2*². La transformación se llevó a cabo con el plásmido pART27_*Twi1*, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

2.7.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'

Con la construcción pART27_*Tw1* previamente comprobada en expresión transitoria se realizó la transformación genética de tomate 'Moneymaker' mediante co-cultivo de explantes de cotiledón, como se detalla en Materiales y Métodos. De dicha transformación se obtuvieron 10 líneas de tomate resistentes a kanamicina. Para comprobar que el transgén se había insertado, se realizó una extracción de DNA genómico y una posterior amplificación del inserto por PCR para cada una de las líneas, sobre plantas T₀ transgénicas y control. De entre todas las líneas analizadas, un total de siete presentaban el inserto íntegro en su DNA, mientras no se detectó inserto en las plantas control. Plantas de estas líneas transgénicas fueron aclimatadas en el invernadero y cultivadas para obtener semillas de la generación T₁. Dichas semillas fueron crecidas en presencia de kanamicina, tal y como se describe en Materiales y Métodos, para llevar a cabo los ensayos que se presentan a continuación.

2.7.2. Caracterización de las plantas transgénicas de tomate RNAi *Tw1*

De entre las líneas transgénicas RNAi *Tw1* que fueron aclimatadas en el invernadero, las líneas 1 y 28 fueron las primeras en dar fruto, y por tanto semillas de la generación T₁. Decidimos iniciar los ensayos de caracterización con ambas líneas transgénicas.

Para comprobar si el silenciamiento de *Tw1* se producía correctamente en estas plantas de tomate RNAi *Tw1*, era necesario producir una situación que indujera *Tw1* en plantas de tomate y que dicha inducción no ocurriera en las plantas transgénicas de silenciamiento. Se decidió llevar a cabo la inducción de *Tw1* mediante tratamientos exógenos con diferentes compuestos fenólicos, como habíamos realizado previamente, pero esta vez sobre las plantas transgénicas RNAi *Tw1*.

2.7.3. Tratamiento exógeno con compuestos fenólicos de plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1*

Plantas de tomate RNAi *Twi1* de un mes de edad de las líneas transgénicas 1 y 28, así como plantas control, fueron tratadas con disoluciones 1 mM de ácido salicílico (SA), ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA) y ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA) mediante *stem-feeding*, como se describe en Materiales y Métodos. Se tomaron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas de tratamiento.

Estudio de la inducción de *Twi1*

Por ser el tratamiento con 2,4-DHBA el que causó una mayor inducción de *Twi1* (ver Figura 29), las muestras de plantas tratadas con este compuesto se estudiaron en primer lugar. Dichas muestras fueron analizadas por PCR cuantitativa para determinar el nivel de acumulación de mRNA de *Twi1*. Los resultados obtenidos para el tratamiento con 2,4-DHBA se muestran en la Figura 32.

Como habíamos observado previamente, se aprecia que el tratamiento con 2,4-DHBA es capaz de inducir *Twi1* en las plantas de tomate control. Tras 1 hora de tratamiento, la inducción de *Twi1* ya es unas 20 veces superior al nivel de partida, y a las 6 horas alcanza un valor máximo en torno a 50 veces, para descender a las 24 horas de nuevo a los valores de inducción observados a 1 hora de tratamiento. En ambas plantas transgénicas RNAi *Twi1* (RNAi 1 y RNAi 28), apenas se observa inducción de *Twi1*. Durante todo el ensayo los valores de inducción en estas plantas se mantienen muy bajos, no siendo comparables a los observados en el caso de las plantas control, donde la inducción de *Twi1* debido al tratamiento con 2,4-DHBA es evidente.

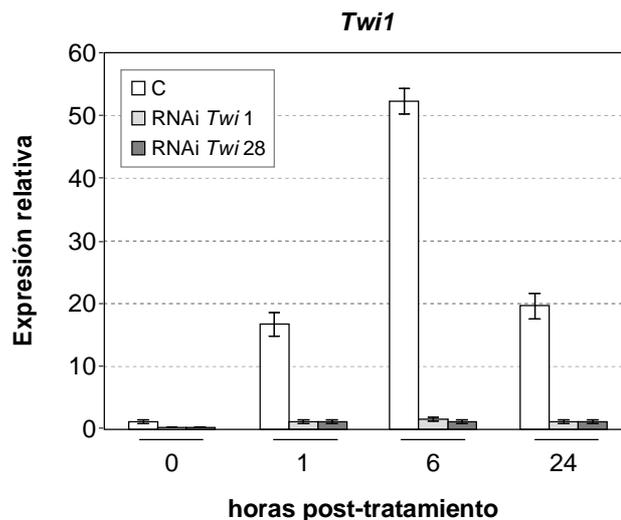


Figura 32. Niveles de expresión del gen *Twi1* en plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* tratadas con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA). Se analizó la acumulación de mRNA de *Twi1* mediante RT-PCR cuantitativa, en hojas de las líneas transgénicas RNAi *Twi1* y RNAi *Twi28* y de plantas control (C), embebidas en disoluciones 1 mM de 2,4-DHBA. Se recogieron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas a tiempo 0. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

Se obtuvieron resultados muy similares en el caso de tratamientos exógenos con SA o 2,4,6-THBA, donde no se apreció inducción de *Twi1* en plantas transgénicas RNAi *Twi1* en comparación con plantas control (datos no mostrados). Todos estos resultados ponen de manifiesto que en las plantas RNAi *Twi1* se está produciendo un fenómeno de silenciamiento de *Twi1*, de forma notable y duradera.

Estudio de la conjugación de 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA

Una vez obtenido este resultado positivo en cuanto al silenciamiento de *Twi1* en las plantas transgénicas RNAi *Twi1*, nos propusimos estudiar las posibles consecuencias de este silenciamiento. En el ensayo de actividad *in vitro* habíamos observado que la proteína *Twi1* recombinante presentaba actividad glicosiltransferasa frente a 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA. Sin embargo, diferentes estudios muestran que la actividad glicosiltransferasa detectada *in vitro* puede diferir de la detectada *in vivo*,

pues la actividad de las GTs recombinantes suele ser bastante baja. Además, la especificidad de sustrato de estas proteínas en ensayos *in vitro* es menor que la real, *in vivo*. La capacidad de conjugar diversos sustratos, por parte de la proteína recombinante, dificulta la posibilidad de conocer cuál es el papel fisiológico de la GT en la planta (Jones y Vogt, 2001; Bowles *et al.*, 2005; Achnine *et al.*, 2005), lo que denota la importancia de estudiar la actividad *in vivo*.

Para observar la actividad de *Twi1 in vivo* se realizó una extracción de compuestos fenólicos a partir de las plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* que habían sido tratadas con 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA, y se llevó a cabo el análisis de estos metabolitos mediante HPLC y qToF (ver Materiales y Métodos). La Figura 33 muestra los resultados de acumulación de 2,4-DHBA libre y 2,4-DHBA total en plantas de tomate control y plantas transgénicas RNAi *Twi1* de la línea 1 y la línea 28, a las 6 y 24 horas de tratamiento.

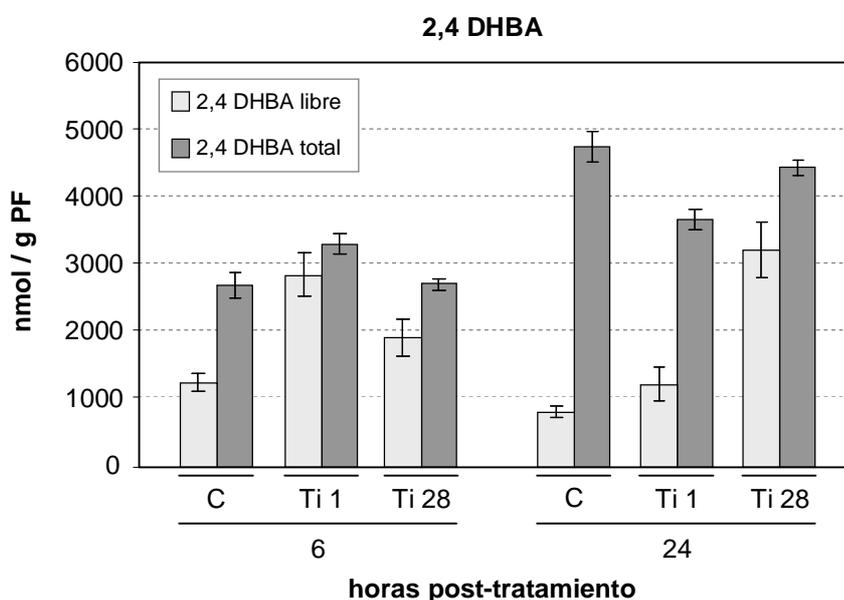


Figura 33. Acumulación de 2,4-DHBA libre y 2,4-DHBA total en plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* tras el tratamiento con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA). Se realizó un análisis mediante HPLC de fluorescencia de extractos de compuestos fenólicos foliares de las líneas transgénicas RNAi *Twi 1* (Ti 1) y RNAi *Twi 28* (Ti 28) y plantas control (C) embebidas en una disolución de 2,4-DHBA 1 mM, a las 6 y 24 horas post-tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

Se observan niveles de acumulación de 2,4-DHBA total similares en plantas transgénicas RNAi y plantas control, alcanzando una acumulación mayor a las 24 horas con valores en torno a los 4000 nmol/ g peso fresco. Sin embargo, se comprueba que en ambas líneas transgénicas RNAi la cantidad de 2,4-DHBA en forma libre es mayor, respecto al control, a lo largo de todo el experimento.

Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, los valores de cantidad de 2,4-DHBA libre así como el porcentaje de conjugación, se detallan en la Tabla 9. La cantidad de 2,4-DHBA libre es claramente superior en plantas transgénicas RNAi en comparación con plantas control. Este aumento en la cantidad de compuesto libre concuerda con el menor porcentaje de conjugación que presentan las líneas transgénicas 1 y 28, frente a las plantas control. Así pues, el silenciamiento de *Twi1* llevaría consigo una disminución de la conjugación de 2,4-DHBA, confirmando así la actividad conjugadora de *Twi1* frente a este compuesto *in vivo*.

6 horas post-tratamiento	2,4 DHBA libre (nmol / g PF)	conjugación (%)	24 horas post-tratamiento	2,4 DHBA libre (nmol / g PF)	conjugación (%)
Money Maker	1256.95 ± 120.88	53.96	Money Maker	788.11 ± 37.79	83.40
RNAi <i>Twi</i> 1	2840.44 ± 322.46	14.52	RNAi <i>Twi</i> 1	1227.77 ± 239.42	66.55
RNAi <i>Twi</i> 28	1923.26 ± 281.68	28.94	RNAi <i>Twi</i> 28	3227.53 ± 420.95	27.54

Tabla 9. Porcentaje de conjugación y acumulación de 2,4 DHBA libre en plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* tras el tratamiento con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA). Plantas de las líneas transgénicas RNAi *Twi* 1 y RNAi *Twi* 28 y plantas control (Money Maker) fueron embebidas en disoluciones de 2,4 DHBA 1 mM y el material vegetal se recogió a las 6 y 24 horas post-tratamiento.

Por lo que respecta a los tratamientos de plantas transgénicas RNAi *Twi1* con 2,4,6-THBA, se detectó la presencia de este compuesto en plantas de tomate como consecuencia del tratamiento, alcanzando un valor máximo de 3500 nmol/g peso fresco a las 24 horas post-tratamiento (Figura 34). Al igual que sucedió para el 2,4-DHBA, se observa en ambas líneas transgénicas RNAi que la cantidad de 2,4,6-THBA en

forma libre es mayor, respecto al control, durante todo el experimento. De hecho, no se ha detectado acumulación de 2,4,6-THBA libre en plantas control, ni a 6 ni a 24 horas de tratamiento, mientras sí se detecta la presencia de 2,4,6-THBA libre en las plantas transgénicas, en ambas líneas analizadas y para ambos tiempos.

En la Tabla 10, donde se presenta la cantidad de 2,4,6-THBA libre en cada línea y el porcentaje de conjugación, observamos que el contenido de 2,4,6-THBA libre es mayor en plantas transgénicas RNAi. Esto concuerda con el menor porcentaje de conjugación que presentan las líneas transgénicas 1 y 28, frente a las plantas control. De nuevo, el silenciamiento de *Tw1* llevaría consigo una disminución de la conjugación de 2,4,6-DHBA, confirmando así la actividad glicosiltransferasa *in vivo*.

Estos resultados corroboran aquéllos obtenidos en el ensayo de actividad *in vitro*, donde *Tw1* presentó actividad frente a 2,4,6-THBA, si bien las diferencias en el porcentaje de conjugación, así como en la cantidad de compuesto en forma libre, son mucho más evidentes en el caso del tratamiento con 2,4-DHBA. Esto podría deberse a que la conjugación del 2,4,6-THBA quizás no sea llevada a cabo exclusivamente por *Tw1*, sino que otras glicosiltransferasas podrían estar contribuyendo en dicha función. Esta redundancia de función sería menos acusada a tiempos cortos (6 horas), donde la ausencia de *Tw1* se hace más notable, que a las 24 horas de tratamiento, donde otras GTs podrían estar ya presentes y compensar el silenciamiento de *Tw1*. Teniendo esto en cuenta, parece que el efecto del silenciamiento de *Tw1* es más acusado en el caso del 2,4-DHBA, lo que sugiere que la glicosilación de este compuesto podría depender en gran medida de *Tw1*. En cualquier caso, nuestros resultados de actividad *in vitro* e *in vivo* indican que *Tw1* es, en efecto, una glicosiltransferasa que conjuga los hidroxibenzoatos 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA.

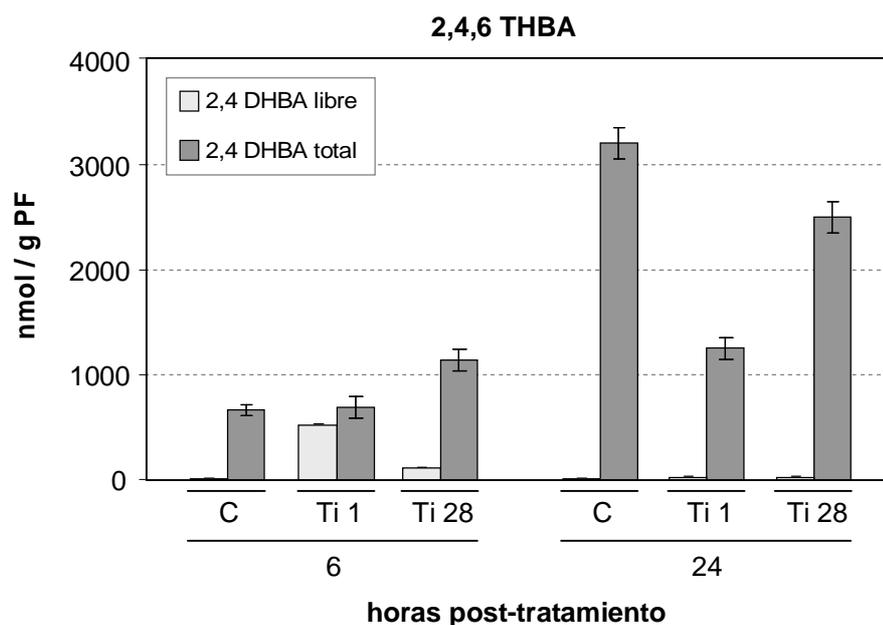


Figura 34. Acumulación de 2,4,6-DHBA libre y 2,4,6-DHBA total en plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* tras el tratamiento con ácido 2,4,6-dihidroxibenzoico (2,4,6 DHBA). Se efectuó un análisis mediante UPLC-PDA-qToF de extractos fenólicos de hojas de las líneas transgénicas RNAi *Twi 1* (Ti 1) y RNAi *Twi 28* (Ti 28) y plantas control (C) embebidas en una disolución de 2,4,6-DHBA 1 mM, a las 6 y 24 horas post-tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

6 horas post-tratamiento	2,4,6 THBA libre (nmol / g PF)	conjugación (%)	24 horas post-tratamiento	2,4,6 THBA libre (nmol / g PF)	conjugación (%)
Money Maker	0	100.00	Money Maker	0	100.00
RNAi <i>Twi 1</i>	521.45 ± 5.5	23.65	RNAi <i>Twi 1</i>	11.9 ± 1.49	99.05
RNAi <i>Twi 28</i>	73.05 ± 0.83	93.50	RNAi <i>Twi 28</i>	8.66 ± 0.16	99.65

Tabla 10. Porcentaje de conjugación y acumulación de 2,4,6 THBA libre en plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* tras el tratamiento con ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6 THBA). Plantas de las líneas transgénicas RNAi *Twi 1* y RNAi *Twi 28* y plantas control (Money Maker) fueron embebidas en disoluciones de 2,4,6 THBA 1 mM y el material vegetal se recogió a las 6 y 24 horas post-tratamiento.

Como se ha mencionado anteriormente, numerosos trabajos describen la obtención de plantas transgénicas de sobreexpresión de glicosiltransferasas con el fin de realizar el estudio acerca de su función. Sin embargo, también se han generado

plantas transgénicas de silenciamiento de GTs, como es el caso de TOGT, que fue identificada como una glicosiltransferasa de escopoletina, y cuyo silenciamiento en tabaco dio lugar a un fenotipo de susceptibilidad frente a TMV (Chong *et al.*, 2002). También en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) fue identificada una UDP-glicosiltransferasa 1 (CaUGT1), cuyo silenciamiento por VIGS produjo un retraso en la aparición de HR frente a la infección con TMV, respecto a las plantas control (Lee *et al.*, 2009). Resultados similares han sido descritos para el caso de una glicosiltransferasa de SA, puesto que la inhibición de dicha actividad producía una mayor acumulación de SA en su forma libre en *Arabidopsis* y, como consecuencia, las plantas mostraron un aumento de la resistencia frente a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato AvrRpm1* (Noutoshi *et al.*, 2012).

Todos estos trabajos indican que las glicosiltransferasas ejercen un claro papel en la respuesta defensiva de las plantas. Para profundizar en el estudio del posible papel de *Twi1* en la respuesta defensiva, decidimos estudiar si el silenciamiento de esta glicosiltransferasa lleva asociado, además de un aumento en las formas libres del 2,4-DHBA y del 2,4,6-THBA, un incremento en la acumulación de proteínas defensivas tales como PR1.

Estudio de la inducción de PR1

En plantas de tomate 'Moneymaker' tratadas con 2,4-DHBA durante 48 horas habíamos detectado la acumulación de la proteína de defensa PR1. Por otra parte, en los ensayos de actividad *in vivo* con plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1*, los mejores resultados se habían obtenido en el caso de tratamientos exógenos con 2,4-DHBA, ya que presentaban una mayor acumulación de 2,4-DHBA libre respecto a las plantas control. Teniendo en cuenta el fenotipo observado, decidimos, en un primer abordaje, estudiar la expresión de *PR1* en las plantas transgénicas con silenciamiento de *Twi1* tratadas con 2,4-DHBA, con respecto a sus correspondientes controles. Para ello, muestras de plantas transgénicas RNAi *Twi1* y plantas control tratadas durante 24 horas con este compuesto fueron analizadas mediante PCR cuantitativa empleando

cebadores específicos de *PR1* de tomate. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35.

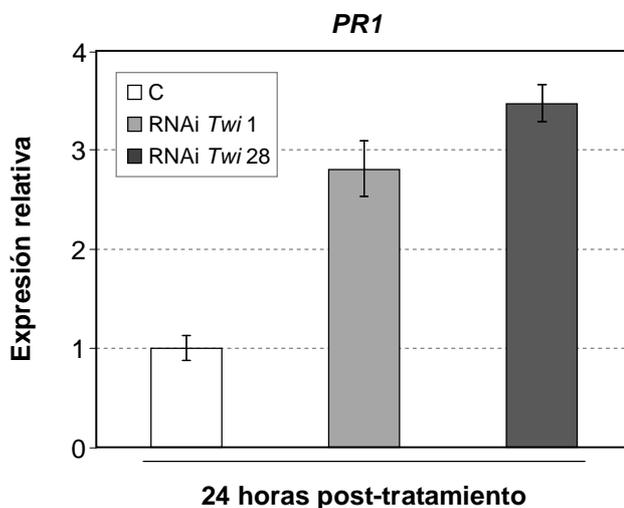


Figura 35. Niveles de expresión del gen *PR1* en plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* tratadas con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA). Se realizó un análisis por RT-PCR cuantitativa de la acumulación de mRNA de *PR1* en hojas de las líneas transgénicas RNAi *Twi 1* y RNAi *Twi 28*, y plantas control (C), embebidas en disoluciones 1 mM de 2,4-DHBA. Las muestras se recogieron a las 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1 α)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas a tiempo 0. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron dos experimentos independientes.

La inducción de *PR1* resulta ser mayor en plantas transgénicas RNAi *Twi1*, en ambas líneas transgénicas, en comparación con las plantas control. Estos resultados muestran que la mayor cantidad de 2,4-DHBA en forma libre que se acumula en estas plantas produce una mayor inducción de *PR1*, indicando un posible rol de este compuesto en la respuesta defensiva de la planta frente a ataques patogénicos.

Los resultados obtenidos en tomate para el silenciamiento de *Twi1* concuerdan con los obtenidos en el caso de la sobreexpresión de *GAGT*. Por un lado, la sobreexpresión de *GAGT* da lugar a un aumento del porcentaje de conjugación y, en consecuencia, una disminución en los niveles de GA libre, respecto a las plantas control. En el caso de *Twi1*, su silenciamiento en tomate conlleva una disminución del porcentaje de conjugación y, como resultado, una mayor acumulación de sus

sustratos 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA en forma libre, respecto a las plantas control. En futuros experimentos sería interesante estudiar si el fenotipo metabólico observado en plantas transgénicas de tomate RNAi *Twi1* conlleva un fenotipo de resistencia frente a una infección patogénica, contrariamente a lo que hemos comprobado en el caso de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con sobreexpresión de *GAGT*, que han resultado ser más susceptibles a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, respecto a las plantas control.

Capítulo 3

IMPLICACIÓN DE LAS HCAA EN LA RESPUESTA DEFENSIVA

Antecedentes

Estudios previos en nuestro laboratorio acerca de la interacción de plantas de tomate con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* demostraron la acumulación de cuatro compuestos de naturaleza fenólica en respuesta a la infección, que fueron identificados como amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAA) (Zacarés *et al.*, 2007). Además, se comprobó que la acumulación en tomate de estas cuatro amidas como consecuencia de la infección bacteriana iba acompañada de la inducción del gen *THT1-3* (von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003; Zacarés *et al.*, 2007). Por otra parte, un hallazgo bastante prometedor, también obtenido en nuestro laboratorio, ha sido la caracterización en este mismo sistema planta-patógeno de otras cuatro HCAA, entre las cuales se encontraba la trans-feruloil noradrenalina, un metabolito no descrito hasta el momento con una potente actividad antioxidante (López-Gresa *et al.*, 2011). Entre las varias funciones que se atribuyen a las HCAA, destaca la de formar parte de la respuesta defensiva de las plantas frente a ataques patogénicos.

La obtención de plantas transgénicas que sobreexpresen *THT* resulta un paso clave a la hora de llevar a cabo estudios sobre la función de este gen, así como del papel de las HCAA en la planta. Por ello, en nuestro laboratorio se clonó el cDNA completo del isogen *THT1-3* de tomate en el vector binario pBI121 bajo el control transcripcional del promotor 35S2X del Virus del Mosaico de la Coliflor y con la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa, obteniéndose la construcción pBI_ *THT*. Por su facilidad para la transformación, se empleó *Arabidopsis thaliana* como primera aproximación para la obtención de plantas transgénicas sobreexpresoras de dicho gen. Las diferentes líneas transgénicas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia) obtenidas mostraban expresión constitutiva del gen *THT1-3*, lo que daba lugar a la producción de proteína activa que parecía ser responsable de una cierta acumulación diferencial de HCAA en plantas transgénicas respecto a plantas control (Zacarés, 2008). En el presente trabajo

decidimos llevar a cabo la transformación de plantas de tomate con esta misma construcción, que ya había sido empleada previamente en *Arabidopsis*, y estudiar su resistencia frente a una infección patogénica (publicado en Campos *et al.*, 2014b; Anexo II).

1. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate THT

1.1. Transformación genética de tomate 'MoneyMaker'

Para llevar a cabo la transformación genética de tomate, se seleccionó la variedad 'MoneyMaker' portadora del gen *Tm2²*. Dicha variedad presenta una elevada eficiencia de transformación y es resistente al Virus del Mosaico del Tomate. La transformación genética de tomate se realizó mediante co-cultivo de explantes de cotiledón con *Agrobacterium* portador de la construcción pBI_ *THT* para la sobreexpresión de *THT*, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. El porcentaje de yemas resistentes a kanamicina fue del 15%, alcanzando niveles comparables a los previamente descritos en la literatura (Ellul *et al.*, 2003). A partir de dicha transformación se obtuvo un total de 7 líneas independientes (líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). A continuación se llevó a cabo un análisis de la actividad GUS, la inducción del gen *NptII* de resistencia a kanamicina y la inducción de *THT* en todas las líneas. El estudio de la inducción de ambos genes se realizó mediante RT-PCR, a partir de RNA de plantas T₀ de las diferentes líneas obtenidas. Teniendo en cuenta los resultados de este análisis, se seleccionaron las líneas 3, 4 y 7, ya que presentaron actividad GUS positiva, inducción de *NptII* y una expresión constitutiva del gen *THT*. No se detectó acumulación de transcrito *THT* en plantas control. Plantas de estas tres líneas transgénicas fueron aclimatadas en el invernadero y cultivadas para obtener semillas de la generación T₁, con la que se realizaron los ensayos que se presentan a lo largo de este capítulo.

1.2. Expresión génica de *THT* y acumulación de HCAA en hojas de tomate transgénico

Las líneas transgénicas 3, 4 y 7 fueron analizadas para cuantificar la acumulación de mRNA de *THT*. Para ello, se empleó hojas de tomate de las líneas transgénicas *THT* y de las plantas control para realizar RT-PCR cuantitativa, utilizando cebadores específicos para la amplificación de *THT* de tomate. Como se muestra en la Figura 36A, todas las líneas transgénicas analizadas presentaron una mayor expresión del gen *THT*, comparado con las plantas control. Los niveles de expresión de *THT* variaron significativamente entre las diferentes líneas transgénicas, siendo la línea 4 la que presentó los niveles más bajos y la línea 7 los más elevados. Concretamente, la expresión del gen *THT* en la línea 7 resultó aproximadamente 12 veces superior a la expresión en plantas control.

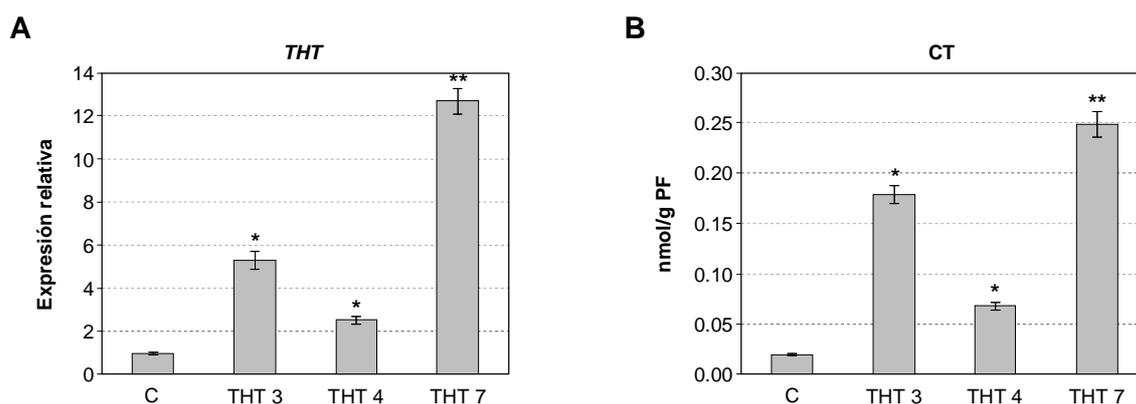


Figura 36. Nivel de expresión del gen *THT* y contenido de HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de *THT*. A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la acumulación de mRNA de *THT* en hojas de tomate de diferentes líneas transgénicas *THT* (3, 4 y 7) y plantas control (C). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1 α)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas control. B) Acumulación de cumaroil tiramina (CT) en hojas de las plantas del apartado A), analizadas por UPLC-PDA-Micromass Q-TOF. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$, respecto a las plantas control. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

Con el fin de estudiar la correlación entre la expresión génica de *THT* y la acumulación de HCAA en las diferentes líneas, se analizó el contenido en HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate *THT* y plantas control mediante UPLC-PDA acoplado a Micromass Q-ToF (ver Materiales y Métodos). Estudios previos habían puesto de manifiesto la elevada acumulación de HCAA de tiramina en plantas de tomate en respuesta a diversos estreses, tales como herida o infección patogénica (Pearce *et al.*, 1998; Zacarés *et al.*, 2007; López-Gresa *et al.*, 2011). Entre las posibles HCAA de tiramina, hemos detectado en plantas transgénicas de tomate *THT* la acumulación constitutiva de las amidas formadas por tiramina con los ácidos ferúlico o cumárico. Mientras que la acumulación de feruloil tiramina (FT) resultó apenas perceptible, todas las líneas transgénicas presentaron un contenido en cumaroil tiramina (CT) superior a las plantas control (Figura 36B). Ello indica la presencia constitutiva de ácido cumárico y tiramina en plantas de tomate, que servirían como sustrato para la *THT* sobreexpresada. Concretamente, hojas de tomate control contenían 0.021 nmol de CT por gramo de peso fresco (PF), mientras que las líneas 3 y 4 acumularon 0.17 y 0.0625 nmol de CT/g PF, respectivamente. Estos niveles de acumulación de CT correlacionaron con los niveles de mRNA de *THT* previamente observados. La línea 7 presentó los niveles más altos de acumulación de CT (0.25 nmol de CT/g PF), con alrededor de 10 veces el contenido de las plantas control. El análisis estadístico puso de manifiesto que las diferencias observadas en las tres líneas transgénicas frente a las plantas control eran estadísticamente significativas, mostrando las líneas 3 y 7 los valores de acumulación de CT más altos. En consecuencia, estas dos líneas independientes se seleccionaron para llevar a cabo los siguientes estudios.

La acumulación de HCAA derivadas de la tiramina, como CT y FT, ha sido descrita en plantas transgénicas sobreexpresoras de *THT* de diferentes especies. Por ejemplo, plantas de tabaco que sobreexpresan *THT* acumulan CT y FT en respuesta a herida, siendo los niveles de HCAA acumulados muy superiores en plantas transgénicas en comparación con plantas control. A diferencia de los resultados que hemos obtenido en tomate, no se detectó acumulación constitutiva de HCAA en hojas de tabaco

transgénico THT (Hagel y Facchini, 2005). Asimismo, se han obtenido líneas de arroz transgénico que sobreexpresan el gen *THT* de pimiento. Al igual que en tabaco, el contenido en CT y FT era apenas perceptible cuando se analizaron plántulas de arroz transgénico de 10 días de edad. Sin embargo, hojas de las plántulas cultivadas en un medio suplementado con tiramina acumularon cinco veces más CT y FT que las cultivadas en su ausencia, presentando un mayor contenido las plántulas transgénicas frente a las plántulas control. La correlación entre los niveles de CT y FT y la presencia de tiramina indican que este compuesto actúa como limitante en la síntesis de HCAA en plantas de arroz (Lee *et al.*, 2007).

Curiosamente, hemos observado que las hojas de las plantas transgénicas de tomate THT acumulan CT de forma constitutiva, indicando que el contenido en tiramina en esta especie debe ser alto, tal y como describen Ly *et al.* (2008), y que no supone un sustrato limitante en la síntesis de HCAA. En relación con esto, llevamos a cabo la medición de los niveles basales de tiramina en plantas transgénicas THT y plantas control, pero no se observó diferencias entre ambas. La acumulación constitutiva de HCAA también fue descrita en plantas de tomate transgénico de sobreexpresión de *SHT*, un enzima implicado en la síntesis de HCAA que presenta una mayor afinidad de sustrato por la amina serotonina (Kang *et al.*, 2009).

Por otra parte, hemos llevado a cabo un estudio de la acumulación de HCAA en respuesta a herida en hojas. Como se ha mencionado anteriormente, plantas de tabaco con sobreexpresión de *THT* presentaron una acumulación de HCAA en hojas muy superior a las plantas no transgénicas, transcurridas 12 horas desde que se produjo la herida (Hagel y Facchini, 2005). La acumulación de HCAA también se ha descrito en plantas de tomate de sobreexpresión de *SHT* en respuesta a herida (Kang *et al.*, 2009). En concordancia con lo descrito por estos autores, nosotros también hemos observado una mayor acumulación de HCAA en respuesta a herida en hojas de plantas de tomate transgénicas THT en comparación con plantas control, alcanzando un valor máximo 24 horas después de herir, resultados que se muestran en la Figura 37.

Ambas líneas 3 y 7 presentaron una mayor acumulación de CT y FT, si bien es cierto que sólo la diferencia en la acumulación de CT resultó estadísticamente significativa en plantas transgénicas respecto a plantas control. De nuevo, fue la línea 7 la que presentó los valores más altos de acumulación de HCAA. En respuesta a herida, el tejido foliar de las plantas transgénicas de la línea 7 mostró niveles de CT hasta 4 veces superiores a los detectados en plantas control, mientras que la acumulación de FT sufrió un incremento de un 30%.

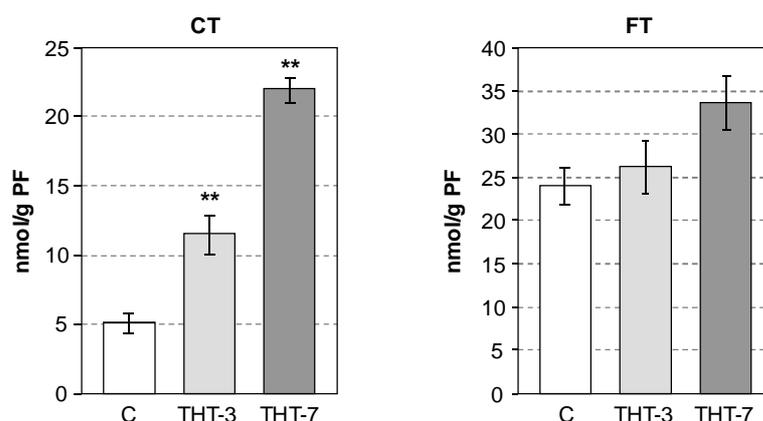


Figura 37. Acumulación de HCAA en plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de THT en respuesta a herida. Niveles de acumulación de cumaroil tiramina (CT) y feruloil tiramina (FT) en la tercera y cuarta hoja de plantas transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C) de tomate, a las 24 horas de producirse la herida. Las muestras se analizaron por UPLC-PDA-Micromass Q-TOF. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

Como se ha indicado previamente, habíamos detectado la acumulación constitutiva de CT en plantas de tomate. En respuesta a herida se produce, además, la acumulación de FT. Esto podría indicar que, en las hojas de tomate heridas, se estaría acumulando ácido ferúlico, que actuaría como sustrato para la formación de la correspondiente amida. La no detección de FT en plantas no heridas sugiere que el ácido ferúlico estaría actuando como sustrato limitante, ya que la tiramina sí está presente de forma constitutiva. Se puede también considerar que el enzima THT muestre distinta afinidad por el ácido cumárico respecto al ferúlico, lo que contribuiría a explicar la mayor acumulación de CT frente a FT.

1.3. Expresión génica de *THT* y acumulación de HCAA en flores de tomate transgénico

Para profundizar en la caracterización de las plantas transgénicas de tomate THT, analizamos flores en estadio de antesis por RT-PCR cuantitativa para estudiar la acumulación del transcrito de *THT*. Como muestra la Figura 38A, ambas líneas transgénicas mostraron elevados niveles constitutivos de *THT*. En este caso, los valores alcanzados en la línea 7 resultaron ser 3 veces más altos que los observados en las flores de plantas control. Por otro lado, para determinar si los niveles de expresión de *THT* en flores se correlacionaban con la acumulación de HCAA, las mismas muestras analizadas por RT-PCR cuantitativa fueron sometidas a análisis mediante UPLC-PDA acoplado a Micromass Q-ToF (ver Materiales y Métodos). En el caso de las flores pudimos detectar acumulación tanto de CT como de FT.

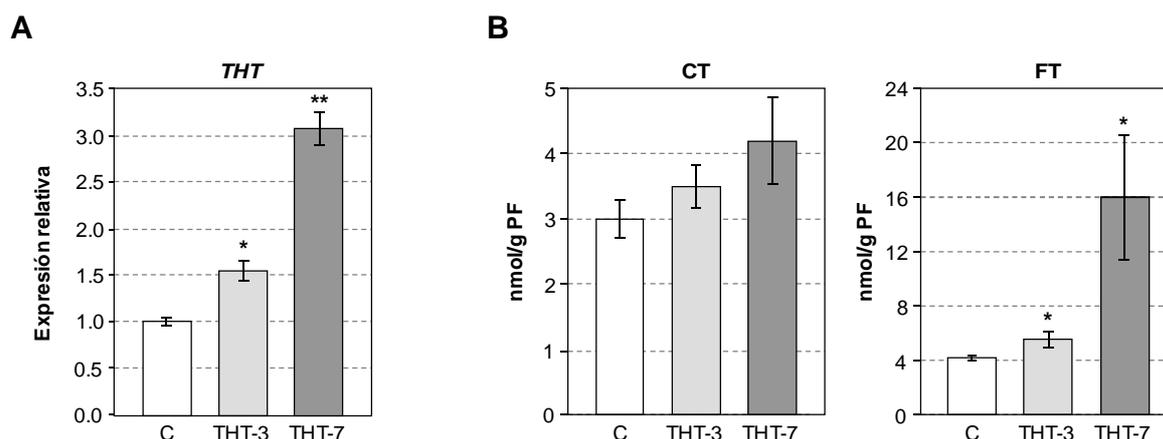


Figura 38. Nivel de expresión del gen *THT* y contenido de HCAA en flores de plantas transgénicas de tomate THT. A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la acumulación de mRNA de *THT* en flores en estadio de antesis de plantas de tomate transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas control. B) Acumulación de cumaroil tiramina (CT) y feruloil tiramina (FT) en las flores del apartado A), analizadas por UPLC-PDA-Micromass Q-TOF. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$, respecto a las plantas control. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

Como se muestra en la Figura 38B, las flores de plantas control de tomate contenían 3 nmol de CT/g PF y 4.1 nmol de FT/g PF, mientras que las flores de la línea 7 acumularon constitutivamente 4 nmol de CT/g PF y 16 nmol de FT/g PF. Mientras el nivel de acumulación de CT fue similar entre las flores transgénicas y las control, siendo las diferencias estadísticamente no significativas, la acumulación de FT sí fue significativa en ambas líneas transgénicas respecto a plantas control.

De igual modo a lo observado previamente en hojas, las flores de plantas transgénicas mostraron un aumento en la acumulación de mRNA de *THT* con respecto a las plantas control. No obstante, mientras que en las hojas se detectó únicamente la acumulación constitutiva de CT, en las flores de plantas THT se detectaron ambas amidas, CT y FT. En consonancia con los resultados obtenidos en hojas, la presencia de altos niveles de HCAA en flores correlacionaba con un mayor nivel de expresión de *THT*. Observando los resultados de la línea 7, el nivel de HCAA de tiramina (CT y FT) en las flores alcanzó niveles aproximadamente 12 veces superiores a los detectados en las hojas de estas mismas plantas transgénicas, lo que indica una mayor acumulación de HCAA en flores.

Estos elevados niveles de HCAA en flores han sido también descritos en otras plantas. Se ha visto que las flores de pimiento acumulan altos niveles de HCAA. Además, las flores resultaron ser los órganos con los niveles más elevados de tiramina en las plantas de pimiento, sugiriendo que los niveles de HCAA son proporcionales a los niveles de sustrato amínico (Kang y Back, 2006). De acuerdo con esto, la elevada acumulación de HCAA que hemos observado en las flores de tomate transgénico podría deberse a elevados niveles basales de tiramina en estos órganos. Esta notable acumulación de HCAA en flores sugiere una función importante para estos compuestos en dichos órganos, bien actuando como agentes antimicrobianos de defensa frente a patógenos, reforzando la pared celular durante la antesis o controlando la organogénesis sexual (Martin-Tanguy y Negrel, 1987; Negrel y Lherminier, 1987; Halbrock y Scheel, 1989; Liyama *et al.*, 1994).

1.4. Expresión génica de *THT* y acumulación de HCAA en frutos de tomate transgénico

Tal y como se ha descrito anteriormente para hojas y flores, analizamos la expresión del gen *THT* y la acumulación de HCAA en frutos de plantas de tomate THT y plantas control. En primer lugar, frutos maduros (rojos) de líneas transgénicas THT y plantas control se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa empleando cebadores específicos para el gen *THT* de tomate. Al igual que en hojas y flores, el nivel de expresión génica de *THT* en frutos transgénicos de ambas líneas fue superior a lo observado en los frutos de plantas control (Figura 39A). En particular la línea 7 presentó una inducción de *THT* aproximadamente 6 veces superior a la del control.

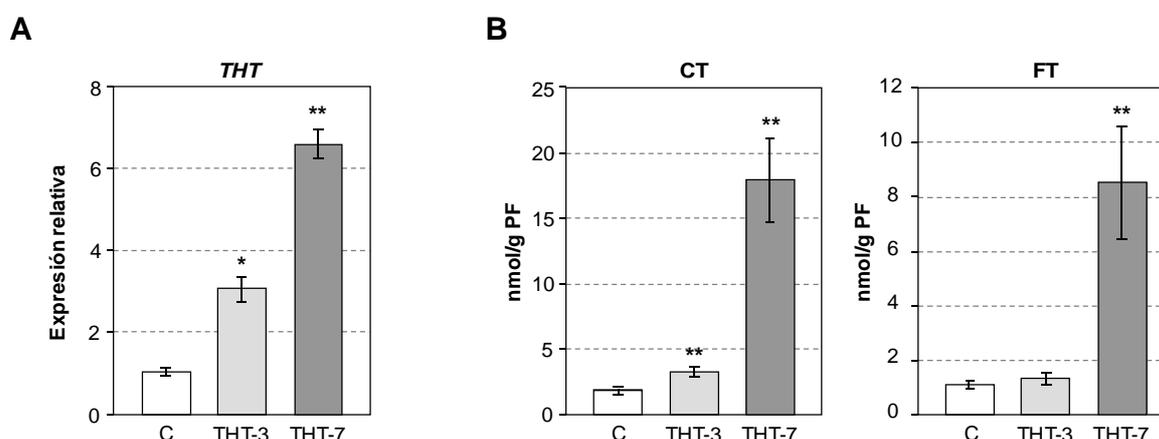


Figura 39. Nivel de expresión del gen *THT* y contenido de HCAA en frutos de plantas transgénicas de tomate THT. A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la acumulación de mRNA de *THT* en frutos maduros de plantas de tomate transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas control. B) Acumulación de cumaroil tiramina (CT) y feruloil tiramina (FT) en los frutos del apartado A), analizadas por UPLC-PDA-Micromass Q-TOF. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$, respecto a las plantas control. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

A continuación, se analizaron los niveles de acumulación de HCAA en frutos de plantas transgénicas y plantas control. Para este análisis, los frutos maduros (rojos) fueron recogidos y tratados como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras

se sometieron a análisis mediante UPLC-PDA acoplado a Micromass Q-ToF para determinar el contenido en HCAA. De acuerdo con lo observado en flores, se detectó la presencia de tanto CT como FT, siendo los niveles de estas dos HCAA superiores en frutos de plantas transgénicas de ambas líneas (Figura 39B). Concretamente, los frutos de plantas control contenían 2.3 nmol de CT/g PF y 1.65 nmol de FT/g PF, mientras que los frutos transgénicos de la línea 7 presentaron 17.7 nmol de CT/g PF y 8.3 nmol de FT/g PF. Mientras las diferencias en los niveles de CT fueron estadísticamente significativas en ambas líneas transgénicas respecto a las plantas control, el contenido en FT sólo fue significativo para la línea 7. Este aumento en el contenido de HCAA en frutos de plantas transgénicas THT se correlaciona con los niveles observados en flores.

Una elevada acumulación de HCAA en frutos podría contribuir a la respuesta defensiva frente a patógenos. En este sentido, Kang *et al.* (2010) han descrito la acumulación de cafeoil serotonina (CaS) en frutos de pimiento infectados con el hongo de la Antracnosis, *Colletotrichum gloeosporoides*. Estos autores sugieren que la CaS, cuya síntesis se induce por la infección patógena y que exhibe actividad antifúngica, juega un papel clave en la defensa de las plantas de pimiento. De acuerdo con estos resultados, la sobreacumulación de CT y FT en frutos de tomate THT podría actuar como una defensa constitutiva contra posibles infecciones. De hecho, CT y FT han sido ampliamente implicadas en las defensa de la planta contra el ataque de patógenos, y varios estudios han demostrado que su síntesis en las plantas se activa en respuesta a la infección por hongos, virus o bacterias. Por ejemplo, se ha descrito que plantas de patata infectadas con *Phytophthora infestans* aumentan la síntesis de CT y FT (Keller *et al.*, 1996) y que la biosíntesis de FT se induce en tabaco tras la infección con el Virus del Mosaico del Tabaco (Negrel y Jeandet, 1987). En este sentido, futuros estudios de infección de frutos de tomate THT podrían ayudar a corroborar esta hipótesis.

2. Infección de plantas transgénicas de tomate THT con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Hemos observado cómo las plantas de tomate THT acumulan una mayor cantidad de HCAA en hojas, flores y frutos, de manera constitutiva, en comparación con las plantas control. También se ha detectado la mayor acumulación de HCAA en respuesta a herida en hojas de plantas transgénicas, frente a plantas control. Diversos estudios han puesto de manifiesto la acumulación de HCAA en respuesta a una infección. Con el fin de estudiar dicha acumulación en plantas de tomate THT en respuesta a un ataque patogénico, decidimos llevar a cabo la infección de estas plantas transgénicas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

2.1. Acumulación de HCAA en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato*

Estudios previos han puesto de manifiesto la inducción de *THT 1-3* debido a la infección de plantas de tomate con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato*, lo que indica un posible papel de este gen en la defensa de la planta (von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003). Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha descrito que hojas de plantas de tomate variedad 'Rutgers' infectadas con *P. syringae* presentaron una rápida activación de *THT*, seguida de la acumulación de HCAA (Zacarés *et al.*, 2007; López-Gresa *et al.*, 2011). Con el fin de comprobar si las plantas transgénicas de tomate THT presentan un aumento en los niveles de HCAA ante una infección virulenta con la bacteria *P. syringae* en comparación con las plantas control, se llevó a cabo un seguimiento de su acumulación en el tiempo. Para ello, hojas infiltradas con una disolución bacteriana (infectadas) y hojas control infiltradas con una disolución de $MgCl_2$ (*mock*), se recogieron a las 0, 24 y 48 horas después de la inoculación (ver

Materiales y Métodos). Los resultados de la acumulación de CT y FT en hojas de tomate THT y control tras la inoculación de *P. syringae* se presentan en la Figura 40.

En primer lugar, se observa que todas las plantas acumularon CT y FT como consecuencia de la interacción compatible, y ambas aumentaban su concentración con el tiempo. Sin embargo, los niveles absolutos de estos metabolitos diferían sustancialmente, siendo los valores más altos los correspondientes a CT. Las líneas transgénicas 3 y 7 presentaron niveles de acumulación superiores a las plantas control. Las diferencias entre la línea 3 y las plantas control fueron estadísticamente significativas para los niveles de CT a 24 y 48 horas post-inoculación (hpi), y para FT a las 48 hpi. La acumulación de CT y FT alcanzó el valor más alto en línea 7, y fue significativa durante toda la infección, respecto a las plantas control.

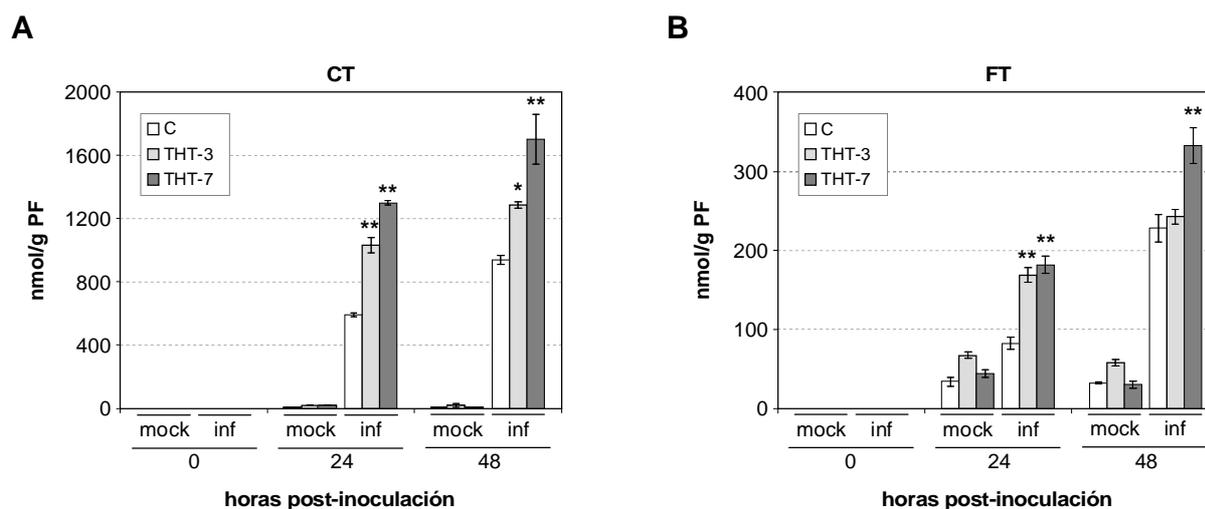


Figura 40. Acumulación de HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Niveles de acumulación de cumaroil tiramina (CT) y feruloil tiramina (FT) en hojas infiltradas con *P. syringae* (inf) e infiltradas con tampón (*mock*) de plantas transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C) a las 0, 24 y 48 horas después de la inoculación. Las muestras fueron analizadas por UPLC-PDA-Micromass Q-TOF. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. La significación estadística se muestra para plantas transgénicas infectadas frente a plantas control infectadas. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$.

Comparando los valores alcanzados en esta línea frente a plantas control, observamos que las plantas control acumularon 943 nmol de CT y 228 nmol de FT por gramo de peso fresco transcurridas 48 horas desde la inoculación bacteriana, mientras que las plantas transgénicas THT acumularon 1704 nmol de CT y 333 nmol de FT por gramo de peso fresco. Por tanto, la acumulación de HCAA de tiramina fue aproximadamente 2 veces mayor en plantas de tomate THT inoculadas con *P. syringae* en comparación con lo observado en plantas control infectadas. Por último, la acumulación de CT y FT también aumentó en hojas infiltradas con la solución de MgCl₂ (*mock*), probablemente como consecuencia de las heridas producidas por la infiltración.

Además de CT y FT, en las plantas transgénicas de tomate THT infectadas con *P. syringae* hemos detectado también la acumulación de HCAA de octopamina y noradrenalina. Esto concuerda con resultados previos de nuestro grupo (López-Gresa *et al.*, 2011), donde se detectó la acumulación de estas mismas amidas en hojas de tomate 'Rutgers' transcurridas 24 y 48 horas desde la infiltración bacteriana. La Figura 41 muestra los resultados de acumulación de cumaroil octopamina (CO), feruloil octopamina (FO), cumaroil noradrenalina (CNA) y feruloil noradrenalina (FNA) en hojas de plantas de tomate THT y plantas control 48 horas después de la inoculación con *P. syringae*. Observamos que las plantas de la línea 3 mostraron diferencia estadísticamente significativa en el contenido de FO, en comparación con las plantas control. En cuanto a la línea 7, las diferencias fueron estadísticamente significativas en la acumulación de las cuatro amidas (CO, FO, CNA y FNA). Comparando los niveles de acumulación entre la línea 7 y las plantas control, para las HCAA de octopamina las plantas control acumulan 60.3 nmol de CO/g PF y 7.3 nmol de FO/g PF, mientras que las plantas de la línea 7 acumularon cuatro veces más CO y el doble de FO por gramo de peso fresco. Respecto a los niveles de las HCAA de noradrenalina, las plantas control acumularon 33 nmol CNA/g PF y 2.1 nmol FNA/g PF, mientras que las plantas transgénicas triplicaron la cantidad de CNA y duplicaron la de FNA. En resumen, la acumulación de todas estas HCAA fue globalmente 3 veces mayor en plantas transgénicas THT infectadas con *P. syringae* comparado con lo observado en las

plantas control. A diferencia de las HCAA de tiramina, las HCAA de octopamina y noradrenalina no fueron detectadas en las hojas infiltradas con la disolución de $MgCl_2$ transcurridas 48 horas desde la infiltración.

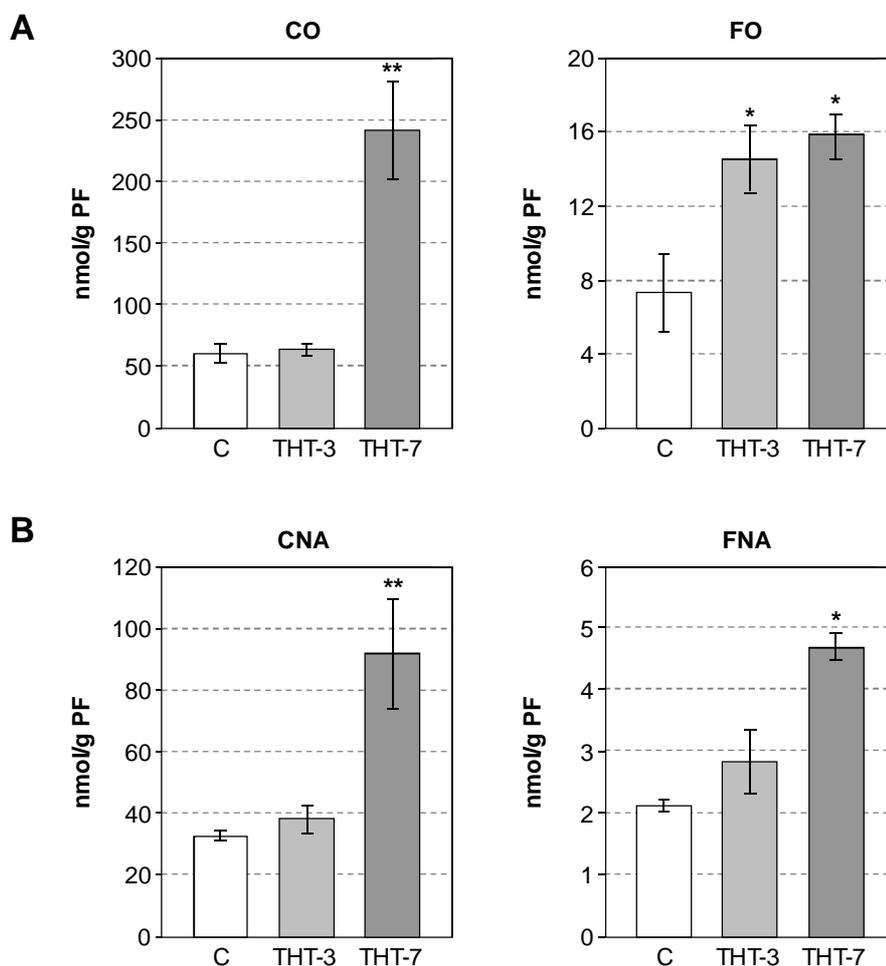


Figura 41. Acumulación de HCAA de octopamina y noradrenalina en hojas de plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. A) Niveles de acumulación de cumaroil octopamina (CO) y feruloil octopamina (FO) en hojas infectadas de plantas transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C) 48 horas después de la inoculación. B) Niveles de acumulación de cumaroil noradrenalina (CNA) y feruloil noradrenalina (FNA) en hojas infectadas de plantas transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C) 48 horas después de la inoculación. Las muestras fueron analizadas por UPLC-PDA-Micromass Q-TOF. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$, respecto a las plantas control. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a las plantas control.

Por tanto, se había detectado hasta el momento la acumulación de HCAA de tiramina tanto de manera constitutiva, en el caso de CT, como inducida en respuesta a herida, donde se acumulan CT y FT, y ahora también como consecuencia de la infección bacteriana. Sin embargo, la acumulación de HCAA de octopamina y noradrenalina únicamente se ha detectado en plantas infectadas, sugiriendo que la acumulación de estas HCAA se produce exclusivamente como consecuencia de la infección. Ello podría indicar una menor disponibilidad en la planta para la formación de HCAA de las aminas octopamina y noradrenalina, en comparación con la tiramina. Por otra parte, estos resultados también podrían explicarse teniendo en cuenta la afinidad de sustrato de la isoforma THT1-3 de tomate, que es mayor por la tiramina y menor por la noradrenalina (von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003), coincidiendo con las HCAA que se acumulan en mayor y menor cantidad, respectivamente.

Como se ha mencionado anteriormente, CT y FT han sido extensamente implicadas en la respuesta defensiva, siendo varios los estudios que demuestran que su síntesis se activa en plantas en respuesta a la infección por patógenos (Negrel y Jeandet, 1987; Keller *et al.*, 1996). Otras HCAA derivadas de la dopamina y la octopamina han mostrado una elevada acción bactericida, así como una notable actividad antioxidante (Zacarés *et al.*, 2007). Por último, entre las HCAA acumuladas en tomate destaca la feruloil noradrenalina (FNA), ya que presenta una extraordinaria actividad antioxidante (López-Gresa *et al.*, 2011). Todo esto indica que las HCAA podrían constituir un componente químico importante de la respuesta defensiva del tomate, actuando como agentes antimicrobianos de defensa frente a patógenos o bien reforzando la pared celular (Martin-Tanguy y Negrel, 1987; Negrel y Lherminier, 1987; Halbrock y Scheel, 1989; Liyama *et al.*, 1994). Por tanto, la mayor acumulación de HCAA que observamos en plantas transgénicas de tomate THT podría conllevar una mayor resistencia de estas plantas frente a los ataques patogénicos. Para estudiar dicha hipótesis, hemos estudiado el crecimiento bacteriano que se produce en plantas de tomate THT infectadas con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato*.

2.2. Crecimiento bacteriano en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato*

Con el fin de investigar el efecto de la sobreexpresión de *THT* y la consiguiente elevada acumulación de HCAA en la defensa de la planta, se cuantificó el crecimiento bacteriano en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con *P. syringae* pv. *tomato*, en comparación con plantas control. Para ello, las hojas fueron infiltradas con una suspensión bacteriana y se recogieron muestras a las 24 y 48 horas después de la inoculación para ser analizadas como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos del conteo se presentan en la Figura 42.

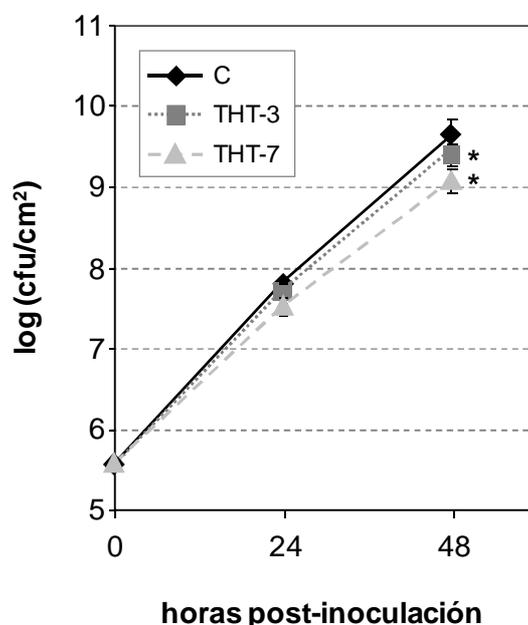


Figura 42. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en hojas de plantas transgénicas de tomate THT. Las unidades formadoras de colonias (cfu) bacterianas en plantas transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C) se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. El crecimiento bacteriano se cuantificó 24 y 48 horas después de la inoculación. La media y el error estándar mostrados corresponden a cinco plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico de *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$, respecto a las plantas control.

El crecimiento bacteriano se redujo significativamente en ambas líneas transgénicas a las 48 horas post-inoculación, respecto a plantas control. Concretamente, en este punto de la infección la línea 7 presentó una disminución del

32% en el número de unidades formadoras de colonias (cfu) con respecto a las plantas control. La comparación del crecimiento bacteriano en las dos líneas transgénicas independientes 3 y 7 pone de manifiesto un efecto dosis, ya que la resistencia observada correlaciona con la acumulación de HCAA (Figuras 40 y 41) en estas líneas. En cuanto a los síntomas, se observó la aparición de necrosis y clorosis en las hojas inoculadas con la bacteria, sin detectar diferencias macroscópicas claras entre las plantas control y las plantas transgénicas. Por lo tanto, las plantas transgénicas de tomate THT exhibieron una resistencia significativa al crecimiento de la bacteria virulenta *P. syringae* pv. *tomato*.

En *Arabidopsis thaliana*, el enzima Agmatina Cumaroil Transferasa (*AtACT*) cataliza la última reacción en la biosíntesis de las HCAA. En respuesta a la infección con el hongo *Alternaria brassicicola*, los transcritos de *AtACT* aumentaron rápidamente y se detectó la acumulación de HCAA de agmatina y putrescina en las hojas de la roseta (Muroi *et al.*, 2009). En consecuencia, mutantes de *Arabidopsis* para *AtACT* mostraron una mayor susceptibilidad al hongo patógeno, indicando que la acumulación de HCAA forma parte de los mecanismos de defensa de *A. thaliana*. Por otro lado, plantas transgénicas de torenia (*Torenia hybrida*) que sobreexpresan el gen *AtACT*, presentaron acumulación de HCAA, acompañada de una mayor resistencia frente al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* (Muroi *et al.*, 2012). Nuestros resultados apoyan estos trabajos en la relación entre presencia de amidas y resistencia.

Desde nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se observa que la sobreexpresión de *THT* conlleve una mayor resistencia a una infección bacteriana. La reducción en el crecimiento bacteriano detectada en las plantas transgénicas THT sugiere que la mejora de la resistencia puede deberse a la elevada acumulación de HCAA.

2.3. Acumulación de SA e inducción del gen PR-1 en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato*

El ácido salicílico (SA) desempeña un papel fundamental en la respuesta defensiva de la planta, puesto que sus niveles aumentan notablemente tras la invasión patogénica y su acumulación resulta crucial para el establecimiento de la resistencia en muchas de las interacciones planta-patógeno (Métraux y Raskin, 1993; Dempsey *et al.*, 1999). Estudios realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que plantas de tomate infectadas con *P. syringae* presentaron un aumento rápido y transitorio de SA a las 24 h de la inoculación bacteriana (Bellés *et al.*, 1999; Zacarés *et al.*, 2007). Con el fin de estudiar si la resistencia observada en plantas transgénicas de tomate THT tenía relación con la señalización de la respuesta defensiva, se midieron los niveles de SA en plantas transgénicas y plantas control a lo largo de la infección con *P. syringae*. Los resultados de la acumulación de SA en hojas de tomate transgénico THT y plantas de tomate control en respuesta a la infección con *P. syringae* se muestran en la Figura 43A.

No se observó diferencias significativas en los niveles de SA entre plantas transgénicas y plantas control a las 24 horas post-inoculación (hpi). No obstante, a las 48 hpi ambas líneas transgénicas presentaron niveles de SA significativamente más altos que los detectados en plantas control. Esto correlaciona con los resultados obtenidos en el ensayo de resistencia, puesto que las diferencias en crecimiento bacteriano en las líneas transgénicas también resultaron estadísticamente significativas a las 48 hpi, respecto a las plantas control. La línea 7 es de nuevo la que presentó los niveles de SA más altos. Concretamente, a las 48 hpi las plantas control presentaban 6 nmol SA/g PF, mientras la línea 7 acumuló hasta 16.9 nmol SA/g PF. Por lo tanto, los niveles de SA fueron aproximadamente 3 veces superiores en plantas de tomate transgénico infectado con *P. syringae* en comparación con las correspondientes plantas control.

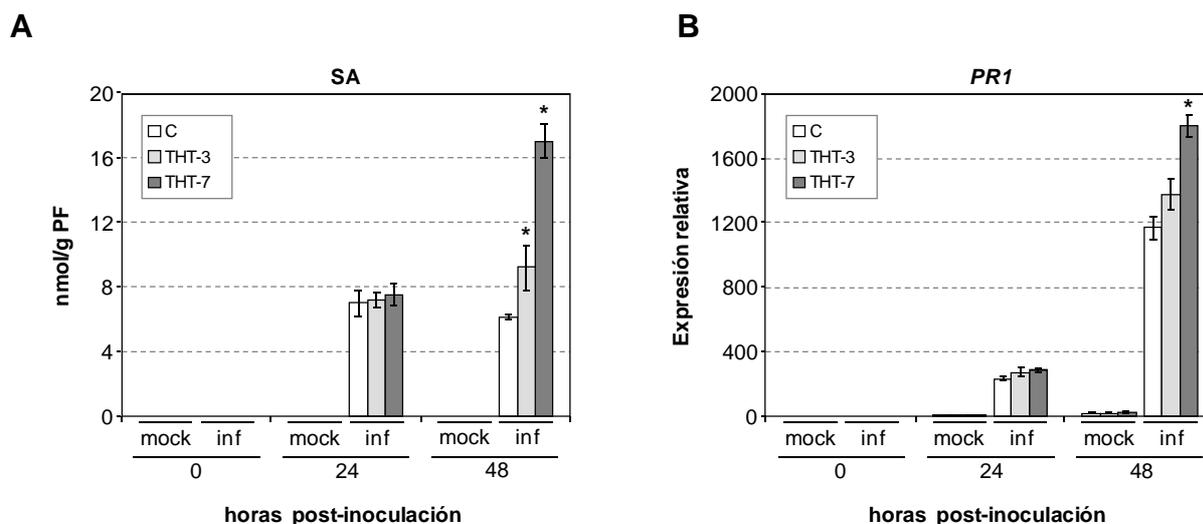


Figura 43. Acumulación de ácido salicílico y expresión del gen *PR1* en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. A) Niveles de ácido salicílico total (SA) en hojas infiltradas con *P. syringae* (inf) e infiltradas con tampón (*mock*) de plantas transgénicas THT-3 y THT-7 y plantas control (C) a las 0, 24 y 48 horas desde la inoculación. Las muestras fueron analizadas por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. B) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la acumulación de mRNA de *PR1* en las plantas del apartado A). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas control. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. La significación estadística se muestra para plantas transgénicas infectadas frente a plantas control infectadas. El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$, respecto a las plantas control.

Debido a que el SA es un importante regulador de la inducción de genes que codifican proteínas de defensa (*Pathogenesis-Related*, PR; van Loon *et al.*, 2006), nos propusimos estudiar el patrón de expresión del gen *PR1*. Para ello, se recogieron muestras a las 24 y 48 horas desde la infiltración bacteriana y se realizó una extracción de RNA total seguida de una RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión del mRNA de *PR1* obtenidos se muestran en la Figura 43B. Se observa cómo los niveles de *PR1* correlacionan con los niveles de SA, aumentando como consecuencia de la infección, siendo superiores en las líneas transgénicas THT. En el caso de la línea 7, la expresión de *PR1* fue aproximadamente 1.5 veces superior en comparación con plantas control a las 48 hpi, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados sugieren que la resistencia mostrada por las plantas transgénicas de tomate THT frente a la infección con *P. syringae* se debe a la mayor acumulación de HCAA en estas plantas transgénicas. Además, la comparación entre dos líneas transgénicas independientes ha puesto de manifiesto un efecto dosis, reforzando la idea de que los niveles de HCAA correlacionan con la inhibición del crecimiento bacteriano. Esto concuerda con trabajos previos en los que se había descrito la relación entre la acumulación de HCAA y la expresión de resistencia, puesto que los niveles de HCAA detectados en interacciones incompatibles en pimiento y tomate eran muy superiores a los niveles alcanzados en las interacciones compatibles correspondientes (Newman *et al.*, 2001; von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003). Los niveles de HCAA que se detectan en las plantas transgénicas de tomate THT infectadas son comparables, e incluso superiores, a los detectados en las interacciones incompatibles en tomate por von Roepenack-Lahaye y colaboradores (2003).

Además de esto, mostramos en este trabajo que la mayor acumulación de HCAA viene acompañada de un incremento en los niveles de SA, lo que conduciría o reforzaría la activación de las defensas de la planta. La posibilidad de que las HCAA deban considerarse no sólo productos finales de la respuesta defensiva de la planta frente al patógeno, sino también intermediarios metabólicos, parece ser cada vez más factible (Bassard *et al.*, 2010). En relación con esto, resultaría interesante realizar experimentos para estudiar si la aplicación exógena de HCAA puede activar el sistema de defensa de la planta, y evitar así posibles infecciones posteriores.

En resumen, hemos observado que las plantas transgénicas de tomate que se han desarrollado en este estudio presentan una elevada expresión de *THT* y la consiguiente acumulación de HCAA en hojas, flores y frutos. Además, esta acumulación de HCAA de tiramina (CT y FT), octopamina (CO y FO) y noradrenalina (CNA y FNA) fue mayor en plantas de tomate THT infectadas con *P. syringae* en comparación con plantas transgénicas control. Este aumento en el contenido de HCAA en las plantas transgénicas viene acompañado de un incremento en los niveles de SA y la inducción de genes *PR*. Finalmente, las plantas transgénicas de tomate THT mostraron una mayor resistencia a la infección por *P. syringae*, sugiriendo que las HCAA juegan un papel

defensivo en esta interacción. Es de destacar el valor de estas plantas transgénicas como una herramienta útil a la hora de proporcionar nuevas aportaciones sobre la función de las HCAA en ésta y otras interacciones planta-patógeno.

Discusión general

A lo largo de este trabajo se ha destacado la importancia de los metabolitos secundarios de naturaleza fenólica y el papel que éstos desempeñan en la respuesta defensiva de las plantas frente al ataque de patógenos (Dixon *et al.*, 2002). Compuestos derivados del ácido benzoico, como el ácido salicílico (SA), que es el más ampliamente estudiado, o el ácido gentísico (GA), pueden actuar como moléculas señal, siendo capaces de activar la respuesta defensiva cuando se encuentran en forma libre (Bellés *et al.*, 1999; Shah, 2003). En este trabajo, además, hemos observado que otro hidroxibenzoato, el ácido 2,4 dihidroxibenzoico (2,4-DHBA), también podría jugar un papel en la activación de la respuesta defensiva en tomate.

Otros compuestos de naturaleza fenólica se consideran componentes finales de la respuesta defensiva, actuando directamente sobre el organismo patógeno. Tal es el caso de las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAA) (Bassard *et al.*, 2010). De hecho, nuestro grupo ha descrito que las HCAA se acumulan en plantas de tomate en respuesta a infecciones patogénicas, y que algunas de ellas poseen actividad antibacteriana, antifúngica o antioxidante (Zacarés *et al.*, 2007; López-Gresa *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se ha estudiado el papel que los metabolitos secundarios de naturaleza fenólica juegan en la respuesta defensiva de las plantas desde dos aproximaciones distintas. Por un lado, hemos llevado a cabo una estrategia de tipo *farmacológico*, análoga a la ya descrita en el caso del SA, para estudiar la posible resistencia a patógenos inducida por el GA en plantas, así como las posibles bases moleculares que subyacen a la misma. Por otro, hemos realizado un abordaje *genético*, consistente en la obtención y caracterización de plantas transgénicas que presenten niveles alterados del metabolito estudiado. Para esta segunda aproximación, hemos utilizado como diana de manipulación genética enzimas que participan en la regulación de la acumulación de los metabolitos en su forma activa, como son las glicosiltransferasas, en el caso de los compuestos derivados del ácido benzoico

(O'Donnell *et al.*, 1998; Tárraga *et al.*, 2010), o el enzima tiramina hidroxicinamoil transferasa, para el caso de las HCAA (von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003).

La acumulación de SA en plantas infectadas con un organismo patógeno ha sido descrita en numerosas ocasiones. También se ha detectado la acumulación de GA en respuesta a infecciones patogénicas en tomate, *Gynura*, pepino y *Arabidopsis* (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2006; Fayos *et al.*, 2006; Bartsch *et al.*, 2010). Se ha descrito que tratamientos exógenos con SA o GA activan la respuesta defensiva de las plantas (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2009; Meher *et al.*, 2011; Lisón *et al.*, 2013). Además, se ha observado que tratamientos con SA también inducen resistencia frente a diferentes patógenos en tomate (Spletzer *et al.*, 1999; Meher *et al.*, 2011) y otras especies vegetales (Saikia *et al.*, 2003; Wang y Liu, 2012). Mediante un abordaje farmacológico similar, en este trabajo hemos observado que tratamientos con SA o GA inducen resistencia en plantas de *Gynura* y tomate frente a infecciones con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) y el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV), respectivamente. La inducción de los genes implicados en el silenciamiento de RNA (*DCLs* y *RDRs*) en plantas de tomate tratadas con SA o GA podría explicar el retraso observado en la infección frente a ToMV como consecuencia de dichos tratamientos. Nuestros resultados parecen indicar que existe una relación entre la resistencia mediada por SA o GA y la activación de los mecanismos de silenciamiento génico en tomate (Campos *et al.*, 2014a). En el futuro sería interesante abordar estrategias de este tipo para las HCAA, llevando a cabo tratamientos exógenos con amidas de síntesis (López-Gresa *et al.*, 2011) y analizando si se produce la activación del sistema defensivo de la planta y, por consiguiente, una mayor resistencia frente a infecciones posteriores.

La obtención de plantas transgénicas que presenten niveles alterados de fenólicos ha sido clave en el estudio de la función que desempeñan dichos compuestos en plantas. Tal es el caso de las plantas transgénicas NahG, que expresan constitutivamente el gen *NahG* de *Pseudomonas putida*, el cual codifica el enzima salicilato hidroxilasa, que transforma el SA en catecol. La contribución del SA a la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) se estudió por primera vez en

plantas transgénicas de tabaco portadoras del gen *NahG*. Dichas plantas apenas acumulaban SA como consecuencia de una infección, y eran incapaces de inducir la SAR frente al Virus del Mosaico del Tabaco (Gaffney *et al.*, 1993). Más adelante se obtuvieron plantas transgénicas *NahG* en *Arabidopsis* y tomate, lo que ha permitido profundizar en el estudio de la función del SA en la respuesta defensiva en dichas especies (Delaney *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995; Brading *et al.*, 2000).

En este trabajo hemos obtenido distintas plantas transgénicas con niveles alterados de fenólicos, con el fin de estudiar el papel de estos compuestos en la respuesta defensiva, mediante un abordaje de tipo genético. Por una parte, la sobreexpresión de *GAGT* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* ha provocado una menor acumulación de GA en forma libre, que es la forma activa del compuesto, y ha resultado en una mayor susceptibilidad de estas plantas a la infección con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato*. También hemos obtenido plantas transgénicas de tomate con sobreexpresión de *THT*, las cuales, en respuesta a la infección con *P. syringae*, presentaron una mayor acumulación de HCAA y una mayor resistencia a la bacteria, respecto a plantas control. Curiosamente, los mayores niveles de HCAA iban acompañados de una alteración en la acumulación de SA, que resultó ser mayor en las plantas transgénicas (Campos *et al.*, 2014b). Tanto las plantas transgénicas de *Arabidopsis* *GAGT* como las de tomate *THT* presentan niveles alterados de GA y SA, respectivamente, en comparación con las plantas control. Teniendo en cuenta la relación que hemos observado entre la resistencia mediada por SA o GA y la activación de los mecanismos de silenciamiento génico en tomate, sería interesante estudiar si en estas plantas transgénicas se produce una mayor o menor activación de la ruta de silenciamiento de RNA como mecanismo de defensa frente a patógenos.

También se han obtenido plantas transgénicas de tomate que han presentado un fenotipo de tipo metabólico. Por una parte, las plantas transgénicas de tomate con sobreexpresión de *GAGT* tratadas exógenamente con GA presentaron el mismo fenotipo que habíamos observado previamente en plantas transgénicas de *Arabidopsis* *GAGT*: un mayor porcentaje de conjugación, que se traduce en una disminución en la cantidad de GA en forma libre. Futuros ensayos de patogenicidad ayudarán a

esclarecer si el fenotipo metabólico en tomate lleva asociado un fenotipo de susceptibilidad, tal y como ocurre en *Arabidopsis*. Por otra parte, la proteína de tomate *Tw1* ha presentado actividad glucosiltransferasa *in vitro* frente a los hidroxibenzoatos 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA. Tratamientos exógenos con estos compuestos en plantas transgénicas de tomate que silencian *Tw1* han permitido confirmar su actividad *in vivo*. El silenciamiento de esta glicosiltransferasa causa una disminución en el porcentaje de conjugación de ambos compuestos, lo que supone un aumento en la acumulación de la forma libre en las plantas transgénicas, respecto a las plantas control. Será igualmente interesante llevar a cabo ensayos de patogenicidad en estas plantas transgénicas y estudiar el fenotipo de resistencia/susceptibilidad. Del mismo modo al que se propone para las plantas transgénicas que han mostrado fenotipos de resistencia o susceptibilidad, estamos interesados en estudiar si, tanto las transgénicas de silenciamiento de *Tw1*, como las de sobreexpresión de *GAGT*, presentan alguna variación en la activación de los mecanismos de silenciamiento de RNA.

Además de las conexiones descritas en este trabajo entre la señalización mediada por SA o GA y el silenciamiento de RNA, diversos autores establecen similitudes entre el modelo de *zig-zag* propuesto para la respuesta inmune y el silenciamiento génico. Dichas similitudes se basan principalmente en que los supresores de silenciamiento descritos, no sólo para virus, sino también para bacterias, actuarían del mismo modo que los efectores producidos por las bacterias para limitar la PTI. Por su parte, las plantas desarrollarían sistemas de defensa contra la supresión del silenciamiento génico producido por los patógenos, aportando así nuevos ejemplos de la interminable carrera de armas moleculares entre el patógeno y la planta (Peláez y Sánchez, 2013; Pumplín y Voinnet, 2013; Nakahara y Masuta, 2014). Esto da idea de la enorme complejidad del sistema defensivo de las plantas, las interconexiones entre las diferentes respuestas y la variedad de componentes que intervienen en la activación o regulación de unas vías u otras, así como en el ataque directo al patógeno.

Los metabolitos *secundarios* de naturaleza fenólica, como el SA, el GA y las HCAA entre muchos otros, juegan un papel muy importante en sistema defensivo de las plantas, no sólo formando parte de la respuesta defensiva final frente al patógeno,

sino actuando como moléculas señal y/o compuestos intermediarios. Por ello, la generación de plantas transgénicas que presenten niveles alterados de estos metabolitos constituye una herramienta muy útil a la hora de profundizar en el estudio de la función que desempeñan en el complejo sistema defensivo de las plantas (Chong *et al.*, 2002; Poppenberger *et al.*, 2003; Niggeweg *et al.*, 2004; Guillet y de Luca, 2005; Hagel y Facchini, 2005; Lorenc-Kukula *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2014; Kim y Hwang, 2014). Al mismo tiempo, dicha estrategia puede constituir un medio de obtención de plantas más resistentes frente a ataques patogénicos de diversa naturaleza. También resulta de especial interés biotecnológico el avance en la búsqueda de nuevos *fitofortificantes*, es decir, compuestos que aplicados exógenamente mejoren la resistencia de las plantas frente a patógenos (Walters *et al.*, 2005; Noutoshi *et al.*, 2012). Todo ello pone de manifiesto la importancia de los compuestos de naturaleza fenólica en el sistema defensivo de las plantas, reforzando más si cabe el interés en el estudio del metabolismo *secundario* de las plantas.

Conclusiones

- I. Salicylic and gentisic acids promote resistance to RNA pathogens in plants, thus giving further support to the signaling function of these metabolites in the plant defence response.
- II. There is a correlation between SA- and GA-mediated resistance and the activation of gene silencing mechanisms in tomato plants.
- III. Overexpression of the tomato glycosyltransferase GAGT in *Arabidopsis thaliana* and tomato plants results in a decrease of the free GA content, confirming the activity of this GA glycosyltransferase *in vivo*.
- IV. Arabidopsis plants overexpressing GAGT are more susceptible to infection with the bacteria *P. syringae* pv. *tomato*, suggesting that GA could also play a role in defence in this plant species.
- V. The glycosyltransferase activity of the tomato protein Twi1 is confirmed. The recombinant protein conjugates glucose to the hydroxybenzoates 2,4-DHBA and 2,4,6-THBA *in vitro*. When treated with these substrates, Twi1-silenced transgenic tomato plants displayed a lower conjugation rate of both compounds, thus confirming the activity of Twi1 also *in vivo*.
- VI. The glycosyltransferase Twi1 could play a role in tomato defence response, since it is induced as a consequence of the infection with *P. syringae*. In addition, Twi1-silenced tomato plants showed a greater induction of PR1 upon treatment with 2,4-DHBA, as compared to the corresponding control plants.
- VII. THT overexpression in tomato produces an enhanced accumulation of HCAA and a better resistance to *Pseudomonas syringae*, confirming the defensive role of these compounds.

- I. Los ácidos salicílico y genticónico promueven resistencia a patógenos de RNA en plantas, lo que refuerza el papel señalizador de estos metabolitos en la respuesta defensiva.
- II. Existe una correlación entre la resistencia mediada por SA y GA y la activación de mecanismos de silenciamiento génico en plantas de tomate.
- III. La sobreexpresión de la glicosiltransferasa de tomate GAGT en plantas de *Arabidopsis thaliana* y tomate resulta en una disminución del contenido en GA libre, confirmando la actividad conjugadora de GA de esta glicosiltransferasa *in vivo*.
- IV. Las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan GAGT son más susceptibles a la infección con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato*, sugiriendo que el GA podría jugar un papel en defensa también en esta especie.
- V. Se confirma la actividad glicosiltransferasa de la proteína Twi1 de tomate. La proteína recombinante conjuga glucosa a los hidroxibenzoatos 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA *in vitro*. Plantas transgénicas de tomate que silencian *Twi1* tratadas con estos sustratos presentan un menor porcentaje de conjugación de los mismos, confirmando la actividad conjugadora de Twi1 también *in vivo*.
- VI. La glicosiltransferasa Twi1 podría jugar un papel en la respuesta defensiva de tomate, puesto que se induce como consecuencia de la infección con *P. syringae*. Las plantas transgénicas de tomate que silencian *Twi1* tratadas con 2,4-DHBA, presentan además una mayor inducción de *PR1*, respecto a las correspondientes plantas control.
- VII. La sobreexpresión de *THT* en tomate produce una mayor acumulación de HCAA y una mayor resistencia frente a *Pseudomonas syringae*, confirmando el papel defensivo de estos compuestos.

Bibliografía

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992) Ethylene in plant biology, 2nd Ed. Academic Press San Diego 264-296
- Achnine L, Huhman DV, Farag MA, Sumner LW, Blount JW, Dixon RA (2005) Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 41: 875-887
- Agarwal P, Agarwal PK (2014) Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling. *Mol Biol Rep.* 41(2): 599-611
- Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press
- Alamillo JM, Saénz P, García JA (2006) Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spreads of plum box virus in tobacco. *Plant J.* 48: 217-227
- Álvarez ME (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 429-442
- Ament K, Krasikov V, Allmann S, Rep M, Takken FL, Schuurink RC (2010) Methyl salicylate production in tomato affects biotic interactions. *Plant J.* 62(1): 124-34
- Armah, CN, Mackie AR, Roy C, Price K, Osbourn AE, Bowyer P, Ladha S (1999) The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophys J.* 76: 281-290
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Sedman JG, Smith JA, Struhl K (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc. Boston. EE. UU.
- Bai M, Yang GS, Chen WT, Mao ZC, Kang HX, Chen GH, Yang YH, Xie BY (2012) Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analyses in response to viral infection and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum*, *Gene* 501: 52-62
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 721-733
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 694: 473-488

- Bartsch M, Bednarek P, Vivancos PD, Schneider B, von Roepenack-Lahaye E, Foyer CH, Kombrink E, Scheel D, Parker JE (2010) Accumulation of isochlorogenic acid-derived 2,3-dihydroxybenzoic 3-O-beta-D-xyloside in Arabidopsis resistance to pathogens and ageing of leaves. *J Biol Chem.* 285(33): 25654-65
- Bassard JE, Ullmann P, Bernier F, Werck-Reichhart D (2010) Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71: 1808-1824
- Baulcombe D (2003) siRNAs in plants. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona 2003. Oral presentation
- Beckers GJ, Spoel SH (2006) Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol.* 8(1): 1-10
- Bednarek P (2012) Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 15(4): 407-14
- Beggs CJ, Kuhn K, Böcker R, Wellmann E (1987) Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons: Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172: 121-126
- Bellés JM, Garro R, Navarro P, Primo J, Conejero V (1999) Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12(3): 227-235
- Bellés JM, Garro R, Pallás V, Fayos J, Rodrigo I, Conejero V (2006) Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* 223: 500-511
- Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-21
- Block A, Schmelz E, O'Donnell PJ, Jones JB, Klee HJ (2005) Systemic acquired tolerance to virulent bacterial pathogens in tomato. *Plant Physiol.* 138(3): 1481-90
- Boachon B, Gamir J, Pastor V, Erb M, Dean JV, Flors V, Mauch-Mani B (2014) Role of two UDP-Glycosyltransferases from the L group of Arabidopsis in resistance against *Pseudomonas syringae*. *Eur J Plant Pathol.* 139: 707-720

- Boatwright JL, Pajerowska-Mukhtar K (2013) Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. *Mol Plant Pathol.* 14(6): 623-34
- Boccaro M, Sarazin A, Thiébeauld O, Jay F, Voinnet O, Navarro L, Colot V (2014) The Arabidopsis miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP- and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS Pathog.* 10(1): e1003883
- Bologna NG, Voinnet O (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol.* 65:473-503
- Bottcher C, von Roepenack-Lahaye E, Schmidt J, Schmotz C, Neumann S, Scheel D, Clemens S (2008) Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 147:2107-2120
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Plant Biol.* 8: 254-263
- Bowles DJ (1990) Defense-Related Proteins in higher plants, *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907
- Bozorov TA, Pandey SP, Son Truong D, Kim SG, Heinrich M, Gase K, Baldwin IT (2012) DICER-like proteins and their role in plant-herbivore interactions in *Nicotiana attenuata*, *Journal of Integrative Plant Biology* 54: 189-206
- Brading PA, Hammond-Kosack KE, Parr A, Jones JD (2000) Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.* 23(3): 305-18
- Brodersen P, Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants, *Trends in Genetics* 22: 268-280
- Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MFC, Cammue BPA (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 393-416
- Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA, Mason JG (1999) Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. *Plant J.* 19: 441-451

- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2002) Natural products (secondary metabolites). In: Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists 1250-1318
- Campos L, Granell P, Tárraga S, López-Gresa MP, Conejero V, Bellés JM, Rodrigo I, Lisón P (2014a) Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 77: 35-43
- Campos L, Lisón P, López-Gresa MP, Rodrigo I, Zacarés L, Conejero V, Bellés JM (2014b) Transgenic tomato plants overexpressing tyramine N-hydroxycinnamoyl-transferase exhibit elevated hydroxycinnamic acid amide levels and enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27(10): 1159-1169
- Carbonell A, Martínez de Alba AE, Flores R, Gago S (2008) Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371(1): 44-53
- Carr JP, Lewsey MG, Palukaitis (2010) Signaling in induced resistance. in: J.P. Carr, G. Loebenstein (Eds.) *Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses*, Pt II, pp. 57-121
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricipigliano J, Klessig DF (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 4134-4137
- Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013) Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72: 1-20
- Chong J, Baltz R, Fritig B, Saindrenan P (1999) An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Lett.* 458: 204-208
- Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* 14: 1093-1107

- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541-549
- Clarke DD (1982) The accumulation of cinnamic acid amides in the cell walls of potato tissue as an early response to fungal attack. *Active Defence Mechanisms in Plants* (R. Wood, ed.). New York: Plenum Press 321-322
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16(6): 735-43
- Coego A, Ramirez V, Ellul P, Mayda E, Vera P (2005) The H₂O₂-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *Plant J.* 42(2): 283-93
- Cohn JR, Martin GB (2005) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J.* 44: 139-54
- Collinge DB, Milligan DE, Dow JM, Scofield G, Daniels MJ (1987) Gene expression in *Brassica campestris* showing a hypersensitive response to the incompatible pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens*. *Plant Mol Biol.* 8(5): 405-14
- Conejero V (2003) Viroids and gene silencing. *Viroids*. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. y Semancik, J.S. (Eds.). CSIRO Publishing, Australia, pp 67-70
- Conejero V, Bellés JM, García-Breijo F, Garro R, Hernández-Yago J, Rodrigo I, Vera P (1990) Signaling in Viroid Pathogenesis. *Recognition and Response in Plant-Virus Interactions*. Springer-Verlag. Heidelberg. RFA: 233-263
- Conejero V, Granell A (1986) Stimulation of a viroid-like syndrome and the impairment of viroid infection in *Gynura aurantiaca* plants by treatment with silver ions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29: 317-323
- Conejero V, Semancik JS (1977) Analysis of the proteins in crude plant extracts by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathol.* 67: 1424-1426
- Cowley T, Walters DR (2002a) Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Plant, Cell and Environment* 25: 461-468

- Cutt JR, Harpster MH, Dixon DC, Carr JP, Dunsmuir P, Klessig DF (1989) Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* 173(1): 89-97
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411(6839): 826-33
- Dean JV, Delaney SP (2008) Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 132(4): 417-25
- Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221: 287-296
- Debener T, Lehnackers H, Arnold M, Dangl JL (1991) Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J.* 1(3): 289-302
- Deikman J (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol Plant* 100: 561-566
- Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense, *Science* 313: 68-71
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1994) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588
- Dempsey DA, Shah J, Klessig DF (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 547-575
- Derksen H, Rampitsch C, Daayf F (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.* 207: 79-87

- Di serio F, Flores R (2008) Viroids: molecular implements for dissecting RNA trafficking in plants. *RNA Biol.* 5(3): 128-131
- Di Serio F, Martínez de Alba AE, Navarro B, Gisel A, Flores R (2010) RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus, *Journal of Virology* 84: 2477-2489
- Ding B (2009) The biology of viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 105-131
- Ding SW, Voinnet O (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413-426
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3: 371–390
- Dixon RA, Paiva ML (1995) Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097
- Domingo C, Conejero V, Vera P (1994) Genes encoding acidic and basic class III beta-1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Mol Biol.* 24(5): 725-32
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185-209
- Ebel J, Cosio EG (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev.Cytol.* 148: 1-36
- Ecker JR, Davis RW (1987) Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 5202-5206
- Edgar CI, McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Maclean DC, Schenk PM, Kazan K (2006) Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*, *Australasian Plant Pathology* 35: 581-591
- Edwards R (1994) Conjugation and metabolism of salicylic acid in tobacco. *J. Plant Physiol.* 143: 609-614
- Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, Moreno V (2003) The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent [corrected]. *Theor. Appl. Genet.* 106: 231-8

- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2480-2484
- Facchini PJ, Hagel J, Zulak KG (2002) Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Can. J. Bot.* 80: 577-589
- Fattorusso E, Lanzotti V, Tagliatela-Scafati O (1999) Antifungal N-feruloyl amides from roots of two *Allium* species. *Plant Biosyst.* 133: 199–203
- Fayos J, Bellés JM, López-Gresa MP, Primo J, Conejero V (2006) Induction of gentisic acid 5-O- β -D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry* 67: 142-148
- Feldman JM, Lee EM (1985) Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 42: 639-643
- Fleming AJ, Mandel T, Roth I, Kuhlemeier C (1993) The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell* 5: 297-309
- Flor H (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 257-296
- Flores R, Gago-Zachert S, Serra P, Sanjuán R, Elena SF (2014) Viroids: Survivors from the RNA World? *Annual Review of Microbiology* 68: 395-414
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol.* 5(5): 344-50
- Fraissinet-Tachet L, Baltz R, Chong J, Kauffmann S, Fritig B, Saindrenan P (1998) Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Lett.* 437: 319-323
- Frydman A, Weisshaus O, Bar-Peled M, Huhman DV, Sumner LW, Marin FR, Lewinsohn E, Fluhr R, Gressel J, Eyal Y (2004) Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant J.* 40: 88-100

- Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Fukui Y, Nakao M, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Kusumi T, Hase T, Tanaka Y (2003) Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose:anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. *Plant Physiol.* 132: 1652-1663
- Gachon C, Baltz R, Saindrenan P (2004) Over-expression of a scopoletin glucosyltransferase in *Nicotiana tabacum* leads to precocious lesion formation during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus but does not affect virus resistance. *Plant Mol. Biol.* 54: 137-146
- Gachon CM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* 10: 542-549
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Ukness S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756
- Gao QM, Kachroo A, Kachroo P (2014) Chemical inducers of systemic immunity in plants. *J Exp Bot.* 65(7): 1849-55
- García-Breijó FJ, Garro R, Conejero V (1990) C7(P32) and C6(P34) PR proteins induced in tomato leaves by citrus exocortis viroid infection are chitinases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 249-260
- Ghasemi Pirbalouti A, Sajjadi SE, Parang K (2014) A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)* 347(4): 229-39
- Glazebrook J (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 280-286
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 205-227
- Gleave AP (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 20: 1203-1207
- Gómez G, Martínez G, Pallás V (2008) Viroid-Induced Symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity. *Plant Physiol.* 148: 414-423

- Gómez G, Martínez G, Pallás V (2009) Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14: 264-269
- Gómez G, Pallás V (2007) Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J.* 51(6): 1041-1049
- Grandmaison J, Olah GM, Vancalsteren MR, Furlan V (1993) Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3: 155-164
- Granel A, Bellés JM, Conejero V (1987) Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 83-90
- Granel P (2011) Estudio de la resistencia a patógenos mediada por ácido genticico en plantas. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia
- Grant JJ, Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124(1): 21-29
- Gu YQ, Yang C, Thara VK, Zhou J, Martin GB (2000) Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12(5): 771-786
- Guillet G, De Luca V (2005) Wound-inducible biosynthesis of phytoalexin hydroxycinnamic acid amides of tyramine and tryptophan and tyrosine decarboxylase transgenic tobacco lines. *Plant Physiol.* 137: 692-699
- Hagel JM, Facchini PJ (2005) Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves. *Planta* 221: 904-914
- Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-369
- Hall TJ (1980) Resistance at the Tm-2 locus in the tomato to tomato mosaic virus. *Euphytica* 29: 189-197
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441): 950-2

- Hammerschmidt R (2009) Systemic acquired resistance. *Advances in Botanical Research* 51: 173-222
- Hanahan D (1986) Studies on transformation of *Scherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- Handrick V, Vogt T, Frolov A (2010) Profiling of hydroxycinnamic acid amides in *Arabidopsis thaliana* pollen by tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 398: 2789-2801
- Hans J, Brandt W, Vogt T (2004) Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Plant J.* 39(3): 319-33
- Hansen SF, Bettler E, Rinnan A, Engelsen SB, Breton C (2010) Exploring genomes for glycosyltransferases. *Mol Biosyst.* 6(10): 1773-81
- Hanssen IM, van Esse HP, Ballester AR, Hogewoning SW, Parra NO, Paeleman A, Lievens B, Bovy AG, Thomma BPHJ (2011) Differential tomato transcriptomic responses induced by Pepino Mosaic Virus isolates with differential aggressiveness. *Plant Physiology* 156: 301-318
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 6: 2:19
- Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007) Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446: 1017-1022
- He J, Dong Z, Jia Z, Wang J, Wang G (2010) Isolation, expression and functional analysis of a putative RNA-dependent RNA polymerase gene from maize (*Zea mays* L.). *Mol. Biol. Rep.* 37(2): 865-74
- Hennig J, Malamy J, Gryniewicz G, Indulski J, Klessig DF (1993) Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* 4: 593-600
- Hirotsani M, Kuroda R, Suzuki H, Yoshikawa T (2000) Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Planta* 210: 1006-1103

- Hohlfeld H, Scheel D, Strack D (1996) Purification of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell-suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. cv. Datura. *Planta* 199: 166-168
- Horvath DM, Chua NH (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* 31: 1061-1072
- Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ (2004) N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 47822-47832
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 2.1-2.27
- Hughes J, Hughes MA (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq.* 5: 41-49
- Husar S, Berthiller F, Fujioka S, Rozhon W, Khan M, Kalaivanan F, Elias L, Higgins GS, Li Y, Schuhmacher R, Krska R, Seto H, Fabian E, Vaistij FE, Bowles D, Poppenberger B (2011) Overexpression of the UGT73C6 alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 11:51
- Ibrahim RK, Towers GH (1959) Conversion of salicylic acid to gentisic acid and o-pyrocatechuic acid, all labelled with carbon-14 in plants. *Nature* 184: 1803
- Iqbal N, Trivellini A, Masood A, Ferrante A, Khan NA (2013) Current understanding on ethylene signaling in plants: the influence of nutrient availability. *Plant Physiol Biochem.* 73: 128-38
- Iriti M, Faoro F (2004) Plant defense and human nutrition: the phenylpropanoids on the menu. *Curr. Top. Nutraceutical Res.* 2: 47-95
- Iriti M, Faoro F (2009) Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int. J. Mol. Sci.* 10(8): 3371-99
- Itaya A, Folimonov A, Matsuda Y, Nelson RS, Ding B (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1332-1334

- Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, Harris AR, Molina C, Nelson RS, Ding B (2007) A structured viroid RNA serves as a substrate for Dicer-like cleavage to reduce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J. Virol.* 81: 2980-2994
- Ivanova D, Milev I, Vachev T, Baev V, Yahubyan G, Minkov G, Gozmanova M (2014) Small RNA analysis of Potato spindle tuber viroid infected *Phelipanche ramosa*. *Plant Physiol Biochem.* 74: 276-82
- Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hoggett J, Ashford DA, Bowles DJ (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol. Chem.* 276(6): 4350-6
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6(13): 3901-7
- Ji LH, Ding SW (2001) The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 715-724
- Jones JDG, Dangl J (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Jones P, Vogt T (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174
- Jovel J, Walker M, Sanfacon H (2011) Salicylic acid-dependent restriction of tomato ringspot virus spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 706-718
- Kachroo A, Robin GP (2013) Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16(4):527-33
- Kang K, Lee K, Ishihara A, Park S, Kim YS, Back K (2010) Induced synthesis of caffeoylserotonin in pepper fruits upon infection by the anthracnose fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Sci. Hortic.* 124: 290-293
- Kang K, Lee K, Sohn SO, Park S, Lee S, Kim SY, Kim YS, Back K (2009) Ectopic expression of serotonin N-hydroxycinnamoyltransferase and differential production of phenylpropanoid amides in transgenic tomato tissues. *Sci. Hortic.* 120: 504-510

- Kang S, Back K (2006) Enriched production of N-hydroxycinnamic acid amides and biogenic amines in pepper (*Capsicum annuum*) flowers. *Sci. Hortic.* 108: 3337-341
- Katiyar-Agarwal S, Jin H (2010) Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 48: 225-46
- Keller H, Hohlfeld H, Wray V, Hahlbrock K, Scheel D, Strack D (1996) Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 42: 389-396
- Kim DS, Hwang BK (2014) An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *J Exp Bot.* 65(9): 2295-306
- Kim JH, Campbell BC, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, May GS (2007) Enhancement of fluudioxonil fungicidal activity by disrupting cellular glutathione homeostasis with 2,5-dihydroxybenzoic acid. *FEMS Microbio. Lett.* 270: 284-290
- Kita M, Hirata Y, Moriguchi T, Endo-Inagaki T, Matsumoto R, Hasegawa S, Suhayda CG, Omura M (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in Citrus. *FEBS Lett.* 469: 173-178
- Korkina LG (2007) Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.* 53: 13-23
- Kroon J, Souer E, de Graaff A, Xue Y, Mol J, Koes R (1994) Cloning and structural analysis of the anthocyanin pigmentation locus *Rt* of *Petunia hybrida*: characterization of insertion sequences in two mutant alleles. *Plant J.* 5: 69-80
- Kubo A, Arai Y, Nagashima S, Yoshikawa T (2004) Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation. *Arch. Biochem. Biophys.* 429: 198-203
- Kurosawa Y, Takahara H, Shiraiwa M (2002) UDP-glucuronic acid: soyasapogenol glucuronosyltransferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds. *Planta* 215(4): 620-9
- Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, Burgyan J (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* 23: 876-884

- Langlois-Meurinne M, Gachon CM, Saindrenan P (2005) Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 1890-1901
- Lattanzio V, De Cicco D, Venere D, Lima G, Salerno M (1994) Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Ital. J. Food Sci.* 6: 23-30
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals, J (1995) Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 863-887
- Lee BJ, Kim SK, Choi SB, Bae J, Kim KJ, Kim YJ, Paek KH (2009) Pathogen-inducible CaUGT1 is involved in resistance response against TMV infection by controlling salicylic acid accumulation. *FEBS letters* 583: 2315-2320
- Lee DE, Kang K, Lee SG, Back K (2007) Enhanced synthesis of feruloyltyramine and 4-coumaroyltyramine is associated with tyramine availability in transgenic rice expressing pepper tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase. *Plant Sci.* 172: 57-63
- Lee HI, Raskin I (1998) Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. *Phytopathology* 88: 692-697
- Lee HI, Raskin I (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 274: 36637-36642
- Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes AP, Memelink J, Pieterse CM, Ritsema T (2010a) Ethylene signaling renders the jasmonate response of Arabidopsis insensitive to future suppression by salicylic Acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23(2): 187-97
- Leon-Reyes A, Van der Does D, De Lange ES, Delker C, Wasternack C, Van Wees SC, Ritsema T, Pieterse CM (2010b) Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232(6): 1423-32
- Li X, Svedin E, Mo H, Atwell S, Dilkes BP, Chapple C (2014) Exploiting Natural Variation of Secondary Metabolism Identifies a Gene Controlling the Glycosylation Diversity of Dihydroxybenzoic Acids in Arabidopsis thaliana. *Genetics.* pii: genetics.114.168690

- Lim EK, Bowles DJ (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J.* 23: 2915-2922
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-1759
- Linthorst HJ, Meuwissen RL, Kauffmann S, Bol JF (1989) Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1(3): 285-91
- Lisón P, Rodrigo I, Conejero V (2006) A Novel Function for the Cathepsin D Inhibitor in Tomato1. *Plant Physiology* Vol. 142: 1329-1339
- Lisón P, Tárraga S, López-Gresa P, Saurí A, Torres C, Campos L, Bellés JM, Conejero V, Rodrigo I (2013) A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *Proteomics* 13(5): 833-44
- Liu Y, Gao QQ, Wu B, Ai T, Guo XQ (2009) NgRDR1, an RNA-dependent RNA polymerase isolated from *Nicotiana glutinosa*, was involved in biotic and abiotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 359-368
- Liyama K, Lam TB, Stone BA (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320
- Llave C (2010) Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.* 15(12): 701-707
- Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 466-472
- López-Gresa MP, Maltese F, Bellés JM, Conejero V, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2010) Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochem. Anal.* 21: 89-94
- López-Gresa MP, Torres C, Campos L, Lisón P, Rodrigo I, Bellés JM, Conejero V (2011) Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environ. Exp. Bot.* 74: 216-228

- Lorenc-Kukula K, Jafra S, Oszmianski J, Szopa J (2005) Ectopic expression of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in potato tuber causes increased resistance to bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 53: 272-281
- Lorenc-Kukula K, Zuk M, Kulma A, Czemplik M, Kostyn K, Skala J, Starzycki M, Szopa J (2009) Engineering Flax with the GT Family 1 *Solanum soganandinum* Glycosyltransferase SsGT1 Confers increased Resistance to *Fusarium* infection. 57: 6698-6705
- Love AJ, Geri C, Laird J, Carr C, Yun BW, Loake GJ, Tada Y, Sadanandom A, Milner JJ. (2012) Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. *PLoS One* 7(10): e47535
- Luo J, Fuell C, Parr A, Hill L, Bailey P, Elliott K, Fairhurst SA, Martin C, Michael AJ (2009) A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in *Arabidopsis* seed. *Plant Cell* 21: 318-333
- Lutwak-Mann C (1943) The excretion of a metabolic product of salicylic acid. *Biochem. J.* 37(2): 246-8
- Ly D, Kang K, Choi JY, Ishihara A, Back K, Lee SG (2008) HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine, and the hydroxycinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. *J. Med. Food* 11: 385-389
- Ma W, Berkowitz GA (2007) The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell Microbiol.* 9: 2571-85
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic acid - a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral-infection. *Science* 250: 1002-1004
- Malamy J, Hennig J, Klessig DF (1992) Temperature-Dependent Induction of Salicylic Acid and Its Conjugates during the Resistance Response to Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Cell* 4: 359-366
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26(4): 403-410
- Mallona I, Weiss J, Egea-Cortines M (2011) pcrEfficiency: a Web tool for PCR amplification efficiency prediction. *BMC Bioinformatics* 20; 12: 404

- Mandal S, Mallick N, Mitra A (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 642-649
- Marco JA (2006) Terpenos. *Química de los productos naturales*. Ed. Síntesis. pp: 172-233
- Markarian N, Li HW, Ding SW, Semancik JS (2004) RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.* 149(2): 397-406
- Martínez de Alba AE, Flores R, Hernández C (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 76: 13094-13096
- Martinez G, Donaire L, Llave C, Pallas V, Gomez G (2010) High-throughput sequencing of Hop stunt viroid-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Mol. Plant Pathol.* 11(3): 347-359
- Martin-Tanguy J, Cabanne F, Perdrizet E, Martin C (1978) Distribution of hydroxycinnamic acid-amides in flowering plants. *Phytochemistry* 17: 1927-1928
- Martin-Tanguy J, Martin C, Gallet M (1973) Presence de composés aromatiques liés à la putrescine dans divers *Nicotiana* virus. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Paris D276*, 1433-1435
- Martin-Tanguy J, Martin C, Gallet M, Vernoy R (1976) Sur les puissants inhibiteurs de multiplication du virus de la mosaïque de tabac. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Paris D282*, 2231-2234
- Martin-Tanguy J, Negrel J (1987) Hydroxycinnamic acid amides, hypersensitivity, flowering and sexual organogenesis in plants. In: vonWettstein, D., Chua, N.H. (Eds.), *Plant Molecular Biology*. Plenum, New York, pp 253-263
- Matousek J, Kozlová P, Orctová L, Schmitz A, Pesina K, Bannach O, Diermann N, Steger G, Riesner D (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* 388(1): 1-13
- Matros A, Mock HP (2004) Ectopic expression of a UDP-glucose:phenylpropanoid glucosyltransferase leads to increased resistance of transgenic tobacco plants against infection with Potato Virus Y. *Plant Cell Physiol.* 45: 1185-1193

- Matzinger P (2007) Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat. Immunol.* 8: 11-13
- McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of eruloyl-3-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* 17: 523–534
- Meher HC, Gajbhiye VT, Ghanendra S (2011) Salicylic acid-induced glutathione status in tomato crop and resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Journal of Xenobiotics* 1: 22-28
- Messner B, Thulke O, Schaffner AR (2003) Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* 217: 138-146
- Métraux JP, Raskin I (1993) Role of phenolics in plant disease resistance. In: *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wiley-Liss, New York, pp 191-209
- Métraux JP, Siger H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Guadin J, Raschdoorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006
- Metzler MC, Cutt JR, Klessig DF (1991) Isolation and Characterization of a Gene Encoding a PR-1-Like Protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 96(1):346-8
- Moehs CP, Allen PV, Friedman M and Belknap WR (1997) Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* 11: 227-236
- Moissiard G, Voinnet O (2006) RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 19593-19598
- Mur LAJ, Bi YM, Darby RM, Firek S, Draper J (1997) Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV infected tobacco. *Plant J.* 12: 1113-1126

- Muroi A, Matsui K, Shimoda T, Kihara H, Ozawa R, Ishihara A (2009) Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230: 517–527
- Muroi A, Matsui K, Shimoda T, Kihara H, Ozawa R, Ishihara A, Nishihara M, Arimura G (2012) Acquired immunity of transgenic torenia plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests. *Sci Rep.* 2: 689
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, Watanabe Y, Nakamura K (2007) Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (8): 2095-2100
- Nakahara KS, Masuta C (2014) Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20C: 88-95
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289
- Naranjo MA, Romero C, Bellés JM, Montesinos C, Vicente O, Serrano R (2003) Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Planta* 217: 417-424
- Navarro B, Gisel A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F (2012) Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie.* 94(7): 1474-80
- Navarro B, Pantaleo V, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Di Serio F, Burgyan J (2009) Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid Interaction. *Plos One* 4: e7686
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321(5891): 964-7
- Negrel J, Javelle F (1997) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine *N*- (hydroxycinnamoyl) transferase from tobacco cell-suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* 247: 1127-1135
- Negrel J, Javelle F, Paynot M (1993) Wound induced tyramine hydroxycinnamoyl transferase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber disks. *J. Plant Physiol.* 142: 518-524

- Negrel J, Jeandet P (1987) Metabolism of tyramine and feruloyltyramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 26: 2185-2190
- Negrel J, Lherminier J (1987) Peroxidase mediated integration of tyramine into xylem cell-walls of tobacco-leaves. *Planta* 172: 494-501
- Negrel J, Martin C (1984) The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 23: 2797-2801
- Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM (2001) Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by hp gene-dependent and hp gene-independent mechanisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 785-792
- Niggeweg R, Michael AJ, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.* 22: 746-754
- Nobuta K, Okrent RA, Stoutemyer M, Rodibaugh N, Kempema L, Wildermuth MC, Innes RW (2007) The GH3 Acyl Adenylase Family Member PBS3 Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 144: 1144–1156
- Noutoshi Y, Okazaki M, Kida T, Nishina Y, Morishita Y, Ogawa T, Suzuki H, Shibata D, Jikumaru Y, Hanada A, Kamiya Y, Shirasu K (2012) Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in Arabidopsis. *Plant Cell* 24(9): 3795-804
- Nümberger T (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 167-182
- O'Donnell PJ, Schemelz EA, Moussatche P, Lund ST, Jones JB, Klee HJ (2003) Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant J.* 33: 245-257
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Calvert CM, Dorans A, Roberts MR, Bowles DJ (1998) A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant J.* 14: 137-142
- Pallás V, Flores R (1989) Interactions between citrus exocortis and potato spindle tuber viroids in plants of *Gynura aurantiaca* and *Lycopersicon esculentum*. *Intervirology* 30(1): 10-7

- Pandey SP, Baldwin IT (2007) RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *Plant Journal* 50: 40-53
- Pandey V, Niranjana A, Atri N, Chandrashekar K, Mishra MK, Trivedi PK, Misra P (2014) WsSGTL1 gene from *Withania somnifera*, modulates glycosylation profile, antioxidant system and confers biotic and salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Planta* 239(6): 1217-31
- Papaefthimiou I, Hamilton AJ, Denti MA, Baulcombe DC, Tsagris M, Tabler M (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29: 2395-2400
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116
- Parry AD, Edwards R (1994) Characterization of O-glucosyltransferases with activities toward phenolic substrates in alfalfa *Phytochemistry* 37(3): 655-661
- Paynot M, Perennec P, Martin C, Martin-Tanguy J, Vernoy R, Javelle F (1983) Photopériodisme, tubérisation et phénolamides. *C.R. Acad. Sci. Paris* 297: 87-90
- Pearce G, Marchand PA, Griswold J, Lewis NG, Ryan CA (1998) Accumulation of feruloyltyramine and *p*-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* 47: 659-664
- Peláez P, Sanchez F (2013) Small RNAs in plant defense responses during viral and bacterial interactions: similarities and differences. *Front. Plant Sci.* 5(4): 343
- Pelham J (1966) Resistance in tomato to tobacco mosaic virus. *Euphytica* 15: 258-267
- Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, De Samlanx GW, Buchala A, Metraux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996) Pathogen induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant cell* 8: 2309-2323
- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Metraux J-P, Broekaert WF (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 2103-2113

- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glossl J, Luschnig C, Adam G (2003) Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 47905-47914
- Poulton JE (1988) Localization and catabolism of cyanogenic glycosides. *Ciba Found Symp.* 140: 67-91
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341
- Pumplin N, Voinnet O (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 11(11): 745-60
- Quilis J, Peñas G, Messeguer J, Brugidou C, San Segundo B (2008) The *Arabidopsis* AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 1215-1231
- Rairdan GJ, Delaney TP (2002) Role of salicylic acid and NIM1/NPR1 in race-specific resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* 161: 803-811
- Ratcliff F, Harrison DH, Baulcombe DC (1997) A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. *Science* 276: 1558-1560
- Ratcliff FG, MacFarlane SA, Baulcombe DC (1999) Gene Silencing without DNA: RNA-mediated Cross-Protection between Viruses. *Plant Cell* 11: 1207-1215
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 317-43
- Rodrigo I, Vera P, Frank R, Conejero V (1991) Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Mol. Biol.* 16: 932-934

- Rodrigo I, Vera P, Tornero P, Hernández-Yago J, Conejero V (1993) cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. Characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol.* 1023: 939-945
- Rogers SO, Bendich AJ (1998) Extraction of DNA from plant tissue. *Plant Molecular Biology Manual*, vol. A6. Gelvin, S.B. y Schilperoort, (eds). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27: 1122-1134
- Ronald PC, Salmeron JM, Carland FM, Staskawicz BJ (1992) The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J. Bacteriol.* 174(5): 1604-11
- Roychoudhury R, Pohl NL (2010) New structures, chemical functions, and inhibitors for glycosyltransferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(2): 168-73
- Ruiz-Ferrer V, Voinnet O (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 485-510
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819
- Saikia R, Singh T, Kumar R, Srivastava J, Srivastava AK, Singh K, Arora DK (2003) Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research* 158: 203-213
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3
- Scalschi L, Vicedo B, Camañes G, Fernandez-Crespo E, Lapeña L, González-Bosch C, García-Agustín P (2013) Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Mol. Plant Pathol.* 14(4): 342–355
- Schiebel W, Pelissier T, Riedel L, Thalmeir S, Schiebel R, Kempe D, Lottspeich F, Sanger HL, Wassenegger M (1998) Isolation of an RNA-Directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* 10: 2087-2101

- Schmidt A, Grimm R, Schmidt J, Scheel D, Strack D, Rosahl S (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase. *J. Biol. Chem.* 274: 4273-80
- Schmidt A, Scheel D, Strack D (1998) Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* 205: 51-55
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, Van Breusegem F, Eberl L, Hartmann A, Langebartels C (2006) Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29(5): 909-18
- Schulze K, Schreiber L, Szankowski I (2005) Inhibiting effects of resveratrol and its glucoside piceid against *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *J. Agric. Food Chem.* 53: 356-362
- Seto Y, Hamada S, Matsuura H, Matsushige M, Satou C, Takahashi K, Masuta C, Ito H, Matsui H, Nabeta (2009) Purification and cDNA cloning of a wound inducible glucosyltransferase active toward 12-hydroxy jasmonic acid. *Phytochemistry* 70(3): 370-9
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-367
- Shang J, Xi DH, Xu F, Wang SD, Cao S, Xu MY, Zhao PP, Wang JH, Jia SD, Zhang ZW, Yuan S, Lin HH (2011) A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta* 233: 299-308
- Shin S, Torres-Acosta JA, Heinen SJ, McCormick S, Lemmens M, Paris MP, Berthiller F, Adam G, Muehlbauer GJ (2012) Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a barley UDP-glucosyltransferase exhibit resistance to the mycotoxin deoxynivalenol. *J. Exp. Bot.* 63(13): 4731-40
- Simon C, Langlois-Meurinne M, Didierlaurent L, Chaouch S, Bellvert F, Massoud K, Garmier M, Thureau V, Comte G, Noctor G, Saindrenan P (2014) The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are components of redox status in resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant Cell Environ.* 37(5): 1114-29

- Singh DP, Moore CA, Gilliland A, Carr JP (2004) Activation of multiple antiviral defence mechanism by salicylic acid. *Mol. Plant Pathol.* 5: 57-63
- Song JT, Koo YJ, Seo HS, Kim MC, Choi YD, Kim JH (2008) Overexpression of AtSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* 69(5): 1128-34
- Spletzer ME, Enyedi AJ (1999) Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* 89: 722-727
- Spoel SH, Dong X (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3(6): 348-51
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270
- Stochmal A, Kowalska I, Janda B, Perrone A, Piacente S, Olesze W (2009) Gentisic acid conjugates of *Medicago truncatula* roots. *Phytochemistry* 70 (10): 1272-1276
- St-Pierre P, Hassen IF, Thompson D, Perreault JP (2009) Characterization of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *Virology* 383(2): 178-182
- Strack D (1997) Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*, P.M.Dey and J.B. Harborne, eds. Academic Press, London. pp 387-416
- Suzuki T, Holden I, Casida JE (1981) Diphenyl ether herbicides remarkably elevate the content of *Spinacia oleracea* of (\pm)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(2-(4-hydroxy-3-methylphenyl) ethyl)-2-propenamides. *J. Agric. Food Chem.* 29: 992-995
- Taguchi G, Fujikawa S, Yazawa T, Kodaira R, Hayashida N, Shimosaka M, Okazaki M (2000a) Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Sci.* 151: 153-161
- Taguchi G, Imura H, Maeda Y, Kodaira R, Hayashida N, Shimosaka M and Okazaki M (2000b) Purification and characterization of UDP-glucose:hydroxycoumarin 7-O-glucosyltransferase, with broad substrate specificity from tobacco cultured cells. *Plant Sci.* 157: 105-112

- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur. J. Biochem.* 268: 4086-4094
- Tárraga S (2006) Una nueva glicosiltransferasa de inducción temprana frente a señales patogénicas, en tomate. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia
- Tárraga S, Lisón P, López-Gresa MP, Torres C, Rodrigo I, Bellés JM, Conejero V (2010) Molecular cloning and characterization of a novel tomato xylosyltransferase specific for gentisic acid. *J. Exp. Bot.* 61 (15): 4325-4338
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17(5): 260-70
- Tornero P, Rodrigo I, Conejero V, Vera P (1993) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, p1-p14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol.* 102(1): 325
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141: 373-378
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24: 145-9
- Tsagris EM, Martínez de Alba AE, Gozmanova M, Kalantidis K (2008) Viroids. *Cell Microbiol.* 10(11): 2168-79
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X, Holuigue L (2004) NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 34-42
- Van der Biezen EA, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Plant Sci.* 23: 454-456
- van der Hoorn RAL, Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* 20: 2009-2017

- van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 245-264
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162
- van Loon LC, van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97
- van Etten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus 'phytoanticipins'. *Plant Cell* 6: 1191–1192
- Vera P, Conejero V (1988) Pathogenesis-related proteins of tomato: p-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol.* 87(1): 58-63
- Vera P, Hernández-Yago J, Conejero V (1988) Immunocytochemical localization of the major "pathogenesis-related" (PR) protein of tomato plants. *Plant Sci.* 55: 223-230
- Vick BA, Zimmerman DC (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111(2): 470-7
- Villegas M, Brodelius PE (1990) Elicitor induced hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant-cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* 78: 414-420
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease, in: *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206
- Vogt T, Jones P (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* 5: 380-386
- Vogt U, Pélissier T, Pütz A, Razvi F, Fischer R, Wassenegger M (2004) Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. *Plant J.* 38(1): 107-118
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33(5):949-56

- von Roepenack-Lahaye E, Newman MA, Schornack S, Hammond-Kosack KE, Lahaye T, Jones JDG, Daniels MJ, Dow JM (2003) p-coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. *J. Biol. Chem.* 278: 43373-43383
- von Ropenack E, Parr A, Schulze-Lefert P (1998) Structural analysis and dynamics of soluble cell wall bound barley phenolics and their role in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus. *Journal of Biological Chemistry* 273: 9013–9022
- von Saint Paul V, Zhang W, Kanawati B, Geist B, Faus-Kessler T, Schmitt-Kopplin P, Schäffner AR (2011) The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell* 23(11): 4124-45
- Walker N, Evans WC (1952) Pathways in the metabolism of the monohydroxybenzoic acids by soil bacteria. *Biochem. J.* 52: 23-24
- Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G (2005) Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* 95: 1368-1373
- Wang MB, Bian XY, Wu LM, Liu LX, Smith NA, Isenegger D, Wu RM, Masuta C, Vance VB, Watson JM, Rezaian A, Dennis ES, Waterhouse PM (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(9): 3275-3280
- Wang X (2009) Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS letters* 583: 3303-3309
- Wang Y, Liu JH (2012) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck), *Journal of Plant Physiology* 169: 1143-1149
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals J (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094
- Warnecke DC, Heinz E (1994) Purification of a Membrane-Bound UDP-Glucose:Sterol [beta]-D-Glucosyltransferase Based on Its Solubility in Diethyl Ether. *Plant Physiol.* 105(4): 1067-1073

- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.* 100(4): 681-97
- Wasternack C (2014) Action of jasmonates in plant stress responses and development--applied aspects. *Biotechnol Adv.* 32(1): 31-9
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany.* *Ann Bot.* 111(6): 1021-58
- Weaver LM, Hermann KM (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 346-351
- Werner C, Matile P (1985) Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barley mesophyll protoplasts. *J. Plant Physiol.* 118: 237-249
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27(6): 581-590
- Whetten R, Sederoff R (1995) Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565
- Xiang C, Miao Z, Lam E (1997) DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 34: 403-415
- Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 6516-6521
- Xu TF, Zhao XC, Jiao YT, Wei JY, Wang L, Xu Y (2014) A Pathogenesis Related Protein, VpPR-10.1, from *Vitis pseudoreticulata*: An Insight of Its Mode of Antifungal Activity. *PLoS One* 9(4): 95-102

- Xu ZJ, Nakajima M, Suzuki Y, Yamaguchi I (2002) Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiol.* 129: 1285-1295
- Yalpani N, León J, Lawton M, Raskin I (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315-321
- Yamane S, Shimoda K, Watanabe K, Hirata T (2002) Purification and characterization of gentisic acid glucosyltransferase from the cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17(2): 59-63
- Yang H, Morita A, Matsubayashi Y, Nakamura K, Sakagami Y (2000) A rapid and efficient system of *Agrobacterium* infection-mediated transient gene expression in rice *Oc* cells and its application for analysis of the expression and antisense suppression of preprophytosulfokine, a precursor of phyto-sulfokine-a, encoded by *OsPSK* gene. *Plant Cell Physiol.* 41: 811-6
- Yang SJ, Carter SA, Cole AB, Cheng NH, Nelson RS (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 6297-6302
- Yang Y, Shah J, Klessig DF (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639
- Yu D, Fan B, MacFarlane SA, Chen Z (2003) Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 206-216
- Yu M, Facchini PJ (1999) Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase from opium poppy. *Planta* 209: 33-44
- Zacarés L (2008) Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. Identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia

Zacarés L, López-Gresa MP, Fayos J, Primo J, Bellés JM, Conejero, V (2007) Induction of *p*-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 1439-1448

Zipfel C (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35(7): 345-351

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767

Anexos

Anexo I



Research article

Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens



Laura Campos, Pablo Granell, Susana Tárraga, Pilar López-Gresa, Vicente Conejero, José María Bellés, Ismael Rodrigo*, Purificación Lisón

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València (UPV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2013

Accepted 25 January 2014

Available online 2 February 2014

Keywords:

Resistance

Salicylic acid

Gentisic acid

Gene silencing

ToMV

CEVd

Tomato

ABSTRACT

We have observed that treatments with salicylic acid (SA) or gentisic acid (GA) induced resistance to RNA pathogens such as ToMV and CEVd in tomato and *Gynura aurantiaca*, respectively. Accumulation of SA and GA has been found to occur in plants infected by these pathogens, thus pointing out a possible defence role of both molecules. To study the molecular basis of the observed induced resistance to RNA pathogens the induction of silencing-related genes by SA and GA was considered. For that purpose, we searched for tomato genes which were orthologous to those described in *Arabidopsis thaliana*, such as *AtDCL1*, *AtDCL2*, *AtDCL4*, *AtRDR1*, *AtRDR2* and *AtRDR6*, and we tracked their induction in tomato along virus and viroid infections. We observed that CEVd significantly induced all these genes in tomato, with the exception of *ToRDR6*, being the induction of *ToDCL4* the most outstanding. Regarding the ToMV asymptomatic infection, with the exception of *ToRDR2*, we observed a significant induction of all the indicated silencing-related genes, being *ToDCL2* the most induced gene. Subsequently, we analyzed their transcriptional activation by SA and at the time when ToMV was inoculated on plants. *ToDCL2*, *ToRDR1* and *ToRDR2* were significantly induced by both SA and GA, whereas *ToDCL1* was only induced by SA. Such an induction resulted more effective by SA treatment, which is in agreement with the stronger SA-induced resistance observed. Our results suggest that the observed delay in the RNA pathogen accumulation could be due to the pre-induction of RNA silencing-related genes by SA or GA.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Higher plants can not move, and are consequently exposed to a wide array of damaging agents, including biotic (viroids, viruses, bacteria, fungi, insects) and abiotic (drought, salinity, heat, cold, soil toxicity) environmental aggressions. To cope with these continuous challenges, plants have evolved broad and efficient mechanisms to obtain an adequate defence. One prominent defensive response of plants against pathogen attack is the synthesis of a remarkably vast array of low molecular weight compounds with disparate functions in plant-pathogen interactions (Dixon, 2001).

Resistance in plants can also be induced by treatments with a variety of abiotic and biotic elicitors that lead to the activation of plant defence responses and consequently enhanced protection against disease. The interest in developing agents for activating the

plant's own resistance mechanisms to control diseases has increased over the last years (Walters et al., 2005).

The simple phenolic salicylic acid (SA) plays a very important role in plant defence, and is crucial to establish the resistance response in many plant-pathogen interactions (Delaney et al., 1994). In this sense, elevated levels of SA are found in many incompatible plant-pathogen interactions but also in some compatible ones (Baebler et al., 2011; Bellés et al., 1999) and exogenous treatments with SA induce in the plant the synthesis of a group of proteins that are collectively referred to as pathogenesis-related (PR) proteins, many of which have antimicrobial properties (van Loon et al., 2006). Moreover, *nahG* plants, which are unable to accumulate SA, are more susceptible to pathogens (Vlot et al., 2009). Several studies have demonstrated that exogenous treatments with SA induce resistance to different pathogens in tomato (Mandal et al., 2009; Meher et al., 2011; Shang et al., 2011; Spletzer and Enyedi, 1999) and other plant species (Edgar et al., 2006; Saikia et al., 2003; Wang and Liu, 2012).

Gentisic acid (GA), a metabolic derivative of SA, has been proposed as a signal molecule for plant defence response in compatible, non-necrotizing, interactions (Bellés et al., 1999). Interestingly,

* Corresponding author. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València (UPV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), CPI – Edif. 8E, Ingeniero Fausto Elio S/N, 46022 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 3877862; fax: +34 96 3877859.

E-mail address: irodrig@ibmcp.upv.es (I. Rodrigo).

GA has been found to accumulate in different compatible plant-pathogen interactions (Bellés et al., 2006, 2008), being produced at much higher levels than other signal molecules such as SA. Moreover, exogenous GA elicits the induction of a specific set of pathogenesis-related proteins (PRs) which are not induced by SA (Bellés et al., 1999, 2006; Lisón et al., 2013). Additionally, NMR-based metabolomics showed that glycosylated gentisic acid was the most important induced metabolite of viroid-infected plants (López-Gresa et al., 2010). Unlike SA, which is conjugated to glucose, GA is conjugated to xylose by a specific GA-xylosyl-transferase in tomato (Fayos et al., 2006; Tárraga et al., 2010). Salicylic acid has been widely related to the establishment of plant resistance against pathogen attack. In contrast, little is known on the possible role of gentisic acid in plant pathogen resistance.

Gene silencing is a kind of induced resistance which occurs in plants infected with RNA pathogens. It consists of a series of interconnected pathways that limit the synthesis, stability and translatability of foreign or aberrant RNAs. These processes have three stages in common: (a) presence or formation of double-stranded RNA (dsRNA), (b) processing of this dsRNA into small RNA fragments called sRNA, and (c) incorporation of the sRNA into a complex that is associated specifically with the complementary RNA target. As a result, the negative regulation of RNA target occurs, producing the so-called gene silencing (Brodersen and Voinnet, 2006; Carr et al., 2010).

Different genes have been described to participate in the gene silencing mechanisms. In the first stage (a), the double-stranded RNA may be already present or may result from the copy of a single-stranded RNA (ssRNA) into a dsRNA by an RNA-dependent RNA polymerase (RDR or RdRP). In the second stage (b), the dsRNA is processed into sRNAs by Dicer-like endoribonucleases (DCL). Finally (c), the sRNA generated by DCLs are incorporated into the AGO-RISC complex, where they will serve as a template to direct the specific degradation of the RNA target (Brodersen and Voinnet, 2006).

RNA silencing could explain different induced-resistance phenomena such as cross-protection between homologous viruses. In this case, an infection using a mild virus strain protects the plant against a severe strain of the same virus or a closely related one, a mechanism that has remained unexplained for more than 75 years (Ziebell and Carr, 2010). Similarly, RNA silencing has also been described for viroids, which are single-stranded, circular, non-coding RNAs that infect plants, causing devastating diseases (Flores et al., 2005). It has been observed that the infection by members of the two viroid families Pospiviroidae and Avsunviridae is followed by the accumulations of their corresponding sRNAs (Navarro et al., 2012; Sano et al., 2010).

Several lines of evidence indicate a possible overlap between RNA-silencing pathways and signal transduction pathways governed by SA. Among them, NtRdRP activity has been found to increase in tobacco plants following SA treatment (Xie et al., 2001). Orthologous genes of *NtRDR1* have been also characterized in other species, such as *Nicotiana glutinosa* (*NgRDR1*), *Nicotiana benthamiana* (*NbRDR1m*), *Arabidopsis thaliana* (*AtRDR1*), *Medicago truncatula* (*MtRDR1*) and rice (*OsRDR1*), being all of them induced by both viral infection and SA treatments (Liu et al., 2009; Quilis et al., 2008; Yang et al., 2004; Yu et al., 2003). Besides, certain viral silencing suppressor proteins also suppress SA-mediated defence (Ji and Ding, 2001). Environmental conditions (e.g., temperature) influence the induction of SA-dependent defence responses and RNA silencing (Szittyta et al., 2003; Wang et al., 2009). Therefore, it should be considered that there are links between RNA silencing and SA-mediated defence, although the way these connections are established remains unclear (Carr et al., 2010).

Using different plant-pathogen systems we have investigated the involvement of salicylic acid and gentisic acid in the induction of resistance to RNA pathogens. Symptom development and pathogen spread was monitored, and the expression of different silencing-related genes was also analysed along the infections and treatments. Our results indicate that salicylic acid and gentisic acid might play a role in plant resistance against RNA pathogens.

2. Methods

2.1. Plant material and growth conditions

Seeds from tomato (*Solanum lycopersicum* cv. "Rutgers") were surface-sterilized with 50% (v/v) bleach before use. Plants were grown in 15-cm diameter pots containing a mixture of peat and vermiculite mixed 1:1 (one plant per pot), and were sub-irrigated with Hoagland solution. Plants were cultivated in a greenhouse at a temperature of 25/30 °C (day/night) with a relative humidity between 50 and 70% and a photoperiod of 16 h light/8 h darkness. Four-week-old tomato plants were used in all the experiments described in this article.

Gynura aurantiaca DC. plants were grown as previously described (Bellés et al., 1990) from rooted cuttings in a greenhouse at 30/24 °C (day/night), with a relative humidity between 50 and 70% and a photoperiod of 16 h light/8 h darkness.

2.2. Treatments with SA and GA

Tomato plant treatments were carried out by stem-feeding, according to the method described by Gu et al. (2000). For that purpose, four-week-old Rutgers tomato plants were excised with a scalpel just above the cotyledons, and the stems were immersed in 50 ml plastic tubes containing either buffer 50 mM sodium phosphate pH 7.4 (control plants), 1 mM SA in phosphate buffer or 2 mM GA, prepared in the same buffer. These concentrations were chosen according to our previous experience since GA conjugates to a much greater extent than SA after the corresponding treatments (Tárraga et al., 2010). Treatments were performed in a growth chamber at a constant temperature of 24 °C and a photoperiod of 16 h light (55–75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) and 8 h darkness. Both third and fourth leaves from the explants were harvested at the indicated times and immediately frozen in liquid nitrogen for RTqPCR analysis. For virus inoculation, explants were transferred to water 48 h after the corresponding treatment, and the third leaf was then inoculated with ToMV.

Treatments of *G. aurantiaca* plants were performed by spraying plants until run-off with 1 mM SA or 2 mM gentisic acid (sodium salt forms) supplemented with 0.05% Tween 20 (Sigma) as a wetting agent. Equivalent control plants were only sprayed with 0.05% Tween 20. Treatments were repeated three times a week during the entire experiment.

2.3. Pathogen inoculations

Infection of Rutgers tomato plants with the Murakishi PV-0143 strain of Tomato Mosaic Virus (obtained from Leibniz Institute DSMZ, Braunschweig, Germany) was performed with a viral extract obtained from leaves of ToMV-infected tomato plants that were homogenized in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 0.5% sodium bisulphite, 0.5% diethyldithiocarbamic acid (1 g leaf material in 20 mL buffer) as described (Bellés et al., 2006). Tomato explants were placed in 50-ml plastic tubes containing distilled water, and the third leaf (numbered from cotyledons to apex) was dusted with carborundum (particle size 0.037 mm). One millilitre of viral extract or buffer (mock-inoculated control) was applied to the

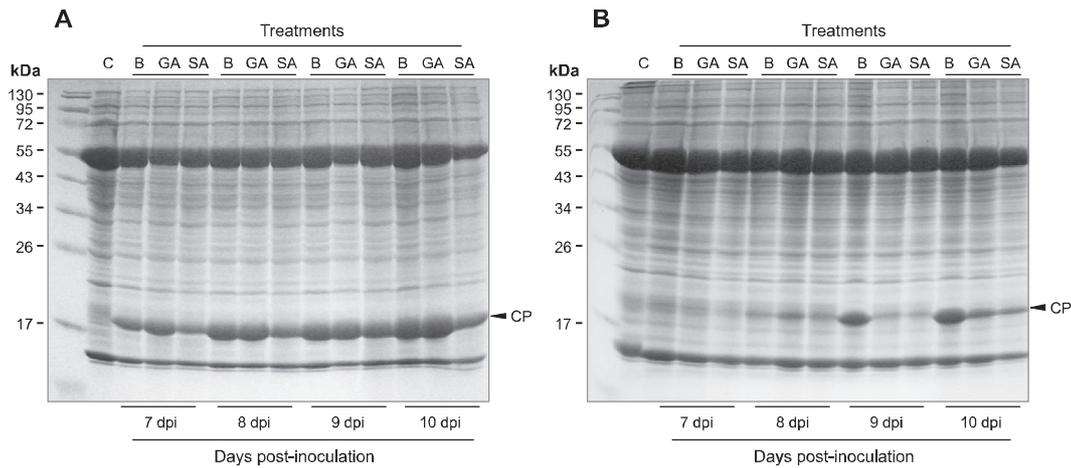


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of soluble proteins from Tomato Mosaic Virus (ToMV)-infected tomato leaves. Prior inoculation, plants were pre-treated either with buffer (B), gentisic acid (GA) or salicylic acid (SA), and leaf tissue samples were collected at the indicated days post-inoculation (dpi). Protein size markers (kDa) are indicated on the left. Arrow on the right indicates the ToMV coat protein (CP). A) Protein profile of infected (local) leaves. B) Protein profile of systemic (distal) leaves.

dusted leaf by gently rubbing the adaxial surface with a soft camel-hair brush. The third and fourth leaves (local and distal tissues, respectively) were harvested separately at the indicated times, and immediately frozen in liquid nitrogen.

Inoculation of tomato and *G. aurantiaca* plants with citrus exocortis viroid (CEVd) was performed following the protocol described by Bellés et al. (1990).

2.4. Protein extraction and electrophoretic analysis

Leaf tissue was harvested under liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Protein extracts of tomato leaves were performed by homogenization in extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM 2-mercaptoethanol), as described in Rodrigo et al. (1993). Proteins were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 as described by Conejero and Semancik (1977).

2.5. RNA extraction and treatment

Total RNA of tomato leaf tissue was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNA was further precipitated by adding one volume of LiCl 6 M, and then the

pellet was washed with LiCl 3 M and dissolved in RNase-free water. Finally, 2 units of TURBO DNase (Ambion) were added per μL RNA to remove contaminating genomic DNA.

2.6. Quantitative RT-PCR analysis

One μg total RNA was used to obtain the corresponding cDNA target sequences using an oligo (dT)₁₈ primer and the PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time, Takara) according to the manufacturer's protocol. PCR was carried out in the presence of the double-stranded DNA-specific dye Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Amplification was monitored in real time with the 7500 FAST Real-Time PCR System (Life Technologies). The PCR primers used for RT-PCRs are shown in Table S2.

2.7. Statistical analysis

The parameter used to perform the statistical analysis was the plant "Infectivity Index". It consists of the total number of days that each plant presents symptoms, thus providing a measure of the delay in the onset of symptoms. Data from a total of 122 plants corresponding to 3 independent experiments were used to perform

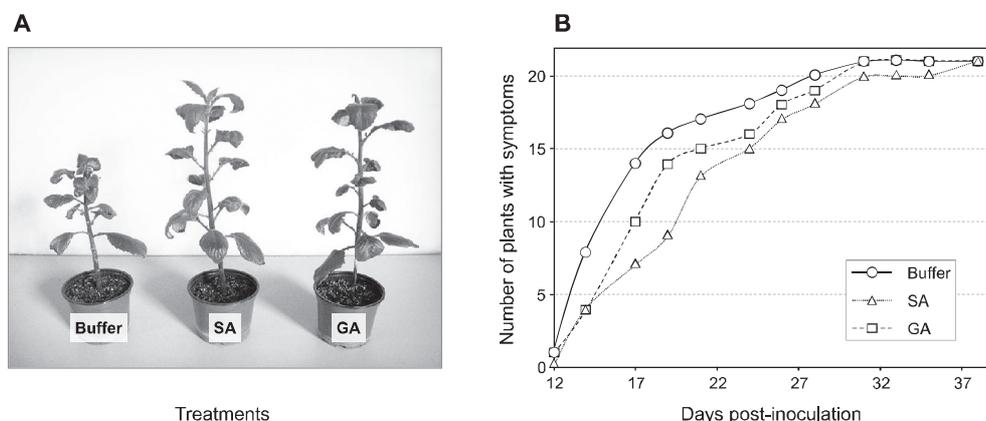


Fig. 2. Disease development in *Gynura aurantiaca* plants infected with CEVd. Plants were treated either with buffer, gentisic acid (GA) or salicylic acid (SA). A) Comparison of CEVd symptoms (stunting, leaf epinasty and rugosity) in *Gynura aurantiaca* plants treated with buffer, GA or SA. B) Evolution of the number of *Gynura aurantiaca* plants showing CEVd symptoms at the indicated days post-inoculation.

a Kruskal–Wallis test (non-parametric test equivalent to the one-way ANOVA).

For the qRT-PCR analysis shown in Figs. 3 and 4, a *t*-test analysis was performed. Comparisons between multiple groups (SA-treated, GA-treated and buffer-treated plants) in Fig. 5 were made by analysis of variance (ANOVA) for each time point. A *p* value <0.05 was considered significant.

The SPSS v.19 package (IBM) was used for all the statistical analysis.

3. Results

3.1. SA and GA treatments induce resistance to ToMV in tomato

The tomato–ToMV plant–pathogen interaction has been used to study the effect of SA and GA treatments on the plant resistance to RNA pathogens. Along the infection, the accumulation of SA and GA has been described to occur (Bellés et al., 1999). To study the effect of these compounds on resistance to the virus, tomato plants were cut and stem-fed either with SA, GA or buffer solutions for 48 h. Explants were then transferred to water and inoculated with ToMV as described in Methods. Samples of both the inoculated leaves (local tissues) and the immediately superior leaves (distal tissues) were taken at different time points. As a marker of the infection, we analyzed the accumulation of the ToMV coat protein by SDS-PAGE.

As Fig. 1A shows, all the inoculated (local) tissues accumulated viral coat protein at the studied times. However, plants treated with SA seemed to have slightly lower levels of viral protein when compared with GA-treated or control plants.

Regarding the distal samples (Fig. 1B), the coat protein appeared to be detectable upon eight days after inoculation. At 9 dpi, a systemic infection was clearly noticeable in the buffer-treated samples, whilst the plants treated with GA and SA presented significantly

lower levels of the viral protein, therefore indicating a systemic resistance of tomato plants to ToMV induced by GA and SA. Finally, a slight difference can be observed after 10 dpi between the GA-induced resistance and the resistance mediated by SA, the last one being the most effective.

These results indicate that SA or GA treatments induce systemic resistance to ToMV in tomato plants.

3.2. SA and GA treatments induce a delay in the appearance of CEVd symptoms in *G. aurantiaca*

It has been reported that *G. aurantiaca* plants infected with *Citrus exocortis viroid* (CEVd) accumulate GA and SA (Bellés et al., 2006). To study whether the SA- or GA-induced resistance also took place in this systemic RNA-based infection, *G. aurantiaca* plants were sprayed either with these compounds or buffer solutions, and then inoculated with CEVd. Treatments were repeated throughout the experiment, as described in Methods.

A follow-up of the onset of symptoms was carried out by observing the appearance of leaf epinasty and reduced growth during the development of the infection. As shown in Fig. 2, plants treated with GA or SA presented a delay in the onset of symptoms with respect to control plants treated with buffer. Similarly to what was found for the viral infection in tomato, the resistance induced by SA was more effective than that promoted by GA.

To check the statistical significance of the differences shown in Fig. 2, we used the “Infectivity Index” of the plant as a measure of the delay in the onset of symptoms. This parameter consists of the total number of days that each plant presents symptoms, in such a way that the smaller this number is, the higher the delay would be in the appearance of symptoms. Infectivity indexes from the plants corresponding to 3 independent experiments were used to perform a statistical analysis (see Methods). We observed statistically significant differences (*p*-value = 0.018) among the infectivity indexes

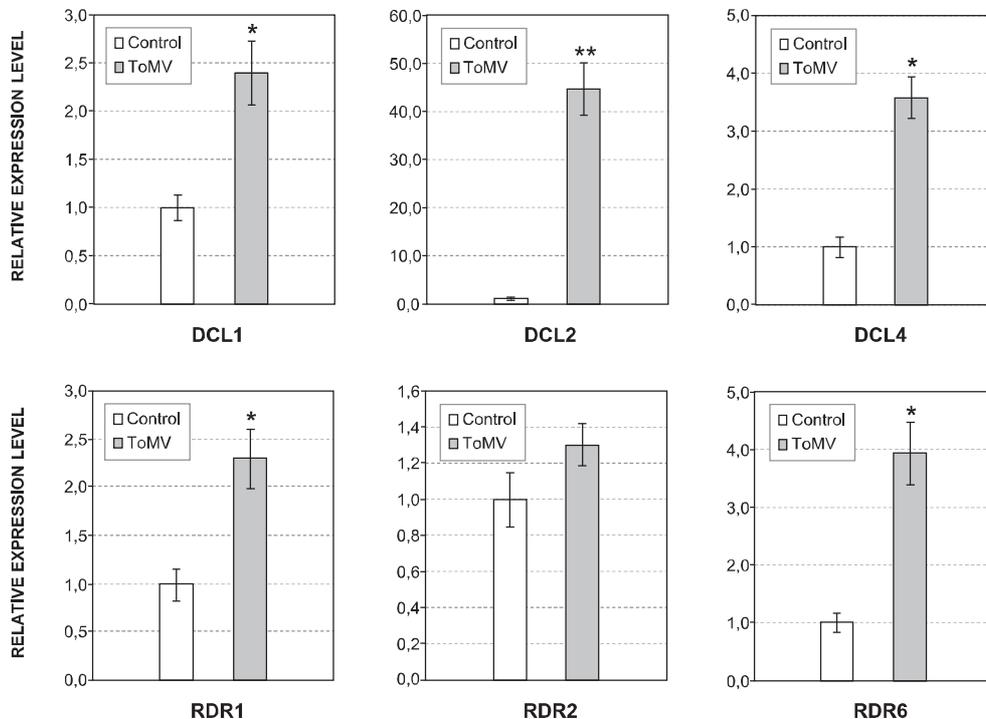


Fig. 3. Expression levels of tomato *DCL1*, *DCL2*, *DCL4*, *RDR1*, *RDR2* and *RDR6* genes in ToMV-infected tomato plants determined by real-time qRT-PCR analysis. Values were first normalized to the actin expression level and then made relative to the mRNA amount in the control, which refers to non-infected plants. Three biological repetitions were carried out. Expression levels are expressed as means \pm standard errors. A *t*-test analysis was performed. Asterisks (*) indicate statistical significance with *p* value < 0.05. Double asterisks (**) indicate statistical significance with *p* value < 0.01.

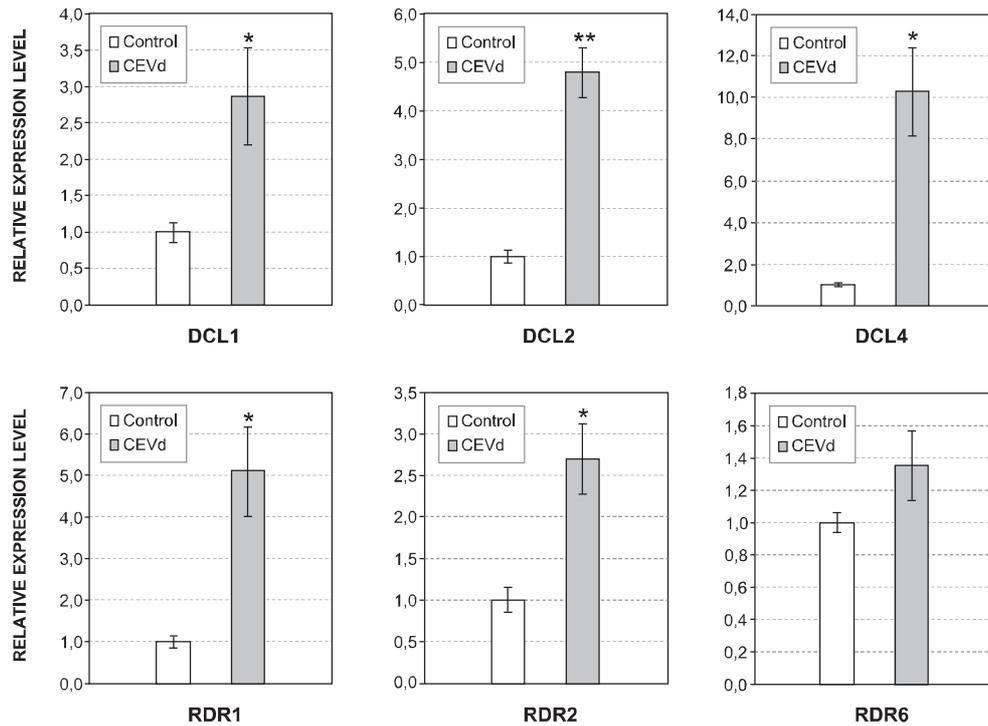


Fig. 4. Expression levels of tomato *DCL1*, *DCL2*, *DCL4*, *RDR1*, *RDR2* and *RDR6* genes in CEVd-infected tomato plants determined by real-time qRT-PCR analysis. Values were first normalized to the actin expression level and then made relative to the mRNA amount in the control, which refers to non-infected plants. Three biological repetitions were carried out. Expression levels are expressed as means \pm standard errors. A *t*-test analysis was performed. Asterisks (*) indicate statistical significance with *p* value < 0.05. Double asterisks (**) indicate statistical significance with *p* value < 0.01.

for Control, GA and SA treated plants (Supplementary Data Table S1A). Comparing the groups in pairs (Control-GA and Control-SA), the differences were statistically significant (*p*-value = 0.046 and *p*-value = 0.008, respectively), thus indicating that both treatments provoke a significant delay in the onset of symptoms with respect to the control plants treated with buffer. There was not significant difference between the infectivity index of the GA and SA treated plants (*p*-value = 0.403) plants (Supplementary Data Table S1B). Therefore, these results indicate that both SA and GA treatments induce resistance to CEVd in plants of *G. aurantiaca* in a similar way.

3.3. Tomato genes involved in gene silencing are induced by ToMV and CEVd

To study the molecular basis of the observed resistance to RNA pathogens, we considered to test the induction by SA or GA of gene silencing related genes, in tomato. So we decided to look for the tomato DCL, AGO and RDR genes and study their pattern of induction by virus and viroid infections. Based on the corresponding sequences of *A. thaliana* and using the Blast tool of Solgenomics database (<http://solgenomics.net/tools/bblast/index.pl>) we found the tomato orthologues of the *AtDCL1*, *AtDCL2*, *AtDCL4*, *AtRDR1*, *AtRDR2* and *AtRDR6* genes (Supplementary Data Table S2). To test the correct assignment of the tomato sequences with the RDRs and the DCLs described in *A. thaliana*, we performed a phylogenetic tree from sequence alignments for each group of genes (See Supplementary Data, Fig. S1). The different RDRs and DCLs proposed for tomato matched precisely to those described in Arabidopsis. Moreover, the tomato sequence orthologous to the Arabidopsis RDR1 turned out to be the so-called RdRp, described by Schiebel et al. (1998). All these data confirmed the alignment-based correspondences.

To verify the possible involvement of these candidate sequences in tomato RNA gene silencing, we tested their expression upon CEVd and ToMV infection. For virus infection, real-time-quantitative PCR was performed for tomato *RDR* and *DCL* sequences, using RNAs from ToMV-infected tomato plants taken 7 days after the inoculation, as well as their corresponding uninfected controls (see Methods). We observed a statistically significant induction of all the silencing-related genes as a consequence of the asymptomatic virus infection, with the exception of the RNA-dependent RNA polymerase *ToRDR2*, which displayed only a minor increase in its expression which resulted to be non-significant (Fig. 3). ToMV infection provoked the strongest induction on *ToDCL2*, reaching levels up to 40 times higher than those found in control plants.

To track the expression pattern of these genes for a RNA pathogen of a different nature, tomato seedlings were inoculated with citrus exocortis viroid (CEVd). A systemic infection was clearly established twenty days after the inoculation, whose symptoms consisted of leaf epinasty and reduced growth. At that stage, we carried out RT-qPCR analyses for the indicated silencing-related genes from CEVd-infected tomato plants and their corresponding controls. Fig. 4 shows that CEVd infection significantly induced all these genes, with the exception of the *ToRDR6* polymerase, whose expression was barely higher and statistically non-significant as compared to control plants. Unlike what happened in viral infection, the induction of *ToDCL4* appeared to be the most prominent in viroid-infected plants.

3.4. Tomato genes involved in gene silencing are induced by GA and SA treatments

In an attempt to explain the increased resistance to virus found in tomato plants treated with SA and GA, we considered to study

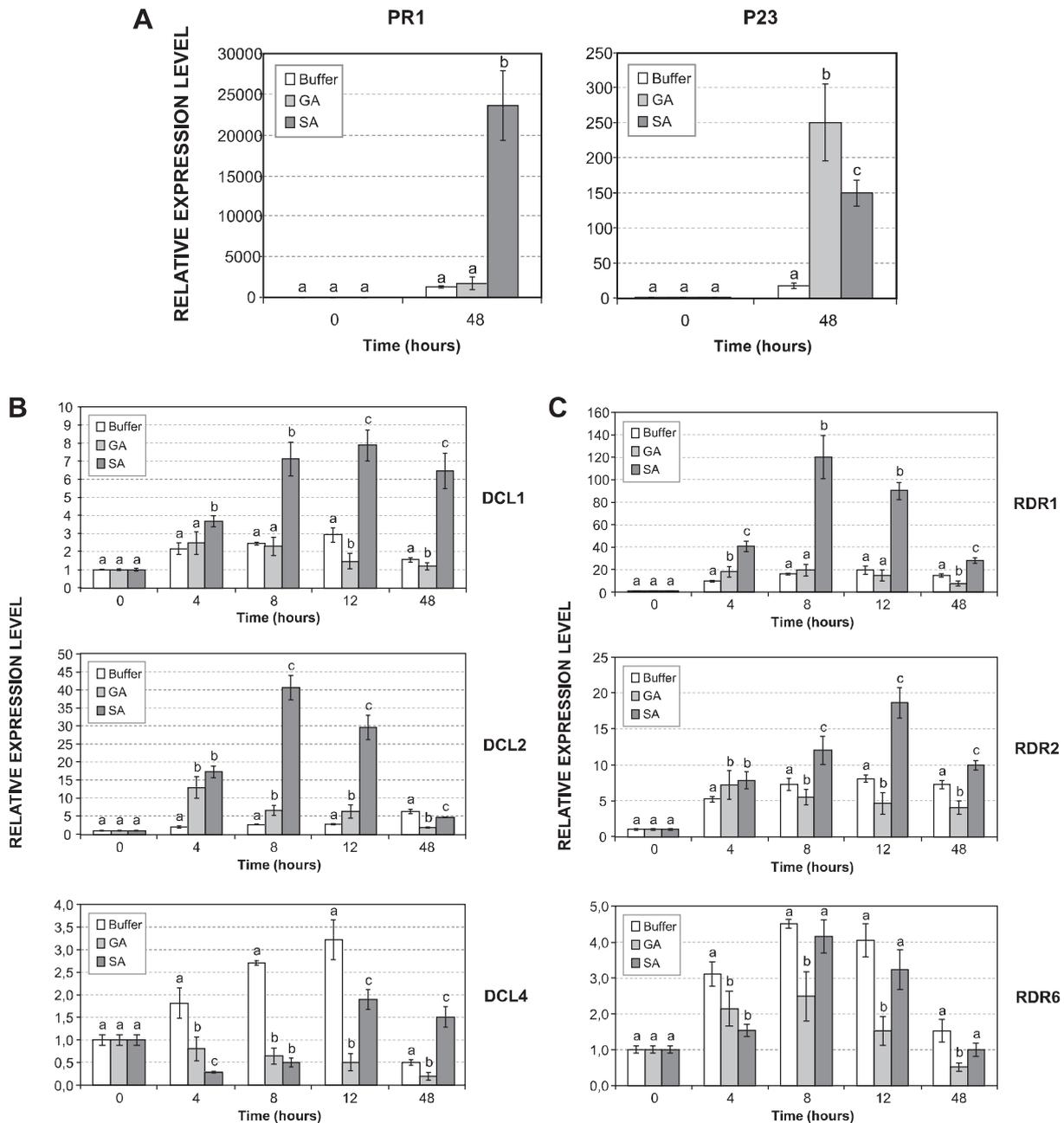


Fig. 5. Expression levels of silencing-related genes in tomato plants treated either with buffer, gentisic acid (GA) or salicylic acid (SA). The mRNA levels of the pathogenesis-related proteins PR1 and P23 (5A); *DCL1*, *DCL2* and *DCL4* (5B) and *RDR1*, *RDR2* and *RDR6* (5C) were determined by real-time qRT-PCR analysis. Values were first normalized to the actin expression level and then made relative to the mRNA amount in the control, which refers to non-infected plants. Three biological repetitions were carried out. Expression levels are expressed as means \pm standard errors. Comparisons between multiple groups (SA-, GA- and buffer-treated plants) were performed by analysis of variance (ANOVA) for each time point. The same letter indicates that there are no significant differences (p value < 0.05).

the effect of these signal molecules in the expression of tomato *DCLs* and *RDRs*. For that purpose, we performed the tomato stem feeding treatments, either with SA, GA or buffer, collecting tissue samples at different time points: 0, 4, 8, 12, 24 and 48 h of incubation. These samples were analyzed by RT-qPCR with specific primers of the tomato silencing related genes. We used the induction of tomato Pathogenesis-Related PR1 and P23 genes as positive control of the treatments with SA and GA, respectively (Fig. 5A) (Bellés et al., 1999).

As Fig. 5B shows, SA treatment significantly induced the expression of both *ToDCL1* and *ToDCL2* endonucleases, showing a

maximum at 12 h and 8 h, respectively. Treatment with GA treatment resulted in a statistically significant induction of *ToDCL2*, with a maximum at 4 h. Therefore, the induction of *ToDCL2* by GA seemed to be faster than the effect caused by SA, although less intense. A slight induction of the three tomato *DCLs* was observed in the buffer-treated plants, which might be due to the wound produced by the stem feeding treatment. On the other hand, a strong and significant repression of *ToDCL4* was detected upon treatments with SA or GA.

As far as the tomato *RDR* polymerases are concerned (Fig. 5C), *ToRDR1* and *ToRDR2* were found to be strongly induced by SA,

displaying a maximum at 8 and 12 h of treatment, respectively. Interestingly treatment with SA produced a 100-fold increase in the expression of *ToRDR1* (also known as RdRP). On the other hand, we could detect a significant induction of *ToRDR1* and *ToRDR2* by GA after 4 h of treatment. Similarly to what was observed for *ToDCL4*, no induction of *ToRDR6* was detected upon SA or GA treatments. Again, we observed a slight induction of the three RDRs in the control plants, which could be due to the wound caused by the treatment. Similarly to what was found for *ToDCL4*, a repression of *ToRDR6* was observed in the plants treated with SA or GA.

These results indicate that the observed GA or SA induced resistance could be related with the induction of the genes involved in the gene silencing response in tomato. The greater efficiency of the SA-induced resistance correlates with the stronger SA induction of the *DCLs* and *RDRs*, with respect to the effect produced by GA.

4. Discussion

An increased resistance to ToMV has been found in tomato plants treated with SA or GA. Besides, *G. aurantiaca* plants sprayed with SA or GA also present a delay in the onset of symptoms of CEVd infection. Both pathogens are RNA-based, and the accumulation of SA and GA has been described to occur in both plant-pathogen systemic interactions (Bellés et al., 1999).

It is well known that SA plays a very important role in plant defence signalling (Vlot et al., 2009). Moreover, a number of studies have demonstrated that exogenous treatments with SA induce resistance to different pathogens in different species (Edgar et al., 2006; Mandal et al., 2009; Meher et al., 2011; Saikia et al., 2003; Shang et al., 2011; Spletzer and Enyedi, 1999; Wang and Liu, 2012). Studies with different plant-pathogen systems establishing a compatible, non-necrotizing interaction, have reported a significant accumulation of gentisic acid (GA) in infected plants (Bellés et al., 1999, 2006; López-Gresa et al., 2010). Furthermore, exogenous applications of this compound induce defensive responses different than those mediated by salicylic acid (SA). Therefore, gentisic acid has emerged as a signalling molecule additional to salicylic acid in compatible infections (Bellés et al., 1999). In this paper, we have demonstrated that treatments with GA can also induce resistance to RNA pathogens, in a similar way as its metabolic precursor SA.

It is commonly admitted that the SA-induced resistance is due in part to the induction of PR proteins (Bowles, 1990; Hammerschmidt, 2009; Van Loon and Van Strien, 1999). Many PRs have antibacterial or antifungal activity (Van Loon and Van Strien, 1999), however none of the described PR proteins seems to have antiviral activity (Cutt et al., 1989; Linthorst et al., 1989). Related to this, it has been described that the induced tomato resistance to different RNA viruses caused by treatments with jasmonic acid and SA, seems not to be related with PR proteins (Shang et al., 2011). Therefore, it is of great interest to explore the molecular basis of the observed SA and GA induced plant resistance by considering the induction of genes not related with defence against herbivores, fungi or bacteria, but specifically targeted to pathogens based on RNA, such as viruses and viroids.

To this respect, RNA silencing is a powerful defence mechanism against RNA pathogens, with a great specificity and adaptability (Ding and Voinnet, 2007). Moreover, there are several lines of evidence indicating that there is some kind of cross-talk between defences mediated by SA and the RNA silencing in various species, such as tobacco, *A. thaliana* or *N. benthamiana* (Carr et al., 2010; Xie et al., 2001; Yang et al., 2004; Yu et al., 2003). Therefore we decided to study the involvement of SA and GA in the regulation of the silencing-related genes implicated in the observed resistance to RNA pathogens.

A search in the Sol Genomics Network database allowed us to obtain the tomato orthologous sequences of *AtDCL1*, *AtDCL2*, *AtDCL4*, *AtRDR1*, *AtRDR2* and *AtRDR6* which perfectly matched to the genes that have been very recently described (Bai et al., 2012). The expression of DCL endonucleases has been reported to be activated as a result of virus or viroid infections (Carr et al., 2010). On the other hand, the RDRs have also been implicated in viral and viroidal silencing. Therefore, we tested whether the expression of the tomato RDR and DCL genes that we found was altered as a result of a viral or viroidal infection.

In ToMV-infected tomato plants, we have observed an induction of all the analyzed genes with the exception of *ToRDR2*, being *ToDCL2* the most prominently induced gene.

In *A. thaliana*, genetic studies have revealed the hierarchical access of DCL4 and DCL2 to viral dsRNA. DCL4 is the primary sensor of viral dsRNAs and produces 21 nt vsRNAs, the most abundant size class in infected tissues. DCL2 acts as a DCL4 surrogate to generate 22 nt vsRNAs (Deleris et al., 2006; Llave, 2010). However, we have observed that *ToDCL2* is induced by ToMV in a greater extent than *ToDCL4*. In accordance to our results, a significant induction of the *DCL2* gene has been reported in tomato upon *Pepino mosaic virus* (PepMV) infection, being the induction of *DCL4* by PepMV much less pronounced (Hanssen et al., 2011). The authors claim that such an induction of *DCL2* could be indicative of the presence of a virus-encoded silencing suppressor that could be interfering with DCL4 activity. Finally, although DCL1 is a minor contributor to vsRNA formation in plants infected with RNA viruses (Llave, 2010), DCL1 is thought to excise hairpin-like structures from primary transcripts in dsDNA-Cauliflower mosaic virus-infected plants, thereby facilitating access by the other DCLs (Moissiard and Voinnet, 2006). In accordance to this, we have also observed a slight induction of DCL1 in tomato by ToMV.

On the other hand, numerous studies indicate that the RDRs are involved in antiviral silencing, since plants that present alterations in the activity of these proteins show an increased susceptibility to RNA and DNA viruses. Although they may act in a complementary and coordinated manner, it seems that the RDRs display specific sensitivities to different viruses (Llave, 2010). This could explain the fact that *ToRDR1* and tomato *ToRDR6* were induced by ToMV, while *ToRDR2* was not altered. The induction of *RDR1* by virus has been described in other plant-virus systems such as *A. thaliana* infected with the crucifer-infecting Tobacco Mosaic Virus (TMV-cg) (Yu et al., 2003). Similar results have been reported in tobacco plants infected either with Tobacco Mosaic Virus (TMV) (Xie et al., 2001), with Plum Pox Virus (Alamillo et al., 2006) or with Tomato Ring Spot Virus (Jovel et al., 2011). Accordingly, to what has been described in tomato plants infected with PepMV (Hanssen et al., 2011), we have observed a slight up-regulation of *ToRDR6* in tomato plants infected by ToMV.

Concerning the viroid infection, we have observed an induction of all the analyzed genes in tomato, with the exception of *ToRDR6*, being the induction of *ToDCL4* the most outstanding.

The endonuclease DCL1 has been implicated in the cleavage of RNA molecules derived from DNA viruses and also in the formation of microRNAs (Broderson and Voinnet, 2006). Since viroids are RNA molecules, the observed DCL1 induction could be related to the accumulation of microRNAs acting on plant mRNAs. Therefore, this induction is in accordance with the hypothesis, supported by many authors, that the viroid-activated silencing would be part of the viroid disease itself more than a plant defence mechanism (Gómez et al., 2008; Markarian et al., 2004; Martínez et al., 2010; Matousek et al., 2007; Navarro et al., 2012; Papaefthimiou et al., 2001; Wang et al., 2004). To our best knowledge, the induction patterns of DCL2 and DCL4 by viroid infection have not been studied so far, although their activities on viroid RNA particles are supposed to occur

since the accumulation of VdsRNAs have been described several times (Navarro et al., 2009).

The *ToRDR1* viroid induction has also been described in tomato plants infected by Potato Spindle Viroid (Schiebel et al., 1998). Although we have observed no induction *ToRDR6* by viroid, *RDR6* has been involved in the induction of viroid symptoms in plants of *N. benthamiana* infected with Hop Stunt Viroid (HSVd) (Gómez et al., 2008) or by the Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) (Di Serio et al., 2010). Finally, some authors have proposed that *RDR2*, which we have observed to be induced by CEVd in tomato, could be implicated in the recognition of (+) viroid RNAs (Navarro et al., 2009).

Our results on the induction pattern of the tomato orthologous silencing-related sequences upon viral and viroid infection confirmed the possible involvement of these genes in RNA silencing mechanisms. Consequently, we analyzed the transcriptional induction of the tomato silencing-related genes by SA and GA, in order to explain the previously observed induced resistance.

As mentioned above, there are different lines of evidence that correlate the SA-induced response and RNA silencing (Carr et al., 2010). Among these, it has been described that *RDR1* is induced as a consequence of SA treatments in different plant species (Liu et al., 2009; Quilis et al., 2008; Xie et al., 2001; Yang et al., 2004; Yu et al., 2003). Our results are added to those already described, since they indicate that *ToRDR1* is induced as a result of exogenous SA treatments in tomato. Similarly, *ToDCL1*, *ToDCL2* and *ToRDR2* are also induced by SA treatments, which further reinforce the relationship between SA-induced response and RNA silencing.

Exogenous GA treatments were also found to induce RNA silencing-related genes in tomato, such as *ToRDR1* and *DCL2*, although their effect appeared to be weaker. The involvement of gentisic acid in gene silencing could explain the increased gene expression and activity of *RDR1* in systemic infections caused by a compatible strain of TMV (Xie et al., 2001), although the accumulation of SA does not occur in these plants (Malamy et al., 1990).

In addition, our results seem to indicate that wounding could be activating some tomato DCLs and RDRs. Accordingly, evidences that correlate wound response and gene silencing have been reported. For instance, *RdR1* has been found to mediate the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature (Pandey and Baldwin, 2007), and *DCL2* and *DCL4* are proposed to participate in the anti-herbivore defences (Bozorov et al., 2012). On the other hand, we have observed a repression of *ToDCL4* and *ToRDR6* upon treatment with SA and GA, when compared with buffer-treated plants. This could be due to an antagonistic effect of the SA or GA treatments on the wounding response. The antagonism between SA and jasmonic acid, which is the signal molecule implicated in the wound response, has been well established in the literature (reviewed in Thaler et al., 2012; Derksen et al., 2013).

In summary, we have observed that both SA and GA treatments induce resistance to different RNA pathogens and activate RNA silencing-related genes in tomato. Treatments involving stronger induction of these genes correlated with the stronger resistance. Besides, we have found that shorter GA and SA treatments, which are insufficient to produce an effective accumulation of PR proteins (Matsuoka and Ohashi, 1986) produce a delay in virus accumulation (see Supplementary Figure S2). Therefore, our results suggest that the observed induced resistance could be due to the induction of RNA silencing mechanisms, thus reinforcing the connections between gene silencing and plant pathogen defence.

Contributions

The work presented here was carried out in collaboration between all authors. Purificación Lisón, Ismael Rodrigo, José María

Bellés and Vicente Conejero defined the research theme. Laura Campos, Pablo Granell, Susana Tárraga and Pilar López-Gresa designed methods and experiments, carried out the laboratory experiments, analyzed the data and interpreted the results. Purificación Lisón and Ismael Rodrigo wrote the paper. All authors have contributed to, seen and approved the manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to Cristina Torres and Asunción Sauri for technical support. This work was supported by Grant BFU2009-11958 from Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento, from Spanish Ministry of Science and Innovation, and Grants PAID-06-08-3295 and SP20120576 from Universitat Politècnica de València (UPV). Laura Campos was the recipient of a predoctoral fellowship ACIF/2010/231 from Generalitat Valenciana (Spain). M^a Pilar López Gresa held a postdoctoral fellowship JAE-Doc_08_00402 from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spain).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.016>.

References

- Alamillo, J.M., Saenz, P., García, J.A., 2006. Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J.* 48, 217–227.
- Baebler, S., Stare, K., Kovac, M., Blejec, A., Prezelj, N., Stare, T., Kogovsek, P., Pompe-Novak, M., Rosahl, S., Ravnikar, M., Gruden, K., 2011. Dynamics of responses in compatible potato - potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS One* 6 (12), e29009.
- Bai, M., Yang, G.-S., Chen, W.-T., Mao, Z.-C., Kang, H.-X., Chen, G.-H., Yang, Y.-H., Xie, B.-Y., 2012. Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analyses in response to viral infection and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum*. *Gene* 501, 52–62.
- Bellés, J.M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., Conejero, V., 1999. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 227–235.
- Bellés, J.M., Garro, R., Pallás, V., Fayos, J., Rodrigo, I., Conejero, V., 2006. Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* 223, 500–511.
- Bellés, J.M., Granell, A., Conejero, V., 1990. Impairment of viroid infection in gynura-aurantiaca plants by treatment with 2-chloroethylphosphonic acid (ethephon). *Can. J. Plant Pathol.* 12, 175–179.
- Bellés, J.M., López-Gresa, M.P., Fayos, J., Pallás, V., Rodrigo, I., Conejero, V., 2008. Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants. *Plant Sci.* 174, 524–533.
- Bowles, D.J., 1990. Defense-Related Proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 873–907.
- Bozorov, T.A., Pandey, S.P., Son Truong, D., Kim, S.-G., Heinrich, M., Gase, K., Baldwin, I.T., 2012. DICER-like proteins and their role in plant-herbivore interactions in *Nicotiana attenuata*. *J. Integr. Plant Biol.* 54, 189–206.
- Brodersen, P., Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22, 268–280.
- Carr, J.P., Lewsey, M.G., Palukaitis, P., 2010. Signaling in induced resistance. In: Loebenstein, G., Carr, J.P. (Eds.), *Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses*, pp. 57–121.
- Conejero, V., Semancik, J.S., 1977. Exocortis viroid - Alteration in proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology* 77, 221–232.
- Cutt, J.R., Harpster, M.H., Dixon, D.C., Carr, J.P., Dunsmuir, P., Klessig, D.F., 1989. Disease response to Tobacco Mosaic Virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1B gene. *Virology* 173, 89–97.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J., 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247–1250.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Derksen, H., Rampitsch, C., Daayf, F., 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.* 207, 79–87.

- Di Serio, F., Martínez de Alba, A.-E., Navarro, B., Gisel, A., Flores, R., 2010. RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J. Virol.* 84, 2477–2489.
- Ding, S.-W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413–426.
- Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843–847.
- Edgar, C.I., McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Maclean, D.C., Schenk, P.M., Kazan, K., 2006. Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Pathol.* 35, 581–591.
- Fayos, J., Bellés, J.M., López-Gresa, M.P., Primo, J., Conejero, V., 2006. Induction of gentisic acid 5-O-beta-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry* 67, 142–148.
- Flores, R., Hernandez, C., de Alba, A.E.M., Daros, J.A., Di Serio, F., 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 117–139.
- Gómez, G., Martínez, G., Pallás, V., 2008. Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity. *Plant Physiol.* 148, 414–423.
- Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., Martin, G.B., 2000. *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the *Pto* kinase. *Plant Cell.* 12, 771–785.
- Hammerschmidt, R., 2009. Systemic acquired resistance. In: Van Loon, L.C. (Ed.), *Plant Innate Immunity*, pp. 173–222.
- Hanssen, I.M., van Esse, H.P., Ballester, A.R., Hogewoning, S.W., Parra, N.O., Paelman, A., Lievens, B., Bovy, A.G., Thomma, B.P., 2011. Differential tomato transcriptomic responses induced by pepino mosaic virus isolates with differential aggressiveness. *Plant Physiol.* 156, 301–318.
- Ji, L.H., Ding, S.W., 2001. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 715–724.
- Jovel, J., Walker, M., Sanfacon, H., 2011. Salicylic acid-dependent restriction of tomato ringspot virus spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 706–718.
- Linthorst, H.J.M., Meuwissen, R.L.J., Kauffmann, S., Bol, J.F., 1989. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus-infection. *Plant Cell.* 1, 285–291.
- Lisón, P., Tárraga, S., Pilar, L.-G., Saurí, A., Torres, C., Campos, L., Bellés, J.M., Conejero, V., Rodrigo, I., 2013. A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *Proteomics* 13, 833–844.
- Liu, Y., Gao, Q., Wu, B., Ai, T., Guo, X., 2009. *NgRDR1*, an RNA-dependent RNA polymerase isolated from *Nicotiana glutinosa*, was involved in biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 359–368.
- López-Gresa, M.P., Maltese, F., Bellés, J.M., Conejero, V., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2010. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochem. Anal.* 21, 89–94.
- Llave, C., 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.* 15, 701–707.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I., 1990. Salicylic acid - a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral-infection. *Science* 250, 1002–1004.
- Mandal, S., Mallick, N., Mitra, A., 2009. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 642–649.
- Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W., Semancik, J.S., 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.* 149, 397–406.
- Martínez, G., Donaire, L., Llave, C., Pallás, V., Gómez, G., 2010. High-throughput sequencing of Hop stunt viroid-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Mol. Plant Pathol.* 11, 347–359.
- Matousek, J., Kozlova, P., Orctova, L., Schmitz, A., Pesina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G., Riesner, D., 2007. Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* 388, 1–13.
- Matsuoka, M., Ohashi, Y., 1986. Induction of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 80, 505–510.
- Meher, H.C., Gajbhiye, V.T., Ghanendra, S., 2011. Salicylic acid-induced glutathione status in tomato crop and resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *J. Xenobiotics* 1, e5, 22–28.
- Moissiard, G., Voinnet, O., 2006. RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19593–19598.
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.-E., Delgado, S., Flores, R., Di Serio, F., 2012. Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94, 1474–1480.
- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Di Serio, F., Burgyan, J., 2009. Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *Plos One* 4 (11), e7686.
- Pandey, S.P., Baldwin, I.T., 2007. RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *Plant J.* 50, 40–53.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., Tabler, M., 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29, 2395–2400.
- Quilis, J., Penas, G., Messegue, J., Brugidou, C., San Segundo, B., 2008. The *Arabidopsis* AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1215–1231.
- Rodrigo, I., Vera, P., Tornero, P., Hernandez Yago, J., Conejero, V., 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related Protein-P23. Characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol.* 102, 939–945.
- Saikia, R., Singh, T., Kumar, R., Srivastava, J., Srivastava, A.K., Singh, K., Arora, D.K., 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiol. Res.* 158, 203–213.
- Sano, T., Barba, M., Li, S.-F., Hadidi, A., 2010. Viroids and RNA silencing: mechanism, role in viroid pathogenicity and development of viroid-resistant plants. *GM Crops* 1, 80–86.
- Schiebel, W., Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H.L., Wassenegger, M., 1998. Isolation of an RNA-Directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell.* 10, 2087–2101.
- Shang, J., Xi, D.-H., Xu, F., Wang, S.-D., Cao, S., Xu, M.-Y., Zhao, P.-P., Wang, J.-H., Jia, S.-D., Zhang, Z.W., Yuan, S., Lin, H.H., 2011. A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta* 233, 299–308.
- Spletzer, M.E., Enyedi, A.J., 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* 89, 722–727.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z., Burgyan, J., 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* 22, 633–640.
- Tárraga, S., Lisón, P., López-Gresa, M.P., Torres, C., Rodrigo, I., Bellés, J.M., Conejero, V., 2010. Molecular cloning and characterization of a novel tomato xylosyltransferase specific for gentisic acid. *J. Exp. Bot.* 61, 4325–4338.
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K., 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17, 260–270.
- van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Van Loon, L.C., Van Strien, E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85–97.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., Klessig, D.F., 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206.
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., Lyon, G., 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* 95, 1368–1373.
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezain, A., Dennis, E.S., Waterhouse, P.M., 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3275–3280.
- Wang, Y., Bao, Z., Zhu, Y., Hua, J., 2009. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 498–506.
- Wang, Y., Liu, J.-H., 2012. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *J. Plant Physiol.* 169, 1143–1149.
- Xie, Z.X., Fan, B.F., Chen, C.H., Chen, Z.X., 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6516–6521.
- Yang, S.J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.H., Nelson, R.S., 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6297–6302.
- Yu, D.Q., Fan, B.F., MacFarlane, S.A., Chen, Z.X., 2003. Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 206–216.
- Ziebell, H., Carr, J.P., 2010. Cross-Protection: a Century of mystery. In: Loebenstein, G., Carr, J.P. (Eds.), *Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses*, pp. 211–264.

Anexo II

Transgenic Tomato Plants Overexpressing Tyramine *N*-Hydroxycinnamoyltransferase Exhibit Elevated Hydroxycinnamic Acid Amide Levels and Enhanced Resistance to *Pseudomonas syringae*

Laura Campos, Purificación Lisón, María Pilar López-Gresa, Ismael Rodrigo, Laura Zacarés, Vicente Conejero, and José María Bellés

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universitat Politècnica de València (UPV)–Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), CPI - Edif. 8E, Ingeniero Fausto Elío S/N, 46022 Valencia, Spain

Submitted 8 April 2014. Accepted 2 July 2014.

Hydroxycinnamic acid amides (HCAA) are secondary metabolites involved in plant development and defense that have been widely reported throughout the plant kingdom. These phenolics show antioxidant, antiviral, antibacterial, and antifungal activities. Hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (THT) is the key enzyme in HCAA synthesis and is induced in response to pathogen infection, wounding, or elicitor treatments, preceding HCAA accumulation. We have engineered transgenic tomato plants overexpressing tomato *THT*. These plants displayed an enhanced *THT* gene expression in leaves as compared with wild type (WT) plants. Consequently, leaves of *THT*-overexpressing plants showed a higher constitutive accumulation of the amide coumaroyltyramine (CT). Similar results were found in flowers and fruits. Moreover, feruloyltyramine (FT) also accumulated in these tissues, being present at higher levels in transgenic plants. Accumulation of CT, FT and octopamine, and noradrenaline HCAA in response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* infection was higher in transgenic plants than in the WT plants. Transgenic plants showed an enhanced resistance to the bacterial infection. In addition, this HCAA accumulation was accompanied by an increase in salicylic acid levels and pathogenesis-related gene induction. Taken together, these results suggest that HCAA may play an important role in the defense of tomato plants against *P. syringae* infection.

Hydroxycinnamic acid amides (HCAA) are low molecular-weight phenolic compounds that have been found in a wide range of plant families (Martin-Tanguy et al. 1978). They are formed by the condensation of hydroxycinnamic acids, such as *p*-coumaric (4-hydroxycinnamic acid) and ferulic (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) acids, with different amines. Among these, polyamines such as putrescine and spermidine or the

β -phenylethylamine-alkaloids tyramine (2-[4-hydroxyphenyl]ethylamine) and octopamine (2-hydroxy-2-[4-hydroxyphenyl]ethylamine) have been shown to form part of HCAA (Facchini et al. 2002; Strack 1997). The presence of HCAA has been reported throughout the plant kingdom, usually as main phenolic constituents of flowers, seeds, and pollen grains (Bottcher et al. 2008; Handrick et al. 2010; Luo et al. 2009). These phenolic compounds, showing strong antioxidant and chemotherapeutic effects, are often considered as nutraceuticals (Kawashima et al. 1998; Nagatsu et al. 2000; Park and Schoene 2002; Roh et al. 2004; Zhang et al. 1997), and they represent an important class of bioactive compounds with antiviral, antibacterial, antifungal, and insecticidal activities (Grandmaison et al. 1993; Lee et al. 2004; Tebayashi et al. 2007).

HCAA play an important role in plant defense, and their synthesis is induced in response to various stresses, including pathogen infection, wounding, or elicitor treatments, in different plant tissues (Hahlbrock and Scheel 1989; Keller et al. 1996; Pearce et al. 1998; Schmidt et al. 1998; Newman et al. 2001). They have been particularly described in solanaceous plants (Clarke 1982; Keller et al. 1996; Negrel and Javelle 1997). In this respect, tomato plants challenged with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* have been reported to synthesize *p*-coumaroyloctopamine and *p*-coumaroylnoradrenaline in response to infection (von Roepenack-Lahaye et al. 2003).

Two major roles have been proposed for HCAA in plant defense. On the one hand, they can be incorporated into the plant cell wall in order to strengthen it against microbial degradation. Some studies have reported that HCAA of tyramine are synthesized in the cytosol and are transported into the cell wall through a peroxidase-mediated process in response to wounding or pathogen challenge (Clarke 1982; Negrel and Lherminier 1987; Hagel and Facchini 2005). The accumulation of HCAA together with other cell wall-bound phenolics creates a barrier against pathogens either by reducing the digestibility of the cell wall, by directly inhibiting the growth of fungal hyphae, or both (Grandmaison et al. 1993).

On the other hand, HCAA can act directly as antimicrobial agents. For instance, coumaroyltyramine (CT) and feruloyltyramine (FT), which accumulate in pepper plants infected with the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris*, display antibacterial activity in vitro (Newman et al. 2001). In addition, FT isolated from allium roots has been reported to present antifungal activity (Fattorusso et al. 1999). Moreover, it has

Current address for L. Zacarés: ITENE, Parque Tecnológico, C/ Albert Einstein, 1, 46980 Paterna, Valencia, Spain.

Corresponding author: M. P. López-Gresa; E-mail: mplopez@ceqa.upv.es; Telephone: +34 96 3877880; Fax: +34 96 3877859.

* The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that two supplementary tables and a supplementary figure are published online.

been found that inoculation of tomato cv. Rutgers with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* led to the accumulation of CT and FT as well as dopamine HCAA (coumaroyldopamine and feruloyldopamine) upon bacterial infection. Interestingly, the HCAA of dopamine showed a notable bactericidal action. This HCAA accumulation was accompanied by a rapid and sharp induction of salicylic acid (SA) (Zacarés et al. 2007). This compound has been described as an important intermediary signal in the activation of certain plant defense responses to biotic and abiotic stress agents (Delaney et al. 1994). The accumulation of SA in the plant induces the synthesis of pathogenesis-related (PR) proteins, such as PR-1 (Tornero et al. 1997; van Loon et al. 2006).

Hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (THT; EC 2.3.1.110) is the key regulatory enzyme responsible for the synthesis of HCAA (Facchini et al. 2002; Negrel and Javelle 1997; Negrel and Martin 1984; Schmidt et al. 1999) and is induced in response to elicitor treatment, wounding, and pathogens (Negrel et al. 1993; Schmidt et al. 1998; Villegas and Brodelius 1990). This suggests a general role for THT in plant defense responses. The enzyme was first isolated from tobacco (Negrel and Martin 1984) and has been purified from other species, such as potato, tobacco, and opium poppy. In order to establish the specificity for different acceptors, purified enzymes have been characterized and wide substrate specificity has been reported for all of them (Hohlfeld et al. 1996; Negrel and Javelle 1997; Yu and Facchini 1999). It is generally assumed that THT displays the highest affinity to tyramine, followed by octopamine and dopamine. In tomato, THT is encoded by a multigene family. Four different tomato *THT* homologs have been identified, one being *tomTHT1-3*, which is highly expressed upon *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* infection (von Roepenack-Lahaye et al. 2003).

In order to study the role of THT in HCAA biosynthesis, transgenic plants overexpressing the *THT* gene had been engineered previously. Transgenic tobacco lines with an increase in THT activity showed high levels of CT and FT in leaves in response to wounding (Hagel and Facchini 2005). Also, overexpression of the pepper *THT* gene in rice increased HCAA content upon exogenous tyramine application (Lee et al. 2007). These authors proposed that the absence of HCAA accumula-

tion in healthy or untreated transgenic plants may be due to possible amine substrate limitation. Therefore, it could be interesting to transform species presenting higher basal levels of amines. That is the case in tomato, which contains constitutively elevated levels of tyramine and serotonin (Feldman and Lee 1985; Kang et al. 2009).

Thus, in the present study, we have generated transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum*) overexpressing the tomato *THT1-3* gene. We have extensively characterized these plants by analyzing the accumulation of HCAA in the different tissues and studying their response to infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

RESULTS

Generation and selection of transgenic tomato plants overexpressing *THT*.

To study the biological function of the HCAA accumulation, transgenic tomato plants expressing the *tomTHT1-3* gene under the control of the constitutive double *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter were generated. To this purpose, wild-type (WT) tomato (*S. lycopersicum* cv. MoneyMaker) plants were transformed with the binary vector pBI-THT via *Agrobacterium tumefaciens* (discussed below). Different independent transgenic lines were regenerated in vitro in the presence of kanamycin. Plants from all these lines were first assayed for β -glucuronidase (GUS) activity and were then tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for neomycin phosphotransferase II (*Npt II*) and *THT* gene expression. Lines 3, 4, and 7 displayed the highest levels of *THT* mRNA, presented positive GUS activity, and all of them accumulated *Npt II* mRNA. These lines were selected for further studies.

THT gene expression and HCAA accumulation in transgenic tomato leaves.

Transgenic lines 3, 4, and 7 were analyzed to accurately obtain the level of *THT* mRNA accumulation. For this purpose, tomato leaves from both *THT* transgenic lines and WT plants were used to perform quantitative RT-PCR, using specific primers for the tomato *THT* gene. All the transgenic lines ana-

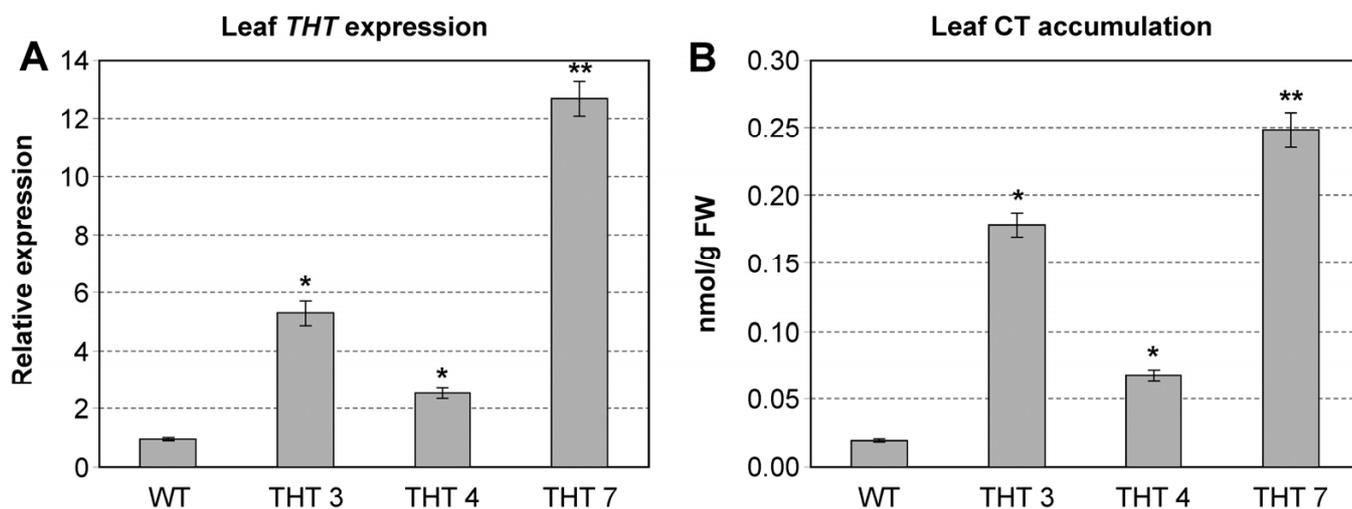


Fig. 1. Tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (*THT*) gene expression and hydroxycinnamic acid amides content in leaves of *THT* transgenic tomato plants. **A**, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of *THT* mRNA accumulation in leaves from different transgenic tomato lines (3, 4, and 7), and wild-type (WT) plants. The *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*) gene was used as endogenous reference. **B**, Accumulation of coumaroyl-tyramine (CT) in leaves from the plants shown in A, analyzed by ultra-performance liquid chromatographic-photodiode array-Micromass quadrupole-time-of-flight. Results correspond to means \pm standard error of three independent plants from a representative experiment. A *t*-test analysis was performed with the data coming from three independent experiments. Asterisks (*) indicate statistical significance with *P* value <0.05 with respect to WT plants. Double asterisks (**) indicate statistical significance with *P* value <0.01 with respect to WT plants.

lyzed presented higher constitutive *THT* gene expression when compared with the parental plants (Fig. 1A). The *THT* gene-expression levels largely varied among the different transgenic lines, with line 4 showing the lowest levels of *THT* mRNA accumulation and line 7 the highest ones. In fact, *THT* gene expression in line 7 was approximately 12-fold higher than that observed in WT plants.

In order to study the correlation between *THT* gene expression and HCAA accumulation in the different lines, leaves from control and *THT*-transgenic tomato plants were subjected to ultra-performance liquid chromatographic-photodiode array (UPLC-PDA)-Micromass quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) analysis to measure the HCAA content (discussed below). Previous studies reported that HCAA of tyramine accumulated to high levels in tomato in response to various stresses, such as wounding or pathogen infection (Pearce et al. 1998; Zacarés et al. 2007). Among them, we have detected the constitutive accumulation of amides formed by tyramine with ferulic or coumaric acids in noninfected transgenic tomato plants. Although FT was barely detectable (data not shown), all the transgenic lines presented CT levels higher than those found in WT plants (Fig. 1B). These CT accumulation levels correlated well with the observed *THT* mRNA levels (Fig. 1A). Line 7 presented the highest levels of CT accumulation, containing up to 10 times the content found in WT plants. Statistical analysis showed that the differences observed in the three lines with respect to WT plants were statistically significant, with lines 3 and 7 exhibiting the highest levels. Therefore, these two independent lines were selected for further assays.

***THT* gene expression and HCAA accumulation in flowers of transgenic tomato plants.**

To better characterize the overexpressing transgenic plants, we used quantitative RT-PCR to analyze the *THT* mRNA accumulation in flowers at the anthesis stage for transgenic tomato and WT plants. As shown in Figure 2A, both transgenic lines constitutively expressed elevated *THT* mRNA levels. In line 7, *THT* mRNA levels were around threefold higher than those observed in WT flowers. On the other hand, to determine whether the *THT* expression levels in flowers were correlated

with HCAA accumulation, flowers at the anthesis stage from WT and transgenic tomato plants were subjected to UPLC-PDA-Micromass Q-TOF analysis (discussed below). Unlike what was found in leaves, accumulation of both CT and FT was detected in tomato flowers. The level of CT was quite similar in transgenic and WT flowers, showing no statistical differences. However, the accumulation of FT was significantly higher in both transgenic lines as compared with WT plants. Line 7 presented FT levels up to fourfold higher than the levels detected in WT flowers.

***THT* gene expression and HCAA accumulation in fruits of transgenic tomato.**

In a manner similar to that previously described for leaves and flowers, we tested both constitutive *THT* gene expression and HCAA accumulation in WT and transgenic tomato fruits. First, mature (red) fruits from transgenic tomato lines and WT plants were analyzed by quantitative RT-PCR, using specific primers for tomato *THT* gene expression. As observed in leaves and flowers, the level of *THT* gene expression in transgenic fruits was higher (approximately sixfold in line 7) than that observed in the WT fruits (Fig. 3A).

HCAA levels were also examined in WT and transgenic tomato fruits. For this analysis, mature fruits from transgenic tomato and WT plants were collected and processed as described below. Samples were then subjected to UPLC-PDA-Micromass Q-TOF analysis to measure the content of HCAA. Similar to observations in flowers, levels of CT and FT were higher in transgenic plants than in the WT (Fig. 3B). While CT levels were significantly higher for both analyzed transgenic lines, differences in FT levels were only significant for line 7. In this line, both CT and FT levels were fourfold higher than those observed in the WT plants. The increase in HCAA content in fruits of *THT* transgenic tomato plants correlates with the high levels observed in flowers.

HCAA accumulation in *Pseudomonas syringae*-infected transgenic tomato plants.

Previous studies have reported the induction of *THT 1-3* in tomato plants upon *P. syringae* infection, thus indicating a pos-

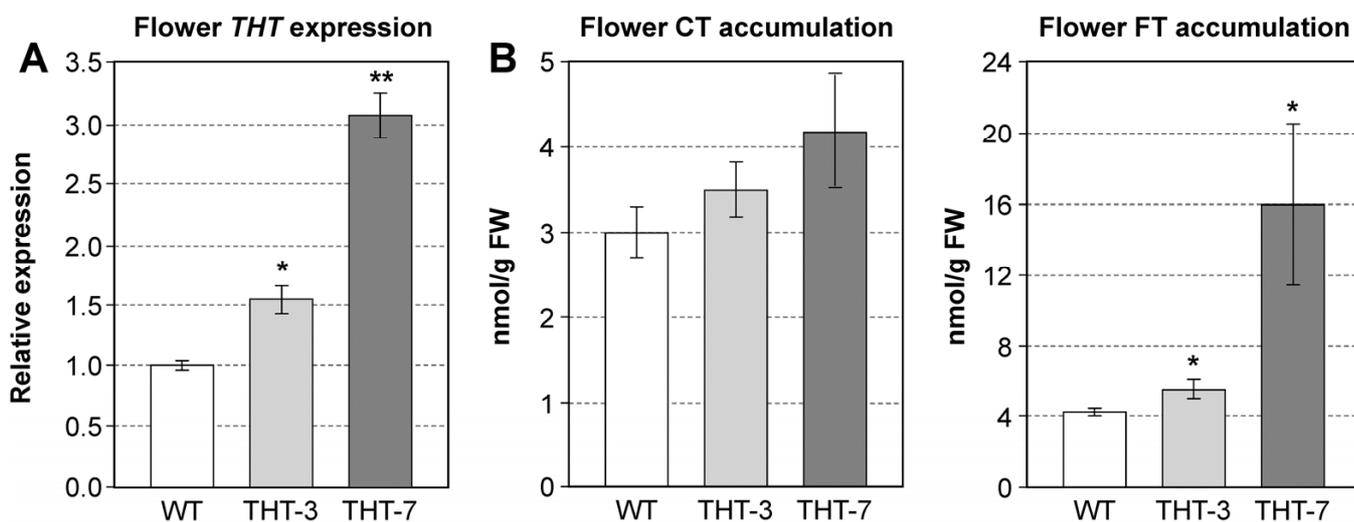


Fig. 2. Tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (*THT*) gene expression and hydroxycinnamic acid amides (HCAA) content in flowers of *THT* transgenic tomato plants. **A**, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of *THT* mRNA accumulation in flowers harvested from the flower stalk at the anthesis stage from wild-type (WT) plants and transgenic lines THT-3 and THT-7. The *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*) gene was used as endogenous reference. **B**, Accumulation of coumaroyltyramine (CT) and feruloyltyramine (FT) in flowers from the plants shown in A, analyzed by ultra-performance liquid chromatographic-photodiode array-Micromass quadrupole-time-of-flight. Results correspond to means \pm standard error of three independent plants from a representative experiment. A *t*-test analysis was performed with the data coming from three independent experiments. Asterisks (* or **) indicate statistical significance with *P* values <0.05 or <0.01 with respect to WT plants.

sible role for this gene in plant defense (von Roepenack-Lahaye et al. 2003). Moreover, it has been reported that 'Rutgers' tomato leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* showed a rapid *THT* activation, followed by HCAA accumulation (López-Gresa et al. 2011; Zacarés et al. 2007). In order to analyze the HCAA accumulation upon a virulent *P. syringae* infection, time-course studies were performed on WT and THT tomato plants. As described below, infected and mock-inoculated leaves from WT and THT tomato plants were harvested at 0, 24 and 48 h after *P. syringae* infiltration. Results of the time-course analysis for CT and FT accumulation in leaves from THT and WT tomato plants upon *P. syrin-*

gae challenge are presented in Figure 4. As a general overview, all plants displayed enhanced levels of CT and FT along the compatible infection, both amides increasing in a time-dependent manner. The absolute levels of these metabolites differed substantially depending on HCAA, the highest values corresponding to CT. Lines 3 and 7 displayed higher HCAA levels as compared with WT plants. Differences between line 3 and WT plants were statistically significant for CT levels at both 24 and 48 h postinoculation (hpi) and for FT levels at 48 hpi. Line 7 presented significantly higher values of both CT and FT at 24 and 48 h after the bacterial inoculation. In this line, the accumulation of tyramine HCAA

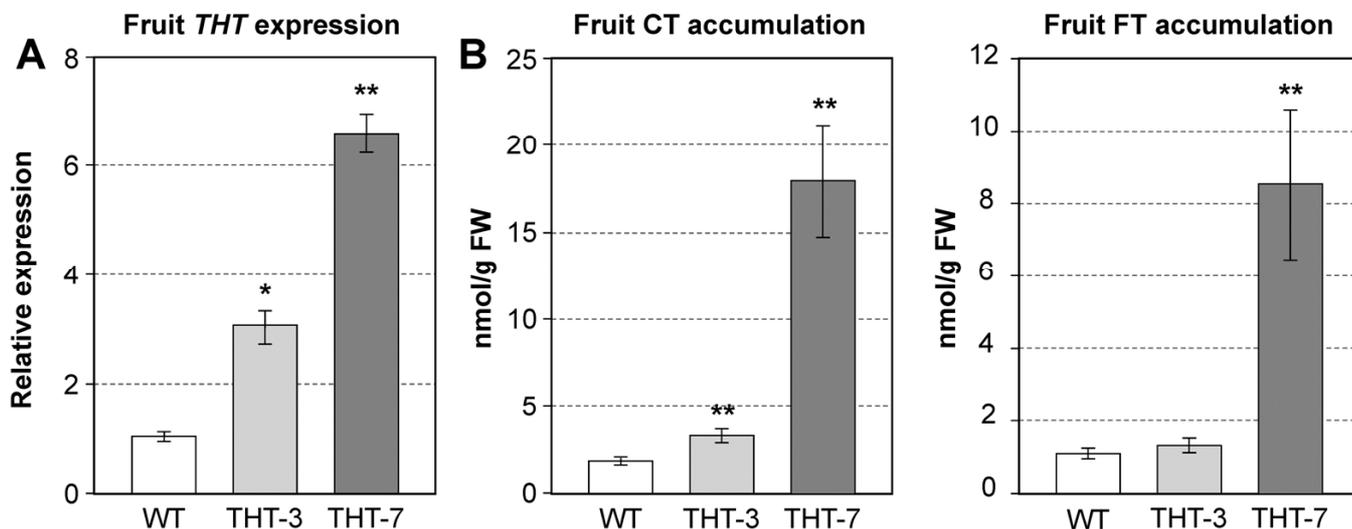


Fig. 3. Tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (*THT*) gene expression and hydroxycinnamic acid amides (HCAA) content in fruits of *THT* transgenic tomato plants. **A**, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of *THT* mRNA accumulation in mature fruits from wild-type (WT) plants and transgenic lines THT-3 and THT-7. The *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*) gene was used as endogenous reference. **B**, Accumulation of coumaroyltyramine (CT) and feruloyltyramine (FT) in mature fruits from the plants shown in **A**, analyzed by ultra-performance liquid chromatographic-photodiode array-Micromass quadrupole-time-of-flight. Results correspond to means \pm standard error of three independent plants from a representative experiment. A *t*-test analysis was performed with the data coming from three independent experiments. Asterisks (* or **) indicate statistical significance with *P* values <0.05 or <0.01 with respect to WT plants.

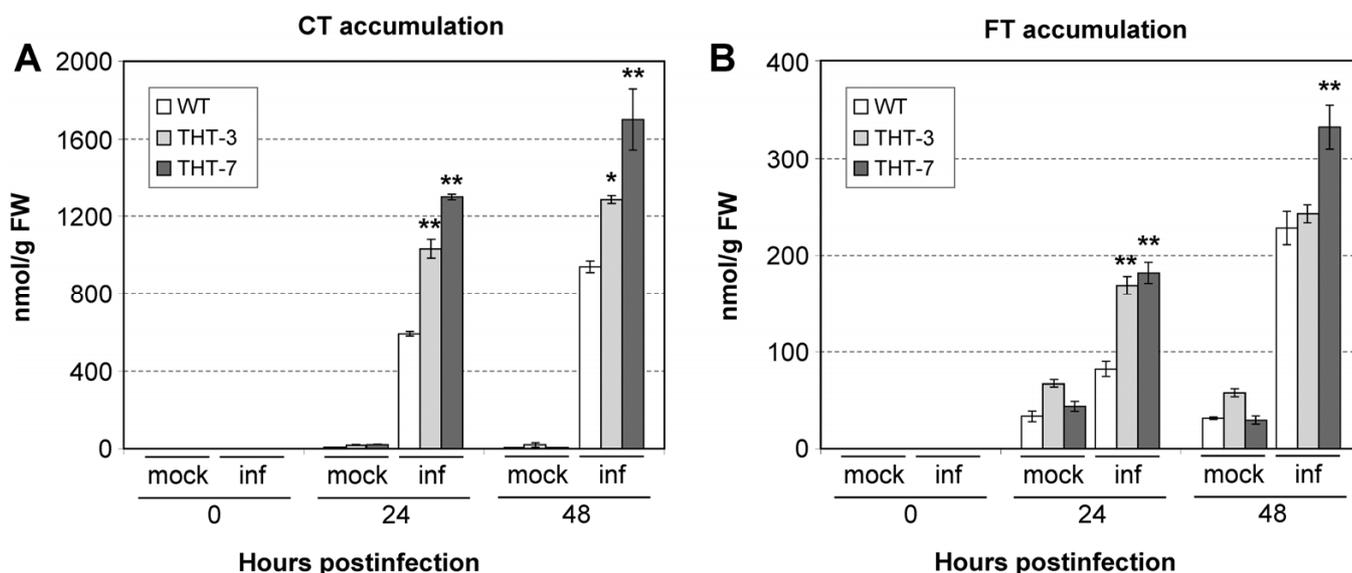


Fig. 4. Hydroxycinnamic acid amides (HCAA) accumulation in leaves from tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (*THT*) transgenic tomato plants upon infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **A**, Levels of coumaroyltyramine (CT) and **B**, feruloyltyramine (FT) in infected (inf) and mock-inoculated (mock) leaves from wild-type (WT) plants and transgenic lines THT-3 and THT-7 at 0, 24, and 48 h after *P. syringae* pv. *tomato* infiltration. Samples were analyzed by ultra-performance liquid chromatographic-photodiode array-Micromass quadrupole-time-of-flight. Results correspond to means \pm standard error of three independent plants from a representative experiment. A *t*-test analysis was performed with the data coming from three independent experiments. Statistical significance is shown for infected transgenic plants with respect to infected WT plants. Asterisks (* or **) indicate statistical significance with *P* values <0.05 or <0.01 with respect to WT plants.

upon bacterial infection was approximately twofold higher when compared with that observed in WT plants. CT and FT levels showed a slight increase in the mock-inoculated ones, probably as a consequence of the wounding produced by the inoculation method.

We have also detected the accumulation of HCAA of octopamine and noradrenaline in the transgenic tomato plants infected with *P. syringae*. This is in agreement with our previous results (López-Gresa et al. 2011), in which the same amides were found to accumulate in 'Rutgers' tomato leaves at 24 and 48 h after bacterial infiltration. Figure 5 shows our results of coumaroyloctopamine (CO), feruloyloctopamine (FO), coumaroylnoradrenaline (CNA), and feruloylnoradrenaline (FNA) accumulation in leaves from THT and WT tomato plants 48 h after *P. syringae* challenge. We observed that plants from line 3 exhibited statistical differences in the content of FO when

compared with WT plants. Differences were statistically significant for all the amides (CO, FO, CNA, and FNA) in line 7. In these plants, the accumulation of these HCAA was approximately threefold higher upon *Pseudomonas syringae* infection as compared with that observed in WT plants. In contrast with HCAA of tyramine, HCAA of octopamine and noradrenaline were not detected in mock-inoculated leaves during 48-h experiments.

Resistance in *P. syringae*-infected transgenic tomato plants.

To investigate the effect of *THT* overexpression and the consequent high accumulation of HCAA in plant defense, we studied the response of transgenic tomato plants to infection with the bacterial pathogen *P. syringae* pv. *tomato*. To test bacterial growth, WT and transgenic tomato plants were infiltrated with *P. syringae* and were harvested at 24 and 48 hpi (dis-

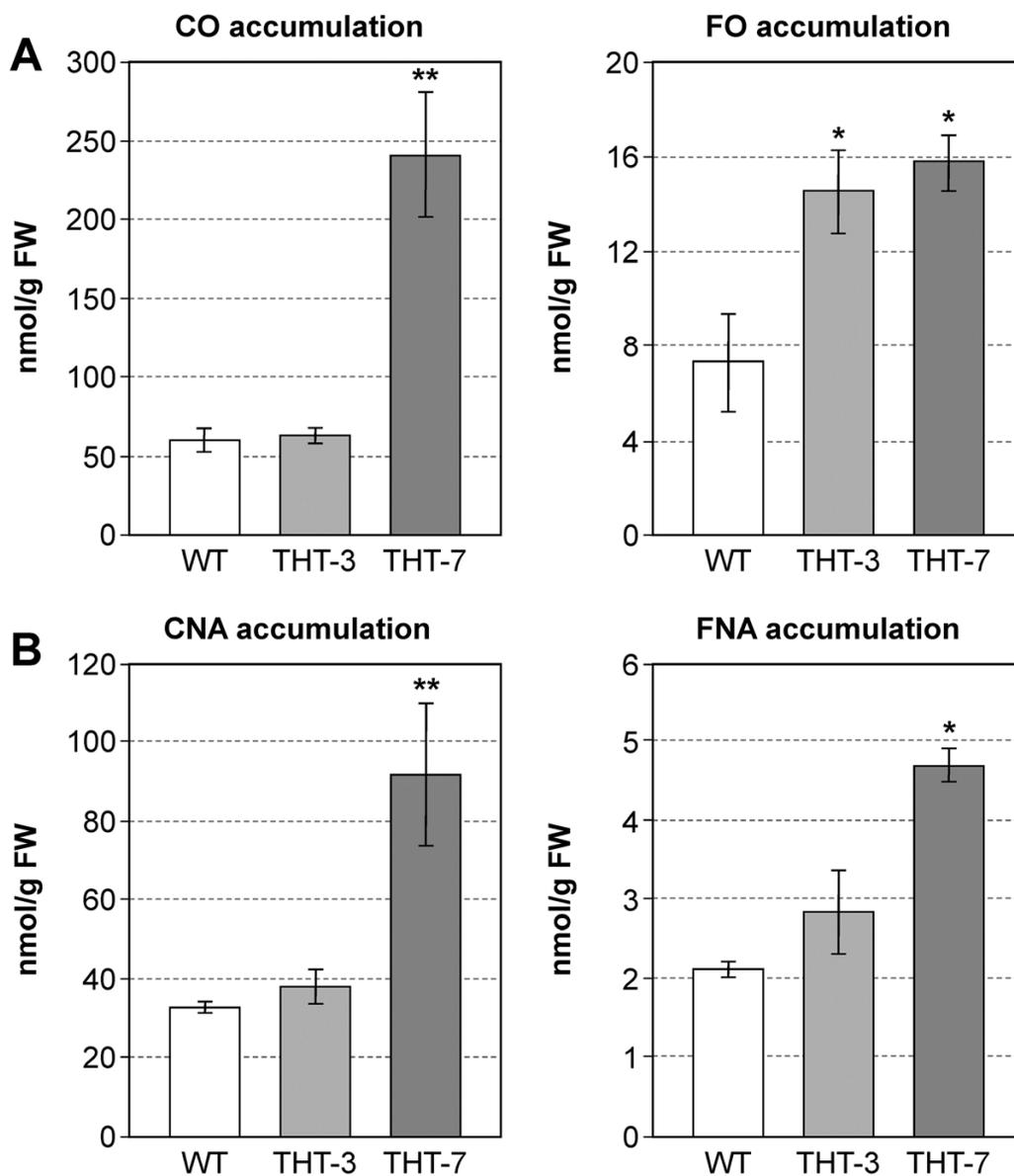


Fig. 5. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides (HCAA) of octopamine and noradrenaline in tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (*THT*) transgenic tomato plants upon infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **A**, Levels of coumaroyloctopamine (CO) and feruloyloctopamine (FO) in leaves from wild-type (WT) plants and transgenic lines THT-3 and THT-7 at 48 h after *P. syringae* pv. *tomato* infiltration. **B**, Levels of coumaroylnoradrenaline (CNA) and feruloylnoradrenaline (FNA) in leaves from WT plants and transgenic line THT-3 and THT-7 tomato plants at 48 h after *P. syringae* pv. *tomato* infiltration. Samples were analyzed by ultra-performance liquid chromatographic-photodiode array-Micromass quadrupole-time-of-flight. Results correspond to means \pm standard error of three independent plants from a representative experiment. A *t*-test analysis was performed with the data coming from three independent experiments. Asterisks (* or **) indicate statistical significance with *P* value <0.05 or <0.01 with respect to WT plants.

cussed below). Results of the time-course analysis corresponding to bacterial growth in leaves from transgenic (THT-3 and THT-7) and WT tomato plants upon *P. syringae* challenge are presented in Figure 6. Bacterial growth was significantly re-

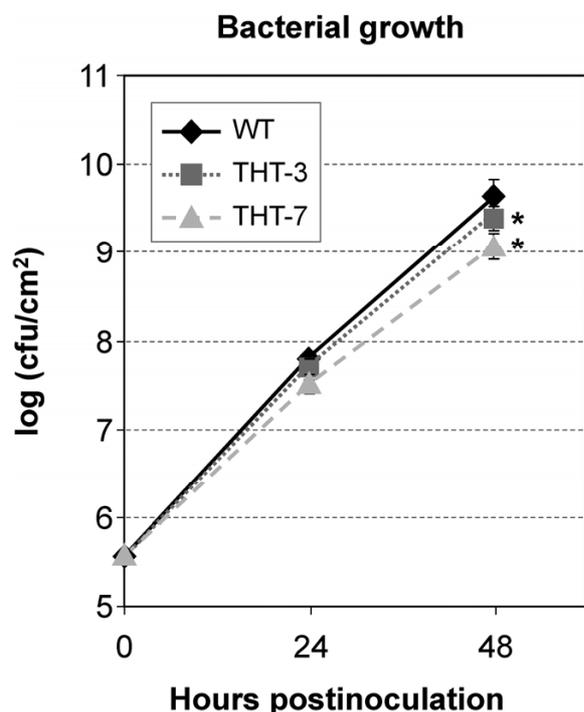


Fig. 6. Growth of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on leaves of tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (*THT*) transgenic tomato plants. Leaf colony-forming units (CFU) of bacteria were measured in wild-type (WT) plants and transgenic lines THT-3 and THT-7. Bacterial growth was measured 24 and 48 h after inoculation. Results correspond to means \pm standard error of five independent plants from a representative experiment. A *t*-test analysis was performed with the data coming from three independent experiments. Asterisks (*) indicate statistical significance with a *P* value <0.05 with respect to WT plants.

duced in both transgenic lines with respect to the control plants at 48 hpi. For line 7, a 32% decrease was observed in the number of colony-forming units (CFU) as compared with WT plants at 48 hpi. Comparison of bacterial growth between lines 3 and 7 reveals a dosage effect, thus correlating resistance with HCAA accumulation (Figs. 4 and 5). Concerning the symptoms, we observed the appearance of necrosis and chlorosis in the infected leaves, without clear macroscopic differences between WT and transgenic infected plants.

SA accumulation and *PR-1* gene induction in *P. syringae*-infected transgenic tomato plants.

It is generally admitted that SA plays a central role in plant defense (Dempsey et al. 1999; Métraux and Raskin 1993). Previous studies reported that 'Rutgers' tomato plants infected with *P. syringae* produced a rapid and sharp increase of SA after bacterial inoculation (Bellés et al. 1999). In order to test whether the resistance induced by *THT* overexpression might be related to signaling, we followed SA levels in transgenic and WT plants along the course of infection with *P. syringae* (Fig. 7A). We observed no significant differences in SA levels between WT and transgenic lines at 24 hpi. Nevertheless, at 48 hpi, both transgenic lines presented significantly higher levels of SA when compared with the levels detected in the WT plants. This is in accordance with the results shown here, in which significant differences in bacterial growth occurred at 48 hpi between transgenic lines and WT. Among them, SA levels in line 7 were threefold higher in *P. syringae*-inoculated plants as compared with the corresponding WT plants.

Since SA is a major regulator of PR protein gene induction, total RNA was isolated at different timepoints after the onset of bacterial infiltration and was subjected to quantitative RT-PCR analysis in order to determine the expression levels of *PR-1* mRNA (Fig. 7B). Correlating with the observed SA accumulation, the expression of *PR-1* increased as a consequence of the infection, being higher in both THT lines. Expression of the *PR-1* gene was approximately 1.5-fold higher in line 7 when compared with that observed in WT plants at 48 hpi, a statistically significant difference.

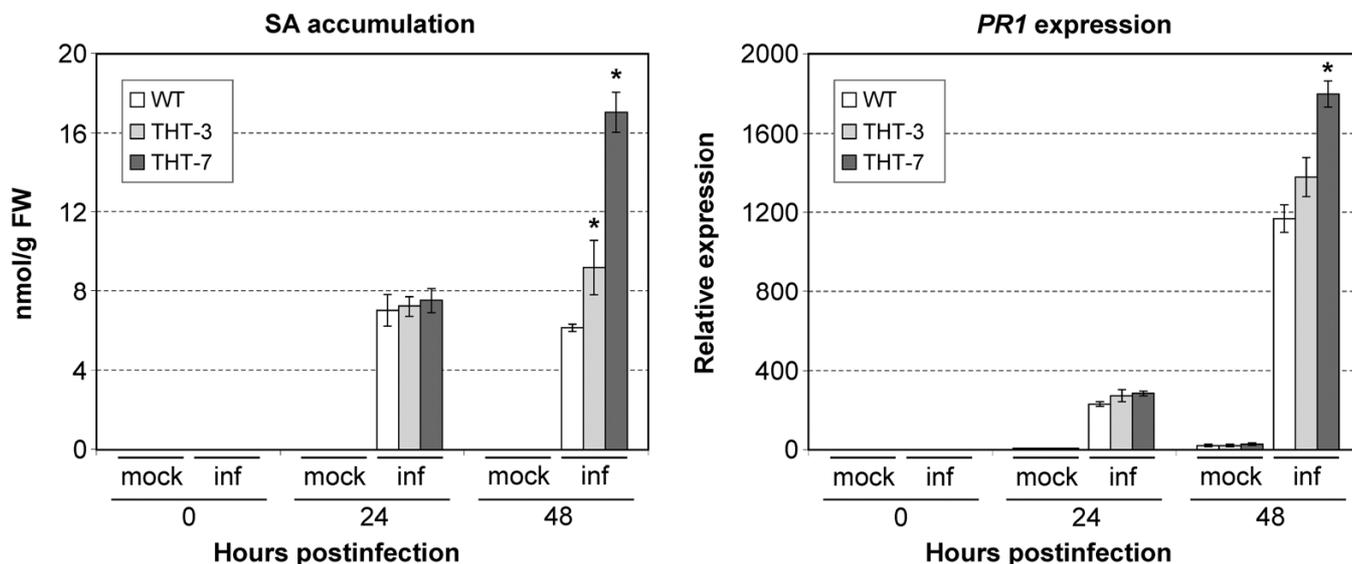


Fig. 7. Accumulation of salicylic acid and expression of *PR-1* gene in tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (*THT*) transgenic tomato plants upon infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **A**, Levels of salicylic acid (SA) in infected (inf) and mock-inoculated (mock) third and fourth leaves from wild-type (WT) plants and transgenic lines THT-3 and THT-7 harvested at 0, 24, and 48 h after *P. syringae* pv. *tomato* infiltration. **B**, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of *PR-1* gene in infected and mock inoculated leaves from the plants shown in A. Results correspond to means \pm standard error of three independent plants from a representative experiment. A *t*-test analysis was performed with the data coming from three independent experiments. Statistical significance is shown for infected transgenic plants with respect to infected WT plants. Asterisks (*) indicate statistical significance with a *P* value <0.05 with respect to WT plants.

DISCUSSION

THT is the key enzyme in HCAA synthesis, catalyzing the condensation of hydroxycinnamic acids with different amines. The resulting amides have been described as an important class of bioactive compounds with antiviral, antibacterial, antifungal, and insecticidal activities (Grandmaison et al. 1993; Lee et al. 2004; Tebayashi et al. 2007). In addition, *THT* induction and the consequent HCAA accumulation occurs upon pathogen infection or wounding, all pointing to their role in plant defense (Grandmaison et al. 1993; Hahlbrock and Scheel 1989; Keller et al. 1996; Lee et al. 2004; Newman et al. 2001; Pearce et al. 1998; Schmidt et al. 1998; Tebayashi et al. 2007). In this study, to better understand the biological function of this accumulation, we generated and characterized transgenic tomato plants overexpressing *THT*. In addition, we studied their response to the bacterial pathogen *P. syringae* pv. *tomato* as compared with the response displayed by the WT plants.

Several overexpressing *THT* transgenic tomato lines have been generated, showing abundant *THT* gene expression levels in the leaves. Specifically, the best line presented a *THT* mRNA accumulation approximately 12-fold higher than the WT levels. This overexpression was directly coupled with a high HCAA accumulation. This line showed the highest CT accumulation as well, reaching levels 10-fold higher than that observed in the WT plants.

The accumulation of tyramine derivatives, such as CT and FT, has been previously reported in transgenic *THT*-overexpressing plants obtained in different species. For instance, transgenic tobacco plants overexpressing *THT* have been reported to rapidly accumulate FT and CT in response to wounding (Hagel and Facchini 2005). In these plants, HCAA levels were higher in *THT* wounded leaves when compared with those observed in the WT plants. Unlike our results in tomato, no constitutive HCAA accumulation was detected in transgenic *THT* tobacco leaves. Related to this, transgenic rice lines overexpressing a *THT* gene from pepper have been obtained (Lee et al. 2007). Similarly to what was observed in tobacco, CT and FT contents were barely detectable when analyzing transgenic 10-day-old rice shoots. However, leaves of these seedlings supplemented with tyramine produced five times more CT and FT relative to those grown in its absence, showing transgenic leaves with the highest CT and FT contents. The correlation between CT and FT levels and the presence of tyramine also indicate a limited tyramine pool in rice plants.

Interestingly, we have observed that CT constitutively accumulated in leaves of transgenic tomato plants overexpressing *THT*, indicating that tyramine content is high enough in this species, as described by Ly and associates (2008), and does not play a substrate rate-limiting role in HCAA synthesis. Basal levels of tyramine of WT and *THT* transgenic tomato plants were measured and no clear differences were observed (data not shown). Constitutive HCAA accumulation was also described in transgenic tomato plants overexpressing *SHT*, an enzyme implicated in HCAA synthesis that accepts serotonin with the highest substrate affinity (Kang et al. 2009). These authors have described HCAA accumulation in transgenic *SHT* tomato plants upon wounding. We have also observed a significantly enhanced accumulation of CT in wounded *THT* transgenic tomato leaves when compared with the WT, while FT levels remained practically unchanged (Supplementary Fig. S1).

We further characterized the transgenic tomato plants by studying *THT* gene expression in flowers. Similar to what was observed in the leaves, flowers showed an increase in *THT* mRNA accumulation as compared with the WT plants. In contrast to what was observed in leaves, both amides CT and FT were detected in flowers. The level of CT was quite similar,

whereas the accumulation of FT was fourfold higher in flowers from transgenic line 7 compared with WT. In accordance with the results observed in leaves, the presence of high levels of tyramine HCAA in flowers was coupled with enhanced levels of *THT* expression. Interestingly, the levels of HCAA of tyramine (CT and FT) in flowers of this line were approximately 12-fold higher than the levels detected in the leaves.

Similar to our observations, pepper flowers have been reported to accumulate high levels of HCAA. In addition, flowers proved to be the organs with the highest levels of tyramine in pepper, thus indicating that HCAA levels correlated with those of the amine substrates (Kang and Back 2006). In accordance with this, the higher levels of HCAA that we observed in transgenic tomato flowers may be due to the basal content of tyramine present in these organs. This HCAA accumulation suggests an important function for these compounds, acting as antimicrobial defense against pathogens, reinforcing the cell wall during anthesis, or controlling sexual organogenesis (Hahlbrock and Scheel 1989; Martin-Tanguy et al. 1987; Negrel and Lherminier 1987; Liyama et al. 1994).

THT gene expression was also tested in mature (red) tomato fruits from transgenic plants, showing approximately sixfold higher levels in transgenic fruits in line 7 compared with WT. This elevated *THT* expression was accompanied by a higher FT and CT content. A high HCAA accumulation in fruits has been proposed to contribute to the defense response. In this respect, Kang and associates (2010) have recently reported the accumulation of the HCAA caffeoylserotonin (CaS) in pepper fruits challenged with the anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporoides*. These authors suggested that CaS, which is induced by pathogen infection and exhibits antifungal activity, plays a key role in pepper plant defense. In agreement with these results, the overaccumulation of CT and FT found in *THT* tomato fruits may act as a constitutive defense against possible infections. In fact, CT and FT have been long implicated in plant defense against pathogen attack, and several studies showed that their synthesis in plants is activated in response to infection by fungi, viruses, or bacteria. For instance, potato plants infected with *Phytophthora infestans* have been reported to increase the synthesis of CT and FT (Keller et al. 1996) and FT biosynthesis was induced in tobacco upon *Tobacco mosaic virus* infection (Negrel and Jeandet 1987).

In order to study the response of *THT*-overexpressing plants to pathogen attack, transgenic tomato plants were infected with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. We observed that CT and FT accumulated in a time-dependent manner along the course of infection, the highest values corresponding to CT. The accumulation of CT and FT was up to twofold higher in *P. syringae*-inoculated transgenic plants from line 7 compared with the corresponding infected WT plants. In addition, accumulation of other HCAA of octopamine (CO and FO) and noradrenaline (CNA and FNA) was also detected, with levels approximately threefold higher in infected transgenic tomato plants from line 7 as compared with WT. Hence, *THT* transgenic tomato plants overaccumulated HCAA upon *P. syringae* infection.

We have previously reported the accumulation of HCAA of tyramine, octopamine, and noradrenaline in tomato leaves after bacterial infiltration. Interestingly, feruloylnoradrenaline displays a very outstanding antioxidant activity, indicating that it may be a component of the tomato chemical defense response against pathogens (López-Gresa et al. 2011; Zacarés et al. 2007). Thus, supporting the idea that HCAA overaccumulation may lead to an enhanced resistance to pathogens.

To investigate this possibility, we studied the response of *THT* tomato plants to the bacterial pathogen *P. syringae* pv. *tomato*. It is worth noting that bacterial growth was significantly

reduced in transgenic plants 48 hpi. To our knowledge, this is the first report indicating that transgenic plants overexpressing *THT* exhibit resistance to bacteria. Our results suggest that this enhanced resistance is most probably due to HCAA overaccumulation. Comparison of two independent transgenic lines reveals a dosage effect, thus reinforcing the idea that HCAA levels correlate with inhibition of bacterial growth. This is in accordance with the previously described relationship between HCAA accumulation and expression of resistance, since HCAA levels in pepper and tomato subjected to incompatible interactions were higher as compared with the corresponding compatible ones (Newman et al. 2001; von Roepenack-Lahaye et al. 2003). HCAA levels detected in our infected *THT* overexpressing lines are comparable, and even higher, than the concentration found in the incompatible interactions described in tomato by von Roepenack-Lahaye and associates (2003).

In *Arabidopsis thaliana*, AtACT catalyzes the last reaction in HCAA biosynthesis. In response to *Alternaria brassicicola* challenge, AtACT transcripts rapidly increased and HCAA accumulation of agmatine and putrescine was detected in rosette leaves (Muroi et al. 2009). Interestingly, an *Arabidopsis AtACT* mutant showed enhanced susceptibility to the pathogenic fungus, indicating that HCAA accumulation is a part of the effective defense mechanisms of *Arabidopsis thaliana*. On the other hand, overexpression of AtACT in transgenic torenia (*Torenia hybrida*) plants resulted in HCAA accumulation accompanied by an enhanced resistance against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* (Muroi et al. 2012). Our present results further support the relationship between these amides and resistance.

SA plays a central role in plant defense signaling and it has been reported to accumulate in tomato plants upon challenge with *P. syringae* (Bellés et al. 1999; Dempsey et al. 1999). Thus, levels of SA were measured in THT transgenic and WT plants infected with *P. syringae*. SA levels were approximately threefold higher in THT plants from line 7. Considering that SA is a major regulator of *PR* gene induction (van Loon et al. 2006), the expression level of *PR-1* was also tested at different timepoints after the onset of bacterial infiltration. We have observed that levels of *PR-1* increased along the course of the infection, being higher in THT plants as than WT plants. These results correlated well with the SA accumulation levels observed in the *THT* overexpressing plants.

HCAA promote resistance by creating a barrier against pathogens or directly acting as antimicrobial agents (Clarke 1982; Fattorusso et al. 1999; Negrel and Martin 1984; Newman et al. 2001). Our results show that the accumulation of these compounds is accompanied by the SA synthesis, leading to the activation of plant defense. It is increasingly admitted that phenolamides have to be regarded also as metabolic intermediates rather than just final products (Bassard et al. 2010). Further experiments to test whether exogenous HCAA application could activate the plant defense system in order to prevent possible infections would be of particular interest.

To summarize, this study shows that transgenic tomato plants overexpressing *THT* display enhanced *THT* gene expression levels in leaf tissue coupled with a constitutive CT overaccumulation. The same was observed when analyzing transgenic flowers and fruits, and FT was also found to accumulate constitutively in these tissues. In addition, the accumulation of these two amides, together with CO, FO, CNA, and FNA, was higher in *Pseudomonas*-infected THT tomato plants as compared with WT plants. This increase in HCAA content in the transgenic tomato plants was accompanied by increased SA levels and *PR* gene induction. Finally, THT transgenic tomato plants showed enhanced resistance against *P. syringae* infection, suggesting a defensive role for HCAA in this interaction. The present study highlights the value of these engi-

neered transgenic plants as a tool to provide new evidence of the HCAA role in this and further plant-pathogen interactions.

MATERIALS AND METHODS

Vector construction and tomato transformation.

The full-length cDNA of *tomTHT1-3* (von Roepenack-Lahaye et al. 2003) was amplified by RT-PCR, using total RNA obtained from tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Primers used were 5'-CCGGATCCTCTAGAATGGCTCCTGCTCTTGAA CA-3' as the forward primer and 5'-CCGGATCCCTAACAGC TCCCTTTCGCCGT-3' as the reverse primer, both oligonucleotides containing the *Bam*HI restriction site. The resulting PCR product (THT) was cloned into the pGEM-T Easy vector (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) and was sequenced. The generation of the binary vector for plant transformation was carried out in two steps. First, the DNA band obtained by digestion of pGEM-THT with the restriction enzyme *Bam*HI was cloned into a pBluescript modified vector containing a double region of the *Cauliflower mosaic virus* 35S and a *nos* termination sequence. Then, the [2XCaMV35S::THT::nos] cassette was released by digestion with the restriction enzyme *Hind*III and was inserted into pBI121 vector. This vector carries the neomycin phosphotransferase gene (*NPTII*) as a transgenic selectable marker. The final construction (pBI-THT) was used to transform *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. This *Agrobacterium tumefaciens* was then used for coculture with tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker) cotyledons. Explant preparation, selection, and regeneration followed the methods described by Ellul and associates (2003). Transformation frequencies were around 15%. Transformants were selected in kanamycin-containing medium and were propagated in soil, for obtaining T₁ seeds. WT tomato seeds used in all the studies came from in vitro-regenerated plants, which were obtained in parallel with the transgenic plants.

GUS activity.

For the histochemical detection of GUS activity, fresh tissue samples were infiltrated under vacuum for 25 min in a solution containing 0.5 mg of X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) and 0.1% Triton X-100 in 50 mM phosphate buffer at pH 7.2, and were incubated at 37°C for 10 to 16 h. Tissue samples were then destained with successive washes of 70% ethanol.

Plant material and treatments.

Seeds from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker, *Tm*², *pto*), and transgenic tomato plants overexpressing the *THT* gene were used in this study. Tomato 'Money-maker' seeds were provided by J. D. G. Jones (John Innes Centre, Norwich, U.K.). The *Tm*² gene confers resistance to *Tomato mosaic virus*. These plants lack the *Pto* resistance gene that recognizes the AvrPto effector from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, and therefore, they are susceptible to this pathogen.

Plants (one per pot) were grown under standard greenhouse conditions at a temperature range from 20 to 25°C, with a 16-h light and 8-h dark photoperiod and a relative humidity of 50 to 70%, in 12-cm diameter pots containing a 1:1 mixture of peat (Biolan, Kauttua, Finland) and vermiculite. The pots were sub-irrigated once a day with a nutrient Hoagland solution (Bellés et al. 2006; Naranjo et al. 2003).

Three different types of tissue were analyzed for 'Money-maker' control and T₁ THT transgenic tomato plants: leaves, flowers, and fruits. For leaf tissues, the third and fourth leaves from 4-week-old tomato plants at the five- to six-leaf stage

were harvested. Flowers were harvested from the flower stalk in the anthesis stage. Tomato fruits were collected when ripe (red). Each fruit was washed and cut, and seeds and placentas were removed, so that the tissue sample consisted of the fleshy part of the fruit (mesocarp and endocarp).

Wounding treatments were performed with 4-week-old plants by crushing the third and fourth compound leaves per plant with forceps, according to Lisón and associates (2006). Samples were collected 24 h after wounding.

Plant material was harvested in liquid nitrogen at the indicated timepoints and were immediately reduced to a fine powder with mortar and pestle or stored frozen at -80°C .

Bacterial inoculation and CFU determination.

The third and fourth leaves from 4-week-old tomato plants ('Moneymaker' *pto* control and T₁ THT transgenic plants) were infected with a bacterial suspension of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ avrPto (provided by S. Giménez, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid). There was no *AvrPto-Pto*-mediated gene-for-gene interaction; consequently, a compatible interaction was established.

Bacteria were grown overnight at 28°C in 20-ml petri dishes with King's B agar medium supplemented with 100 μl of rifampicin (50 mg/ml). Then, bacterial colonies were transferred to 15 ml of King's B medium and were grown overnight at 28°C . Bacteria were pelleted by centrifugation and were resuspended in 10 mM MgCl_2 to an optical density of 0.1 at 600 nm. Dilution plating was used to determine the final inoculum concentration, which averaged 1×10^5 CFU/ml. One hundred microliters of this bacterial suspension were injected into the abaxial side of each leaflet with a 1-ml sterilized plastic syringe without a needle, as described by Collinge and associates (1987). Equivalent control leaflets were mock-inoculated with a sterile solution of 10 mM MgCl_2 .

For determining in planta bacterial growth, three leaf disks (1 cm^2 each) from the bacteria-infiltrated leaves were excised from each plant, from a total of five plants per line and per time, at the appropriate timepoints (24 and 48 h after inoculation, adapted from Coego and associates [2005]). Then, the three leaf disks were macerated in 10 mM MgCl_2 in order to obtain the density of the bacterial populations, determined by plating serial dilutions and counting the CFU on King's B medium supplemented with rifampicin.

RNA extraction and quantitative RT-PCR analysis.

Total RNA of tomato tissues was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) according to the manufacturer's protocol. After extraction, RNA was further precipitated by adding one volume of 6 M LiCl, and then, the pellet was washed with 3 M LiCl and dissolved in RNase-free water. Finally, 2 U of TURBO DNase (Ambion, Austin, TX, U.S.A.) were added per microliter of RNA to remove contaminating genomic DNA. Quantitative RT-PCR analysis was performed as previously described by Campos and associates (2014). One microgram of total RNA was used to obtain the corresponding cDNA target sequences, using an oligo(dT)₁₈ primer and the PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time, Takara Bio Inc, Otsu, Shiga, Japan) according to the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was carried out in the presence of the double-stranded DNA-specific dye Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.), and amplification was monitored in real time with the 7500 FAST Real-Time PCR system (Life Technologies). A housekeeping gene transcript, *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1 α*), was used as endogenous reference. The PCR primers were designed using the pcrEfficiency software (Mallona et al. 2011) (Supplementary Table S1).

Extraction procedure and

UPLC-PDA-micromass Q-TOF analysis of HCAA.

Extraction of methanol-soluble HCAA from tomato leaves, flowers, and fruits was done according to López-Gresa and associates (2011). An aliquot of 0.5 g of frozen powdered tissue from each sample was transferred to a mortar and was homogenized with 1.5 ml of methanol. The extraction mixture was vortexed for 1 min, and was then sonicated for 10 min and centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 min. The pellet was resuspended in 0.5 ml of methanol, and the same steps were repeated as above. Both supernatants (total volume 2 ml) were transferred to 5-ml glass tubes and were dried under a flow of nitrogen at 40°C . The residue was dissolved in 300 μl of methanol and were filtered through 13-mm Nylon 0.45 μm Minispike filters (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.). The solvent was evaporated and the residue dissolved again in 200 μl of methanol. All steps of the extraction were performed under dark conditions to avoid *cis/trans* light-induced isomerization of phenylpropanoid double bonds (Muhlenbeck et al. 1996).

A 5- μl aliquot from the final 200- μl sample was analyzed by UPLC-mass spectrometry (MS) using an ACQUITY UPLC-PDA system coupled to a Q-ToF Micromass spectrometer (Waters Corp.). Separation was performed on an Acquity BEH C18 column (2.1 mm \times 150 mm i.d., 1.7 μm). The mobile phase consisted of formic acid/ultrapure water (1:1,000 vol/vol; phase A) and formic acid/acetonitrile (1:1,000 vol/vol; phase B). Gradient conditions were as follows: 95 to 90% A in 14 min, 90 to 80% A in 15 min, 80 to 65% A in 10 min, 65 to 57% A in 1 min, 57 to 0% A in 1 min, held at 100% B for 3 min, returned to 95% A in 1 min, and equilibrated for 4 min before the next injection. The flow rate was 0.4 ml/min. The column and sample temperatures were kept at 40 and 4°C , respectively. UV spectra were acquired between 210 and 600 nm with a 1.2-nm resolution and 20 points per second sampling rate. MS analysis was performed by electrospray ionization in negative mode. The mass spectrometer was calibrated with sodium formate (10 ng/ μl in 90:10 propan-2-ol/water). Analysis conditions were as follows: capillary voltage, 3.0 kV; cone voltage, 45 eV; desolvation temperature, 300°C ; source temperature, 120°C ; cone gas flow, 50 liters/h; desolvation gas flow, 500 liters/h; collision energy, 5 eV. MS data were acquired in centroid mode in the mass-to-charge ratio scan range 100 to 1,500 with a scan time of 0.52 s and an interscan time of 0.1 s. Leu-enkephalin was used as the lockmass using a Lock-Spray exact mass ionization source. All data were acquired using Masslynx NT4.1 software (Waters Corp.). HCAA were quantified using synthesized HCAA as standard. HCAA synthesis was performed as described by Zacarés and associates (2007) and López-Gresa and associates (2011).

Extraction and HPLC analysis of SA.

Extraction of SA from tomato leaflets was done according to previously published protocols (Bellés et al. 2008). Briefly, leaves (0.3 to 0.5 g fresh weight of tissue) were ground with a pestle in a mortar using liquid nitrogen and were then homogenized in 1.5 ml of methanol. The extracts were vortexed vigorously, were sonicated for 10 min, and were then centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 min. The pellet was resuspended in 0.5 ml of methanol, and the same steps were repeated as above. The supernatant (2 ml) was divided in two halves and was dried under nitrogen at 40°C using 5-ml glass tubes. One half was dissolved in 1 ml of 0.1 M sodium acetate (pH 4.5), while the other half was dissolved in 1 ml of 0.1 M sodium acetate (pH 4.5) containing 10 U/mg of almond β -glucosidase (EC 3.2.1.21) (14.3 U/mg; Fluka, Buchs, Switzerland), for hydrolysis experiments. Samples were incubated at 37°C for 3 h, and then, to stop the reaction, perchloric acid (70%) was added to

all of them until a final concentration of 5%. The supernatant was extracted with 2.5 ml of 1:1 cyclopentane/ethyl acetate using 5-ml glass tubes, and the organic upper phase was collected and dried at 40°C under a flow of nitrogen. The pellet was resuspended in 300 µl of methanol and was filtered through 13-mm nylon 0.45 µm Minispike filters (Waters Corp.).

Aliquots (30 µl) were injected with a Waters 717 autosampler into a reverse-phase Sun Fire 5-µm C18 (4.6 by 150 mm; Waters Corp.) column equilibrated in 1% acetic acid. Eluents were 1% acetic acid (eluent A) and methanol (eluent B). A linear gradient starting with 100% eluent A and 0% eluent B and ending with 0% eluent A and 100% eluent B was applied over 20 min at a flow rate of 1 ml/min. After washing the column with 100% methanol for 10 min, the initial conditions were applied again, and the column was allowed to equilibrate with 1% acetic acid for 10 min, with a total run time of 40 min. The oven temperature was 30°C. Free and total SA (the sum of free SA and its conjugated glucoside, SAG) was detected with a 470 Waters fluorescence detector (λ excitation 313 nm; λ emission 405 nm). SA was quantified with the Waters Millennium³² software using authentic SA as standard. Data were corrected for losses in the extraction procedure, and recovery of metabolites ranged between 50 and 80%.

Statistical analysis.

Results shown in Figures 1 to 5 and 7 correspond to means \pm standard error of three independent plants from a representative experiment. For the statistical analysis, data coming from three independent growth experiments were used, which corresponds to a total of nine individuals (three from each experiment). For the bacterial growth analysis shown in Figure 6, five individual plants per time were inoculated, and the corresponding statistical analysis was performed for a total of 15 individuals.

Comparison between WT and each transgenic line were performed by a *t*-test analysis, using Excel from Microsoft's Office Suite. A *P* value < 0.05 was considered as significant. The *P* values coming from the *t*-test analysis are presented in Supplementary Table S2.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to C. Torres, A. Saurí, and T. Caballero for technical support. We also thank C. Gómez-Mena for her assistance in tomato flower sampling. This work was supported by Grant BIO2012-33419 from the Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento, from the Spanish Ministry of Science and Innovation. L. Campos was the recipient of a predoctoral fellowship ACIF/2010/231 from Generalitat Valenciana (Spain). The work presented here was carried out in collaboration between all authors. J. M. Bellés defined the research theme. L. Campos, L. Zacarés and M. P. López-Gresa carried out the laboratory experiments. P. Lisón and I. Rodrigo contributed to the experimental design and the interpretation of the data. L. Campos drafted the article. M. P. López-Gresa, P. Lisón and I. Rodrigo participated in revising it critically for important intellectual content. J. M. Bellés and V. Conejero gave the final approval of the version to be published. Each author has participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content.

LITERATURE CITED

Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., and Werck-Reichhart, D. 2010. Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71:1808-1824.

Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., and Conejero, V. 1999. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:227-235.

Bellés, J. M., Garro, R., Pallás, V., Fayos, J., Rodrigo, I., and Conejero, V. 2006. Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* 223:500-511.

Bellés, J. M., López-Gresa, M. P., Fayos, J., Pallás, V., Rodrigo, I., and Conejero, V. 2008. Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants. *Plant Sci.* 174:524-533.

Bottecher, C., von Roepenack-Lahaye, E., Schmidt, J., Schmotz, C., Neumann, S., Scheel, D., and Clemens, S. 2008. Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 147:2107-2120.

Campos, L., Granell, P., Tàrraga, S., López-Gresa, M. P., Conejero, V., Bellés, J. M., Rodrigo, I., and Lisón, P. 2014. Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 77:35-43.

Clarke, D. D. 1982. Active defence mechanisms in plants. Pages 321-322 in: *The Accumulation of Cinnamic Acid Amides in the Cell Walls of Potato Tissue as an Early Response to Fungal Attack*. R. K. S. Wood, ed. Plenum Press, New York.

Coego, A., Ramirez, V., Ellul, P., Mayda, E., and Vera, P. 2005. The H₂O₂-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *Plant J.* 42:283-293.

Collinge, D. B., Milligan, D. E., Dow, J. M., Scofield, G., and Daniels, M. J. 1987. Gene expression in *Brassica campestris* showing a hypersensitive response to the incompatible pathogen *Xanthomonas campestris* pv *vitians*. *Plant Mol. Biol.* 8:405-414.

Delaney, T. P., Uknes, S., Vermooy, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247-1250.

Dempsey, D. A., Shah, J., and Klessig, D. F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547-575.

Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Rios, G., Roig, L., and Moreno, V. 2003. The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent *Theor. Appl. Genet.* 106:231-238.

Facchini, P. J., Hagel, J., and Zulak, K. G. 2002. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: Physiology and biochemistry. *Can. J. Bot.* 80:577-589.

Fattorusso, E., Lanzotti, V., and Tagliatalata-Scafati, O. 1999. Antifungal *N*-feruloyl amides from roots of two *Allium* species. *Plant Biosyst.* 133:199-203.

Feldman, J. M., and Lee, E. M. 1985. Serotonin content of foods: Effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 42:639-643.

Grandmaison, J., Olah, G. M., Vancalsteren, M. R., and Furlan, V. 1993. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3:155-164.

Hagel, J. M., and Facchini, P. J. 2005. Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves. *Planta* 221:904-914.

Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-369.

Handrick, V., Vogt, T., and Frolov, A. 2010. Profiling of hydroxycinnamic acid amides in Arabidopsis thaliana pollen by tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 398:2789-2801.

Hohlfeld, H., Scheel, D., and Strack, D. 1996. Purification of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell-suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. cv. Datura. *Planta* 199:166-168.

Kang, K., Lee, K., Sohn, S. O., Park, S., Lee, S., Kim, S. Y., Kim, Y. S., and Back, K. 2009. Ectopic expression of serotonin *N*-hydroxycinnamoyltransferase and differential production of phenylpropanoid amides in transgenic tomato tissues. *Sci. Hortic.* 120:504-510.

Kang, K., Lee, K., Ishihara, A., Park, S., Kim, Y. S., and Back, K. 2010. Induced synthesis of caffeoylserotonin in pepper fruits upon infection by the anthracnose fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Sci. Hortic.* 124:290-293.

Kang, S., and Back, K. 2006. Enriched production of *N*-hydroxycinnamic acid amides and biogenic amines in pepper (*Capsicum annuum*) flowers. *Sci. Hortic.* 108:337-341.

Kawashima, S., Hayashi, M., Takii, T., Kimura, H., Zhang, H. L., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Murata, K., Oomoto, Y., and Onozaki, K. 1998. Serotonin derivative, *N*-(*p*-coumaroyl) serotonin, inhibits the production of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and IL-6 by endotoxin-stimulated human blood monocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* 18:423-428.

Keller, H., Hohlfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D., and Strack, D. 1996. Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 42:389-396.

- Lee, D. E., Kang, K., Lee, S. G., and Back, K. 2007. Enhanced synthesis of feruloyltyramine and 4-coumaroyltyramine is associated with tyramine availability in transgenic rice expressing pepper tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase. *Plant Sci.* 172:57-63.
- Lee, D. G., Park, Y., Kim, M. R., Jung, H. J., Seu, Y. B., Hahm, K. S., and Woo, E. R. 2004. Antifungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnol. Lett.* 26:1125-1130.
- Lisón, P., Rodrigo, I., and Conejero, V. 2006. A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiol.* 142:1329-1339.
- Liyama, K., Lam, T. B. T., and Stone, B. A. 1994. Covalent cross links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104:315-320.
- López-Gresa, M. P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., and Conejero, V. 2011. Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environ. Exp. Bot.* 74:216-228.
- Luo, J., Fuell, C., Parr, A., Hill, L., Bailey, P., Elliott, K., Fairhurst, S. A., Martin, C., and Michael, A. J. 2009. A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in Arabidopsis seed. *Plant Cell* 21:318-333.
- Ly, D., Kang, K., Choi, J. Y., Ishihara, A., Back, K., and Lee, S. G. 2008. HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine, and the hydroxycinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. *J. Med. Food* 11:385-389.
- Mallona, I., Weiss, J., and Marcos, E. C. 2011. pcrEfficiency: A Web tool for PCR amplification efficiency prediction. *BMC Bioinformatics* 12:404.
- Martin-Tanguy, J., Cabanne, F., Perdrizet, E., and Martin, C. 1978. Distribution of hydroxycinnamic acid-amides in flowering plants. *Phytochemistry* 17:1927-1928.
- Martin-Tanguy, J., Negrel, J., Paynot, M., and Martin, C. 1987. Hydroxycinnamic acid amides, hypersensitivity, flowering and sexual organogenesis in plants. New York.
- Métraux, J. P., and Raskin, I. 1993. Role of phenolics in plant disease resistance. Pages 191-209 in: *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wiley-Liss, New York.
- Muhlenbeck, U., Kortenbusch, A., and Barz, W. 1996. Formation of hydroxycinnamoylamides and α -hydroxyacetovanillone in cell cultures of *Solanum khasianum*. *Phytochemistry* 42:1573-1579.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., and Nishioka, T. 2009. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230:517-527.
- Muroi, A., Matsui, K., Shimoda, T., Kihara, H., Ozawa, R., Ishihara, A., Nishihara, M., and Arimura, G. 2012. Acquired immunity of transgenic torenia plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests. *Sci. Rep.* 2:689.
- Nagatsu, A., Zhang, H. L., Mizukami, H., Okuyama, H., Sakakibara, J., Tokuda, H., and Nishino, H. 2000. Tyrosinase inhibitory and anti-tumor promoting activities of compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) and cotton (*Gossypium hirsutum L.*) oil cakes. *Nat. Prod. Lett.* 14:153-158.
- Naranjo, M. A., Romero, C., Bellés, J. M., Montesinos, C., Vicente, O., Serrano, R. 2003. Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Panta.* 217:417-424.
- Negrel, J., and Javelle, F. 1997. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA: Tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase from tobacco cell-suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* 247:1127-1135.
- Negrel, J., and Jeandet, P. 1987. Metabolism of tyramine and feruloyltyramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 26:2185-2190.
- Negrel, J., and Lherminier, J. 1987. Peroxidase mediated integration of tyramine into xylem cell-walls of tobacco-leaves. *Planta* 172:494-501.
- Negrel, J., and Martin, C. 1984. The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 23:2797-2801.
- Negrel, J., Javelle, F., and Paynot, M. 1993. Wound induced tyramine hydroxycinnamoyl transferase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber disks. *J. Plant Physiol.* 142:518-524.
- Newman, M. A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M. J., and Dow, J. M. 2001. Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by *hrp* gene-dependent and *hrp* gene-independent mechanisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:785-792.
- Park, J. B., and Schoene, N. 2002. Synthesis and characterization of *N*-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:1104-1110.
- Pearce, G., Marchand, P. A., Griswold, J., Lewis, N. G., and Ryan, C. A. 1998. Accumulation of feruloyltyramine and *p*-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* 47:659-664.
- Roh, J. S., Han, J. Y., Kim, J. H., and Hwang, J. K. 2004. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) seeds for melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1976-1978.
- Schmidt, A., Scheel, D., and Strack, D. 1998. Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* 205:51-55.
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D., Rosahl, S. 1999. Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase. *J. Biol. Chem.* 274:4273-80.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. Pages 387-416 in: *Plant Biochemistry*, P. M. Dey and J. B. Harborne, eds. Academic Press, London.
- Tebayashi, S. I., Horibata, Y., Mikagi, E., Kashiwagi, T., Mekuria, D. B., Dekebo, A., Ishihara, A., and Kim, C. S. 2007. Induction of resistance against the leafminer, *Liriomyza trifolii*, by jasmonic acid in sweet pepper. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1521-1526.
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V., and Vera, P. 1997. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Mol Plant Microbe Interact.* 10:624-634.
- van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Villegas, M., and Brodelius, P. E. 1990. Elicitor induced hydroxycinnamoyl-CoA: Tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant-cell suspension cultures. *Physiol Plant.* 78:414-420.
- von Roepenack-Lahaye, E., Newman, M. A., Schornack, S., Hammond-Kosack, K. E., Lahaye, T., Jones, J. D. G., Daniels, M. J., and Dow, J. M. 2003. *p*-coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. *J. Biol. Chem.* 278:43373-43383.
- Yu, M., and Facchini, P. J. 1999. Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase from opium poppy. *Planta* 209:33-44.
- Zacarés, L., López-Gresa, M. P., Fayos, J., Primo, J., Bellés, J. M., and Conejero, V. 2007. Induction of *p*-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1439-1448.
- Zhang, H. L., Nagatsu, A., Watanabe, T., Sakakibara, J., and Okuyama, H. 1997. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* 45:1910-1914.

