

ÍNDICE

Introducción	1
1. La interacción planta-patógeno.....	1
1.1. Respuesta inmune de las plantas	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	9
Otras moléculas señal implicadas en defensa	10
El ácido gentísico	12
1.2. El silenciamiento génico como mecanismo de defensa de las plantas.....	13
1.2.1. <i>El silenciamiento génico en plantas.....</i>	14
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>	18
1.2.4. <i>Relación entre silenciamiento de RNA y resistencia inducida por SA.....</i>	20
2. El metabolismo secundario en el sistema defensivo de las plantas	21
2.1. Metabolitos secundarios de naturaleza fenólica	22
2.1.1. <i>Ácidos salicílico y gentísico</i>	26
2.1.2. <i>Amidas derivadas del ácido hidroxicinámico.....</i>	27
2.2. Modificaciones de los metabolitos secundarios.....	31
2.2.1. <i>La glicosilación en plantas</i>	32
2.2.2. <i>Implicaciones fisiológicas de la glicosilación de metabolitos</i>	33
2.2.3. <i>La glicosilación en la respuesta defensiva</i>	34

Objetivos.....	41
Materiales y Métodos	43
1. Material vegetal y condiciones de cultivo	43
2. Tratamientos	43
2.1. <i>Tratamientos de plantas de tomate.....</i>	<i>43</i>
2.2. <i>Tratamientos de plantas de Gynura aurantiaca.....</i>	<i>44</i>
2.3. <i>Tratamientos de plantas de Arabidopsis thaliana.....</i>	<i>45</i>
2.4. <i>Tratamientos de herida en plantas de tomate</i>	<i>45</i>
3. Inoculación del material vegetal.....	45
3.1. <i>Inoculación de plantas de tomate con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV)</i>	<i>45</i>
3.2. <i>Inoculación de plantas de tomate con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd)</i>	<i>46</i>
3.3. <i>Inoculación de plantas de Gynura con CEVd.....</i>	<i>46</i>
3.4. <i>Inoculación de plantas de tomate con la bacteria Pseudomonas syringae pv. tomato y determinación del crecimiento bacteriano.....</i>	<i>47</i>
3.5. <i>Inoculación de plantas de Arabidopsis con la bacteria Pseudomonas syringae pv. tomato y determinación del crecimiento bacteriano.....</i>	<i>48</i>
4. Toma de muestras	49
5. Plásmidos y cepas bacterianas utilizados.....	50
6. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....	51
6.1. <i>Purificación de plásmidos bacterianos</i>	<i>51</i>
6.2. <i>Digestión de plásmidos con enzimas de restricción</i>	<i>51</i>
6.3. <i>Aislamiento y manipulación de DNA de plantas.....</i>	<i>52</i>
6.4. <i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</i>	<i>52</i>
6.5. <i>Extracción de RNA total de plantas.....</i>	<i>52</i>
6.6. <i>Reacciones de amplificación semicuantitativa (RT-PCR).....</i>	<i>53</i>
6.7. <i>Reacciones de amplificación cuantitativa (qRT-PCR).....</i>	<i>54</i>
6.8. <i>Secuenciación de DNA</i>	<i>55</i>

7. Diseño de las construcciones y técnicas de clonaje.....	55
7.1. Construcciones para la sobreexpresión de los genes <i>GAGT</i> y <i>Tw1</i>	55
7.2. Construcción para el silenciamiento del gen <i>Tw1</i>	57
7.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	58
8. Manipulación de proteínas	59
8.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)	59
8.2. Western blot	60
8.3. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana	60
8.4. Purificación de la proteína <i>Tw1</i> recombinante.....	61
8.5. Ensayo de actividad de la proteína <i>Tw1</i> recombinante.....	62
9. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos	63
9.1. Extracción de ácido salicílico (SA) y ácido gentísico (GA)	63
9.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales por HPLC.....	64
9.3. Extracción de HCAA	64
9.4. Cuantificación de HCAA por UPLC-PDA-QToF.....	65
10. Experimentos de expresión transitoria.....	66
11. Preparación y manipulación de plantas transgénicas	66
11.1. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
11.2. Transformación genética de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
11.3. Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis</i> , germinación y aclimatación	67
11.4. Transformación de plantas de tomate.....	68
11.5. Obtención de semillas de tomate	68
11.6. Esterilización de semillas de tomate y germinación.....	69
12. Medida de la actividad β -glucuronidasa	69
13. Aplicaciones bioinformáticas.....	70
14. Tratamiento estadístico de datos	70

Resultados y discusión 73

CAPÍTULO 1. SA Y GA COMO ACTIVADORES DE LA RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS 73

Antecedentes 73

1. Estudio de la resistencia mediada por GA en plantas de *Gynura aurantiaca* infectadas con viroide 75

2. Estudio de la expresión de genes implicados en el silenciamiento viral y viroidal en tomate 78

2.1. Expresión de genes implicados en el silenciamiento de RNA en plantas de tomate infectadas con ToMV 80

2.2. Expresión de genes implicados en el silenciamiento de RNA en plantas de tomate infectadas con CEVd 83

3. Estudio de las bases moleculares de la resistencia mediada por SA y GA en tomate 86

CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LAS GLICOSILTRANSFERASAS GAGT Y Twi1 93

Antecedentes 93

1. Obtención y caracterización de plantas transgénicas GAGT 94

1.1. Expresión transitoria de GAGT en plantas de *Nicotiana benthamiana* 94

1.2. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de *Arabidopsis* GAGT 96

1.2.1. Transformación genética de *Arabidopsis thaliana* 97

1.2.2. Tratamiento exógeno con GA de plantas transgénicas de *Arabidopsis* GAGT 98

1.2.3. Infección de plantas transgénicas de *Arabidopsis* GAGT con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 AvrRpm1 101

Cuantificación de los niveles de ácido gentísico libre y conjugado 102

Cuantificación del crecimiento bacteriano 104

Cuantificación de la expresión del gen marcador de defensa *PR1* 105

1.3. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate GAGT	108
1.3.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'	109
1.3.2. Caracterización de las plantas transgénicas de tomate GAGT.....	109
1.3.3. Tratamiento exógeno con GA de plantas transgénicas de tomate GAGT.....	110
2. Estudio de la proteína de tomate inducida por herida Twi1	114
2.1. Inducción de Twi1 en respuesta a la infección por bacteria en tomate	114
2.2. Expresión transitoria de Twi1 en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	116
2.3. Purificación de la proteína recombinante Twi1	118
2.4. Ensayo de actividad de la proteína recombinante Twi1.....	119
2.5. Tratamiento exógeno de plantas de tomate con los sustratos de Twi1.....	121
2.5.1. Estudio de la inducción del gen Twi1	121
2.5.2. Estudio de la acumulación de la proteína de defensa PR1	123
2.6. Silenciamiento de Twi1 mediante expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> de la construcción pART27_Twi1	125
2.7. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1	127
2.7.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'	127
2.7.2. Caracterización de las plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1	128
2.7.3. Tratamiento exógeno con compuestos fenólicos de plantas transgénicas de tomate RNAi Twi1	128
Estudio de la inducción de Twi1	129
Estudio de la conjugación de 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA	130
Estudio de la inducción de PR1	135
 CAPÍTULO 3. IMPLICACIÓN DE LAS HCAA EN LA RESPUESTA DEFENSIVA	 137
Antecedentes.....	137
1. Obtención y caracterización de plantas transgénicas de tomate THT	138
1.1. Transformación genética de tomate 'Moneymaker'.....	138
1.2. Expresión génica de THT y acumulación de HCAA en hojas de tomate transgénico.....	138
1.3. Expresión génica de THT y acumulación de HCAA en flores de tomate transgénico.....	142

1.4. Expresión génica de THT y acumulación de HCAA en frutos de tomate transgénico	144
2. Infección de plantas transgénicas de tomate THT con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>.....	146
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>	147
2.2. Crecimiento bacteriano en plantas transgénicas de tomate THT infectadas con la bacteria <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	151
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>	153
Discusión general	157
Conclusiones	163
Bibliografía.....	167
Anexos	203
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	203
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	211

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	23
Figura 4. Ruta de los fenilpropanoides.....	25
Figura 5. Biosíntesis de HCAA	28
Figura 6. Secuencia consenso de las glicosiltransferasas (GTs).....	33
Figura 7. Conjugación del ácido salicílico y ácido gentísico en tomate.....	35

Materiales y Métodos:

Figura 8. Obtención de los clones de expresión para GAGT y Twi1.....	57
Figura 9. Obtención del clon para el silenciamiento de <i>Twi1</i>	58
Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa	53
Tabla 2. Secuencias de los cebadores empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa.....	54

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).....	74
Figura 11. Desarrollo de la enfermedad en plantas de <i>Gynura aurantiaca</i> infectadas con CEVd	76

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.....	82
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	84
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 gentísico (GA) y ácido salicílico (SA).....	87
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 gentísico (GA) y ácido salicílico (SA).....	88
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 gentísico (GA) y ácido salicílico (SA).....	90
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 gentísico (GA) y ácido salicílico (SA)	77
Tabla 4. Correspondencias entre genes implicados en el silenciamiento génico en <i>Arabidopsis</i> y sus ortólogos en tomate	80
 CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LAS GLICOSILTRANSFERASAS GAGT Y Twi1	
Figura 17. Expresión de <i>GAGT</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i>	96
Figura 18. Acumulación del mRNA de <i>GAGT</i> en las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	97
Figura 19. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> GAGT tras el tratamiento con ácido gentísico.....	98
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 gentísico (GA) y ácido salicílico (SA), a las 24 horas post-tratamiento	101
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 AvrRpm1</i>	102
Figura 22. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato AvrRpm1</i> en hojas de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> GAGT	105

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 AvrRpm1</i>	106
Figura 24. Nivel de expresión del gen <i>GAGT</i> en hojas de plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de <i>GAGT</i>	110
Figura 25. Acumulación de GA libre y GA total en plantas transgénicas de tomate GAGT tras el tratamiento con GA.....	111
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 (Pst)</i>	115
Figura 27. Estudio de la expresión del cDNA <i>Twi1</i> recombinante en plantas de <i>N. benthamiana</i>	117
Figura 28. Purificación de <i>Twi1</i> recombinante producida por expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	118
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).....	122
Figura 30. Estudio de la expresión de <i>PR1</i> en plantas de tomate ‘Moneymaker’ tratadas con ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4 DHBA) y ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6 THBA)	124
Figura 31. Niveles de expresión del gen <i>Twi1</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i>	126
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)	129
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)	131
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)	133
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)	135
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.....	99

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	103
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	112
Tabla 8. Resultados cualitativos frente a diferentes hidroxibenzoatos en la caracterización de la actividad <i>in vitro</i> de la proteína recombinante Twi1	120
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)	132
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)	134

CAPÍTULO 3. IMPLICACIÓN DE LAS HCAA EN LA RESPUESTA DEFENSIVA

Figura 36. Nivel de expresión del gen <i>THT</i> y contenido de HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de <i>THT</i>	139
Figura 37. Acumulación de HCAA en plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de <i>THT</i> en respuesta a herida	142
Figura 38. Nivel de expresión del gen <i>THT</i> y contenido de HCAA en flores de plantas transgénicas de tomate <i>THT</i>	143
Figura 39. Nivel de expresión del gen <i>THT</i> y contenido de HCAA en frutos de plantas transgénicas de tomate <i>THT</i>	145
Figura 40. Acumulación de HCAA en hojas de plantas transgénicas de tomate <i>THT</i> infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	148
Figura 41. Acumulación de HCAA de octopamina y noradrenalina en hojas de plantas transgénicas de tomate <i>THT</i> infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	150
Figura 42. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> en hojas de plantas transgénicas de tomate <i>THT</i>	152
Figura 43. Acumulación de ácido salicílico y expresión del gen <i>PR1</i> en plantas transgénicas de tomate <i>THT</i> infectadas con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	154