



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



**MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE  
PLANTAS**

**Estudio del desarrollo de la  
infección viroidal en mutantes  
*Never ripe* de tomate**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

Curso: 2018/2019

Realizado por:

**Francisco Vázquez Prol**

Directores:

**Ismael Rodrigo Bravo**

**María Purificación Lisón Párraga**

**Valencia, enero 2020**



*A Blanca*



*Gracias de corazón a todos los que habéis hecho posible esta  
locura*



*Celia, gracias por ayudarme a subir el sofá*



## ABSTRACT

To study the role of ethylene in the defensive response of tomato plants to the citrus exocortis viroid (CEVd), tomato plants from Rutgers and Pearson cultivars and their ethylene insensitive mutants *Never ripe* (*Nr*) were infected with CEVd. Both cultivars and their corresponding mutants developed several symptoms including bunchiness and epinasty of the leaves, marked growth retardation, stunting and necrosis at 3 weeks post inoculation. Symptoms were more severe in *Nr* mutants than their corresponding control. As the infection developed, an accumulation of pathogen-related proteins and viroid transcript was observed. The induction of genes related to defensive signalling like *PR1* was quantified. The expression of genes related to ethylene biosynthesis (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS)) was also quantified, as well as ethylene levels emitted by infected and control plants. Results show an induction of these genes caused by an infection with CEVd. However, the development of symptoms correlates with ethylene levels emitted and not with the accumulation of viroid transcript. As a final assay, alterations in the translation machinery caused by CEVd was studied as a new aspect of viroid pathogenesis. A higher expression level of the ribosomal stress mediator *SINAC082* and an accumulation of non-mature rRNA was detected in CEVd-infected tomato leaves. These results indicate the induction of ribosomal stress in an infection with CEVd.

Key words: ethylene, tomato, *Never ripe*, CEVd, RNA, stress, ribosome.



## RESUMEN

Para investigar el papel del etileno en la respuesta de plantas de tomate infectadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), plantas de tomate de los cv. Rutgers y Pearson y mutantes insensibles a etileno *Never ripe* (*Nr*) fueron infectados con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd). Ambos cultivares y mutantes desarrollaron varios síntomas incluyendo la reducción y arrugamiento de las hojas, enanismo, epinastia pronunciada y necrosis a las 3 semanas post-inoculación, aunque los síntomas no fueron tan severos en plantas Rutgers y Pearson como en los mutantes *Nr*. A medida que avanzó la enfermedad se produjo la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y transcrito de CEVd. Además, se cuantificó la inducción de genes implicados en las rutas de señalización defensiva como *PR1*, así como la expresión del gen que codifica la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y la 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa ACC sintasa (ACO), enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis del etileno. Por otro lado, se analizaron los niveles de etileno emitidos por las plantas infectadas y sus correspondientes controles. Los resultados obtenidos sugieren que la infección por viroide induce la expresión de estos genes. Sin embargo, los síntomas producidos en la infección con CEVd parecen depender de los niveles de etileno emitidos y no de la acumulación del viroide. Por último, se estudiaron las alteraciones causadas por CEVd en la maquinaria de traducción en plantas de tomate como un nuevo aspecto de la patogénesis de los viroides. Se detectó un mayor nivel de expresión del mediador de estrés ribosómico *SINAC082* y una acumulación de RNA ribosómico no maduro en las hojas de tomate infectadas con CEVd. Los resultados obtenidos indican una implicación del CEVd en el desarrollo del estrés ribosomal durante la infección.

Este proyecto ha contribuido al conocimiento del sistema defensivo de las plantas frente a patógenos, tanto en sus aspectos de señalización como en los que se refieren a los componentes de la respuesta final de la planta, con vistas a su posible aplicación a la obtención de plantas más resistentes mediante técnicas de biología molecular.

Palabras clave: etileno, tomate, *Never ripe*, CEVd, RNA, estrés, ribosoma.



## RESUM

Per a investigar el paper de l'etilé en la resposta de les plantes de tomaca infectades pel viroid de l'exocortis dels citrics (CEVd), plantes de tomaca de les varietats Rutgers i Pearson i mutants insensibles a etilé Never ripe (*Nr*) van ser infectats amb el CEVd. Les dues varietats i també els mutants van desenvolupar diversos símptomes incloent la reducció i arrugamiento de les fulles, nanisme, epinastia pronunciada i necrosi a les 3 setmanes post-inoculació, encara que els símptomes no van ser tan severes en plantes Rutgers i Pearson com en els mutants *Nr*. A mesura que va avançar la malaltia es va produir l'acumulació de proteïnes relacionades amb la patogènesis denominaes PR i transcrit de CEVd. A més, es va quantificar la inducció de gens implicats en les rutes de senyalització defensiva com PR1, així com, l'expressió del gen que codifica l'enzim 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) i la 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO), enzims implicats en la ruta de biosíntesi de l'etilé. D'altra banda, es van analitzar els nivells d'etilé emesos per les fulles de les plantes infectades i dels corresponents controls. Els resultats obtinguts suggereixen que la infecció pel viroid indueix l'expressió d'aquestos gens. No obstant això, els símptomes produïts per la infecció amb CEVd semblen dependre dels nivells d'etilé emesos i no de l'acumulació del viroid. Finalment, es van estudiar les alteracions causades pel CEVd en la maquinària de traducció en plantes de tomaca en un nou aspecte de la patogènesi dels viroids. Es va detectar un major nivell d'expressió del mediador d'estrés ribosòmic NAC082 en les fulles de tomaca infectades amb CEVd. Estos resultats podrán permetre dilucidar els factors implicats en l'augment de l'estrés ribosomal per una infecció amb el CEVd.

Els resultats obtinguts en este projecte augmenten el coneixement del sistema defensiu de les plantes enfront de patògens, tant en els aspectes de senyalització com en els components de la resposta final de la planta, tot aixó amb l'objectiu últim d'obtenir plantes més resistents a diferents patógenes.

Paraules clau: etilé, tomaca, Never ripe, CEVd, RNA, estrés, ribosoma.



## ABREVIATURAS

<b>ACC:</b> Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	<b>NAC082:</b> Dominio NAC que contiene la proteína 82
<b>ACO:</b> Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa	<b>Nr:</b> <i>Never ripe</i>
<b>ACS:</b> Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa	<b>nt:</b> Nucleótido
<b>Avr:</b> Avirulencia	<b>P:</b> Dominio patogénico
<b>C:</b> Dominio central	<b>PAMPs:</b> <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
<b>CCR:</b> Región central conservada	<b>PCR:</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>cDNA:</b> DNA complementario	<b>PR:</b> <i>Pathogenesis-Related</i>
<b>CEVd:</b> Viroide de la Exocortis de los Cítricos	<b>PRRs:</b> <i>Pattern Recognition Receptors</i>
<b>CTR1:</b> <i>Constitutive triple response 1</i>	<b>PSTVd:</b> Viroide del tubérculo fusiforme de la patata
<b>DEPC:</b> Pirocarbonato de dietilo	<b>PTI:</b> <i>PAMP-Triggered Immunity</i>
<b>dNTPs:</b> Desoxirribonucleótidos	<b>qRT-PCR:</b> PCR cuantitativa o en tiempo real
<b>EBF1 y EBF2:</b> <i>EIN3-Binding F-Box protein 1/2</i>	<b>R:</b> genes de resistencia
<b>EIL1:</b> <i>Ethylene insensitive 3-like 1 protein</i>	<b>RPL2:</b> Proteína ribosomal L2
<b>EIN:</b> <i>Ethylene Insensitive</i>	<b>rRNA:</b> RNA ribosómico o ribosomal
<b>EIN2C:</b> C terminal de EIN2	<b>RT-PCR:</b> Transcripción reversa de RNA seguida de PCR
<b>ET:</b> Etileno	<b>SA:</b> Ácido salicílico
<b>ETI:</b> <i>Effector-Triggered Immunity</i>	<b>SAM sintasa:</b> S-adenosilmetionina sintasa
<b>HR:</b> Respuesta hipersensible	<b>SAM:</b> S-adenosilmetionina
<b>JA:</b> Ácido jasmónico	<b>SAR:</b> Resistencia sistémica adquirida
<b>LeETR:</b> <i>Lycopersicon esculentum ethylene receptor</i>	<b>SDS-PAGE:</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>mRNA:</b> RNA mensajero	<b>snoRNA U3:</b> Pequeño RNA nuclear rico en uracilo
<b>MTA:</b> 5-metiltoadenosina	<b>Spi:</b> Semanas post-inoculación

**TL:** Dominio terminal izquierdo

**TR:** Dominio terminal derecho

**UPFs:** *Nonsense-mediated decay proteins*

**UV:** Ultravioleta

**V:** Dominio variable

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. EL TOMATE .....	1
2. EL SISTEMA DEFENSIVO DE LAS PLANTAS .....	1
3. ETILENO .....	3
3.1. Vía de biosíntesis de etileno.....	3
3.2. Dos enzimas clave en la ruta de biosíntesis de etileno: ACS y ACO .....	5
3.3. Percepción de etileno.....	5
3.4. Señalización por etileno .....	6
4. VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS.....	8
5. ESTRÉS RIBOSOMAL .....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	15
2. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE Y GERMINACIÓN .....	15
3. INFECCIÓN .....	16
3.1. Inoculación de plantas de tomate con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) .	16
3.1.1. Preparación del inóculo viroidal.....	16
3.1.2. Inoculación del material vegetal .....	16
3.2. Seguimiento de la sintomatología de la infección viroidal .....	17
3.3. Toma de muestras.....	17
4. MEDIDAS DE ETILENO .....	17
5. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	18
5.1. Extracción de RNA total de plantas.....	18
5.2. Reacciones de amplificación semicuantitativa (RT-PCR) y cuantitativa (qRT-PCR).....	18
6. HIBRIDACIÓN <i>NORTHERN BLOT</i> .....	19
7. EXTRACCIÓN Y ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS FOLIARES EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS/PAGE).....	20
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	21
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	23
1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE ETILENO <i>Nr</i> FRENTE A LA INFECCIÓN POR CEVd .....	23
1.1. Infección y estudio de la sintomatología .....	23
1.2. Cuantificación del viroide.....	26

2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MUTANTES DE ETILENO <i>Nr</i> FRENTE A LA INFECCIÓN POR CEVd .....	29
2.1. Análisis de la expresión de genes implicados en las rutas de señalización defensiva .....	29
2.2. Análisis de la expresión de genes implicados en la ruta de biosíntesis de ET .....	32
3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS MUTANTES DE ETILENO <i>Nr</i> FRENTE A LA INFECCIÓN POR CEVd .....	35
3.1. Análisis de los niveles de etileno .....	35
4. ESTUDIO DEL ESTRÉS RIBOSOMAL .....	38
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Modelo en “zig-zag” ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas.....	2
Figura 2. Biosíntesis y regulación de etileno .....	4
Figura 3. Representación esquemática de la familia de receptores de etileno en tomate .....	6
Figura 4. Modelo de la vía de señalización de etileno .....	7
Tabla 1. Características utilizadas para la clasificación de los viroides .....	8
Figura 5. Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para la mayor parte de los miembros de la familia <i>Pospiviroidae</i> .....	9
Figura 6. Aislado de la cepa de CEVd utilizado para este estudio [Genoma completo, 370 nt].	10
Figura 7. Modelo ribosómico de la patogénesis viroidal .....	11
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa .....	18
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa .....	19
Tabla 4. Sonda utilizada para el análisis <i>Northern</i> .....	20
Figura 8. Comparación de los síntomas de la infección con CEVd (enanismo, epinastia, rugosidad) en plantas mutantes <i>Nr</i> y plantas parentales para el cultivar Rutgers (A) y Pearson (B) .....	23
Figura 9. Desarrollo de la enfermedad en plantas <i>Never ripe</i> de los cultivares Rutgers y Pearson (línea discontinua), así como sus correspondientes líneas parentales (línea continua) infectadas con CEVd .....	24
Figura 10. Severidad de los síntomas en plantas Rutgers y Pearson infectadas con CEVd .....	25
Figura 11. Acumulación del transcrito de CEVd en plantas Rutgers y Rutgers <i>Nr</i> .....	26
Figura 12. Niveles de expresión del transcrito CEVd en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR .....	27
Figura 13. Niveles de expresión del transcrito CEVd en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR .....	28
Figura 14. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas solubles de hojas de tomate infectadas con CEVd .....	29
Figura 15. Niveles de expresión del transcrito <i>PR1</i> en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR .....	30
Figura 16. Niveles de expresión del transcrito <i>ACS</i> y <i>ACO</i> en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.....	32
Figura 17. Niveles de expresión del transcrito <i>ACS</i> y <i>ACO</i> en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.....	33
Figura 18. Emisión del etileno emitido en hoja medido mediante GC-FID .....	35
Figura 19. Niveles de expresión del transcrito <i>SINAC082</i> en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR .....	37

Figura 20. Alteración en el procesamiento del rRNA de plantas de tomate Rutgers y Rutgers <i>Nr</i> infectadas con CEVd .....	40
Tabla 5. Influencia del cultivar en la infección por CEVd .....	41

# *Introducción*

---



# INTRODUCCIÓN

## 1. EL TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo hortícola que ocupa el primer lugar en importancia económica a nivel mundial. La producción en España durante 2017 fue de más de 5 millones de toneladas según los datos disponibles en la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (FAOSTAT, 2017).

Además de su importancia como fuente de alimentación, el tomate se utiliza como planta modelo en investigación debido a características propias de gran importancia agronómica no presentes en otras plantas empleadas en los laboratorios (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*) como frutos carnosos, desarrollo simpodial del tallo y hojas compuestas. Además, el tomate pertenece a la familia *Solanaceae*, por lo que está estrechamente relacionado con otras plantas de interés comercial como la patata, la berenjena, el tabaco, la petunia y los pimientos, de forma que los estudios realizados en tomate pueden ser aplicados a estos otros cultivos. La secuenciación de su genoma (Tomato Genome Consortium, 2012) permite entender su evolución y es una gran herramienta para los estudios basados en Biología Molecular.

A su vez, es susceptible a un gran número de enfermedades, por lo que constituye una excelente especie modelo para el estudio de los mecanismos de resistencia de las plantas. La caracterización de la respuesta defensiva de la planta de tomate a diferentes agentes patógenos ha dado lugar a la identificación de un gran número de genes de resistencia (*R*). El primer gen *R* clonado (*Pto*) es el responsable de conferir resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringæ* pv. *tomato* DC3000 (Martin *et al.*, 1993) y fue clonado a partir de plantas de tomate.

## 2. EL SISTEMA DEFENSIVO DE LAS PLANTAS

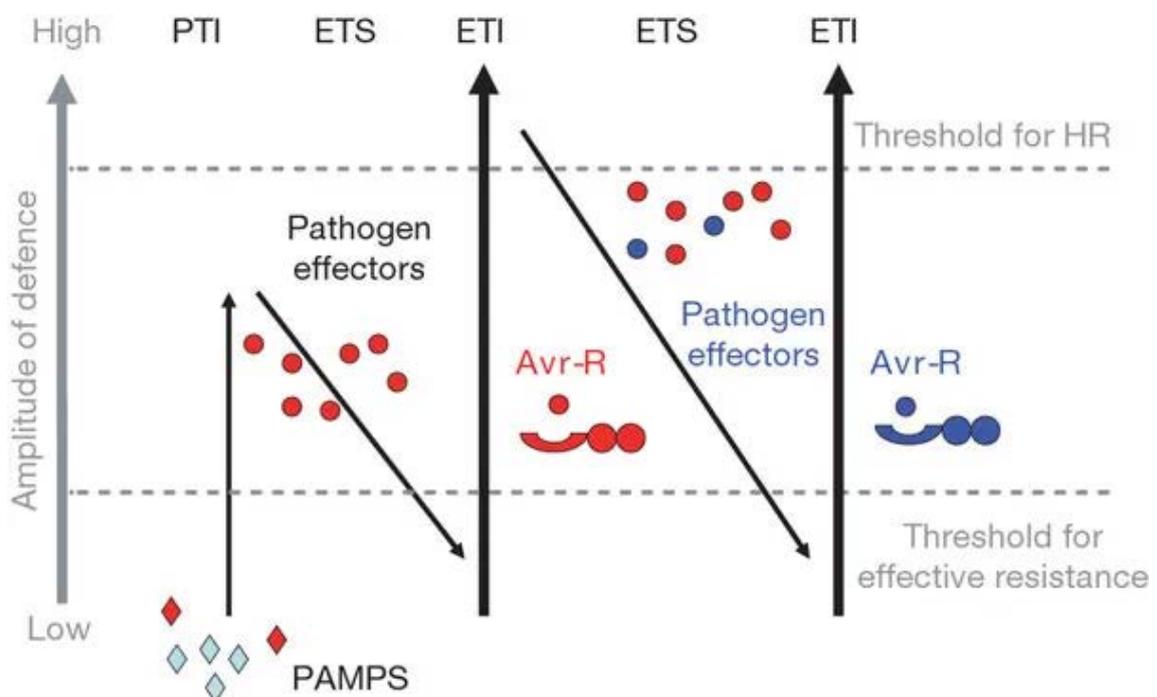
Las plantas están expuestas a multitud de estreses ambientales, tanto bióticos como abióticos, que afectan a la producción y calidad del fruto. Los estreses abióticos, entre los que se incluyen radiación, salinidad, inundaciones, sequía, temperaturas extremas, metales pesados y otros, provocan grandes pérdidas de cultivos a nivel mundial y actualmente se ven exacerbados por el cambio climático (Gull, Ahmad Lone and Ul Islam Wani, 2019).

Por otro lado, los ataques por patógenos como bacterias, hongos, virus, viroides, nematodos e insectos masticadores son conocidos como estreses bióticos. Al tratarse de organismos sésiles en la naturaleza, las plantas han desarrollado varios mecanismos con el fin de superar estos estreses. Son capaces de recibir estímulos externos y activar una respuesta celular apropiada a través de distintas rutas de señalización. Esto

conduce a la expresión diferencial de genes defensivos para lograr que la planta resista al estrés correspondiente (Gull, Ahmad Lone and Ul Islam Wani, 2019).

La respuesta defensiva comienza mediante el reconocimiento de las PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) (Figura 1), moléculas asociadas a patógenos reconocidas por receptores no específicos PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) que activan el primer nivel de defensa, PTI (*Pattern-Triggered Immunity*). Uno de estos mecanismos de defensa es la producción de proteínas de defensa PR (*Pathogenesis Related*) (Jones and Dangl, 2006). El siguiente nivel de defensa, ETI (*Effector-Triggered Immunity*), implica la interacción entre los factores de avirulencia (Avr) del patógeno y los productos de los genes de resistencia (R) de la planta. Este reconocimiento específico gen a gen se conoce como interacción de tipo incompatible, que da lugar a una respuesta hipersensible (HR) caracterizada por la muerte celular alrededor de la zona de infección impidiendo el desarrollo de la enfermedad. Esta puede ir acompañada de la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) a lo largo de toda la planta (Dodds and Rathjen, 2010).

En ausencia del reconocimiento gen a gen se produce una interacción del tipo compatible, lo que permite la extensión del patógeno dando lugar a una infección sistémica (Jones and Dangl, 2006). Este es el caso del Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) en plantas de tomate (Pallás and Flores, 1989).



**Figura 1. Modelo en “zig-zag” ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas.** La planta detecta los PAMPs mediante los receptores no específicos transmembrana PRRs; de esta forma se establecen mecanismos de defensa en la planta activados por los PAMPs (PTI). Determinados efectores patogénicos pueden interferir con la PTI estableciéndose una

susceptibilidad ligada a dichos efectores (ETS). Un efector patogénico o factor de avirulencia (Avr) es reconocido de forma específica por un gen R, activando la inmunidad ligada al efector (ETI), lo cual suele desencadenar una respuesta hipersensible (HR), causando la muerte celular en el lugar de la infección (Jones and Dangl, 2006).

La activación de la respuesta defensiva a lo largo de toda la planta implica que deben existir moléculas señal que viajen a lo largo de la misma. Las fitohormonas juegan un papel esencial en dicha señalización. 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. Las rutas del JA y el ET actúan de forma conjunta y de forma antagonista con la ruta del SA (Wasternack, 2014; Iqbal *et al.*, 2017).

### **3. ETILENO**

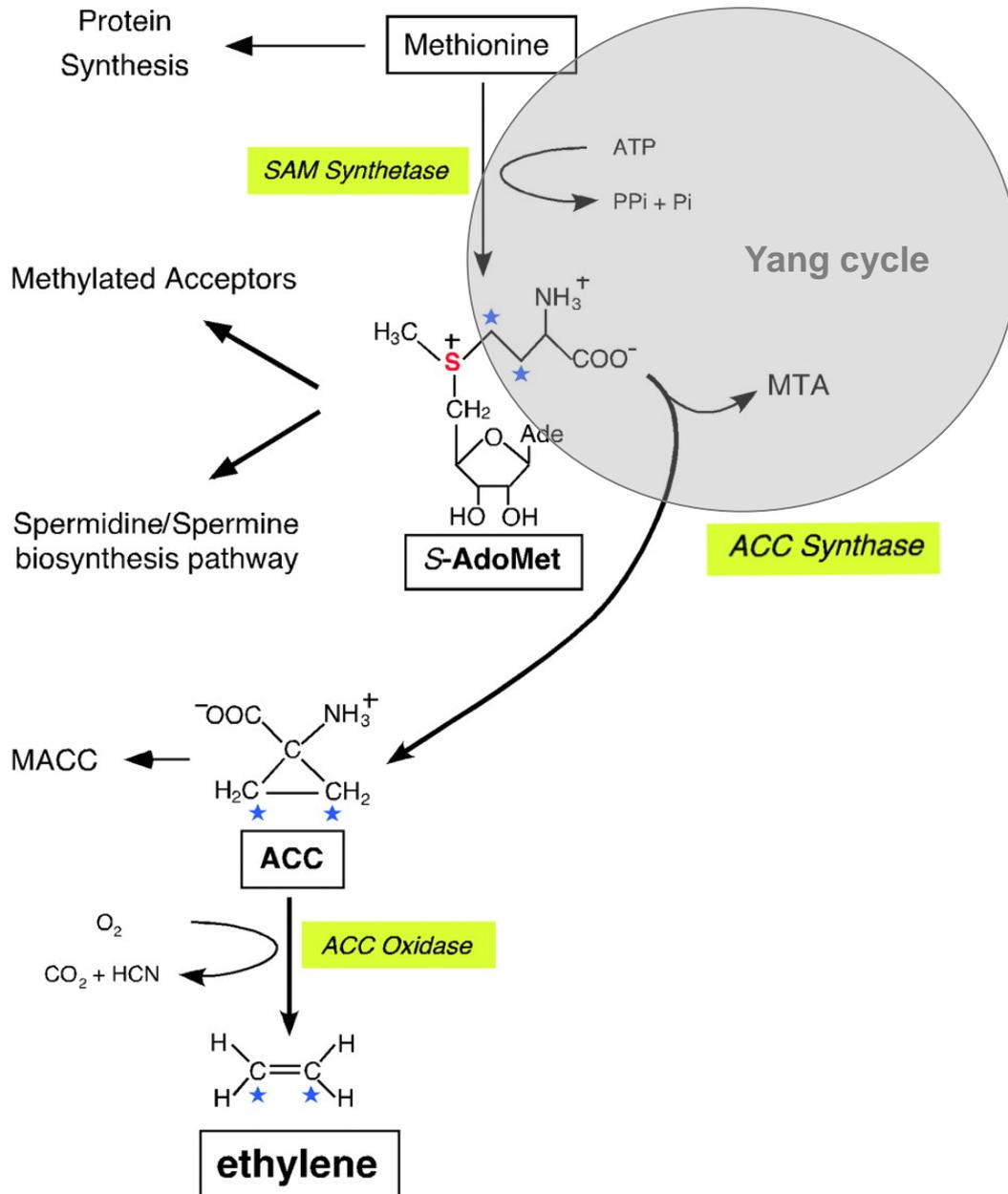
El etileno es una hormona vegetal de muy bajo peso molecular, gaseosa e insoluble en agua con un papel fundamental en el crecimiento, desarrollo y la respuesta a estrés biótico y abiótico de las plantas. Los niveles basales de etileno en planta suelen ser bajos, pero se inducen durante determinados estadios del desarrollo como la maduración de los frutos y eventos de estrés como la senescencia o la infección por patógenos (Dubois, Van den Broeck and Inzé, 2018). Debido a sus características, al contrario que otras hormonas vegetales, el etileno no tiene transportadores asociados, por lo que actúa en el lugar donde se sintetiza. Esto hace que el paso clave en la regulación de la señalización por etileno sea su biosíntesis (Yang and Hoffman, 1984; Wang, Li and Ecker, 2002).

#### **3.1. Vía de biosíntesis de etileno**

El etileno se sintetiza *in vivo* a partir de los C-3,4 del aminoácido metionina (Figura 2). El 80% de la metionina es el sustrato de la SAM sintasa (*S*-adenosilmetionina sintasa) que la transforma en SAM (*S*-adenosilmetionina), una forma activada de este aminoácido. A partir de la SAM se obtiene el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) en un proceso catalizado por la enzima ACS (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa) que finalmente es oxidada por la ACO (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa) para dar lugar a etileno (Yang and Hoffman, 1984; Wang, Li and Ecker, 2002).

Además de ser un precursor del etileno, la metionina es un metabolito importante para muchos procesos biológicos de las plantas. Los contenidos en metionina en la planta son bajos y estables gracias a la existencia de un ciclo de reciclaje conocido como ciclo de Yang. En este ciclo, se ha descrito la producción de MTA (5-metiloadenosina) como metabolito secundario en la reacción catalizada por ACS al transformar SAM en ACC. Después, la MTA es convertida a metionina permitiendo la preservación del grupo metilo para volver a producir etileno. De esta forma, el etileno

puede seguir sintetizándose continuamente sin necesitar aumentar los niveles de metionina (Miyazaki and Yang, 1987; Wang, Li and Ecker, 2002).



**Figura 2. Biosíntesis y regulación de etileno.** La formación de S-AdoMet es catalizado por la SAM sintasa (*SAM Synthetase*), a partir de AdoMet y una molécula de ATP. S-AdoMet es el donante del grupo metilo (*Methylated Acceptors*). Además, S-AdoMet es el precursor de la vía de síntesis de poliaminas (*Spermidine/Spermine biosynthesis pathway*). La ACC es el precursor del etileno (*ethylene*). El paso limitante en la biosíntesis de etileno es la transformación de la S-AdoMet en ACC llevado a cabo por la ACS (*ACC Synthase*). MTA es un metabolito secundario formado junto con la producción de ACC. El MTA es convertido en metionina (*Methionine*) conservando el grupo metilto el cual permite mantener constante la concentración celular de metionina incluso cuando el etileno es rápidamente sintetizado. La malonilación de la ACC a malonil-ACC (MACC) reduce la producción de etileno. La ACC oxidasa (*ACC Oxidase*) cataliza el paso final de la síntesis de etileno usando ACC como sustrato y genera dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y cianuro (HCN). Adaptado de (Wang, Li and Ecker, 2002).

### 3.2. Dos enzimas clave en la ruta de biosíntesis de etileno: ACS y ACO

Las dos reacciones claves en la biosíntesis de etileno son la transformación de SAM a ACC y la oxidación de este a etileno, catalizadas por ACS y ACO, respectivamente. Cuando en los tejidos no se producen grandes cantidades de etileno los niveles de ACS son bajos. Sin embargo, estos niveles aumentan bajo condiciones que promueven la síntesis de etileno, como el estrés por patógenos. Por el contrario, la ACO está presente de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos vegetales (Wang, Li and Ecker, 2002).

La ACS se considera la enzima limitante en la biosíntesis de etileno. Sin embargo, pruebas recientes indican que la ACO también actúa como punto de control ante condiciones específicas de estrés en algunas especies (Sun *et al.*, 2017).

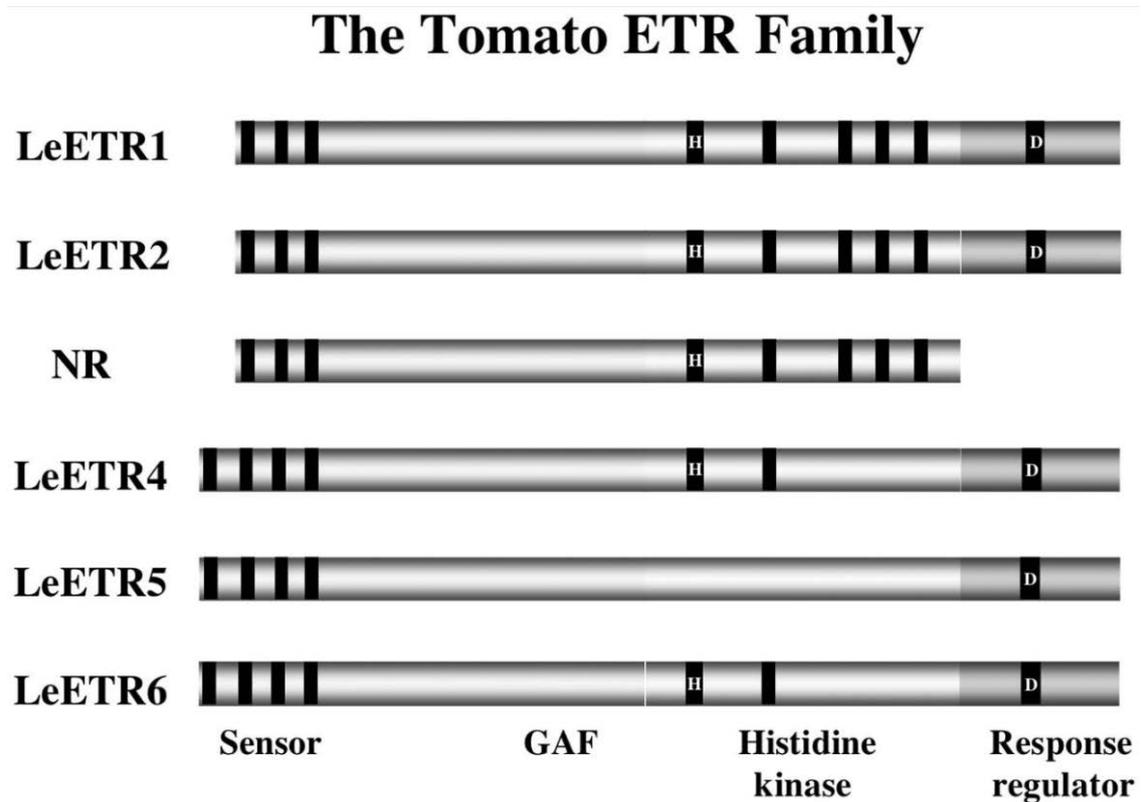
### 3.3. Percepción de etileno

Los receptores de etileno están presentes *in vivo* como dímeros y presentan varios dominios. El primer dominio se conoce como dominio sensor y contiene varios dominios transmembrana hidrofóbicos. En esta región es donde se produce la unión al etileno y la dimerización de los receptores. El siguiente dominio es conocido como dominio GAF y está bastante conservado, pero su función en la señalización por etileno es desconocida. El dominio histidina quinasa presenta hasta cinco subdominios catalíticos poco conservados entre receptores con actividad histidina quinasa. Algunos receptores también presentan actividad serina treonina quinasa. Por último, el dominio regulador C-terminal solo se encuentra conservado en algunos receptores y su función es desconocida (Klee, 2004).

En el caso de *Solanum lycopersicum*, el etileno es percibido por una familia compuesta por seis receptores transmembrana (Figura 3) denominados LeETR1-6. El primer receptor clonado fue LeETR3 o NR y corresponde al gen *Nr*. El gen *Nr* se identificó a partir de una mutación espontánea en plantas del cultivar Pearson que presentan una mutación Pro36Leu en el dominio de unión a etileno, regulando negativamente los niveles de mRNA de ETR1 y ETR4, por lo que son insensibles. Estos mutantes se conocen como mutantes *Never ripe* debido a un fenotipo de ausencia de maduración de los frutos por el cual el tomate pasa de verde a naranja pero nunca llega a adquirir el color rojo por una falta de acumulación de licopeno por ser incapaces de alcanzar el final de la maduración (Aloni *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2019).

Estas seis familias presentan menos del 50% de similitud, siendo muy divergentes. La mayor similitud de secuencia se encuentra en los dominios transmembrana, lo que destaca su importancia en la transducción de la señal. LeETR1, 2 y NR presentan tres dominios transmembrana mientras que LeETR4, 5 y 6 tienen cuatro. El receptor NR es el único que no tiene el dominio receptor C-terminal. Tres de estos receptores (LeETR4, 5 y 6) no presentan uno o varios de los dominios histidina quinasa.

Cada receptor de etileno de tomate tiene un patrón de expresión diferente. LeETR4 y NR se inducen, entre otros factores, por la infección por patógenos (Klee, 2004).



**Figura 3. Representación esquemática de la familia de receptores de etileno en tomate.** Las barras negras en el dominio del sensor representan dominios transmembrana. Los recuadros negros en el dominio de histidina quinasa representan los subdominios conservados, mientras que el recuadro negro en el regulador de respuesta representa el aspartato conservado (Klee, 2004).

### 3.4. Señalización por etileno

En ausencia de etileno (Figura 4A) los receptores de etileno están activados constitutivamente y funcionan como reguladores negativos de la señalización. Los receptores activos se asocian a la serina treonina quinasa CTR1 (*Constitutive triple response 1*), activándola y permitiendo la formación de un homodímero que fosforila a EIN2 (*Ethylene Insensitive protein 2*), marcándolo para su degradación en el proteosoma 26S. Al mismo tiempo, en el núcleo los factores de transcripción EIN3 y EIL1 son degradados por el proteosoma 26S a través de EBF1 y EBF2 (*EIN3-Binding F-Box protein 1 y 2*), dando lugar a la supresión de la respuesta a etileno aguas abajo (Ju *et al.*, 2012).

La unión de etileno a los receptores (Figura 4B) impide la dimerización de CTR1 de forma que no puede fosforilar a EIN2, que es degradado por proteasas que liberan su extremo C-terminal (EIN2C) permitiendo su translocación al núcleo. Esto permite la degradación dependiente de EIN2 de los reguladores negativos EBF1 y EBF2 en el



#### 4. VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS

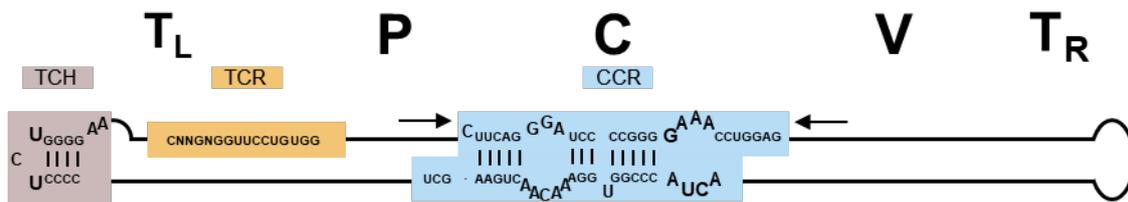
El primer viroide identificado y caracterizado fue el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd, *Potato Spindle Tuber Viroid*). Los viroides son los patógenos de plantas más pequeños conocidos. Se trata de moléculas de RNA circulares, cerradas y desnudas de entre 250 y 450 nucleótidos, con un alto grado de estructura secundaria, y que carecen de la habilidad de codificar proteínas. A pesar de ello, los viroides tienen capacidad autónoma para replicarse parasitando la maquinaria transcripcional de la célula (Flores *et al.*, 2005). Estos patógenos son capaces de causar enfermedades muy graves en distintas especies vegetales produciendo síntomas dependientes de la cepa y del huésped. Al tratarse de moléculas de RNA no codificante, los viroides dependen exclusivamente de su estructura y genoma para llevar a cabo la infección. Debido a ello, los viroides son una herramienta muy poderosa para entender los principios fundamentales de los RNAs no codificantes en los procesos vitales (Ding and Itaya, 2007).

La estructura secundaria de los viroides juega un papel fundamental en su ciclo de vida, especialmente en los procesos de infección, replicación, patogénesis y transporte (Adkar-Purushothama and Perreault, 2019). Se han propuesto cinco dominios para CEVd y viroides relacionados. Estos dominios son el TL (Terminal izquierdo), P (patogénico), C (Central), V (Variable) y TR (Terminal derecho) (Keese and Symons, 1985). Dos series de nucleótidos conservados dentro del dominio C forman la región central conservada (CCR). La presencia o ausencia de este dominio permite clasificar los viroides en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*. Los detalles de la estructura y características funcionales de dicha clasificación se encuentran en la Tabla 1 (Tsagris *et al.*, 2008). Para la mayoría de los miembros de la familia *Pospiviroidae*, la conformación más estable propuesta es la de tipo varilla (Figura 5) (Flores *et al.*, 2005).

**Tabla 1. Características utilizadas para la clasificación de los viroides.**

Características	Familia	
	<i>Pospiviroidae</i>	<i>Avsunviroidae</i>
Estructura	Tipo varilla	Cabeza de martillo o ramificada
Dominios	C (central), P (patogénico), V (variable) y TL y TR (terminal izquierdo y terminal derecho, respectivamente)	-
Actividad ribozima	No	Sí
Lugar de replicación	Nucleolo	Cloroplasto
Modelo de replicación	Asimétrico	Simétrico
Enzimas implicadas	Transcripción de RNA a partir de RNA	Transcripción de RNA a partir de RNA
	Dependientes de DNA	Cloroplásticas codificadas en el núcleo
	RNA polimerasa II	RNA polimerasa
Huéspedes	Rango amplio o estrecho dependiendo del viroide	Rango estrecho

Adaptado de (Adkar-Purushothama and Perreault, 2019)



**Figura 5. Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para la mayor parte de los miembros de la familia *Pospiviroidae*.** La localización aproximada de los cinco dominios se indica en la parte superior de la figura: C (central), P (patogénico), V (variable) y TL y TR (terminal izquierdo y terminal derecho, respectivamente). Los nucleótidos que forman parte de las regiones conservadas CCR, TCR y TCH se han encuadrado. Las flechas que flanquean la rama superior de la CCR indican los nucleótidos que forman, junto con los estrictamente conservados, repeticiones invertidas imperfectas. Las letras N indican los nucleótidos no conservados, y las de mayor tamaño las bases características. Adaptado de (Flores *et al.*, 2005).

La familia *Pospiviroidae* está dividida en géneros basado en homologías de secuencia en la región CCR, en la horquilla terminal y en la región terminal conservada (Flores *et al.*, 2005). El CEVd (Figura 6) tiene alrededor de 370 nt y pertenece a esta familia. Es el agente causal de la enfermedad de la exocortis de *Poncirus trifoliata* y sus híbridos. Tiene un amplio rango de huéspedes, entre los que se encuentra el tomate, aunque la gravedad de los síntomas varía, plantas infectadas muestran reducción y arrugamiento de las hojas, clorosis y enanismo (Verhoeven *et al.*, 2004; López-Gresa *et al.*, 2016; Cottilli *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

>Citrus exocortis viroid (CEVd) complete

```
CGGGAUCUUUCUUGAGGUUCCUGUGGUGCUCACCCUGACCCUGCAGGCAGAAAGAGAAAAAGAGGCGGCGG
GGGAAGAAGUCCUUCAGGGAUCCCCGGGGAAACCUGGAGGAAGUCGAGGUUCGGGGGGACAGCUCUUCG
GUCGCCCGGAUCACUGGCGUCCAGCGGAGAAACAGGAGCUCGUCUCCUUCUUCGUCGUCUGGCUCCAC
AUCCGAUCGUCGUCUGAAGCGCCUCGCCCCUCGCCCCGGAGCUUCUCUCUGGAGACUACCCGGUGGAAACA
ACUGAAGCUUCAACCCCAAGCCGCUUUUCUUAUAUCUUCACUGCUCUCCGGGCGAGGGUGAAAGCCCUUG
GAACCCUAGAUUGGGUCCCU
```

**Figura 6. Aislado de la cepa de CEVd utilizado para este estudio [Genoma completo, 370 nt].**

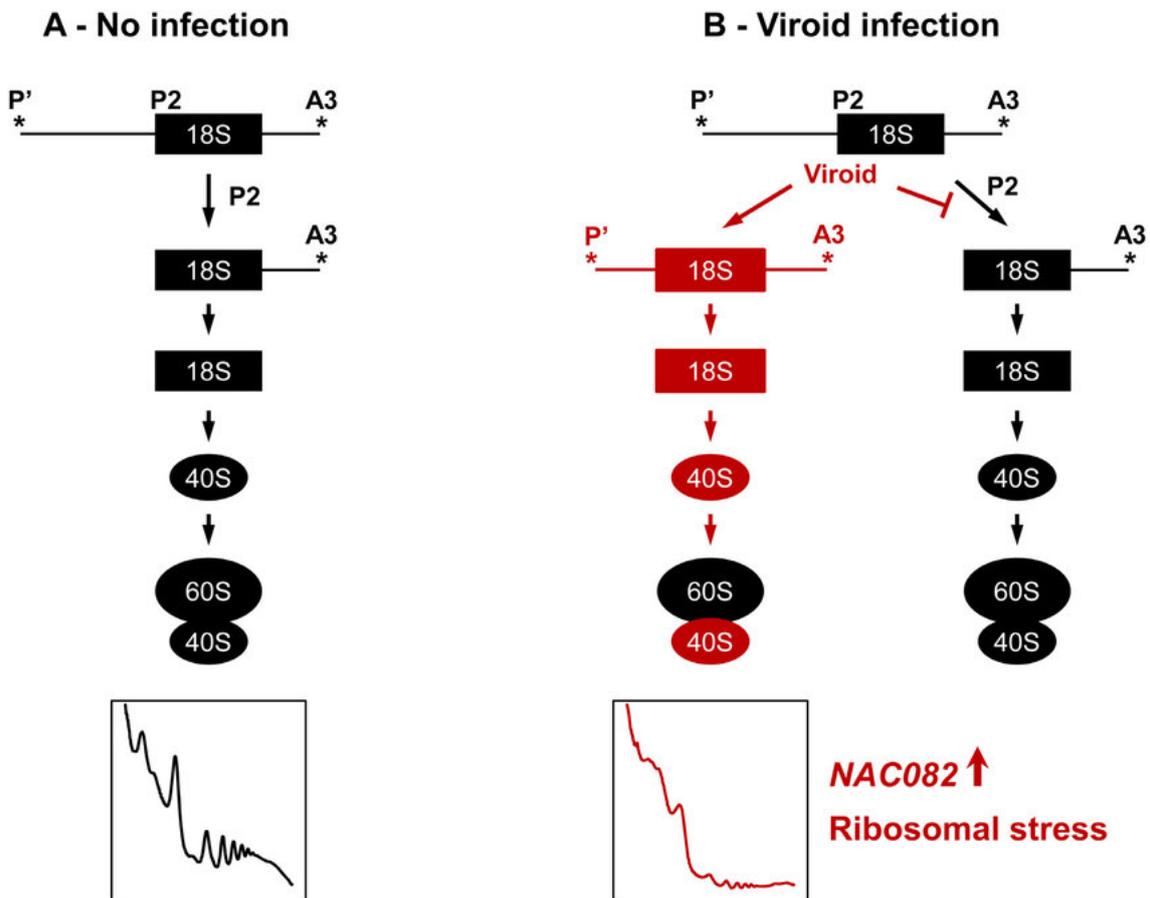
## 5. ESTRÉS RIBOSOMAL

A pesar de la ausencia de capacidad codificante, hay diversas pruebas que relacionan las infecciones viroidales con cambios en la maquinaria de traducción. En el caso de la infección por CEVd en tomate se han detectado alteraciones en la acumulación de las proteínas ribosomales S3, S5 y L10 y en factores de transcripción de síntesis de proteínas como eEF1A, eEF2 y IF5A (Lisón *et al.*, 2013). Recientemente se ha descrito que el CEVd produce estrés ribosomal en plantas de tomate (Cottilli *et al.*, 2019). Asimismo, el factor de transcripción *SINAC082* (*Solanum lycopersicum* *NAC082*) se propone como mediador de la respuesta a estrés ribosomal provocando defectos en el crecimiento y desarrollo de la planta en situaciones de perturbación de la biogénesis de los ribosomas en plantas de tomate (Cottilli *et al.*, 2019). El acrónimo NAC (NAM, ATAF 1/2 y CUC2) viene de tres genes en los que este dominio fue descubierto originalmente: NAM (*No Apical Meristem*), ATAF1 y 2, y CUC2 (*Cup-shaped Cotyledon*) (Nuruzzaman, Sharoni and Kikuchi, 2013).

Los ribosomas de eucariotas están formados por dos subunidades que dan lugar al ribosoma 80S. La subunidad pequeña (40S) actúa como decodificadora de mRNAs y está formada por el rRNA 18S y 33 proteínas ribosomales. La subunidad grande (60S) es responsable de la actividad peptidil transferasa y está formada por los rRNAs 25/28S, 5.8S y 5S y aproximadamente 47 proteínas ribosomales (Lafontaine and Tollervey, 2001; Cottilli *et al.*, 2019). Existe un pequeño RNA nuclear rico en uracilo (snoRNA U3) que reside en el nucleolo, en donde interviene en el procesamiento (reconocimiento y corte) del pre-18S rRNA y el ensamblaje ribosómico (Zhang, Lin and Ye, 2013).

Los resultados de Cottilli *et al.* (2019) sugieren un modelo para explicar el estrés ribosomal provocado por CEVd en plantas de tomate (Figura 7). Según dicho modelo el CEVd provocaría alteraciones en el procesamiento del pre-rRNA 35S y en los perfiles de traducción debido a una posible redistribución del snoRNA U3. Esto podría estar provocado por un impedimento en sitio de corte p2 provocándose una sobreacumulación de P'-A3 que afectaría a la maduración del rRNA 18S y con ello a la

biogénesis de la subunidad 40S del ribosoma, sugiriendo que el CEVd es capaz de provocar estrés ribosomal en tomate.



**Figura 7. Modelo ribosómico de la patogénesis viroidal.** (A) Biogénesis normal de ribosomas en plantas de tomate no infectadas. (B) Alteraciones en la biogénesis de ribosomas producidas por la infección del viroide (en rojo) (Cottilli *et al.*, 2019).

A lo largo de esta Introducción se han descrito los mecanismos defensivos de las plantas frente al CEVd, y las moléculas señal implicadas en la respuesta defensiva. El presente Trabajo Final de Máster pretende profundizar en el estudio del papel defensivo del etileno en la respuesta defensiva de las plantas de tomate frente a una infección viroidal y para ello se emplearán mutantes con alteraciones en la cadena de señalización dependiente de etileno.



## *Objetivos*

---



## OBJETIVOS

El objetivo que se pretende es estudiar el papel del etileno en los mecanismos de señalización de la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la infección por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), utilizando como sistema modelo los mutantes de tomate *Never ripe (Nr)*, que son insensibles a etileno, así como sus correspondientes fondos genéticos. Para ello, los objetivos específicos que nos planteamos son los siguientes:

- I. Caracterización fenotípica de los mutantes de etileno *Nr* frente a la infección por CEVd, mediante el estudio de la sintomatología y la acumulación del patógeno.
- II. Caracterización molecular de los mutantes de etileno frente a la infección por CEVd, mediante el análisis de la expresión de genes implicados en las rutas de señalización defensiva y en la biosíntesis de etileno, así como el estudio del estrés ribosomal causado por este patógeno.
- III. Caracterización bioquímica de los mutantes de etileno *Nr* frente a la infección por CEVd, mediante el análisis de los niveles de etileno, que permita entender el estado fisiológico de estos mutantes como consecuencia de la infección viroidal.



*Materiales*  

---

 *y Métodos*



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), tanto mutantes *Never ripe* de los cultivares Rutgers y Pearson como sus correspondientes fondos genéticos (accesiones LA3001, LA0162, LA1090 y LA0012, <https://tgrc.ucdavis.edu>).

Estas plantas se cultivaron en invernadero bajo condiciones de crecimiento estándar, con una temperatura entre los 25 y 30 °C (noche/día), un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y con una humedad relativa entre el 50 y el 70 %. Para su cultivo se germinaron semillas en placas *Petri* y, aproximadamente una semana después de la siembra, las plántulas se trasplantaron individualmente a macetas (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro interior) que contenían turba y vermiculita (1:1) y se regaron una vez al día con solución nutritiva *Hoagland* (Bellés et al., 2006).

Los experimentos se repitieron tres veces y los datos mostrados en cada caso corresponden a un experimento representativo.

### 2. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE Y GERMINACIÓN

La esterilización del material vegetal se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar mediante lavados en serie, para disminuir la tasa de contaminación. Para ello, las semillas envueltas con membrana *Miracloth* se sometieron a un total de cuatro lavados en botes de vidrio autoclavados a 121 °C durante 25 min. El primero contenía una relación 1:1 de lejía comercial y agua desionizada estéril, a la que se le añadió una concentración de 0,05 % v/v del surfactante Tween-20. En esta disolución, se mantuvieron los paquetes de semillas durante 30 min. A continuación, se realizaron 3 lavados con agua desionizada estéril, sumergiendo las semillas durante 5, 10 y 15 min, respectivamente, para la eliminación del agente desinfectante.

Una vez esterilizadas, las semillas se sembraron en placas *Petri* usando como sustrato una capa de papel filtro humedecido con 14 mL de agua desionizada. Posteriormente, se sellaron los perímetros irregulares de la placa herméticamente con cinta microporosa. Se almacenaron en oscuridad por un periodo de 48 a 72 h, a una temperatura de 23 °C, en cámara de cultivo *in vitro*, para que se produjera la ruptura de la semilla y la aparición de la radícula. A continuación, durante 72-96 h, se realizaron ciclos alternados de luz (16 horas) y oscuridad (8 horas). Pasado este tiempo, las plántulas se transfirieron a macetas como se indica en el apartado anterior.

### 3. INFECCIÓN

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

##### 3.1.1. Preparación del inóculo viroidal

Se realizó una extracción de viroide a partir de hojas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Rutgers infectadas con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) y que presentaban síntomas severos de la infección viroidal, como son enanismo, epinastia foliar y rugosidad (López-Gresa et al., 2016). El material vegetal infectado se recogió en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Se partió de 80 g de material fresco triturado en N<sub>2</sub> líquido a los que se le añadieron 20 mL de EDTA 0,1 M a pH 7, 10 mL de 2-mercaptoetanol, 80 mL de Tris Base 0,2 M a pH 8,9 y 320 mL de fenol. Se homogeneizó con un Polytron y se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min empleando una centrifuga Beckman-Coulter Avanti J-25 con un rotor JA-14. El sobrenadante se llevó a un volumen de 160 mL con H<sub>2</sub>O Milli-Q y se repartió en diferentes tubos de 40 mL a los que se le añadió 1,25 g de celulosa CF11, 3,7 mL de STE 10x, 7,2 mL de HCl y 13,4 mL de EtOH absoluto. Se dejó en agitación a T<sup>a</sup> ambiente durante toda la noche y se centrifugó a 3000 rpm 5 minutos en una centrifuga Beckman-Coulter Allegra 64-R y rotor F0850. El sedimento se lavó tres veces con 30 mL de STE 1x (con etanol), y el RNA retenido en el sedimento tras los lavados se eluyó con 10 mL de STE1x sin etanol hasta un volumen final de 10 mL, a los cuales se añadieron 20 mL de EtOH absoluto, manteniendo a -20 °C durante 12 horas. Se recuperó el RNA por centrifugación a 8000 rpm 30 minutos y el sedimento se resuspendió en 1,9 mL de STE 1x al que se añadió 1 mL de LiCl 10 M, manteniéndose durante 12 h a 4 °C. De nuevo se centrifugó a 8000 rpm 30 minutos, se recuperó el sobrenadante al que se añadió 15 mL de EtOH, y se almacenó a -20 °C 12 h. Por último, se centrifugó a 8000 rpm 30 minutos y el inóculo totalmente seco se disolvió en 0,5 mL de H<sub>2</sub>O. Este homogeneizado se empleó directamente como solución de inoculación.

##### 3.1.2. Inoculación del material vegetal

Una semana después de trasplantarse a maceta, las plantas se infectaron con el inóculo de CEVd. Las plantas se espolvorearon con *carborundum* sobre la cara adaxial del limbo tanto del primer cotiledón como de la primera hoja verdadera y se inocularon frotando con un hisopo de algodón empapado en 10 µL del extracto viroidal o se inocularon de forma simulada con 10 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Estas plantas se mantuvieron en cámara de cultivo con un deshumidificador a una temperatura de entre 24 °C y 28 °C.

### 3.2. Seguimiento de la sintomatología de la infección viroidal

Las plantas Rutgers y Pearson, parentales y *Never ripe*, se examinaron visualmente para evaluar la gravedad y el desarrollo de la enfermedad, durante las tres semanas posteriores a su inoculación con CEVd usando la siguiente escala de sintomatología: sin síntomas, leve, moderado, severo y muy severo (López-Gresa et al., 2016). Si la planta infectada con el viroide no presenta sintomatología se le asigna el valor 0. El valor 1, corresponde a una sintomatología leve, es decir, el inicio de los síntomas. Un valor 2, cuando el arrugamiento de los folíolos de la 3ª y 4ª hoja es considerable. En el momento que se inicia la ralentización del crecimiento vegetativo se le asigna un valor 3. El valor 4 representa el colapso de la planta.

### 3.3. Toma de muestras

La recogida de muestras se llevó a cabo en tres momentos diferentes del desarrollo de la infección: 1, 2 y 3 semanas después de la inoculación viroidal. Se tomaron muestras de la tercera y cuarta hoja de plantas que mostraron síntomas de la infección y sus correspondientes controles. El material se congeló inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, se pulverizó a un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm en nitrógeno líquido con un molino mezclador MM400 Retsch™ y se almacenó a -80 °C.

Adicionalmente, para el análisis del etileno producido, se pesaron 0,5 g de la quinta y sexta hoja en viales de vidrio de 4 mL herméticamente cerrados con *septum* de goma y se mantuvieron durante 4 h a temperatura ambiente para permitir difundir el gas etileno en su interior.

## 4. MEDIDAS DE ETILENO

Para llevar a cabo el análisis de etileno se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 4890A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con una columna capilar Teknokroma (2 m x 1 mm DI, Alumina F1 80/100).

Se tomó 400 µl de fase gaseosa y se inyectó en la columna que está en un horno a 80 °C. El gas portador era helio con una presión de 140 kPa. Las temperaturas del inyector y el detector se ajustaron a 200 °C. El tiempo de retención del compuesto en estas condiciones fue de 2,5 minutos. Se calculó la cantidad de etileno a partir de los datos registrados y analizados con el software Masslynx Waters construyendo una curva patrón con el compuesto, de la cual se obtuvo una ecuación que relacionó el área del pico de etileno con la cantidad de etileno (nL/g) producido por la planta.

## 5. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 5.1. Extracción de RNA total de plantas

La extracción de RNA de los tejidos vegetales se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se homogeneizó 100 mg de material vegetal en 1 mL de TRIzol y, tras obtener el sedimento de RNA, éste se disolvió en 100  $\mu$ L de agua Milli-Q estéril tratada con DEPC. Para su cuantificación se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000.

Los RNA que iban a ser sometidos a análisis por RT-PCR cuantitativa se sometieron a una purificación extra mediante precipitación, agregando un volumen de LiCl 6 M. Tras incubar en un baño de hielo durante 3 horas, los precipitados de RNA se recuperaron por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min, se lavaron con LiCl 3 M y se disolvieron en agua libre de RNasa, ajustándose a una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Para eliminar el DNA genómico, se utilizó el *kit* TURBO DNasa (Ambion, Austin, TX, Estados Unidos) a razón de 2 U por  $\mu$ L de RNA.

### 5.2. Reacciones de amplificación semicuantitativa (RT-PCR) y cuantitativa (qRT-PCR)

Para la transcripción reversa, se sintetizó una hebra de cDNA a partir de 1  $\mu$ g de RNA total obtenido de los tejidos de tomate y el *kit* de reactivos *PrimeScript* RT (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se añaden 0,25  $\mu$ L del oligonucleótido (dT)<sub>18</sub> Primer preparado a 50  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ L de los *RANDOM PRIMERS*, 0,5  $\mu$ L del enzima Transcriptasa Reversa (*PrimeScript* RT enzymeMix I), 2  $\mu$ L de tampón de reacción 5X (*PrimeScript* Buffer) y agua DEPC hasta un volumen de 10  $\mu$ L. Después de agitar, se incuba la solución a 37 °C durante 15 min y posteriormente se inactiva el enzima calentando a 85 °C durante unos segundos. Antes de almacenar a -20 °C las muestras de cDNA obtenido, se diluyen 1:10 con H<sub>2</sub>O-DEPC.

Las RT-PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ L, empleando en cada reacción 1  $\mu$ L de la reacción de RT, 1  $\mu$ L de cada cebador, 1  $\mu$ L de dNTPs 2,5 mM, 2,5  $\mu$ L de tampón de reacción 10X y 0,5  $\mu$ L unidades de DNA polimerasa (Netzyme, NEED). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 min de desnaturalización a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de apareamiento a 56,35 °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 2.

**Tabla 2.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa.

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>CEVd</i>	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG	CCGGGATCCCTGAAGGACTT
<i>RPL2</i>	GGTGACCGTGGTGTCTTTGC	ACCAACGTTTTGTCCAGGAGGT

La qRT-PCR se realizó como se describió anteriormente en (Campos et al., 2014), en un volumen de reacción de 10  $\mu$ L en placas de 96 pocillos MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate (Applied Biosystems) utilizando SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La amplificación fue monitorizada de manera continua con el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Life Technologies). Como gen de referencia endógeno para todos los experimentos se utilizó el gen de la actina. Por cada par de cebadores se incluyó un control negativo que no contuviera cDNA. Se realizaron tres réplicas técnicas en todos los ensayos. Los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
<i>PR1</i>	ACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCA	AGTAAGGACGTTGTCCGATCGAGT
<i>SINAC082</i>	TGCTGAAACCATTGGAACTG	CCAAGGAATTGCTTCCAAAA
<i>ACS</i>	GATGGACTTTGCGTCCACTTT	GATCCAGGCGAGACGTTAAG
<i>ACO</i>	TGTCCTAAGCCCGATTTGAT	TTGAGGAGTTGAAGGCCACT
<i>Actin</i>	CTAGGGTGGGTTTCGCAGGAGATGATGC	GTCTTTTTGACCCATACCCACCATCACAC
<i>CEVd</i>	AGGAGCTCGTCTCCTTCTT	CACCGGGTAGTAGCCAGAAG

## 6. HIBRIDACIÓN NORTHERN BLOT

Para detectar la presencia de CEVd en las preparaciones de ribosomas totales, se desnaturalizaron 15  $\mu$ g de las muestras de RNA total extraídas de plantas de 3 semanas post-inoculación, calentándolas a 65 °C durante 15 minutos usando 4 volúmenes de tampón de muestra (formamida al 50% , formaldehído al 6% en MOPS 200 mM, acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM, pH 7), separando los RNAs por electroforesis en gel de agarosa preparado en MOPS 200 mM , 50 mM acetato de sodio y 10 mM EDTA a pH 7, conteniendo un 1,5% de formaldehído.

Los RNAs se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon Hybond-XL (Amersham, GE Healthcare Life Science) mediante sistema semi-seco. Una vez transferidos, se fijaron los RNAs a la membrana empleando un entrecruzador ultravioleta Vilber-Lourmat BLX-254. La detección específica se realizó mediante hibridación con la sonda mostrada en la Tabla 4. Para preparar la sonda marcada en un volumen final de 50  $\mu$ L, se añaden 37  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 5  $\mu$ L de tampón 10x de polinucleótido quinasa (PNK), 2  $\mu$ L de enzima PNK, 2  $\mu$ L del

oligo de la sonda (Tabla 4) y 4  $\mu\text{L}$  del nucleótido [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP. Se dejó actuar al enzima durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se inactivó con una incubación a 65 °C durante 5 min. Para la eliminación de los nucleótidos no incorporados a la sonda, esta se filtró en gel, mediante la utilización de columnas Mini Quick Spin (Roche).

La prehibridación, la hibridación y los lavados se llevaron a cabo según procedimientos descritos en nuestro laboratorio (Cottilli et al., 2019). Las membranas se prehibridaron con 50 mL de solución de hibridación (15 mL de tampón SSPE (20X), 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M, 1 mL de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  1 M, 900  $\mu\text{L}$  de DNA de esperma de salmón, 25 mg de leche desnatada en polvo, SDS al 10% y agua DEPC hasta volumen final) durante 2 h a la temperatura de fusión del oligonucleótido correspondiente. Tras 24 h, se realizaron tres lavados con tampón SSC 2X a 95 °C durante 10 min. La membrana húmeda, envuelta en *film* de poliuretano, se empleó para impresionar películas de rayos X, manteniendo la exposición el tiempo adecuado a -80 °C antes de su revelado.

Para cuantificar la intensidad de las bandas aparecidas en las autorradiografías, se empleó el programa de análisis de imagen ImageJ (“ImageJ,” 2020).

**Tabla 4.** Sonda utilizada para el análisis *Northern*.

Nombre	Sonda (5'-3')
p2	GAGCGCGGCAGTCATTCGCAAGGAGCATTC

## 7. EXTRACCIÓN Y ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS FOLIARES EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS/PAGE)

Para preparar los extractos de proteína se partió de hojas de tomate infectadas con CEVd y sus correspondientes controles no inoculados. Empleando un mortero, se homogeneizó 0,3 g de tejido foliar congelado a -80 °C y pulverizado, en 1 mL de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), que contenía 15 mM de 2-mercaptoetanol. El homogeneizado se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 12000 rpm 10 minutos a 4 °C. Se tomó 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a los que se añadió 250  $\mu\text{L}$  de tampón de carga de SDS/PAGE 3X. La mezcla se hirvió a 95 °C durante 7 min para provocar la desnaturalización de las proteínas, y se aplicaron 35  $\mu\text{L}$  de muestra por carrera, en geles de poliacrilamida al 14%, tal y como se describe en (Laemmli, 1970). Se cargó, además, un marcador de peso molecular (PageRuler, Fermentas) para la posterior identificación de las bandas proteicas. La electroforesis se desarrolló a 40 mA durante 2-3 horas en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM con SDS al 0,1%.

Finalizado el proceso, los geles se tiñeron con una solución colorante (Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) al 0,05%, en ácido acético al 10% e isopropanol al 20%) durante varias horas y se destiñó con solución decolorante (10% de ácido acético y 10% de isopropanol), manteniendo en agitación durante varias horas hasta eliminar la tinción de fondo.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El programa IBM SPSS Statistics 25 se utilizó para todos los análisis estadísticos. Los datos de un experimento representativo de tres ensayos independientes se utilizaron para realizar análisis estadísticos. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

El análisis estadístico utilizado para comparar dos tipos de muestras independientes se llevó a cabo mediante una prueba no paramétrica (para variables no normales) de Mann-Whitney.

Para analizar la normalidad de las muestras se utilizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Los análisis estadísticos en los que se efectúan comparaciones entre múltiples grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza (Kruskal-Wallis).



*Resultados*  

---

*y Discusión*



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE ETILENO *Nr* FRENTE A LA INFECCIÓN POR CEVd

#### 1.1. Infección y estudio de la sintomatología

Se llevó a cabo la infección con CEVd de plantas *Nr* de los cultivares Rutgers y Pearson, así como sus correspondientes líneas parentales y se realizó la caracterización fenotípica del progreso de la infección viroidal.

La Figura 8 muestra plantas representativas de los mutantes *Nr* y sus correspondientes parentales, 20 días después de la inoculación con CEVd, observándose la diferencia de sintomatología de los mutantes en comparación con sus líneas parentales. La sintomatología viroidal, caracterizada por la reducción y arrugamiento de las hojas, enanismo y epinastia pronunciada (López-Gresa *et al.*, 2016), se aprecia con mucha más intensidad en los mutantes *Nr* que en sus correspondientes parentales.

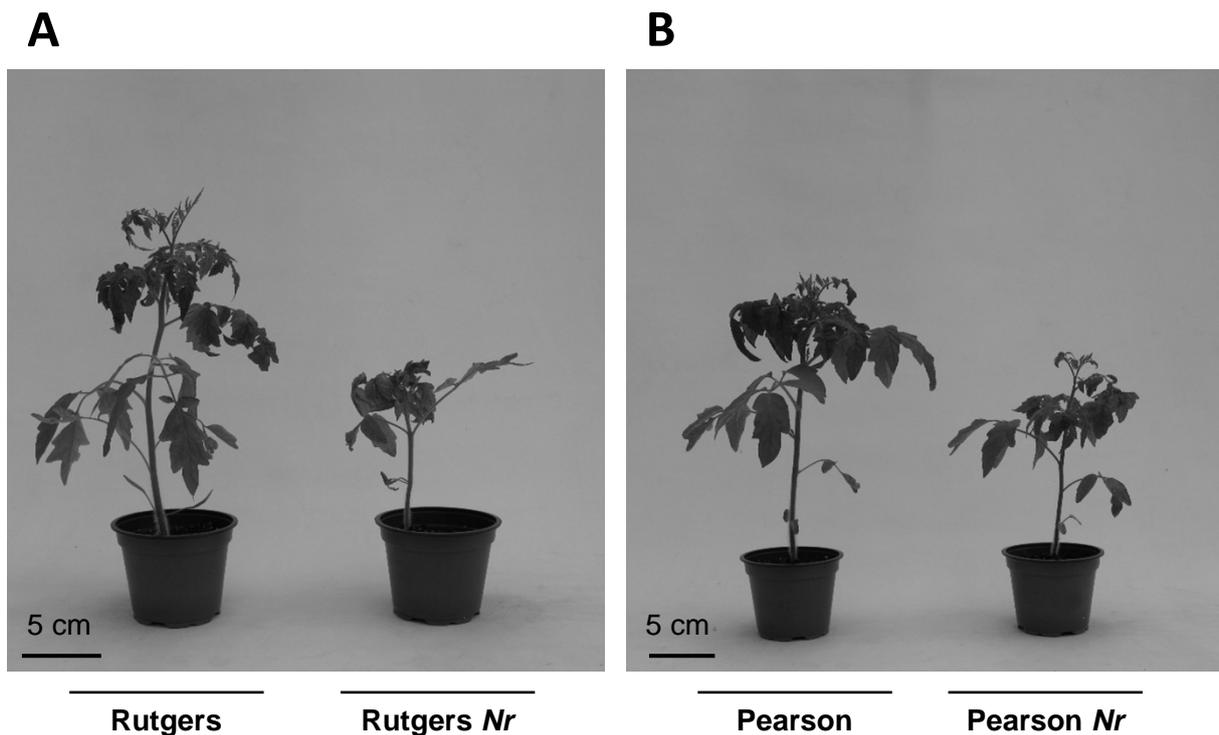
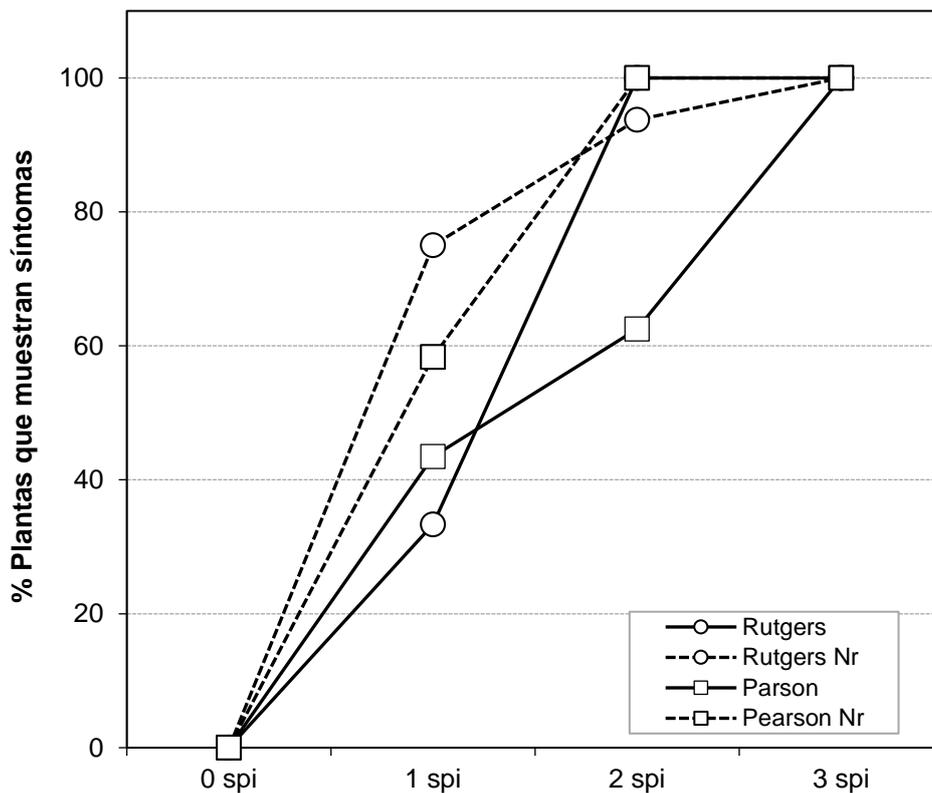


Figura 8. Comparación de los síntomas de la infección con CEVd (enanismo, epinastia, rugosidad) en plantas mutantes *Nr* y plantas parentales para el cultivar Rutgers (A) y Pearson (B).

Con el fin de mostrar gráficamente el desarrollo de la enfermedad, se llevó a cabo un seguimiento de la aparición de dichos síntomas en mutantes *Nr* y sus correspondientes

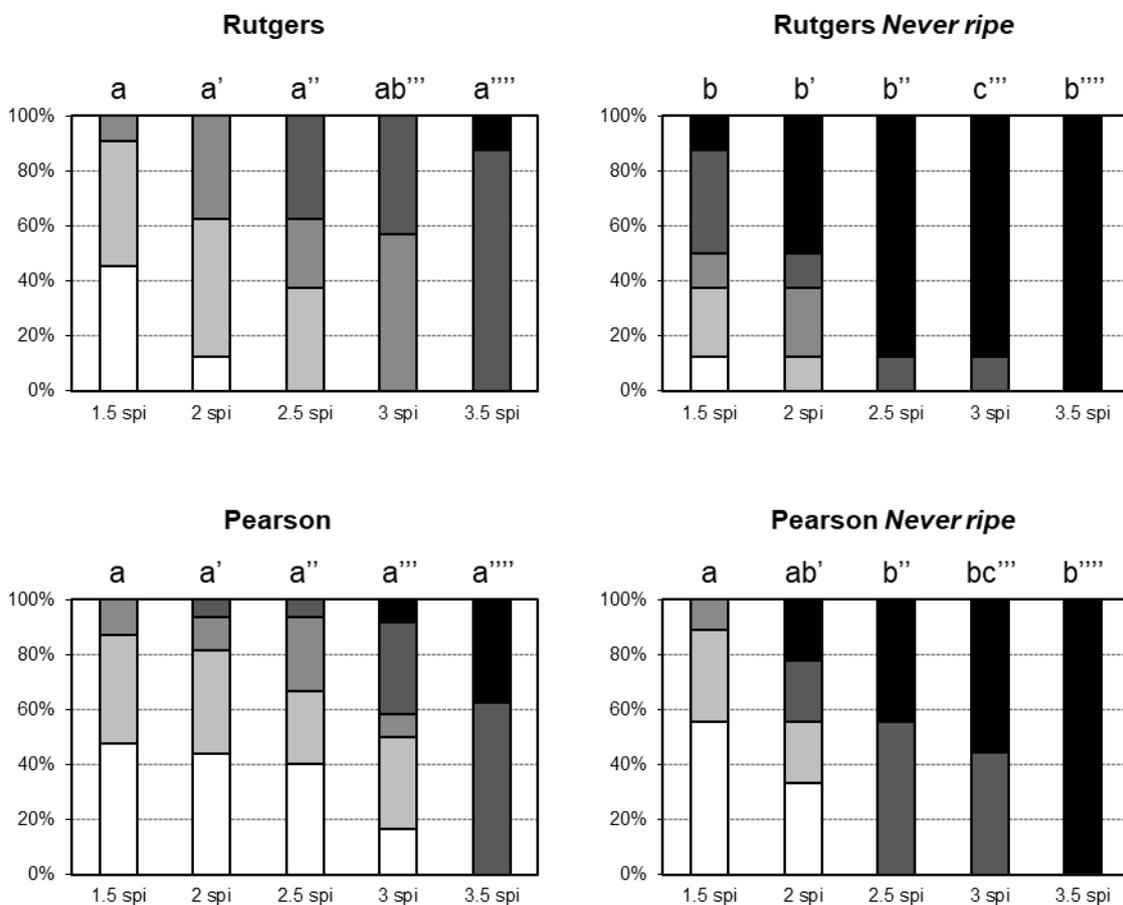
líneas parentales. La Figura 9 muestra el porcentaje de plantas que presentan síntomas tras la infección con CEVd a lo largo del experimento. En la primera semana post-inoculación, se observó una aparición acelerada de los síntomas en los mutantes *Nr* de ambos cultivares frente a sus correspondientes fondos genéticos. Se observaron diferencias claras entre Rutgers y Pearson *Nr*, que presentaron un 80% y un 60% de plantas con sintomatología, respectivamente. Únicamente el 40% de las plantas parentales mostraron síntomas viroidales a este tiempo. En la segunda semana post-inoculación el cultivar Pearson ya presentó síntomas en el 100% de los mutantes *Nr* frente a un 60% de las parentales. A las 3 semanas después de la inoculación los síntomas aparecieron en todas las plantas infectadas con CEVd. El mayor porcentaje de plantas con síntomas en los mutantes del cultivar Rutgers con respecto a Pearson en la primera semana, así como la diferencia observada entre los dos parentales a la segunda semana parecen estar indicando que el cultivar Rutgers presenta una mayor susceptibilidad frente a la infección.



**Figura 9. Desarrollo de la enfermedad en plantas *Never ripe* de los cultivares Rutgers y Pearson (línea discontinua), así como sus correspondientes líneas parentales (línea continua) infectadas con CEVd. Evolución del número de plantas de tomate que muestran síntomas de infección a las semanas post-inoculación (spi) indicadas. Los datos corresponden a un experimento representativo.**

Como complemento al porcentaje de plantas infectadas mostradas en la Figura 9, se realizó un estudio de la severidad de los síntomas para comprobar la agresividad de la infección en las plantas mutantes frente a las parentales. Los resultados mostrados en la Figura 10 fueron analizados estadísticamente (ver Materiales y Métodos).

Una semana y media después de la inoculación (1.5 spi) se observaron diferencias significativas en las plantas Rutgers *Nr* frente al resto de los cultivares. Los síntomas más severos ya eran evidentes en el 12,5% de las plantas. Las diferencias se mantienen en las 2 spi entre Rutgers *Nr* y los parentales, mostrando las plantas Pearson *Nr* una severidad de los síntomas mayor que su correspondiente parental, pero inferior a la observada en los mutantes Rutgers *Nr*, aunque sin diferencias significativas. Las diferencias entre mutantes *Nr* y parentales fueron más pronunciadas a partir de las 2.5 spi. En ese momento la mayoría de las plantas *Nr* exhibieron significativamente síntomas muy severos, mientras que las parentales no presentaron síntomas similares. A las 3 spi las plantas Pearson mostraron globalmente menor severidad de síntomas que las plantas Rutgers, tanto en la línea parental como en los mutantes, ya que el 50% de las plantas parentales se encontraban con síntomas leves (33%) e incluso no mostraban sintomatología alguna (17%). Al acabar el experimento, todas las plantas mutantes mostraron un colapso total, mientras que la mayoría de parentales únicamente manifestaron síntomas severos.



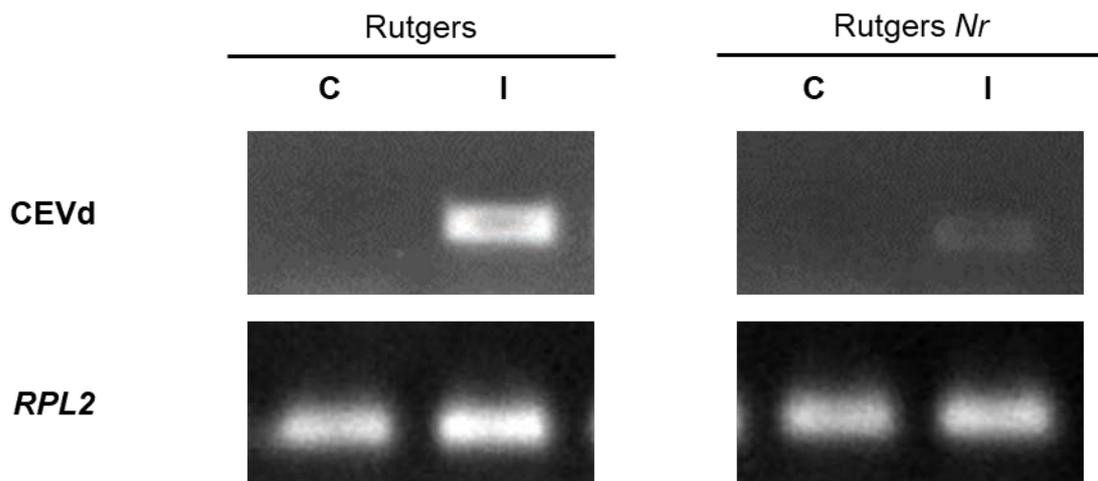
**Figura 10. Severidad de los síntomas en plantas Rutgers y Pearson infectadas con CEVd.** Los datos de sintomatología se recogieron a las 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 semanas post-inoculación (spi) mediante la siguiente escala: sin síntomas (blanco), leve (gris claro), moderado (gris), severo (gris oscuro), muy severo (negro). Los datos corresponden a un experimento representativo. Se realizó un análisis Kruskal-Wallis; las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos. El experimento se repitió 3 veces.

Los resultados confirman la mayor susceptibilidad de las plantas mutantes *Nr* a la infección con CEVd, ya que presentan mayor porcentaje de plantas con síntomas desde el inicio del experimento (Figura 9) y mayor severidad de dichos síntomas que las plantas parentales (Figura 10). A su vez, las plantas del cultivar Rutgers, tanto su fondo genético como los mutantes, parecen mostrar mayor susceptibilidad a la infección, ya que presentan mayor número de plantas infectadas en las primeras semanas del experimento (Figura 9) y mayor severidad de los síntomas a lo largo del experimento (Figura 10).

### 1.2. Cuantificación del viroide

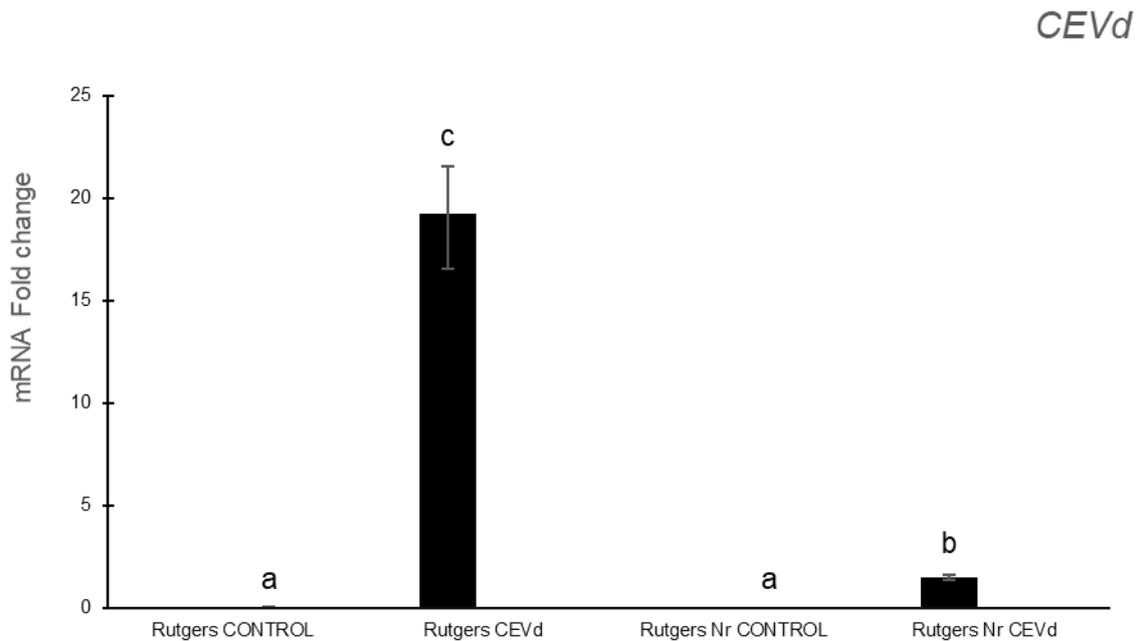
Para estudiar la acumulación del viroide en los tejidos de plantas infectadas con CEVd, se analizó la presencia del viroide mediante RT-PCR y qRT-PCR (ver Materiales y Métodos).

Empezando por el cultivar Rutgers, en la Figura 11 se puede observar la presencia del viroide en todas las plantas infectadas analizadas, encontrándose sorprendentemente mayor cantidad de viroide en plantas Rutgers que en plantas Rutgers *Nr*, a pesar de que la severidad de los síntomas sea menor (Figura 10).



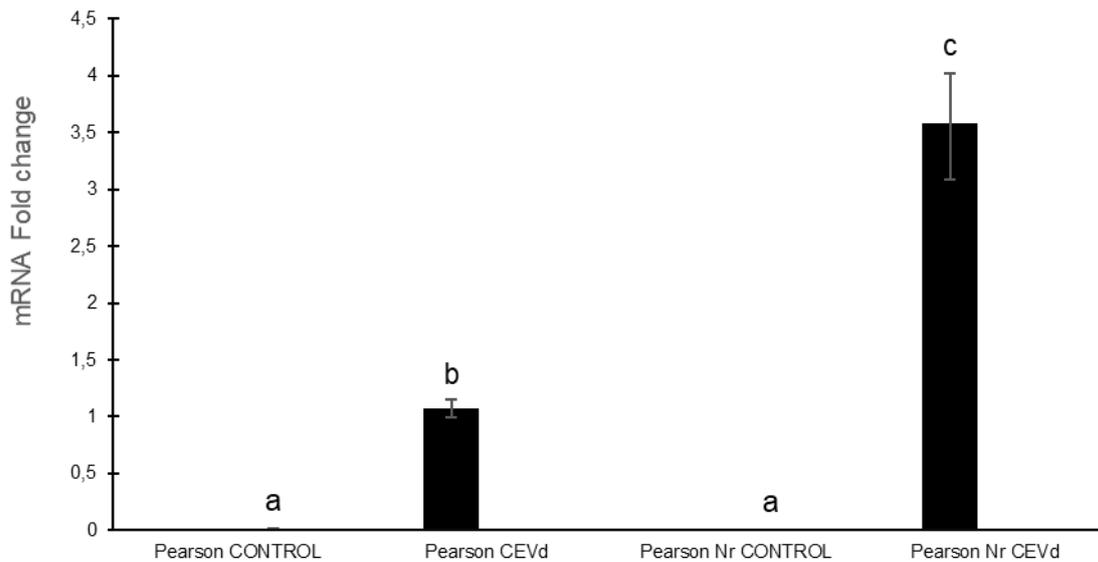
**Figura 11. Acumulación del transcrito de CEVd en plantas Rutgers y Rutgers *Nr*.** Se muestra el análisis electroforético del resultado de la amplificación del transcrito de CEVd mediante RT-PCR a partir de RNAs de plantas control (C) y plantas infectadas (I) a las 3 spi. El panel superior muestra los resultados de la amplificación empleando los cebadores específicos del CEVd. El siguiente corresponde a la amplificación del transcrito del gen *RPL2*, utilizado como control.

Para corroborar los resultados obtenidos por RT-PCR se llevó a cabo un análisis de la expresión génica del viroide mediante qRT-PCR, cuyos resultados se muestran en la Figura 12. Observamos una expresión significativamente mayor del transcrito del viroide en todas las plantas infectadas analizadas respecto a sus controles, y en el fondo genético respecto a Rutgers *Nr*, lo que se corresponde con lo observado en la Figura 11.



**Figura 12. Niveles de expresión del transcrito CEVd en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.** 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) de la primera semana post inoculación. Comparación entre medias de la expresión del transcrito de CEVd entre plantas infectadas Rutgers y Rutgers *Nr* en la tercera semana post inoculación. Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

El mismo análisis por qRT-PCR se llevó a cabo para las plantas del cultivar Pearson. Los resultados se muestran en la Figura 13. En este caso, las plantas mutantes acumulan de forma significativa más transcrito del viroide que las líneas parentales.



**Figura 13. Niveles de expresión del transcrito CEVd en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.** 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) de la primera semana post inoculación. Comparación entre medias de la expresión del transcrito de CEVd entre plantas infectadas Pearson y Pearson *Nr* en la tercera semana post inoculación. Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

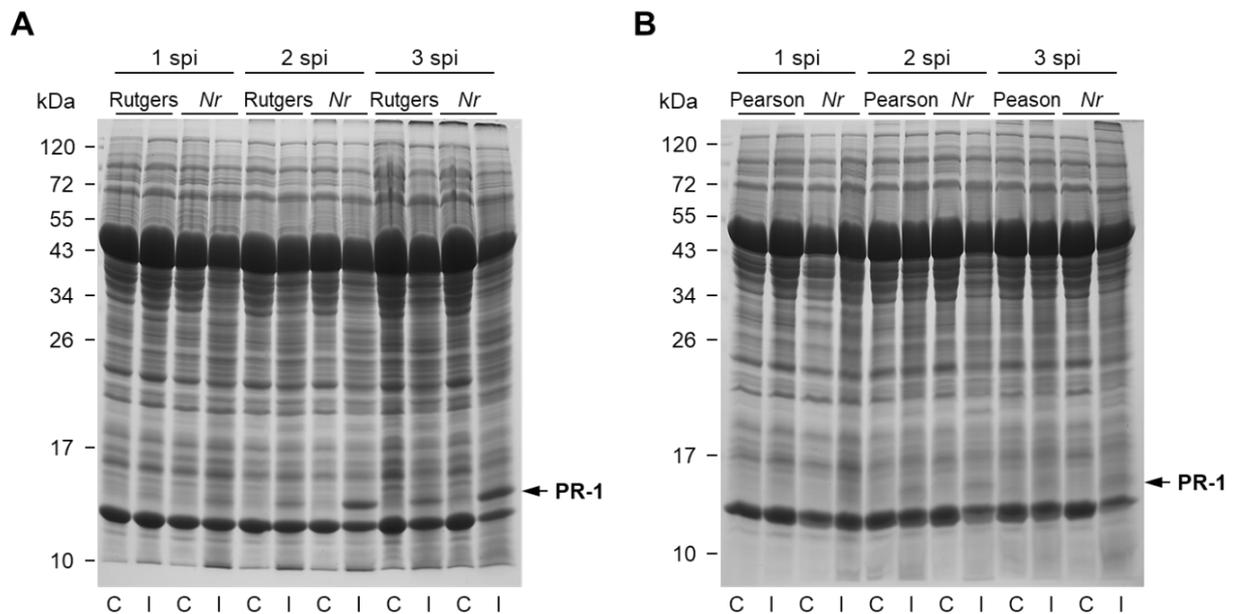
En relación con el estudio de sintomatología realizado anteriormente, las plantas del cultivar Rutgers presentan, curiosamente, mayor cantidad de viroide en la línea parental, a pesar de mostrar menor porcentaje de plantas infectadas y menor severidad de síntomas que sus mutantes *Nr*. El cultivar Pearson, sin embargo, sí acumula más viroide en las plantas mutantes *Nr*, correspondiéndose con la sintomatología observada. Esto sugiere que la sintomatología podría no estar asociada a la cantidad de transcrito de viroide acumulado en las plantas infectadas, tal y como ha sido descrito por otros autores (Gómez, Martínez and Pallás, 2008; López-Gresa *et al.*, 2016).

## 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MUTANTES DE ETILENO *Nr* FRENTE A LA INFECCIÓN POR CEVd

### 2.1. Análisis de la expresión de genes implicados en las rutas de señalización defensiva

Para caracterizar la respuesta bioquímica de la planta a la infección viroidal, se llevó a cabo un estudio de la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis y de la expresión de *PR1*, gen marcador clásico de defensa en plantas (Metzler, Cutt and

Klessig, 1991; van Loon, Rep and Pieterse, 2006), mediante SDS-PAGE y qRT-PCR, respectivamente (ver Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos de la acumulación de la proteína PR1 en las diferentes líneas estudiadas se muestran en la Figura 14.



**Figura 14. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas solubles de hojas de tomate infectadas con CEVd.** A la izquierda de cada imagen se muestra el marcador de masa molecular de proteínas (kDa). La flecha indica la proteína PR1 (14 kDa). Perfil proteico de hojas A) Rutgers y Rutgers *Nr* y B) Pearson y Pearson *Nr* durante 1, 2 y 3 semanas post inoculación (spi).

Para el cultivar Rutgers, se observa mayor acumulación de proteína PR1 a medida que avanzan las semanas post inoculación (Figura 14A). Además, los mutantes *Nr* acumulan más proteína PR1 que la línea parental a medida que progresa la enfermedad. En el caso del cultivar Pearson, no se puede observar una diferencia clara en la acumulación de proteína PR1 al avanzar la enfermedad, aunque parece percibirse una mayor acumulación para el mutante en la tercera semana post inoculación (Figura 14B).

Se llevó a cabo un análisis más sensible de la expresión del gen *PR1* para ambos cultivares mediante qRT-PCR. Los resultados se muestran en la Figura 15.

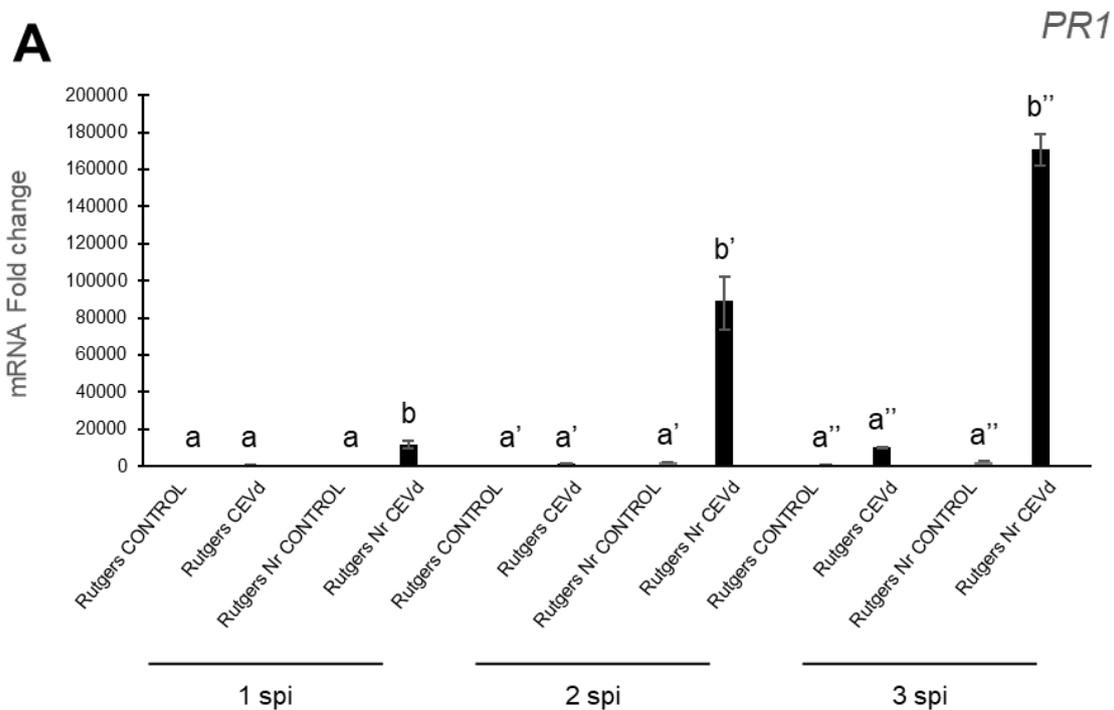
Se observó que el transcrito de *PR1* se acumuló de manera significativa en los mutantes *Nr* de ambos cultivares frente a sus correspondientes parentales para las tres semanas analizadas. A lo largo del experimento, se produjo un aumento exponencial de la expresión de *PR1* en las plantas mutantes. Estos datos se corresponden con el aumento de la severidad de los síntomas observado en el fenotipado (Figura 10), esto parece indicar una mayor susceptibilidad a la enfermedad en los mutantes frente a sus parentales.

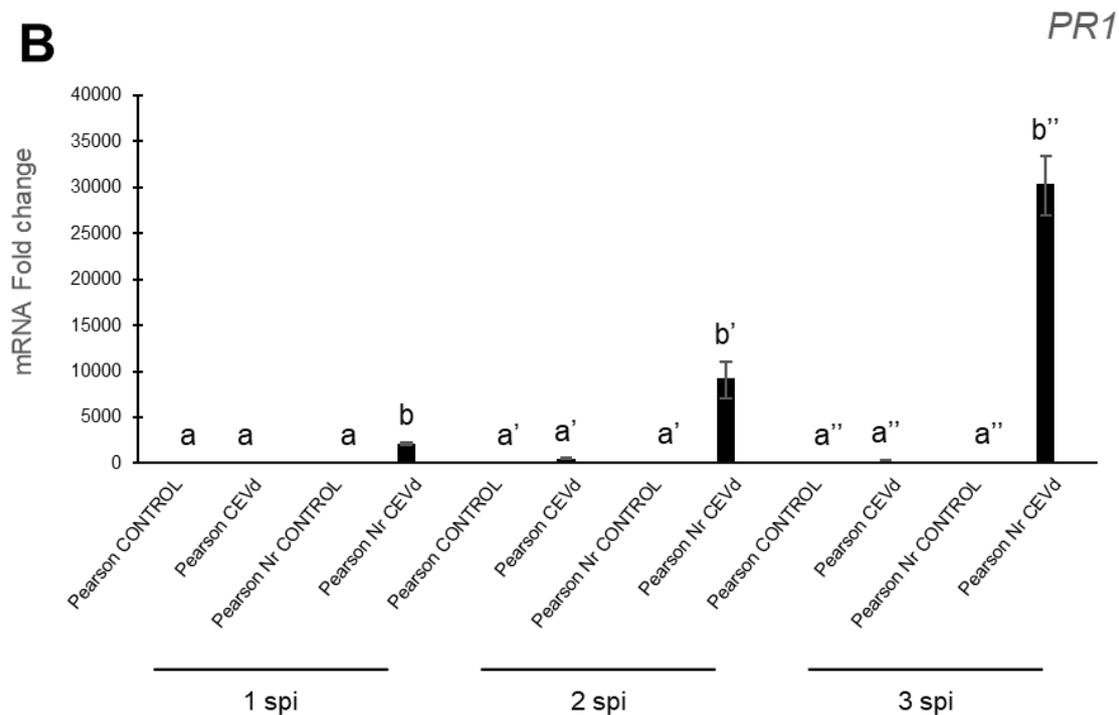
También se observó una expresión significativamente mayor a partir de la segunda semana en las plantas *Nr* del cultivar Rutgers frente a las Pearson, lo cual sugiere una hipersusceptibilidad de las primeras. En términos globales, la acumulación de transcrito de *PR1* es mayor en el cultivar Rutgers, lo que correlaciona con los niveles de proteína observados (Figura 14).

Así pues, hemos observado que los mutantes *Nr* en cualquiera de los dos fondos Rutgers o Pearson presentan una mayor susceptibilidad al CEVd, que correlaciona con una mayor acumulación de PR1. Resultados similares en los que la mayor acumulación de PR correlaciona con la hipersusceptibilidad han sido descritos por nuestro grupo de investigación (López-Gresa *et al.*, 2016).

PR1 es una proteína de defensa que presenta diversas isoformas inducidas por SA y ET (Tornero *et al.*, 1997). Debido a que las plantas *Nr* tienen truncada la respuesta a ET, se puede deducir que la expresión de esta proteína en los mutantes es debida a la isoforma ácida regulada por SA. Esta isoforma es un marcador de respuesta sistémica a patógenos (Tornero *et al.*, 1997).

En relación con la sintomatología estudiada anteriormente, los mutantes *Nr*, que presentan mayor severidad de síntomas, también muestran más activación de la respuesta sistémica a la infección por CEVd, lo que se corresponde con una mayor susceptibilidad al mismo.

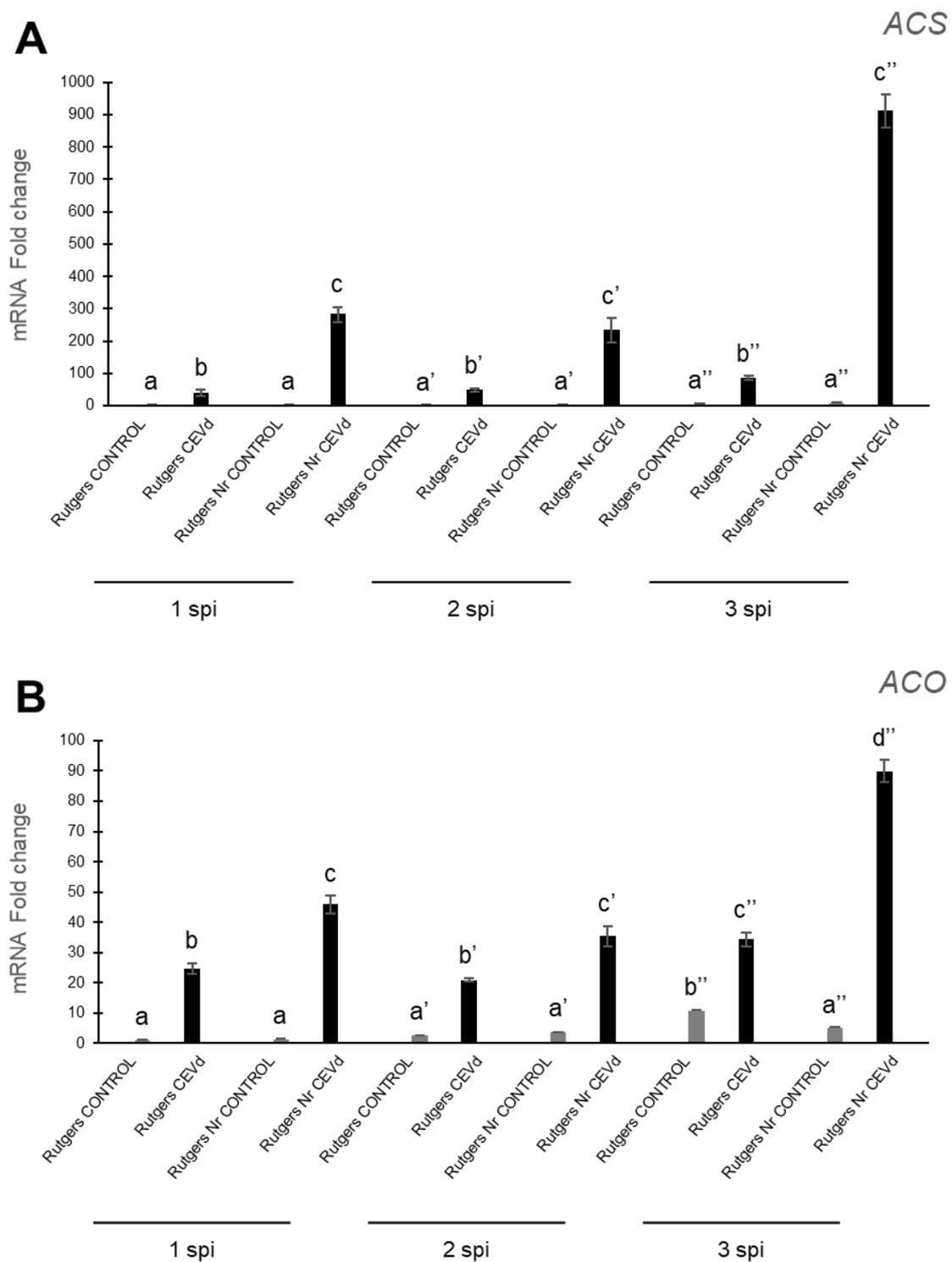




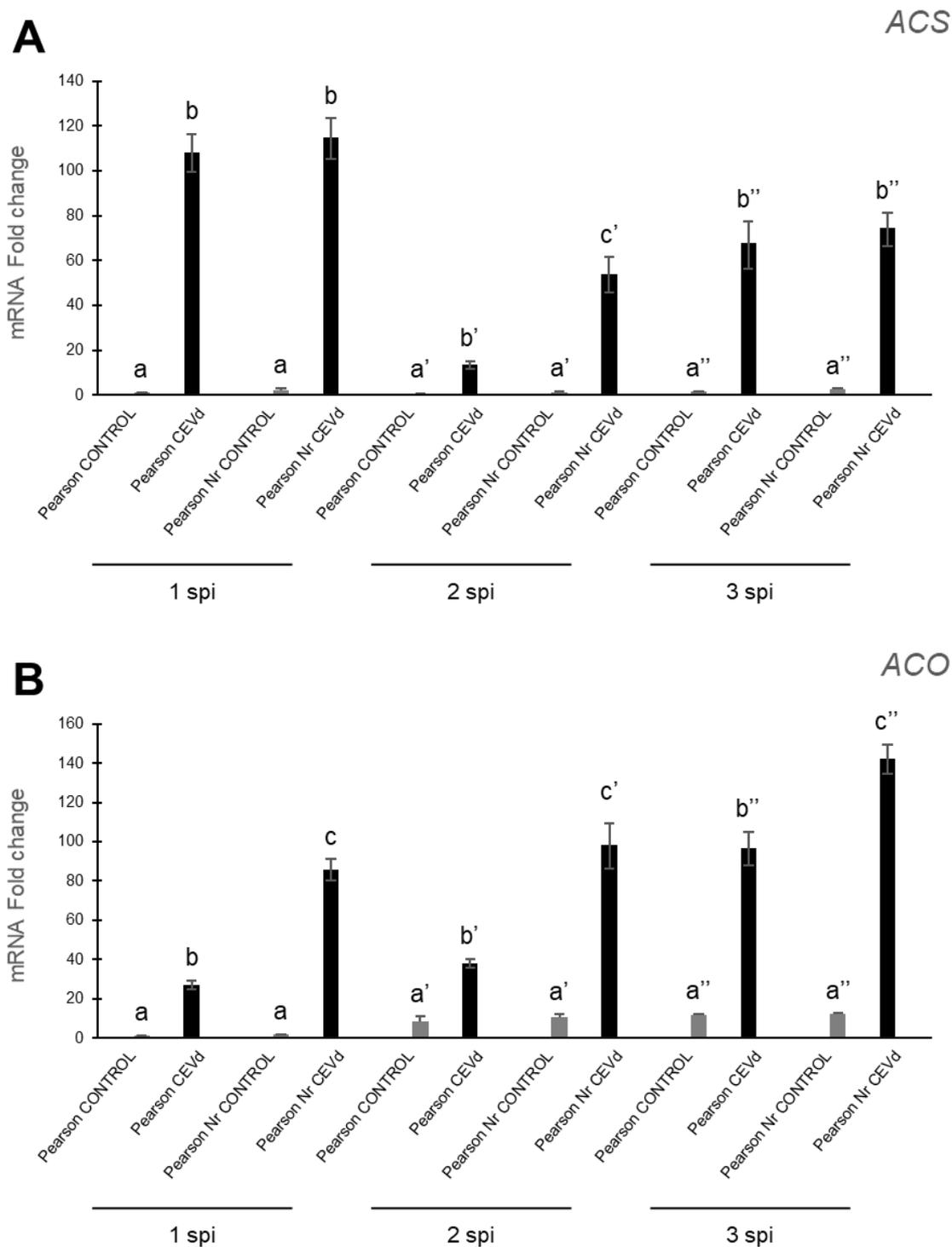
**Figura 15. Niveles de expresión del transcrito *PR1* en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.** Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión de la actina, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas no infectadas (control) de la primera semana post inoculación. Comparación entre medias de la expresión del transcrito de *PR1* entre plantas A) Rutgers y Rutgers *Nr* y B) Pearson y Pearson *Nr* durante una, dos y tres semanas post inoculación (spi). Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

## 2.2. Análisis de la expresión de genes implicados en la ruta de biosíntesis de ET

Para investigar si el etileno está involucrado en la respuesta a la infección por viroide en plantas de tomate, se cuantificó la expresión del gen que codifica el enzima ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), enzimas implicados en la ruta de biosíntesis del etileno (Sun *et al.*, 2017). Los resultados se pueden observar en las Figuras 16 y 17.



**Figura 16. Niveles de expresión del transcrito ACS y ACO en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.** 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) de la primera semana post inoculación. Comparación entre medias de la expresión del transcrito de A) ACS y B) ACO entre plantas Rutgers y Rutgers Nr durante una, dos y tres semanas post inoculación (spi). Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.



**Figura 17. Niveles de expresión del transcrito ACS y ACO en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.** 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) de la primera semana post inoculación. A) Comparación entre medias de la expresión del transcrito de A) ACS y B) ACO entre plantas Pearson y Pearson *Nr* durante una, dos y tres semanas post inoculación (spi). Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

Por lo que respecta a la expresión de *ACS* y *ACO* para las plantas infectadas del cultivar Rutgers, se observa una diferencia de expresión entre los mutantes y las líneas parentales durante las tres semanas post inoculación, siendo significativamente mayor en los mutantes *Nr* para todos los tiempos. Así mismo, en la tercera semana post inoculación se produce un incremento muy significativo en la expresión de estos genes en el mutante *Nr*.

En cuanto a la expresión de *ACS* en el cultivar Pearson, a pesar de que no se observaron diferencias significativas entre los mutantes *Nr* y los parentales en la primera y tercera semana, sí se observa una mayor expresión significativa en los mutantes en la segunda semana post inoculación (Figura 17A). Además, la expresión de *ACS* es menor que en el cultivar Rutgers en todas las semanas.

La expresión de los transcritos de *ACO* en el cultivar Pearson observados en la Figura 17B, indican diferencias significativas entre el mutante y la línea parental a lo largo de todas las semanas post-inoculación, a diferencia de lo observado en la expresión de *ACS*.

Los niveles de expresión de *ACS* y *ACO* están relacionados, ya que corresponden con las actividades enzimáticas más importantes en la ruta de biosíntesis del etileno. *ACS* ha sido descrito como el enzima limitante en esta ruta y *ACO* también se considera un importante punto de regulación de la misma (Sun *et al.*, 2017).

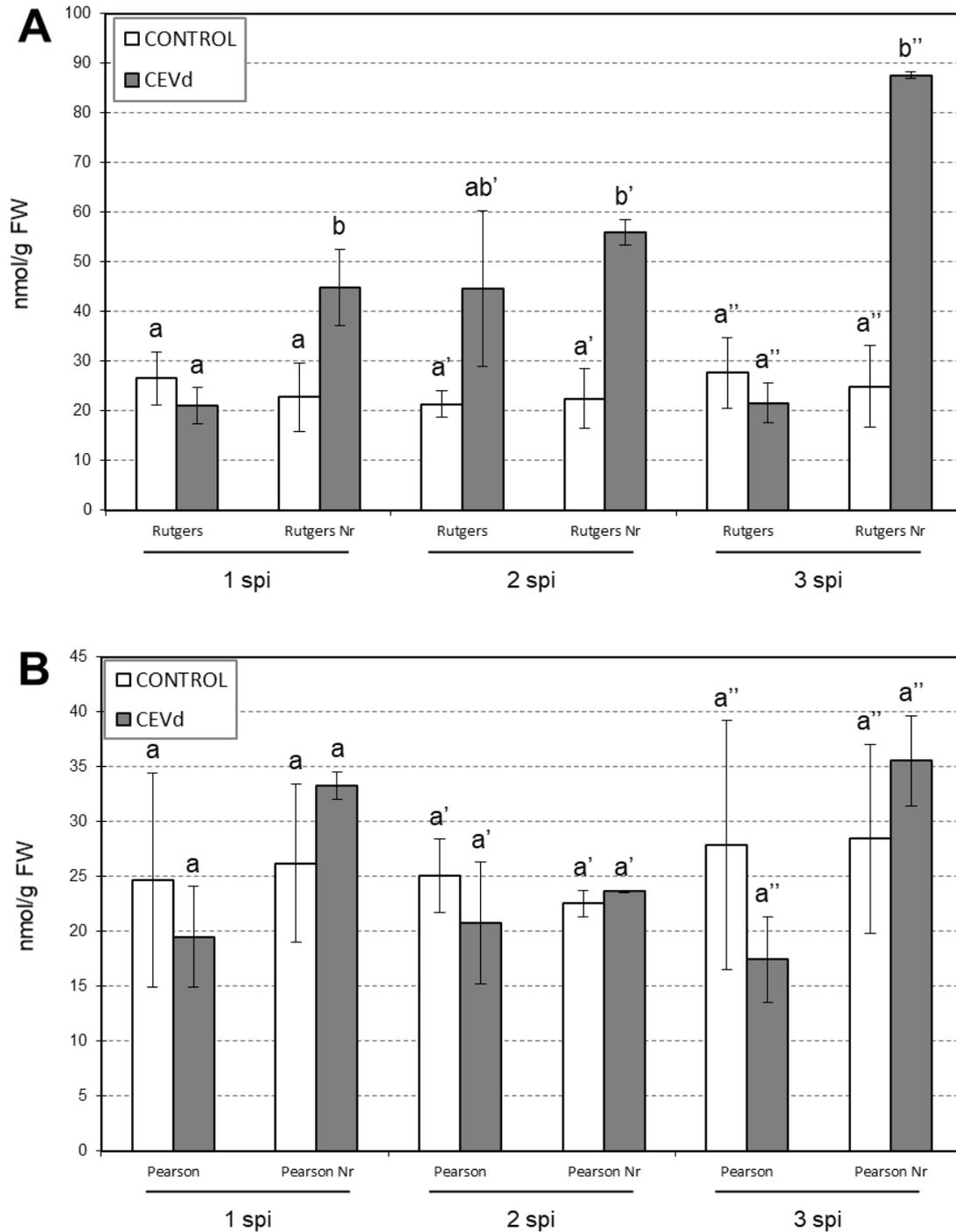
Esto sugiere una mayor síntesis de etileno en Rutgers *Nr* frente a sus líneas parentales en las tres semanas post-inoculación y especialmente en la tercera, ya que ambas actividades enzimáticas están significativamente más expresadas. Por su parte, el cultivar Pearson mostró diferencias de expresión de *ACO* entre mutantes y parentales, pero no de *ACS*. Dado que *ACS* es un enzima limitante de la síntesis de esta hormona, no se puede concluir que las plantas Pearson *Nr* produzcan más etileno que su parental.

### **3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS MUTANTES DE ETILENO *Nr* FRENTE A LA INFECCIÓN POR CEVd**

#### **3.1. Análisis de los niveles de etileno**

A partir del mismo material vegetal se midieron los niveles de etileno mediante GC-FID (ver Materiales y Métodos).

En los análisis de los niveles de etileno en hoja (Figura 18A) mediante GC\_FID se observaron en las plantas infectadas del cultivar Rutgers niveles significativamente superiores de acumulación de etileno en los mutantes frente a su línea parental en la primera y tercera semanas post-inoculación. Estos resultados correlacionan con las diferencias observadas en los niveles de expresión de *ACS* y *ACO* (Figura 16).



**Figura 18. Emisión del etileno emitido en hoja medido mediante GC-FID.** Los valores corresponden a la media y la desviación estándar de los niveles de etileno emitidos por las hojas del cultivar A) Rutgers y Rutgers Nr y B) Pearson y Pearson Nr durante una, dos y tres semanas post inoculación (spi). Se realizó un análisis Kruskal-Wallis; las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

Sin embargo, a pesar de que se observaron diferencias de expresión de estos genes entre los controles y las plantas infectadas en la línea parental Rutgers, no se han

observado diferencias significativas en los niveles de etileno en dichas plantas, mientras que sí se observan entre los controles e infectadas *Nr* (Figura 18A). Para el cultivar Pearson, no se observaron diferencias significativas en niveles de etileno para ninguna de las plantas frente a los controles ni entre plantas mutantes y parentales (Figura 18B).

La no emisión de etileno en plantas *Nr* del cultivar Pearson frente a sus parentales puede deberse a que no se produce una mayor expresión de ACS (Figura 17A), enzima limitante en la biosíntesis de esta hormona. Además, a pesar de que se observa una mayor expresión de ACS en plantas infectadas Pearson y Pearson *Nr* (Figura 17) frente a sus controles, estos niveles son muy inferiores a los observados en Rutgers, lo cual puede explicar la ausencia de acumulación de etileno en el cultivar Pearson.

Ha sido descrita con anterioridad la relación entre los niveles de etileno y el desarrollo de los síntomas por CEVd, pudiendo simularse dichos síntomas empleando etileno o compuestos que actúan de forma similar. Además, se ha descrito que estos síntomas dependen de la acumulación de etileno y no de la biosíntesis del mismo (Conejero and Granell, 1986).

Esto indica que los síntomas producidos en la infección con CEVd dependen del etileno y no del viroide, es decir, existe una correlación positiva entre el etileno y el desarrollo de los síntomas, también descrito en otro tipo de interacciones planta-patógeno (van Loon, Geraats and Linthorst, 2006; Jia *et al.*, 2013). Los resultados en el cultivar Rutgers muestran una mayor severidad de los síntomas en plantas con mayor acumulación de etileno (Rutgers *Nr*) (Figura 18) a pesar de la menor acumulación del viroide (Figura 12) y viceversa.

Se sabe, además, que a pesar de que altos niveles de etileno contribuyen a la severidad de los síntomas, niveles más bajos pueden frenar el avance del viroide (Conejero and Granell, 1986). Esto podría explicar la menor acumulación del viroide en plantas Rutgers *Nr* ya que acumulan más etileno.

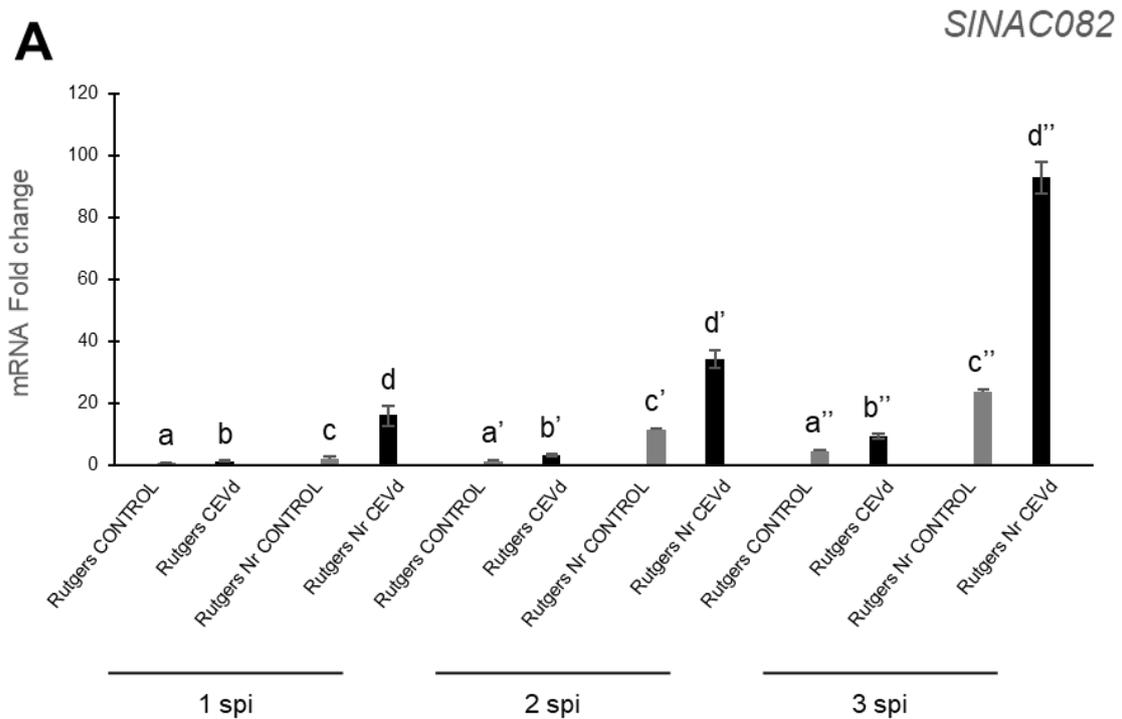
Sin embargo, en el cultivar Pearson los mutantes *Nr* tienen más cantidad de viroide que los parentales, pero ninguno muestra diferencias significativas para la acumulación de etileno. Además, es un cultivar mucho menos susceptible al viroide que Rutgers. Esto indica que debe haber otras vías implicadas en la defensa frente a la infección por CEVd que no han sido tenidas en cuenta en este estudio. Una posible vía sería la interferencia con los mRNAs del huésped por parte de los sistemas de silenciamiento del viroide (Hu *et al.*, 2011).

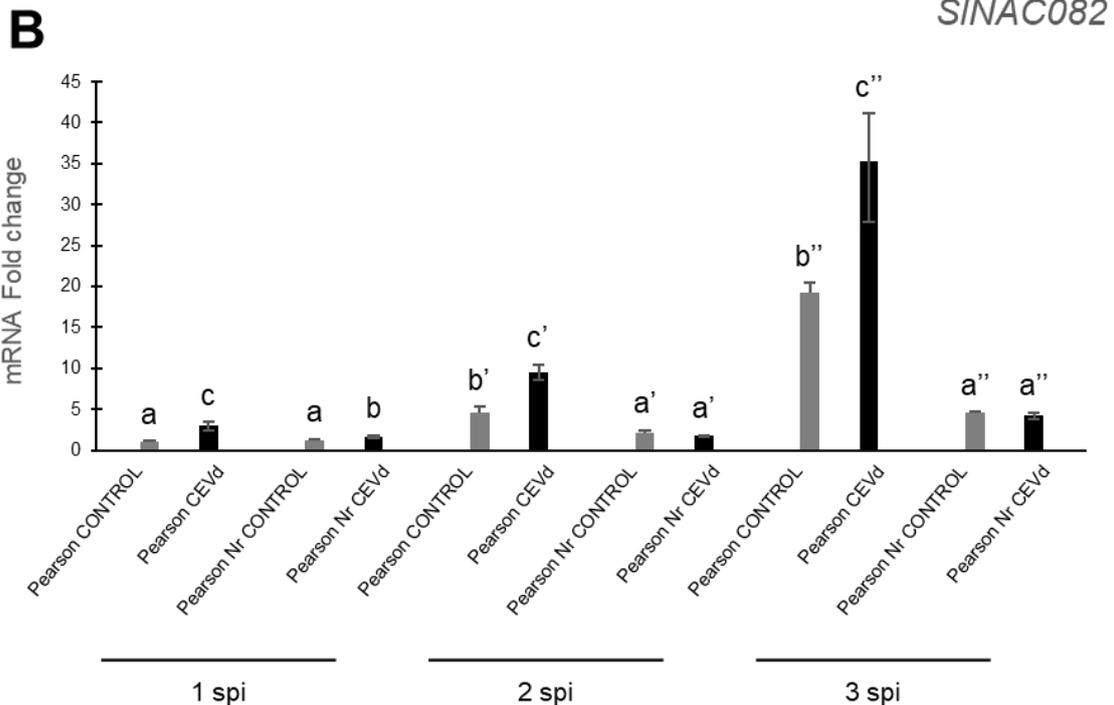
Estudios anteriores en nuestro laboratorio (López-Gresa *et al.*, 2016) también demostraron un aumento de la acumulación de etileno en ausencia de salicílico, lo que se corresponde a un antagonismo entre la vía de señalización del etileno/jasmónico frente a la del salicílico (O'Donnell *et al.*, 2001; Heck *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2013). En

este estudio mostramos la implicación del ET como un componente basal de susceptibilidad frente a los patógenos de RNA.

#### 4. ESTUDIO DEL ESTRÉS RIBOSOMAL

En nuestro laboratorio se ha descrito recientemente la posible relación entre el CEVd y la inducción del estrés ribosomal (Cottilli *et al.*, 2019), de forma que consideramos interesante estudiar la relación entre el estrés ribosomal y el resto de las variables analizadas en este estudio. Para comprobar si se produce dicho estrés en los cultivares Pearson y Rutgers y sus correspondientes mutantes, se examinó mediante qRT-PCR la inducción del gen marcador de la respuesta a estrés ribosomal *SINAC082* (Figura 19), y se realizó un análisis *Northern Blot* del cultivar Rutgers empleando la ribosonda p2 (Figura 20) (Cottilli *et al.*, 2019).





**Figura 19. Niveles de expresión del transcrito *SINAC082* en plantas infectadas y plantas control, determinadas por qRT-PCR.** 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) de la primera semana post inoculación. Comparación entre medias de la expresión del transcrito de *SINAC082* entre plantas A) Rutgers y Rutgers Nr y B) Pearson y Pearson Nr durante una, dos y tres semanas post inoculación (spi). Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

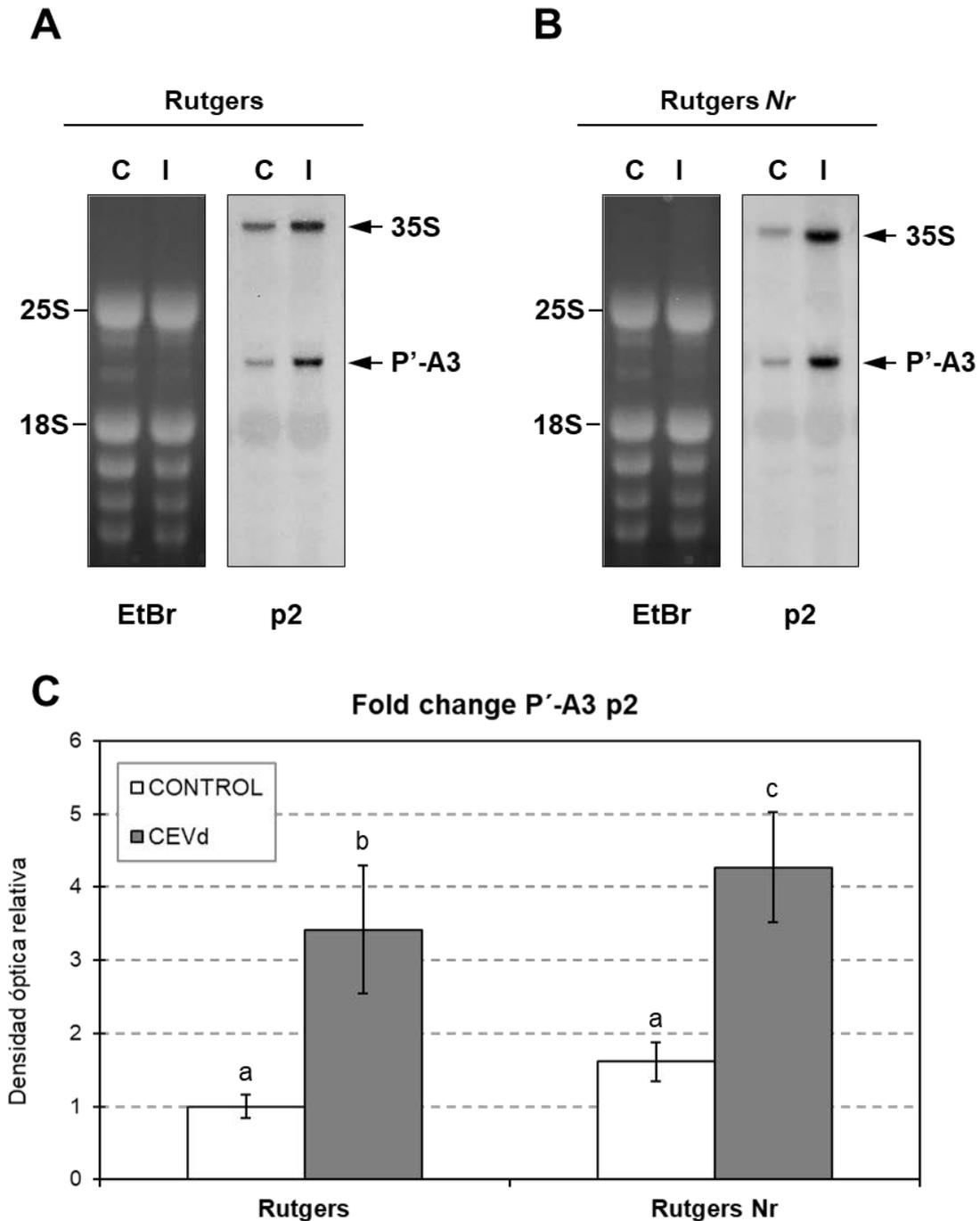
Se observa en primer lugar que todas las plantas analizadas presentan una inducción de *SINAC082* como consecuencia de la infección por CEVd, a excepción de las plantas Pearson Nr. Esto indica una inducción del estrés ribosomal causado por la infección y un comportamiento anómalo del cultivar Pearson debido a la mutación Nr, ya que su parental no mutado sí que exhibe una inducción del gen marcador de estrés ribosomal al ser infectado por CEVd.

Por otra parte, todas las plantas, tanto infectadas como no infectadas, muestran un incremento de la expresión de *SINAC082* a lo largo del tiempo, debido a que trata de un gen implicado en numerosos procesos del desarrollo y crecimiento de la planta (*AT5G09330(NAC082)*, 2020), a excepción, de nuevo, de las plantas Pearson Nr, que presentan un comportamiento totalmente anómalo.

Sorprendentemente, las plantas Rutgers Nr sin infectar (Figura 19A) muestran una mayor expresión significativa del gen *SINAC082* que la línea parental. Esto podría indicar un mayor estrés ribosomal en plantas mutantes Nr para este cultivar debido a la propia mutación.

Por el contrario, en el cultivar Pearson (figura 19B) la línea parental presenta un nivel de expresión de *SINAC082* significativamente mayor que las mutantes a lo largo de todas las semanas de infección. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos, se llevaron a cabo ensayos *Northern Blot* con RNAs totales preparados a partir de plantas de tomate Rutgers infectadas por CEVd, tanto de la línea parentale como del mutante *Nr*, incluyendo los controles correspondientes (Figura 20) tal y como se describe en Cottilli et al. (2019). En esta figura se observa una sobreacumulación estadísticamente significativa de la banda P'-A3 en plantas Rutgers y también en Rutgers *Nr* infectadas, con respecto a sus correspondientes controles sin infectar. Cottilli y colaboradores (2019) sugieren que esto podría ser provocado por algún tipo de impedimento en el sitio de corte p2, lo que resultaría en la generación de un RNA ribosomal 18S defectuoso, afectando de esta manera a la biogénesis de la subunidad 40S del ribosoma.

A su vez, se puede observar una mayor acumulación, estadísticamente significativa, de la banda P'-A3 en plantas *Nr* que en su fondo genético. Esto nos indica que la biogénesis del ribosoma 40S está más afectada en plantas infectadas frente a sus controles, e igualmente está más afectada en plantas Rutgers *Nr* en comparación con su fondo genético no mutado. Teniendo en cuenta el análisis fenotípico de la sintomatología, debe existir en estas plantas una correspondencia entre la sintomatología provocada por CEVd y los problemas de maduración del RNA ribosómico, como se describió previamente en (Cottilli *et al.*, 2019), ya que la intensidad de las bandas observadas en el análisis *Northern Blot* en plantas *Nr* infectadas por CEVd es superior a las correspondientes a plantas Rutgers parentales infectadas, las cuales muestran unos síntomas mucho menos acusados, como se puede apreciar en la Figura 8A.



**Figura 20. Alteración en el procesamiento del rRNA de plantas de tomate Rutgers y Rutgers Nr infectadas con CEVd.** El RNA de hojas de tomate de (A) Rutgers y (B) Rutgers Nr, control (C) e infectadas por CEVd (I) se separó en un gen de agarosa y formaldehído teñido con bromuro de etidio (izquierda) y se realizó un *Northern blot* con una ribosonda para el sitio de corte p2 (derecha). (C) Cuantificación de P'-A3. Se realizaron al menos 3 réplicas biológicas de plantas sin infectar (CONTROL) y de plantas infectadas (CEVd). Se representaron los valores relativos con respecto al control de Rutgers. Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

A modo de resumen, la Tabla 5 presenta los resultados obtenidos a lo largo del presente Trabajo Fin de Máster.

**Tabla 5. Influencia del cultivar en la infección por CEVd**

Cultivar	Síntomas	Cantidad de CEVd	ACS	ACO	Emisión de Etileno	Estrés ribosomal	Alteración procesamiento RNA
Rutgers	++	++++	+	+	-	+	++
Rutgers <i>Nr</i>	++++	+	++++	++	+++	++	+++
Pearson	+	+	+	++	-	+	NM
Pearson <i>Nr</i>	+++	++	+	+++	-	-	NM

(-) No hay diferencias respecto al control

(+) Hay diferencias respecto al control

NM: No medido

La patogenicidad es un proceso biológico complejo y la expresión de síntomas no viene únicamente especificada por el genoma del viroide, sino también por el del huésped (Sänger, 1982). Distintos cultivares pueden responder con distinta severidad de síntomas: muy severos (cv. Rutgers *Nr*), severos (cv. Pearson *Nr*), moderados (cv. Rutgers), leves (cv. Pearson). Sin embargo, los síntomas provocados por CEVd no parecen estar relacionados con la cantidad de viroide acumulada, sino con el etileno emitido.

Los factores de estrés ribosomal medidos parecen indicar el aumento de este frente a una infección del CEVd, posiblemente provocado por problemas en el procesamiento del RNA ribosómico. Todas las plantas infectadas muestran una inducción del marcador de estrés ribosomal *SINAC082*, y los análisis *Northern blot* realizados para plantas del cultivar Rutgers muestran una acumulación de RNA ribosómico sin madurar en plantas infectadas.

Las plantas Pearson *Nr*, sin embargo, presentan un comportamiento anómalo para la mayoría de los factores analizados, incluido el estrés ribosomal. Plantas Pearson *Nr* infectadas por CEVd presentan menor estrés ribosomal que sus fondos genéticos y no parece producirse una inducción de éste por la infección. La mutación *Nr* en este cultivar más bien parece conferir resistencia al estrés ribosomal provocado durante una infección por CEVd, y un futuro estudio de estas plantas podría producir resultados interesantes en la identificación de los factores relacionados con dicho estrés.

Centrándonos en la variedad Rutgers, de la que se dispone de todos los datos, podemos afirmar que la insensibilidad a etileno en los mutantes *Nr* infectados por CEVd lleva consigo una mayor susceptibilidad, mayor emisión de etileno, mayor estrés

Centrándonos en la variedad Rutgers, de la que se dispone de todos los datos, podemos afirmar que la insensibilidad a etileno en los mutantes *Nr* infectados por CEVd lleva consigo una mayor susceptibilidad, mayor emisión de etileno, mayor estrés ribosomal y mayor efecto sobre la biogénesis de ribosomas, indicando que el etileno juega un papel importante en el desarrollo de la sintomatología viroidal. Este cultivar, por tanto, se perfila como idóneo para la continuidad de nuestros estudios acerca de la implicación del etileno en la infección viroidal y el consiguiente estrés ribosomal asociado a la misma.

## *Conclusiones*

---



## CONCLUSIONES

- I. Los mutantes de tomate *Never ripe*, que presentan insensibilidad a etileno, exhiben una hipersusceptibilidad a la infección por CEVd, en comparación con su fondo genético, sugiriendo que la percepción de etileno juega un papel importante en el desarrollo de los síntomas viroidales.
- II. La sintomatología no parece estar asociada a la cantidad de viroide presente en las plantas infectadas, pero correlaciona en todos los casos con una mayor acumulación de PR1.
- III. Las plantas del cultivar Rutgers son más susceptibles al CEVd que las del cv. Pearson y muestran una correlación positiva entre la inducción de ACS y ACO, la producción de etileno, el estrés ribosomal y el desarrollo de los síntomas producidos en la infección con CEVd. Dicha correspondencia no ha sido encontrada en tomate Pearson, por lo que el cultivar Rutgers se perfila como idóneo para continuar con los estudios iniciados en este Trabajo Fin de Máster.



## *Bibliografía*

---



## BIBLIOGRAFÍA

- Adkar-Purushothama, C. R., & Perreault, J. (2019). Current overview on viroid-host interactions. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, (September), e1570. <https://doi.org/10.1002/wrna.1570>
- Aloni, R., Wolf, A., Feigenbaum, P., Avni, A., & Klee, H. J. (1998). The Never ripe Mutant Provides Evidence That Tumor-Induced Ethylene Controls the Morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens* -Induced Crown Galls on Tomato Stems. *Plant Physiology*, *117*(3), 841–849. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.841>
- AT5G09330(NAC082). (2020). Retrieved January 9, 2020, from <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At5g09330>
- 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*(3), 500–511. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0109-8>
- Campos, L., Granell, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Conejero, V., Bellés, J. M., ... Lisón, P. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, *77*, 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2014.01.016>
- Chen, Y., Rofidal, V., Hem, S., Gil, J., Nosarzewska, J., Berger, N., ... Chervin, C. (2019). Targeted Proteomics Allows Quantification of Ethylene Receptors and Reveals SIETR3 Accumulation in Never-Ripe Tomatoes. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01054>
- 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. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *29*(3), 317–323. [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(86\)80048-0](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(86)80048-0)
- Cottilli, P., Belda-Palazón, B., Adkar-Purushothama, C. R., Perreault, J.-P., Schleiff, E., Rodrigo, I., ... Lisón, P. (2019). Citrus exocortis viroid causes ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz679>
- Ding, B., & Itaya, A. (2007). Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(1), 7–20. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-0007>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dubois, M., Van den Broeck, L., & Inzé, D. (2018). The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth. *Trends in Plant Science*, *23*(4), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.003>

- FAOSTAT. (2019). Retrieved December 7, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Flores, R., Hernández, C., Alba, A. E. M. de, Daròs, J.-A., & Serio, F. Di. (2005). Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(1), 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- Gómez, G., Martínez, G., & Pallás, V. (2008). Viroid-Induced Symptoms in *Nicotiana benthamiana* Plants Are Dependent on RDR6 Activity. *Plant Physiology*, *148*(1), 414–423. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120808>
- Gull, A., Ahmad Lone, A., & Ul Islam Wani, N. (2019). Biotic and Abiotic Stresses in Plants. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85832>
- Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Metraux, J.-P., & Nawrath, C. (2003). Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. tomato interaction. *The Plant Journal*, *36*(3), 342–352. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01881.x>
- Hej, J., & Hakoshima, T. (2018). *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. (J. Hejátko & T. Hakoshima, Eds.), *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0>
- Hu, X. xi, Nie, X. zhou, Song, Y., Xiong, X. yao, & Tai, H. (2011). Ethylene is Involved but Plays a Limited Role in Tomato Chlorotic Dwarf Viroid-Induced Symptom Development in Tomato. *Agricultural Sciences in China*, *10*(4), 544–552. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60035-7](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60035-7)
- ImageJ. (2020). Retrieved January 10, 2020, from <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>
- Jia, C., Zhang, L., Liu, L., Wang, J., Li, C., & Wang, Q. (2013). Multiple phytohormone signalling pathways modulate susceptibility of tomato plants to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Experimental Botany*, *64*(2), 637–650. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers360>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., ... Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(47), 19486–19491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214848109>

- Keese, P., & Symons, R. H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(14), 4582–4586. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.14.4582>
- Klee, H. J. (2004, June). Ethylene signal transduction. Moving beyond arabidopsis. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040998>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lafontaine, D. L. J., & Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(7), 514–520. <https://doi.org/10.1038/35080045>
- Li, W., Ma, M., Feng, Y., Li, H., Wang, Y., Ma, Y., ... Guo, H. (2015). EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in Arabidopsis. *Cell*, *163*(3), 670–683. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.037>
- Lisón, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Saurí, A., Torres, C., Campos, L., ... Rodrigo, I. (2013). A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *PROTEOMICS*, *13*(5), 833–844. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200286>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I., & Bellés, J. M. (2016). Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus. *PLoS ONE*, *11*(11), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938>
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., ... Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, *262*(5138), 1432–1436. <https://doi.org/10.1126/science.7902614>
- Merchante, C., Brumos, J., Yun, J., Hu, Q., Spencer, K. R., Enríquez, P., ... Alonso, J. M. (2015). Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2. *Cell*, *163*(3), 684–697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.036>
- Metzler, M. C., Cutt, J. R., & Klessig, D. F. (1991). Isolation and Characterization of a Gene Encoding a PR-1-Like Protein from Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, *96*(1), 346–348. <https://doi.org/10.1104/pp.96.1.346>
- Miyazaki, J. H., & Yang, S. F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, *69*(2), 366–370. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04302.x>
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., & Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology*, *4*(SEP), 248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00248>

- O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J., & Klee, H. J. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *The Plant Journal*, *25*(3), 315–323. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00968.x>
- 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), 10–17. <https://doi.org/10.1159/000150070>
- Sänger, H. L. (1982). Biology, Structure, Functions and Possible Origin of Viroids. In *Nucleic Acids and Proteins in Plants II* (pp. 368–454). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-68347-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-68347-3_12)
- Sun, X., Li, Y., He, W., Ji, C., Xia, P., Wang, Y., ... Guo, H. (2017). Pyrazinamide and derivatives block ethylene biosynthesis by inhibiting ACC oxidase. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15758>
- Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, *485*(7400), 635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V., & 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. Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* (Vol. 10).
- Tsagris, E. M., Martínez de Alba, Á. E., Gozmanova, M., & Kalantidis, K. (2008). Viroids. *Cellular Microbiology*, *10*(11), 2168–2179. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01231.x>
- van Loon, L.C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, *44*(1), 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- van Loon, Leendert C., Geraats, B. P. J., & Linthorst, H. J. M. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, *11*(4), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.005>
- Verhoeven, J. th. j., Jansen, C. C. C., Willemen, T. M., Kox, L. F. F., Owens, R. A., & Roenhorst, J. W. (2004). Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(8), 823–831. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-2493-5>
- Wang, K. L.-C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, *14*(suppl 1), S131–S151. <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>
- Wang, Y., Wu, J., Qiu, Y., Atta, S., Zhou, C., & Cao, M. (2019). Global transcriptomic analysis reveals insights into the response of 'etrog' citron (*Citrus medica* L.) to Citrus Exocortis viroid infection. *Viruses*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/v11050453>

- Wasternack, C. (2014, January). Action of jasmonates in plant stress responses and development - Applied aspects. *Biotechnology Advances*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.009>
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 155–189.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>
- Zhang, L., Lin, J., & Ye, K. (2013). Structural and functional analysis of the U3 snoRNA binding protein Rrp9. *RNA*, 19(5), 701–711.  
<https://doi.org/10.1261/rna.037580.112>
- Zheng, Y., & Zhu, Z. (2016). Relaying the Ethylene Signal: New Roles for EIN2. *Trends in Plant Science*, 21(1), 2–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.013>

