

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Caracterización del fenotipo metabólico de plantas transgénicas NagI. Estudio del patrón de expresión del posible gen de tomate S5H.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Gracián Camps Ramón

TUTORA: María Purificación Lisón Párraga

COTUTORA: María Pilar López Gresa

Curso Académico: 2013-2014

Valencia, Septiembre de 2014





Datos personales

Nombre y apellidos: Gracián Camps Ramón

Datos del Trabajo Fin de Grado:

Título del TFG: Caracterización del fenotipo metabólico de plantas transgénicas *Nagl*. Estudio del patrón de expresión del posible gen de tomate *S5H*.

Lugar de realización: Instituto de Biotecnología, Universidad Politécnica Valencia

Localidad: Valencia

Fecha de lectura: Septiembre 2014

Tipo de licencia: Creative Commons: "Reconocimiento No Comercial – Sin Obra Derivada"

Tutora: María Purificación Lisón Párraga

Cotutora: María Pilar López Gresa

Abstract:

As a defense mechanism against the wide variety of exogenous biotic and abiotic aggressions, plants have developed highly effective defense strategies against each type of stress. After the plant-pathogen interaction, a molecular communication system between them is started, which triggers the induction of defense mechanisms in the plant (Desender et al., 2007). Among the signal molecules involved in the activation of these inducible defenses, in this Final Project, salicylic acid (SA) and gentisic acid (GA) are studied as key components of incompatible and compatible interactions, respectively.

To determine the signalling role of these metabolites, obtaining *NahG* and *Nagl* transgenic plants, unable to accumulate SA and GA in response to the infection, respectively, has been crucial. Thus, *NahG* plants are more susceptible to pathogens that develop incompatible interactions, while *Nagl* plants could be more susceptible to pathogen attacks in compatible interactions.

The main objective of this TFG is the characterization of the metabolic phenotype of *Nagl* transgenic plants and to study the pattern of expression of the possible gene of tomato SA 5-hydroxylase (*S5H*), proposed as responsible for the transformation of SA to GA.

For that purpose, exogenous treatments with GA and SA were performed, as well as with two of their precursors (benzoic acid and o-coumaric acid), in MoneyMaker tomato plants and *NahG* and *Nagl* transgenic plants, and susceptibility of the plants to them was studied. Subsequently, we carried out a study of the accumulation of SA and GA in such plants due to the exogenous application of these metabolites. In addition, MoneyMaker tomato plants infected with the Citrus Exocortis Viroid (CEVd) and the *Pseudomonas syringae* pv *tomato* bacterium were analyzed in order to verify if the ortholog of *S3H* gene of *Arabidopsis thaliana*, identified in tomato, is induced in these plant-pathogen interactions in which the accumulation of GA takes place. Finally, the differential expression of this gene was also studied in *Nagl* and *NahG* transgenic lines upon exogenous treatments with SA, GA, BA and o-CU.

Our results indicate that *NahG* and *Nagl* transgenic plants accumulate lower levels of SA and GA, which may explain the lower susceptibility to exogenous treatments observed with respect to their genetic background MoneyMaker. Moreover, the tomato ortholog of the *Arabidopsis thaliana* gene *S3H* presented higher levels of expression in infections that cause the accumulation of GA, and in *Nagl* plants subjected to these treatments, thus indicating a possible salicylate 5-hydroxylase (*S5H*) activity.



Key words:

tomato, defense, salicylic acid (SA), gentisic acid (GA), *NahG*, *Nagl*, exogenous treatments, SA 5-hydroxylase (*S5H*)

Resumen:

Como mecanismo de defensa ante la gran variedad de agresiones exógenas, tanto de naturaleza biótica como abiótica, las plantas han desarrollado estrategias defensivas muy eficaces frente a cada tipo de estrés. Tras la interacción planta-patógeno, se pone en marcha un sistema de comunicación molecular entre ambos, que desencadena la inducción de mecanismos de defensa en la planta (Desender et al., 2007). De entre las moléculas señal que participan en la activación de estas defensas inducibles, en este Trabajo Fin de Grado se aborda el estudio del ácido salicílico (SA) y del gentísico (GA) como componentes clave de interacciones incompatibles y compatibles respectivamente.

Para determinar el papel señalizador de estos metabolitos, ha sido crucial la obtención de plantas transgénicas *NahG* y *Nagl*, incapaces de acumular SA y GA, respectivamente, como respuesta a la infección. De este modo, las plantas *NahG* son más susceptibles a patógenos en interacciones de tipo incompatible, mientras que las *Nagl* podrían resultar serlo en interacciones de tipo compatible.

El objetivo central del presente TFG es la caracterización del fenotipo metabólico de plantas transgénicas *Nagl* y el estudio del patrón de expresión del posible gen de tomate SA 5-hidroxilasa (*S5H*), propuesto como responsable de la transformación de SA a GA.

Para ello, se llevaron a cabo tratamientos exógenos con GA y SA, así como con dos de sus precursores (ácido benzoico y ácido *o*-cumárico) en plantas de tomate Moneymaker y plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* y se estudió la susceptibilidad de las plantas a los mismos. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de la acumulación de SA y GA en dichas plantas como consecuencia de la aplicación exógena de los metabolitos mencionados. Además, se analizaron plantas de tomate Moneymaker infectadas con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) y la bacteria *Pseudomonas syringae pv tomato* con la finalidad de verificar si el ortólogo del gen *S3H* de *Arabidopsis thaliana* identificado en tomate, presenta niveles de expresión mayores en estas interacciones planta-patógeno donde tiene lugar la acumulación de GA, respecto al control. Por último, se estudió la expresión diferencial de dicho gen en las distintas líneas transgénicas *NahG* y *Nagl* sometidas a tratamientos exógenos con SA, GA, BA y *o*-CU.

Nuestros resultados indican que las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* acumulan menores niveles de SA y GA, lo que explicaría su menor susceptibilidad a los tratamientos exógenos aplicados con respecto a su fondo genético Moneymaker. Por otra parte, el ortólogo en tomate del gen *S3H* de *Arabidopsis thaliana* presentó niveles de expresión mayores tanto en las infecciones que producen la acumulación de GA, como en plantas *Nagl* sometidas a estos tratamientos, indicando así su posible actividad salicilato 5-hidroxilasa (*S5H*).

Palabras clave:

tomate, defensa, ácido salicílico (SA), ácido gentísico (GA), *NahG*, *Nagl*, tratamientos exógenos, SA 5-hidroxilasa (*S5H*)

Agradecimientos

Aprovecho este apartado para demostrar mi gratitud hacia aquellas personas que han hecho posible la realización del presente Trabajo Fin de Grado, así como a aquellas que me han llevado en volandas durante esta intensa e inolvidable carrera.

En primer lugar, querría agradecer al señor José María Bellés el haberme permitido realizar el TFG en su grupo de investigación. Gracias por esto, por trasmitirme ese optimismo característico y por toda la ayuda y consejos recibidos desde el primer día.

También me gustaría dar las gracias a Paula, Rubén, Elías y Laura por compartir los momentos de estrés y alegría y estar siempre que los he necesitado, mucha suerte de aquí en adelante compañeros. Muchas gracias a Susi e Ismael por su ayuda desinteresada, sus consejos y enseñanzas, ha sido un honor poder trabajar al lado de dos profesionales como vosotros. Finalmente gracias a Isabel y Teresa por su amabilidad y apoyo mostrados y a Su por ser la alegría personificada y crear un ambiente de trabajo excepcional.

Se merecen una mención especial las que han sido, sin duda alguna, las tres ángeles de la guarda de mi proyecto. Gracias Cris, por soportarme durante estos tres meses siempre con una sonrisa y una amabilidad digna de admirar, por compartir cada problema, que no han sido pocos, y transformarlo en una mera anécdota, gracias simplemente por ser como eres, sin tu ayuda esto no hubiera sido lo mismo, no me eches mucho de menos. Gracias Puri, por todo el sacrificio, el tiempo dedicado a este proyecto y cada enseñanza recibida, me has demostrado que estaba equivocado al pensar que nadie puede estar en más de un sitio al mismo tiempo, gracias por ser una profesional sensacional y todavía mejor persona, un abrazo enorme. Gracias Mapi, por confiar desde el primer momento en mí e incrementar la confianza en mí mismo, gracias por hacerme sentir como en casa y enriquecer mi formación profesional y personal, ha sido todo un placer realizar este proyecto a tu lado.

No puedo olvidarme de las dos personas que han compartido cada sentimiento de alegría y tristeza, así como noches de fiesta y estudio y un viaje inolvidable durante la carrera. Gracias Silvia, por tu forma de ser haciendo que cada persona a tu alrededor se sienta bien, gracias por controlarme y mantenerme los pies en el suelo cuando es conveniente, por todo esto y más, gracias amiga. Gracias Ximo, por aparecer en mi camino, y, siendo una persona totalmente diferente a mí, convertirte en un amigo de verdad, de esos que están cuando más los necesitas y a los que puedes confiar cualquier cosa. Gracias por avanzar todavía más y pasar a ser una persona esencial en mi día a día, llegando a ser prácticamente como mi hermano no biológico. Sabéis que podéis contar conmigo para lo que sea.

Finalmente, no puedo terminar este apartado sin dar gracias a la vida por dejarme formar parte de una familia maravillosa. Quiero agradecer a los 4 pilares indestructibles, que me mantienen en las nubes y en los que siempre puedo contar para apoyarme y no caer. Gracias Padre y Madre por darme la vida y vivir por y para nosotros, gracias por enseñarme los valores de la humildad, bondad, constancia y amor por los míos, no existen palabras que me permitan expresar la gratitud que siento hacia vosotros, sinceramente mi familia es lo mejor que tengo y os lo debo a vosotros. Gracias Andreu, por ser la persona que más momentos ha compartido conmigo mostrando siempre una lealtad y cariño admirables, me siento orgulloso de ser tu hermano y aprovecho para prometerte que nuestra unión se mantendrá de por vida. Gracias Jordi, por existir y ser el principal motivo de mi felicidad desde el día de tu nacimiento, ver cómo has ido creciendo ha sido todo un placer, sabes que me tendrás siempre a tu lado. Os quiero.

A mis Padres

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1-12
I.1. El cultivo del tomate.....	1
I.2. El sistema defensivo de las plantas.....	1-6
I.2.1. Consideraciones generales.....	1-4
I.2.2. Activación de la respuesta defensiva de las plantas.....	4-6
I.2.2.1. Respuesta defensiva local.....	5
I.2.2.2. Respuesta defensiva sistémica.....	6
I.3. Principales moléculas señalizadoras de la respuesta defensiva.....	6-9
I.3.1. El ácido salicílico.....	7-9
I.3.2. El ácido gentísico.....	9-10
I.4. Estudio del papel del SA y GA mediante plantas transgénicas.....	10-12
I.4.1. Plantas transgénicas <i>NahG</i>	10-11
I.4.2. Plantas transgénicas <i>Nagl</i>	11-12
II. OBJETIVOS.....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14-20
III.1. Material vegetal.....	14-15
III.1.1. Condiciones de cultivo.....	14
III.1.2. Tratamientos.....	14
III.1.3. Toma de muestra.....	14
III.1.4. Infecciones.....	15

III.2. Extracción de compuestos fenólicos.....	15-16
III.2.1. Compuestos fenólicos libres.....	15
III.2.2. Compuestos fenólicos totales.....	16
III.3. Análisis y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	16
III.4. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....	17-19
III.4.1. Extracción de RNA.....	17
III.4.2. Cuantificación de RNA.....	17-18
III.4.3. Obtención de cDNA a partir de RNA (Transcripción Reversa).....	18
III.4.4. Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR.....	18
III.4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
III.4.6. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	19
III.5. Recursos informáticos.....	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21-37
IV.1. Análisis del comportamiento plantas transgénicas <i>NahG</i> y <i>Nagl</i> sometidas a tratamientos exógenos de diferentes compuestos fenólicos implicados en la síntesis de SA y GA.....	22-30
IV.1.1. Estudio de la sintomatología de plantas de tomate <i>NahG</i> , <i>Nagl</i> y Moneymaker tratadas de forma exógena con SA, GA, BA y <i>o</i> -CU.....	22-24
IV.1.2. Análisis de la acumulación de compuestos fenólicos en plantas de tomate <i>NahG</i> , <i>Nagl</i> y Moneymaker tratadas de forma exógena con SA, GA, BA y <i>o</i> -CU.....	25-30
IV.2. Rastreo del gen de tomate ortólogo al <i>S3H</i> en <i>Arabidopsis</i>.....	30-31
IV.3. Estudio de la expresión del posible gen <i>S5H</i> en diferentes infecciones patogénicas de tomate Moneymaker.....	31-33

IV.4. Estudio de la expresión del posible gen <i>S5H</i> en plantas de tomate MoneyMaker, <i>NahG</i> y <i>Nagl</i> sometidas a diferentes tratamientos exógenos.....	33-36
<i>PERSPECTIVAS DE FUTURO</i>.....	37
V. CONCLUSIONES.....	38
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	39
VII. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I. INTRODUCCIÓN..... 1-12

Figura 1. Modelo de interacción gen-a-gen.....	3
Figura 2. Respuesta defensiva de las plantas frente al ataque patogénico.	4
Figura 3. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas.	8
Figura 4. Conjugados de los ácidos salicílico (SA) y genticóico (GA) en plantas.....	9
Figura 5. Catabolismo del ácido salicílico (SA) y ácido genticóico (GA) en plantas transgénicas <i>NahG</i> y <i>Nagl</i>	12

III. MATERIALES Y MÉTODOS..... 14-20

Tabla 1. Oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones en cadena de la polimerasa.....	18
---	----

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 21-37

Figura 6. Sintomatología representativa de hojas de plantas de tomate Moneymaker, <i>NahG</i> y <i>Nagl</i> tratadas con H ₂ O, SA, GA, BA y o-CU, a las 24 horas.....	24
Figura 7. Acumulación de SA libre y total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas <i>NahG</i> y <i>Nagl</i> , tratadas con ácido salicílico (SA), ácido genticóico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU) y sus correspondientes controles a las 24 horas de su aplicación exógena.....	26
Figura 8. Acumulación de GA libre y total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas <i>NahG</i> y <i>Nagl</i> , tratadas con ácido salicílico (SA), ácido genticóico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU) y sus correspondientes controles a las 24 horas de su aplicación exógena.....	27
Figura 9. Acumulación de catecol (CA) libre y total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas <i>NahG</i> y <i>Nagl</i> , tratadas con ácido genticóico (GA) y, también con ácido salicílico (SA) en el caso de Moneymaker.....	28
Figura 10. Árbol filogenético de la secuencia proteica <i>S3H</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y sus posibles correspondencias en tomate.....	31
Figura 11. Efecto de la infección bacteriana sobre la expresión del posible gen <i>S5H</i> de tomate obtenido por homología de secuencia a partir del genoma de <i>Arabidopsis</i>	32
Figura 12. Efecto de la infección viroidal sobre la expresión del posible gen <i>S5H</i> de tomate obtenido por homología de secuencia a partir del genoma de <i>Arabidopsis</i>	33

Figura 13. Estudio de la expresión de los genes *RPL2* y *S5H* en plantas Moneymaker (MM), *NahG* y *Nagl* sometidas a aplicación exógena de ácido salicílico (SA), ácido gentísico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU), a las 24 horas después del tratamiento..... 34

Figura 14. Modelo del comportamiento de los diferentes metabolitos y enzimas que participan en su ruta metabólica, en plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* tratadas con GA o SA, respectivamente..... 36

Tabla 2. Reducción (%) de los niveles de SA y GA libres y totales en plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* tras la aplicación exógena de diferentes metabolitos..... 29

VII. ANEXOS

Figura A1. Curvas patrón para ácido salicílico (SA), ácido gentísico (GA) y catecol (CA).

Figura A2. Acumulación de SA total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas *NahG* y *Nagl*, tratadas ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU) a las 24 horas de su aplicación exógena.

Figura A3. Acumulación de GA total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas *NahG* y *Nagl*, tratadas con ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU) a las 24 horas de su aplicación exógena.

ABREVIATURAS

ANI = ácido anísico

Avr = avirulencia

BA2H = ácido benzoico 2-hidroxilasa

BLAST = basic local alignment search tool

CA = catecol

cDNA = DNA complementario

CEVd = viroide de la exocortis de los cítricos

DEPC = dietilpirocarbonato

dNTPs = desoxirribonucleótidos

E = etileno

ETI = Effector Triggered Immunity

GA = ácido gentísico

GAGT = GA glicosiltransferasa

GDO = gentisato-1,2-dioxigenasa

HPLC = cromatografía líquida de alta resolución

HR = respuesta hipersensible

JA = ácido jasmónico

MeSA = metil-salicilato

MM = Moneymaker

Nagl = gen de la gentisato 1,2-dioxigenasa

NahG = gen de la salicilato hidroxilasa

NCBI = National Center for Biotechnology Information

NO = óxido nítrico

o-CU = ácido orto-cumárico

PAL = fenilalanina amonio liasa

PAMP = *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

PR = Pathogenesis Related Proteins

PRR = Pattern Recognition Receptors

PTI = PAMP Triggered Immunity

RMN = resonancia magnética nuclear

ROS = especies reactivas de oxígeno

RT-PCR = PCR a partir de cDNA

RTS = ruta de transducción de señales

SA = ácido salicílico

SAGT = SA glucosil transferasa

SAR = resistencia sistémica adquirida

S3H = salicilato 3-hidroxilasa

S5H = salicilato 5-hidroxilasa

TMV = Virus del Mosaico del Tabaco

TSWV = Virus del Broceado del Tomate

UV = ultravioleta

2,3-DHBA = ácido 2,3-dihidroxibenzoico

2,5-DHBA = ácido 2,5-dihidroxibenzoico

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El cultivo del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea, dicotiledónea, perenne y anual. Pertenece a la familia de las Solanáceas y es cultivada en todo el mundo por el consumo de su fruto. Fue introducido en Europa en 1540, donde creció y se adaptó con facilidad al clima mediterráneo (Iris E.Peralta and David M.Spooner, 2007). Es la hortaliza más cultivada en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. La producción mundial del tomate se eleva a más de 211.021.843 toneladas, según los datos de 2012 (últimos datos disponibles a nivel mundial) de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). España es el octavo país productor y el tercer país exportador mundial por detrás de Países Bajos y México (Datos FAO).

Además de sus conocidas cualidades nutricionales, diversos estudios han demostrado una fuerte correlación inversa entre el consumo de tomate y el riesgo de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular relacionada con la edad (Martine Dorais *et al.*, 2008), haciendo que su consumo resulte muy beneficioso.

Debido a la importancia tanto nutricional como económica del cultivo del tomate, resulta de especial interés el estudio de los mecanismos de resistencia de las plantas frente a distintos estreses, tanto bióticos como abióticos. Mediante dicho conocimiento, se pretenden desarrollar nuevas estrategias biotecnológicas que proporcionen a las plantas de tomate un sistema defensivo más eficaz, reduciendo las pérdidas ocasionadas por estos estreses en el cultivo de tomate.

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos que disponen las plantas para defenderse frente ataques patogénicos, mediante el estudio de diferentes moléculas señal que participan en la respuesta defensiva. Para ello, se estudiará el comportamiento de plantas transgénicas de tomate incapaces de acumular algunas de estas moléculas señal.

I.2. El sistema defensivo de las plantas

I.2.1. Consideraciones generales

En la naturaleza, las plantas están expuestas a un gran número de organismos patógenos como hongos, bacterias, virus y viroides. Por ello, resulta sorprendente que, a pesar de su naturaleza sésil, la muerte de plantas por enfermedad termine siendo una situación excepcional. Así pues, los mecanismos de defensa de las plantas, tanto aquellos constitutivos como aquellos inducidos por la presencia del patógeno, son considerados muy efectivos.

Por un lado, los mecanismos de defensa constitutivos, tanto estructurales como de naturaleza química, operan constantemente en la planta deteniendo la entrada de patógenos al organismo y constituyendo lo que se denomina *resistencia pasiva* de las plantas. Las defensas estructurales se basan principalmente en la presencia en la superficie de todos los tejidos de una cubierta protectora, denominada cutícula, constituida por cutina, suberina y ceras, que forman una capa hidrofóbica e impermeable sobre la pared de las células de la epidermis. Por su parte, la defensa química está compuesta por la presencia de una gran diversidad de sustancias tóxicas para los organismos patógenos como compuestos fenólicos, lactonas no saturadas, derivados sulfurados, saponinas y proteínas de defensa, entre otros (Conejero *et al.*, 1990; Baker *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 2001, Staal y Dixelius, 2007).

Por otro lado, los mecanismos de defensa activados por el patógeno permiten detener y prevenir la infección de los tejidos en la planta, constituyendo la denominada *resistencia activa*. Dicha resistencia es inducida tras el reconocimiento, por parte de la planta, de factores de estrés procedentes del patógeno. Como consecuencia de tal reconocimiento se despliega una red de señalización interconectada, compleja y coordinada, que determina los cambios transcripcionales, proteicos y metabólicos que se producen en la planta (Conejero *et al.*, 1990; Ebel y Cosio, 1994; Nürnberger, 1999; Beckers y Spoel, 2006; Balbi y Devoto, 2008).

Según sea la naturaleza del reconocimiento entre el patógeno y la planta, se activarán en la planta distintos niveles de defensa conocidos como PTI (*PAMP Triggered Immunity*) o como ETI (*Effector Triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006).

La activación de la PTI tiene lugar tras el reconocimiento inespecífico de los denominados *elicitors* o PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), que son moléculas producidas por un grupo de patógenos y reconocidas por una amplia variedad de huéspedes. Dichas moléculas son reconocidas en las células vegetales por receptores transmembrana no específicos llamados PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), (Jones y Dangl, 2006; Schwessinger y Zipfel, 2008). Los mecanismos de defensa de la planta activados por PAMPs incluyen: el refuerzo de la pared celular mediante deposiciones de callosa y lignina (Hückelhoven, 2007), la producción de proteínas de defensa PR (*Pathogenesis Related Proteins*) tales como quitinasas o glucanasas, la expresión de genes codificantes de proteínas para el establecimiento de barreras físicas que detengan la expansión de la infección patogénica y la inducción de enzimas que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos (Broekaert *et al.*, 2006).

Existen ocasiones en las que los patógenos pueden superar esta primera barrera defensiva en la planta (PTI), sintetizando los denominados factores de avirulencia (Avr) (Jones y Dangl, 2006). Estos factores pueden ser reconocidos de forma específica por los productos de los genes de resistencia R de la planta, en lo que se denomina interacción *gen a gen* (Flor, 1971). Cuando tal interacción tiene lugar,

resulta en el establecimiento en la planta de un nuevo nivel defensivo denominado ETI (Dangl y Jones, 2001; Jones y Dangl, 2006).

Según el modelo de interacción gen a gen (Figura 1), tras el reconocimiento específico entre el producto de expresión de un gen *R* de la planta y el de un gen *Avr* del patógeno, se establece una interacción de tipo *incompatible* en la que es activada una cascada de señalización que conlleva la muerte celular alrededor del punto de origen de la infección, impidiendo así la expansión posterior del patógeno. Esta respuesta local de la planta es conocida como Respuesta Hipersensible (HR). En la mayoría de los casos, la HR lleva consigo la activación de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) en los tejidos distales, que favorece la protección de la planta frente a un amplio espectro de posibles infecciones patogénicas posteriores (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Durrant y Dong, 2004; Beckers y Spoel, 2006).

En el caso de que no ocurra un reconocimiento gen a gen entre la planta (portadora del gen *R*) y el patógeno (portador del gen *Avr*), se dice que la interacción es de tipo *compatible*. En este tipo de interacción, el patógeno escapa a las respuestas defensivas locales, extendiéndose por toda la planta y provocando la enfermedad. Como consecuencia de este hecho, se conoce a este tipo de infección como sistémica y, en el caso de no producirse HR, es conocida como no necrotizante (Nürnberg *et al.*, 2004; Restrepo *et al.*, 2005; Thilmony *et al.*, 2006; Desender *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2007; Balaji *et al.*, 2008).

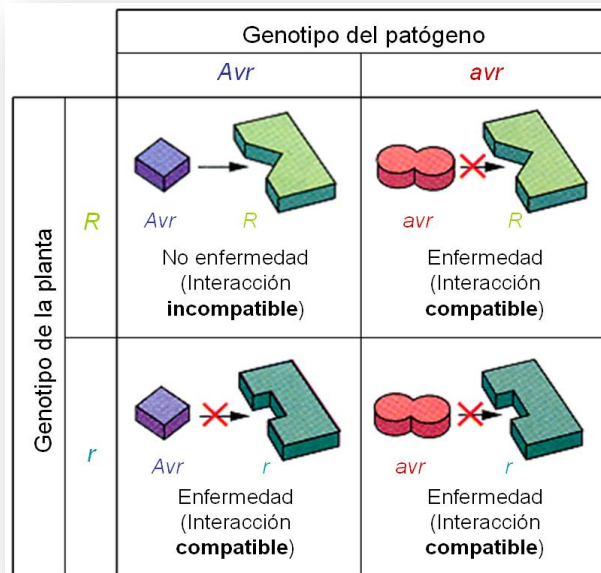


Figura 1. Modelo de interacción gen-a-gen. Para que tenga lugar la interacción de tipo incompatible, se requiere la presencia del gen dominante tanto en la planta como en el patógeno. La alteración o la pérdida del gen dominante tanto en la planta (el cambio del alelo *R* por el *r*) como en el patógeno (cambio del alelo *Avr* por *avr*) genera una reacción de tipo compatible, desencadenándose la enfermedad, ya que no se produce el reconocimiento del patógeno y, por tanto, no se activa la respuesta defensiva (Buchanan *et al.*, 2002).

Así, por ejemplo, plantas de tomate "Rio Grande", que son portadoras del gen de resistencia *Pto*, desarrollan una interacción de tipo *incompatible* cuando son infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 portadoras del gen *AvrPto*. Sin embargo, si son infectadas con la misma bacteria deficiente en ese gen de avirulencia (Δ *avrPto*), sufren una infección de tipo *compatible* y se desarrolla la enfermedad. Otros ejemplos de infecciones compatibles, o también denominadas sistémicas, serían las producidas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) o Virus del Broceado del Tomate (TSWV) en plantas de tomate.

I.2.2. Activación de la respuesta defensiva de las plantas

El reconocimiento del patógeno por parte de la planta desencadena la activación de la respuesta defensiva en la misma. Dicha respuesta defensiva frente al ataque patogénico tiene lugar a nivel local y sistémico. La respuesta defensiva local es la primera en activarse, actúa en la zona de entrada del patógeno e impide la extensión de la infección por toda la planta. Por otro lado, la respuesta defensiva sistémica es activada por mediación de moléculas señal generadas en el lugar de entrada del patógeno y protege a la planta frente a posteriores ataques patogénicos de diversa naturaleza. Las respuestas local y sistémica se asociarían con las antes mencionadas Reacción Hipersensible (HR) y Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), respectivamente (Figura 2).

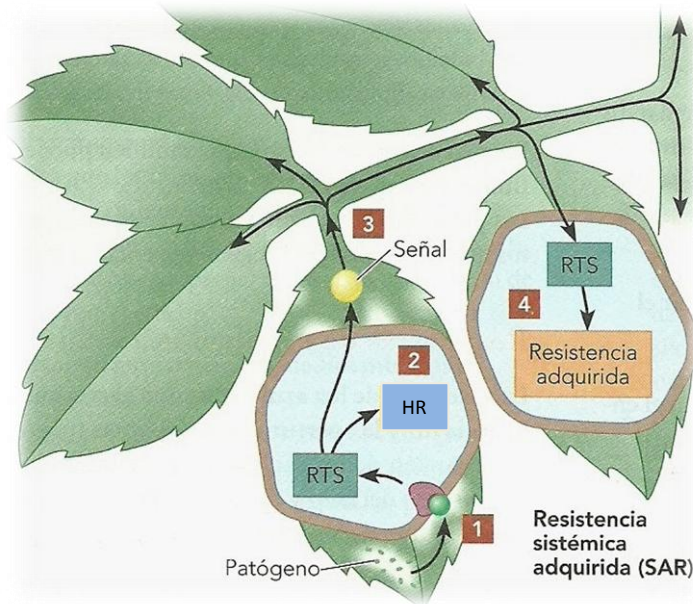


Figura 2. Respuesta defensiva de las plantas frente al ataque patogénico. 1. La unión del patógeno a la membrana plasmática induce una ruta de transducción de señales (RTS). La RTS desemboca en la respuesta hipersensible (HR), que elimina las células vegetales infectadas antes de morir. 3. Las células vegetales que mueren liberan moléculas señal, que son transportadas por toda la planta. 4. En las células sanas, las señales inducen una RTS que genera moléculas antimicrobianas. Esta respuesta es conocida como respuesta sistémica adquirida (SAR).

I.2.2.1. Respuesta defensiva local

En la respuesta local, la HR es el primer síntoma perceptible que confirma la existencia de respuesta de la planta frente al ataque patogénico (Desender *et al.*, 2007). Como ya se ha comentado, tiene lugar tras el reconocimiento entre los productos de los genes Avr del patógeno y R de la planta, y consiste en la muerte celular en el sitio de infección, que se alcanza a ver macroscópicamente a las 12-48 horas (Penell y Lamb, 1997). Generalmente, esta respuesta se asocia a interacciones de tipo incompatible; sin embargo, existen casos en los que en interacciones compatibles las características microscópicas del tejido necrótico son idénticas a las correspondientes en HR (Vleeshouwers *et al.*, 2000). En el caso en el que la activación de la HR no se produzca, gran parte de la respuesta defensiva no se genera, posibilitando el desarrollo de la enfermedad al producirse la extensión sistémica de la infección (Lorrain *et al.*, 2003).

Tras el reconocimiento del patógeno por la planta, tiene lugar de forma muy rápida la despolarización de la membrana plasmática y un cambio de su potencial iónico en la célula vegetal que ha sido infectada, favoreciendo la activación de la respuesta defensiva (Ma *et al.*, 2009). De este modo, los transportadores iónicos, como la bomba H⁺-ATPasa, se ven alterados provocando una modificación del flujo de iones que conlleva una acumulación de Ca²⁺ en el citoplasma y una salida extracelular de Cl⁻ y K⁺ (Dangl *et al.*, 1996; Scheel, 1998; Nürnberger *et al.*, 2004).

El calcio parece tener un papel importante en el establecimiento de las barreras defensivas: podría estar implicado en la deposición de callosa en la pared celular, así como en la síntesis de fitoalexinas; así mismo, el ión calcio podría estar activando factores de transcripción que regulen directamente la expresión de genes de defensa en la planta (Dolmetsch *et al.*, 1997; Yang y Poovaiah, 2002). Por otra parte, su acumulación en el citoplasma provoca alteraciones en quinasas y fosfatasa que pueden traducirse en una activación del complejo NADPH oxidasa (Blumwald *et al.*, 1998). La activación de dicho complejo es responsable de la aparición transitoria de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el radical superóxido (O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). A este fenómeno de generación de ROS se le conoce como “explosión oxidativa” (Xiang *et al.*, 1997). Estas especies reactivas de oxígeno resultan tóxicas para el patógeno y, por tanto, contribuyen a los mecanismos de defensa de la planta (Torres *et al.*, 2006). Además, mediante la explosión oxidativa se activan algunos genes protectores y la acción conjunta y coordinada de los ROS, el óxido nítrico (NO) y el ácido salicílico (SA), activa el proceso de muerte celular programada en la respuesta hipersensible (Delledonne *et al.*, 1994; Romero-Puertas *et al.*, 2004).

Finalmente, cabe mencionar, que en la respuesta defensiva local, también es inducida la síntesis de fitoalexinas (metabolitos antimicrobianos) y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (Pathogenesis Related Proteins, PRs) que actuarían directamente sobre el patógeno.

I.2.2.2. Respuesta defensiva sistémica

Como se ha comentado anteriormente, la activación de la HR lleva consigo la aparición de la SAR en los tejidos distales, protegiendo a la planta de posibles ataques posteriores. Dicha protección es de larga duración y proporciona resistencia frente a un amplio espectro de patógenos (Hunt and Ryals, 1996; Neuenschwander *et al.*, 1996).

El conjunto mayoritario de proteínas defensivas inducidas en la planta durante la SAR son las proteínas defensivas PRs (Glazebrook, 1999; Durrant y Dong, 2004; Beckers y Spoel, 2006). Las PRs son proteínas de bajo peso molecular y elevada resistencia a proteasas, que se acumulan bajo condiciones patogénicas, tanto en el tejido infectado como sistémicamente. Las PRs se clasifican en 17 familias (van Loon *et al.*, 1994), todas ellas con funciones relacionadas con la limitación del avance del patógeno. Entre estas funciones se ha descrito su actividad antibacteriana o antifúngica (van Loon *et al.*, 2006). La inducción de PRs se ha descrito en interacciones de tipo tanto incompatible como compatible. Así, se ha descrito que se acumulan tras la infección con oomicetos, virus, viroides, hongos y bacterias o el ataque de nemátodos o insectos, indicando que estas proteínas ejercen un papel general en la adaptación a condiciones de estrés biótico (Conejero *et al.*, 1990; van Loon y van Strien, 1999; van Loon *et al.*, 2006).

Tanto el hecho de que algunas PRs presenten actividad antimicrobiana así como su acumulación durante las respuestas HR y SAR, indican que estas proteínas juegan un papel importante en el mantenimiento de la resistencia en la planta (Lawton *et al.*, 1993). De hecho, su presencia se utiliza como marcador de la activación de la respuesta defensiva de la planta (van Loon *et al.*, 2006).

I.3. Principales moléculas señalizadoras de la respuesta defensiva

La activación de la respuesta sistémica indica que deben producirse señales que se generen en el punto de infección y que viajen hasta las zonas distales, donde tenga lugar la activación de las defensas (Figura 2). Entre estas señales, el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA) y el etileno (E), han sido las hormonas descritas como responsables de la regulación de la respuesta defensiva de las plantas.

Se ha observado que la infección de plantas con patógenos de distinta naturaleza provoca variaciones en el nivel de estas moléculas señal (Adie *et al.* 2007; Robert-Seilaniantz *et al.* 2007). Por otra parte, aplicaciones exógenas con estas hormonas producen en la planta la activación de la respuesta defensiva, mientras que plantas transgénicas con niveles alterados de las mismas, presentan variaciones en la resistencia frente a diferentes infecciones (Kachroo y Robin, 2013; Gao *et al.*, 2014).

Diversos estudios han demostrado la implicación de otras fitohormonas, menos conocidas en este contexto, en las rutas de señalización de la respuesta defensiva en plantas, como el ácido abscísico, las auxinas, el ácido giberélico, las citoquininas, los brasinoesteroides, las hormonas peptídicas y, más recientemente, el glicerol 3-fosfato y el ácido acelaico (Bari y Jones, 2009; Kachroo y Robin, 2013). Además de estas moléculas señal, en nuestro laboratorio fue identificado el ácido gentísico (GA), un compuesto de naturaleza fenólica y de estructura similar a la del ácido salicílico, pero con un papel diferencial en la activación de la respuesta defensiva de las plantas frente a ataques patogénicos (Bellés *et al.*, 1999).

A continuación se profundizará en el estudio del ácido salicílico (SA) y el ácido gentísico (GA) debido a la importancia de estas moléculas en la activación de programas de defensas inducibles y el estudio de su papel señalizador llevado a cabo en el presente proyecto.

I.3.1. El ácido salicílico

El ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico, SA) es un compuesto fenólico implicado en multitud de procesos. Este compuesto es de especial interés para la industria farmacéutica debido, entre otros, a su efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético (Pierpoint, 1997; Mackowiak, 2000). En plantas, su función mejor caracterizada es la de actuar como molécula señal capaz de activar la respuesta defensiva y aumentar así la resistencia a diferentes ataques patogénicos (Boatwright y Pajeroska-Mukhtar, 2013).

El SA parece desempeñar una función esencial en la activación de HR y SAR, además de ser necesario para el desarrollo de los síntomas de enfermedad (O'Donnell *et al.*, 2003). El incremento en los niveles endógenos de SA y de sus derivados glicosilados en plantas infectadas está relacionado con la activación de genes que codifican proteínas PR y el establecimiento de la resistencia de la planta. De hecho, aplicaciones exógenas de SA promueven en la planta dos fases de expresión génica. En la primera fase, que tiene lugar a las dos o tres horas después del tratamiento, se expresan enzimas detoxificantes (glutathion-S-transferasas, glicosiltransferasas, etc.), que favorecen la protección celular frente al estrés oxidativo (Horvath y Chua, 1996). En la segunda fase, que ocurre entre las doce y las dieciséis horas después de la aplicación del SA, se produce la activación de genes PR (Sticher *et al.*, 1997, Uquillas *et al.*, 2004). La expresión de dichos genes y, por consiguiente, la aplicación exógena de SA, hace más resistente a la planta frente a un ataque patogénico (Shah, 2003).

Hasta hace unos años, estaba ampliamente admitido que el SA era sintetizado en la planta a partir de la fenilalanina, a través de la ruta de los fenilpropanoides (Sticher *et al.*, 1997). Sin embargo, actualmente, existen pruebas que apoyan que la ruta biosintética del isocorismato (Figura 3) es la fuente principal de SA durante la infección patogénica y el establecimiento de la SAR (Willdermuth *et al.*, 2001).

Se han descrito dos rutas de biosíntesis de SA a partir de la fenilalanina, diferenciadas en la etapa que implica la hidroxilación del anillo aromático. Inicialmente la fenilalanina se convierte en ácido cinámico por la fenilalanina amonio liasa (PAL) y posteriormente el ácido cinámico puede ser hidroxilado para formar ácido orto-cumárico. De forma alternativa, la cadena lateral de ácido cinámico se oxida para dar el ácido benzoico, el cual se hidroxila a continuación en la posición orto para dar lugar a SA. Ambas vías se originan a partir de corismato, el producto final de la vía de siquimato (Figura 3) (Wildermuth *et al.*, 2001).

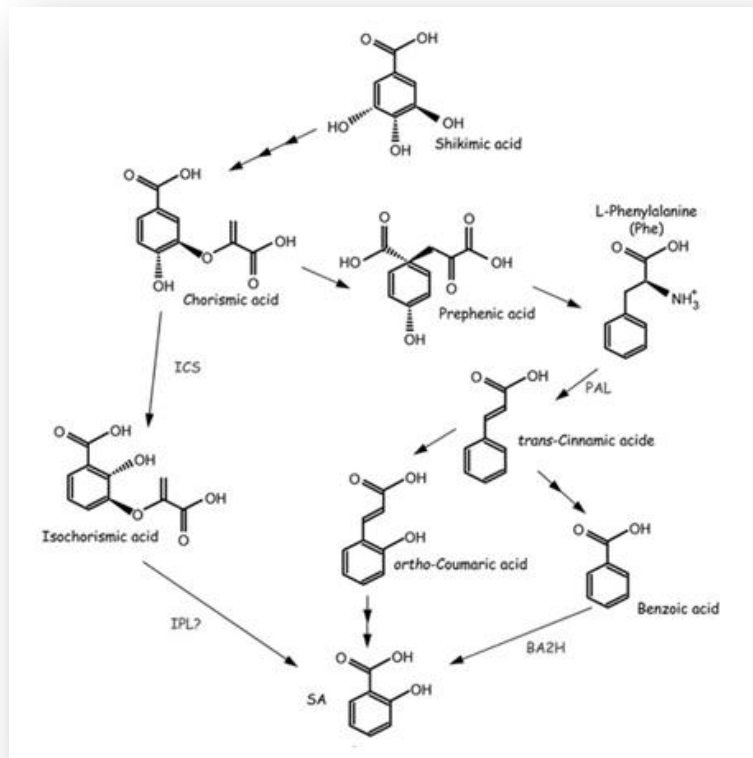


Figura 3. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas. En plantas existen dos vías de síntesis de ácido salicílico (SA), ambas iniciadas a partir del corismato: la ruta partiendo de isocorismato y la ruta biosintética de SA a partir de fenilalanina.

La mayor parte del SA libre en la célula se conjuga con glucosa para formar el SA-O- β -glucósido (Figura 4), que queda recluido en el interior de la vacuola, evitando así su posible efecto tóxico. Este SA conjugado es liberado durante una infección patogénica por la acción de glucosil hidrolasas (Dean *et al.*, 2005). Las vías de catabolismo de SA todavía están por esclarecerse. Sin embargo, en un estudio sobre senescencia foliar en *Arabidopsis*, se ha demostrado que la enzima SA 3-hidroxilasa (S3H), inducida por SA, convierte el SA en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y 2,5-DHBA (GA) *in vitro*, pero sólo 2,3-DHBA *in vivo*. Ambos 2,3-DHBA y 2,5-DHBA son formas desactivadas de SA, cuya formación evita la sobreacumulación de SA (Bartsch M. *et al.*, 2010; Kewei Zhang *et al.*, 2013). También se ha descrito la metilación de SA para dar lugar al metil-salicilato (MeSA), que ha sido descrito como la señal móvil

implicada en la activación de la SAR en tabaco (Park *et al.*, 2007). De hecho, se han obtenido plantas transgénicas de tomate que silencian la metiltransferasa de SA (SAMT), confirmando el papel que tiene la conversión del SA a MeSA en la respuesta defensiva de las plantas (Ament *et al.*, 2010).

I.3.2. El ácido gentísico

El ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 2,5-DHBA, GA) es un compuesto fenólico, formado a partir de la hidroxilación en el carbono 5 del ácido salicílico. En nuestro laboratorio el GA fue identificado durante un estudio comparativo de la acumulación de compuestos fenólicos de una interacción de tipo compatible, entre plantas de tomate control e infectadas con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd). En este estudio se observó en las hojas de las plantas infectadas una importante acumulación de GA (Bellés *et al.*, 1999). En este mismo laboratorio, se ha observado que el GA también se acumula como consecuencia de infecciones no necrotizantes en otras especies vegetales, tales como *Gynura aurantiaca* y *Cucumis sativus* (Bellés *et al.*, 2006). También se ha llevado a cabo un estudio metabolómico, mediante resonancia magnética nuclear (RMN) en combinación con un análisis de datos multivariable, para analizar los cambios metabólicos globales implicados en la interacción tomate-CEVd. Dicho estudio ha permitido la identificación de diferentes metabolitos implicados en esta respuesta sistémica, siendo el GA el metabolito que más fuertemente se induce (López-Gresa *et al.*, 2010).

A diferencia del SA, que se conjuga siempre a glucosa, el GA se une exclusivamente a xilosa (Fayos *et al.*, 2006), siendo GA glicosiltransferasa el enzima responsable de esta conjugación (Figura 4) (Tárraga *et al.*, 2010).

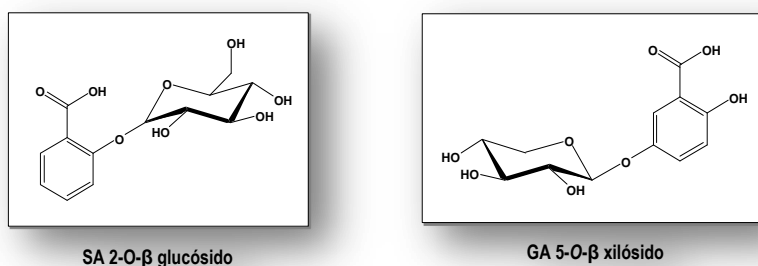


Figura 4. Conjugados de los ácidos salicílico (SA) y gentísico (GA) en plantas.

Por otra parte, se ha visto que aplicaciones exógenas de GA también promueven la inducción de proteínas de defensa PR (P23, P32 y P34) en plantas, siendo estas PRs diferentes a las inducidas por el propio SA (Bellés *et al.*, 1999). Recientemente, también se ha demostrado que aplicaciones exógenas tanto de SA como de GA, promueven no sólo la acumulación de PRs, sino también la activación de mecanismos de silenciamiento génico. Esta activación produce una mayor resistencia de las plantas a patógenos de RNA (Campos *et al.*, 2014).

La elevada acumulación de GA en diferentes interacciones de tipo compatible, su capacidad para inducir PRs distintas a las inducidas por el SA, así como su potencial para inducir mecanismos de silenciamiento génico y resistencia a patógenos de RNA sugieren que el GA es un componente más de la respuesta defensiva de las plantas que podría actuar como una señal adicional y complementaria al SA, en las interacciones planta-patógeno de tipo compatible.

I.4. Estudio del papel del SA y GA mediante plantas transgénicas

Como ya se ha comentado anteriormente, el SA y el GA se acumulan como consecuencia de una interacción planta-patógeno de tipo incompatible y compatible, respectivamente. Aplicaciones exógenas con estos compuestos fenólicos activan la respuesta defensiva de las plantas, así como mecanismos de silenciamiento de RNA y producen un aumento en la resistencia a ataques posteriores (Boatwright y Pajeroska-Mukhtar, 2013; Campos *et al.*, 2014). Con el fin de confirmar el papel señalizador de estas moléculas señal, el estudio metabólico de plantas transgénicas con niveles alterados de estos compuestos resulta de gran interés.

I.4.1. Plantas transgénicas *NahG*.

Para el estudio del papel del SA en el desarrollo de la resistencia local y sistémica ha sido clave el empleo de plantas transgénicas incapaces de acumular SA. Dichas plantas transgénicas expresan constitutivamente el gen *NahG* de *Pseudomonas putida*, que codifica el enzima salicilato hidroxilasa (SAH), que lleva a cabo la conversión de SA en catecol (CA) (Figura 5). Debido a la ausencia de SA, en estas plantas la SAR no es activada y, además, se incrementa la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades, en comparación con sus parentales. Este hecho confirma el papel defensivo que desempeña el SA en las interacciones de tipo incompatible (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995; Mur *et al.*, 1997).

La contribución del SA a la activación de la SAR fue investigada por primera vez en plantas transgénicas de tabaco portadoras del gen *NahG*. Dichas plantas apenas acumulaban SA como consecuencia de una infección y eran incapaces de inducir la SAR frente al virus del mosaico del tabaco (Gaffney *et al.*, 1993). En posteriores investigaciones, se obtuvieron resultados similares en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* frente a patógenos virales, fúngicos y bacterianos (Delaney *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995). Estas líneas transgénicas se han utilizado en varios estudios a pesar del hecho de que la acumulación de CA resultante podría ejercer algún efecto sobre las funciones atribuidas a la deficiencia de SA.

Por otro lado, también se generaron plantas transgénicas de tomate portadoras de este gen, y se estudió la respuesta de las mismas frente al Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) y al hongo *Cladosporium fulvum* (Brading *et al.*, 2000). Con respecto a la infección con TMV, tanto las plantas control como las *NahG* no contrajeron enfermedad puesto que contenían el gen *Tm2²*, que confiere resistencia frente a este virus. Sin embargo, las lesiones de la zona inoculada resultaron mucho mayores en las plantas *NahG* que en las control.

Debido a la importancia del SA como molécula señal en la respuesta defensiva, las plantas transgénicas *NahG* han sido muy estudiadas. No obstante, muchos menos estudios se han llevado a cabo con estas plantas en interacciones de tipo compatible.

1.4.2. Plantas transgénicas *Nagl*.

Con el objetivo de contribuir al conocimiento del papel señalizador del GA en la respuesta defensiva de las plantas, en nuestro laboratorio se han obtenido plantas transgénicas de tomate incapaces de acumular GA. Dichas plantas deberían presentar una mayor susceptibilidad a infecciones de tipo compatible, ya que la acumulación de GA tiene lugar en este tipo de interacciones (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2006).

Para este fin, se preparó una construcción binaria que generaba una sobreexpresión del gen bacteriano *Nagl*. El gen *Nagl* codifica una gentisato-1.2-dioxigenasa (GDO), que rompe el anillo aromático del GA convirtiéndolo en maleil-piruvato (Figura 5) (Fuenmayor *et al.*, 1998). En experimentos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, así como en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, dicha construcción binaria fue testada aportando el GA de manera exógena. En ambas especies se observó una disminución en los niveles de GA con respecto a los controles, confirmando la actividad GDO *in vivo* en plantas (TFC, Ana Hernández Buendía, 2010). Asimismo, estudios de susceptibilidad con plantas transgénicas T₁ *Nagl* revelaron que dichas plantas parecen presentar cierta hipersusceptibilidad frente al Virus del Bronceado del Tomate (TSWV), aunque bastante menor que la que presentan las plantas transgénicas *NahG*. La hipersusceptibilidad a TSWV de las plantas *NahG* y, en menor medida, la de las plantas *Nagl*, estaba correlacionada con los niveles de GA en la planta, confirmando el posible papel que el GA podría tener en las infecciones de tipo compatible (TFC, Mayte Castellano Pérez, 2012). En el momento en el que se comenzó la realización del presente TFG, ya se disponía de semillas homocigotas *Nagl*.

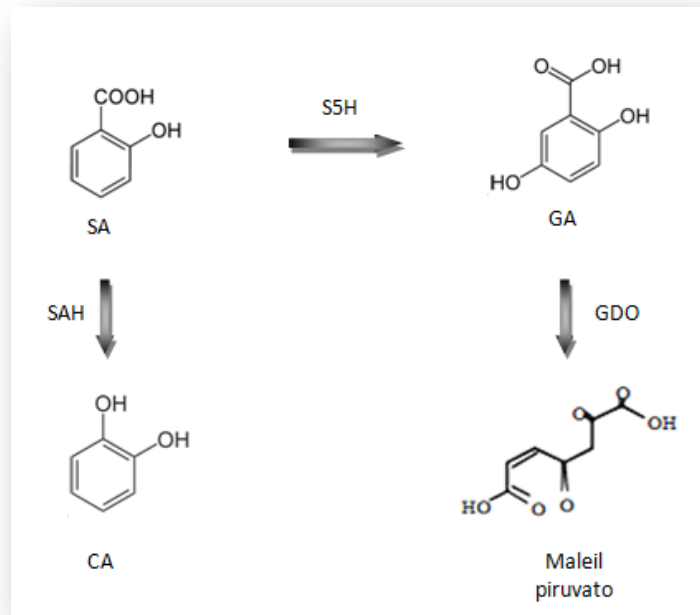


Figura 5. Catabolismo del ácido salicílico (SA) y ácido gentísico (GA) en plantas transgénicas *NahG* y *Nagl*.

La salicilato hidroxilasa (SAH), codificada por el gen *NahG*, lleva a cabo la conversión de ácido salicílico (SA) en catecol (CA). La gentisato-1,2-dioxigenasa (GDO), codificada por el gen *Nagl*, rompe el anillo aromático del ácido gentísico (GA) convirtiéndolo en maleil-piruvato. La salicilato 5-hidroxilasa (S5H) produce la hidroxilación del SA para dar lugar al GA.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona de naturaleza fenólica necesaria para el establecimiento de la resistencia sistémica en interacciones planta-patógeno de tipo incompatible. Por su parte, resultados de nuestro laboratorio indican que el ácido gentísico (GA) podría tener un papel complementario al SA en la función señalizadora de activación en la respuesta defensiva de las plantas en infecciones de tipo compatible (Bellés et al., 1999; Bellés et al. 2006).

Para la determinación de la función señalizadora del SA y GA en interacciones planta-patógeno de tipo incompatible y compatible, respectivamente, ha sido clave la construcción de plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* incapaces de acumular dichas moléculas.

El objetivo central del presente Trabajo Fin de Grado es la caracterización del fenotipo metabólico de plantas transgénicas *Nagl* y el estudio del patrón de expresión del posible gen de tomate *S5H*.

Los objetivos específicos planteados en este proyecto son:

- 1) Caracterización del fenotipo metabólico de las plantas transgénicas *Nagl*.
- 2) Identificación y estudio de la inducción del gen de tomate ortólogo al gen *S3H* de *Arabidopsis thaliana* en plantas de tomate MoneyMaker sometidas a diferentes infecciones de tipo compatible e incompatible.
- 3) Análisis de la expresión del posible gen *S5H* de tomate en plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* sometidas a diferentes tratamientos exógenos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Material vegetal

Para la realización del presente trabajo se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cultivar Moneymaker (MM) y plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* obtenidas a partir de esta variedad. Las semillas de las plantas *NahG* (Brading et al., 2000), fueron amablemente cedidas por el Dr. Jonathan Jones (The Sainsbury Laboratory, Norwich, Reino Unido), mientras que las semillas *Nagl* fueron obtenidas en el laboratorio donde se ha llevado a cabo el presente proyecto (TFC, Ana Hernández Buendía, 2010).

III.1.1. Condiciones de cultivo

Se cultivaron en invernadero todas las plantas de tomate mencionadas a una temperatura que oscilaba entre 25 y 30 °C, con una humedad relativa entre el 50 y 70% y con un fotoperiodo de 16h luz / 8h oscuridad. Para dicho cultivo se prepararon semilleros en vermiculita y, una semana después, se trasplantaron a macetas (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro interior), que contenían turba y vermiculita al 50%, obteniendo una planta por maceta. Las plantas se sometieron a riego a manta automatizado dos veces al día en solución de Hoagland, hasta encontrarse en el estado de 4-5 hojas verdaderas.

III.1.2. Tratamientos

Los tratamientos con ácido salicílico (SA), ácido gentísico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido *o*-cumárico (*o*-CU) de las plantas de tomate se llevaron a cabo cortando y embebiendo el peciolo de la segunda y tercera hoja en disoluciones acuosas de SA, GA, BA y *o*-CU preparadas a 1mM. A su vez, se realizaron controles embebiendo el peciolo de la segunda y tercera hoja de cada planta en agua. Las muestras control a tiempo cero se correspondían con plantas sin someter a tratamiento. Se generaron un total de 3 repeticiones por muestra para cada tratamiento y para cada especie vegetal.

III.1.3. Toma de muestra

La toma de muestras del material vegetal se realizó tomando los folíolos de ambas hojas correspondientes a los tres tipos de plantas (MM, *NahG* y *Nagl*), a las 24 horas después de iniciar el tratamiento con SA, GA, BA y *o*-CU, junto con sus correspondientes controles. El material se recogió sobre nitrógeno líquido y se congeló inmediatamente a -70 °C hasta el momento de su análisis.

III.1.4. Infecciones

Las muestras correspondientes a plantas de tomate Moneymaker inoculadas con el viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) y a plantas de tomate "Río Grande" inoculadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tomato* *AvrPto* o Δ *AvrPto*, así como sus correspondientes controles, fueron generadas previamente en el laboratorio donde ha sido realizado este proyecto.

III.2. Extracción de compuestos fenólicos

Se pesaron aproximadamente 0,5 g de tejido foliar, previamente triturada en nitrógeno líquido y se homogeneizó en mortero con 1,5 ml de metanol. A continuación, las muestras se transvasaron a tubos Eppendorf de 2 ml y fueron sometidas a ultrasonidos durante 10 minutos con el fin de finalizar la disgregación del tejido, favoreciendo de este modo la extracción. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min y a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a viales de vidrio de 4 ml. Se recogió el sobrenadante y el sedimento que quedó en el Eppendorf fue reextraído con 500 μ l de metanol y centrifugado en las mismas condiciones.

Se recuperó de nuevo el sobrenadante recogido en la segunda extracción y se unió con el anterior. El sobrenadante (2 ml) se dividió en dos para extraer los compuestos fenólicos libres y totales por separado y se secaron en corriente de nitrógeno seco a 37°C.

III.2.1. Compuestos fenólicos libres

Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 1 ml de acetato de sodio (0.1M a pH 4.5) y se incubaron 12 horas. Se añadieron 77 μ L de ácido perclórico al 70% y seguidamente se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos adicionando 2,5 ml de una mezcla de acetato de etilo y ciclopentano 1:1 (v/v). Se formaron dos fases inmiscibles, quedando los compuestos de interés en la fase orgánica superior que se recogió y se transvasó a nuevos viales de vidrio secándose a continuación con corriente de nitrógeno seco en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Las muestras secas se resuspendieron en 300 μ l de metanol y se filtraron con ayuda de una jeringa de 1 ml acoplada a un filtro de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 μ m de poro (Waters). Se emplearon 100 μ L para el análisis por HPLC.

III.2.2. Compuestos fenólicos totales

El contenido en compuestos fenólicos glicosilados se determinó mediante la enzima β -glucosidasa. La hidrólisis enzimática llevada a cabo por esta enzima promueve la eliminación del azúcar y, con ello, la recuperación del compuesto fenólico en la fase orgánica, posibilitando que pueda ser detectado de la misma forma que los fenólicos libres.

Las extracciones de compuestos fenólicos conjugados se realizaron del mismo modo que las llevadas a cabo para fenólicos libres hasta el paso correspondiente al primer secado de las muestras en corriente de nitrógeno seco. Una vez llegados a este punto, se añadió 1 ml de tampón acetato sódico 0.1 M, pH 4.5 con la enzima β -glucosidasa (Fluka) preparada a una concentración de 1 mg/ml y la solución resultante se incubó a 37 °C durante toda la noche.

A continuación se adicionaron 77 μ l de ácido perclórico al 70% (v/v) para alcanzar una concentración final del 5%. Seguidamente, se realizó una extracción líquido-líquido con ciclopentano / acetato de etilo 1:1 (v/v) y se terminó la extracción del mismo modo que en el caso de compuestos fenólicos libres.

III.3. Análisis y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis realizados por HPLC de los extractos fenólicos de las muestras foliares fueron llevados a cabo siguiendo los protocolos descritos por Yalpani *et al.* (1993) y Bellés *et al.* (1999). De los 300 μ l del extracto metanólico final se transvasaron 100 μ l a los viales destinados al análisis por HPLC, de los cuales se inyectaron 30 μ l en una columna de fase reversa Sunfire C18 (5 μ m, 4.6 x 150 mm; Waters) equilibrada con ácido acético (J. T. Baker) al 1%.

Se aplicó un gradiente de metanol (0 a 100% en agua) durante 20 min, con un flujo constante de 1 ml/min. El SA y GA se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una λ de excitación de 313 nm y un λ de emisión de 405 nm. Mientras que para la detección del catecol (CA) se utilizó una λ de excitación de 270 nm y un λ de emisión de 330 nm. Con las condiciones cromatográficas empleadas, el CA presenta un tiempo de retención de 9.9 min, mientras que el GA y el SA eluyen a 13.3 y 19.01 minutos, respectivamente.

Finalmente, se elaboraron curvas patrón con distintas muestras de concentración conocida para llevar a cabo la cuantificación de los metabolitos en estudio (Figura A1, ANEXOS).

III.4. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

III.4.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA de las diferentes muestras de los distintos tejidos de planta se llevó a cabo con el reactivo TRIzol (Gibco BRL Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso y se realizaron todas las centrifugaciones a 4°C para evitar la degradación del RNA.

En primer lugar, se adicionó a un tubo Eppendorf aproximadamente 100 mg de tejido homogeneizado y 1 ml de reactivo TRIzol y se trituraron las muestras de tejido foliar empleando varillas de extremo cónico. Seguidamente, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min posibilitando, de esta forma, la disociación de los complejos nucleoproteicos. A continuación se almacenaron las muestras en TRIzol a -80°C como mínimo durante 30 min.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min con la ayuda de una microcentrífuga, se añadió al sobrenadante 200 µl de cloroformo, se agitaron los tubos vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos, transcurridos los cuales se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm durante 15 min. Tras ello, se transfirió la fase acuosa superior a nuevos tubos y fueron añadidos 500 µl de isopropanol, mezcándolos mediante inversión y se mantuvieron nuevamente 10 min a temperatura ambiente.

Pasados los 10 minutos, el RNA se recuperó mediante una centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 1 ml de etanol al 75% preparado en agua tratada con DEPC. Se centrifugó inmediatamente a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó de nuevo el sobrenadante y se dejó secar unos minutos al aire para evaporar el etanol restante. Se resuspendió el precipitado en 35 µl de H₂O tratada con DEPC y se calentó en un termobloque a 65 °C durante 10 min. Finalmente, se centrifugó 10 min a 10.000 rpm y se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a un tubo nuevo, que se almacenó a -20 °C.

III.4.2. Cuantificación de RNA

Para cuantificar la concentración de RNA extraído de las muestras, se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000, que inicialmente fue calibrado a cero con agua DEPC. Se realizó la lectura de la absorbancia a 258/280 nanómetros ($A_{258/280}$). A partir de los datos de absorbancia aportados por el Nanodrop, se calcularon las concentraciones de RNA.

Para ello, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu g}{\mu l} \text{ de RNA} = \text{Absorbancia neta a } 258 \text{ nm} \cdot \frac{1}{\epsilon}$$

siendo ϵ el Coeficiente de Extinción Molar, que en el caso del RNA es 1/40, y el factor de dilución 1:100.

La calidad del RNA extraído, así como la cuantificación del mismo, se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV, tal y como se especifica en el apartado III.4.6.

III.4.3. Obtención de cDNA a partir de RNA (Transcripción Reversa)

Para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa, se añadió a cada tubo Eppendorf: 5 μ g de RNA total extraído de la muestra foliar correspondiente, 2 μ l del oligonucleótido dT18, 10 μ l de tampón de reacción 5X y el volumen de agua tratada con DEPC necesario para alcanzar un volumen final de reacción de 50 μ l. La solución resultante se mantuvo a 65 °C durante 10 min para desnaturalizar los ácidos nucleicos, pasando los tubos posteriormente a hielo otros 10 min. A continuación, se adicionó una mezcla equimolar de desoxirribonucleótidos (dNTPs) a una concentración de 2.5 mM cada uno y 200 unidades (1 μ l) del enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega). Seguidamente se agitó en vórtex la mezcla, se incubó a 42 °C durante 1 hora y posteriormente a 70 °C durante 10 min. Finalmente, la muestra se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

III.4.4. Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR

En el presente proyecto se utilizaron oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes *RPL2* (Fleming *et al.*, 1993) y el ortólogo de tomate del gen *S3H* de Arabidopsis, correspondiente a la secuencia NM_001246911.1. En la Tabla 1 se muestran las secuencias correspondientes a dichos oligonucleótidos.

Secuencia génica amplificada	Cebador	Secuencia del cebador	Tamaño final esperado
<i>RPL2</i>	Directo	5'-GGTGACCGTGGTGTCTTTGC-3'	347 pb
	Reverso	5'-ACCAACGTTTTGTCCAGGAGGT-3'	
<i>S5H</i>	Directo	5'-TGGAGCAGGAATTTGGACCA-3'	427 pb
	Reverso	5'-AGTCCATTTCTCCAGCCCAA-3'	

Tabla 1. Oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones en cadena de la polimerasa.

III.4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizaron amplificaciones por PCR en un volumen final de 50 μ l empleando en cada reacción 5 μ l de cDNA obtenidos tras la reacción de transcripción reversa descrita, 1 μ l de cada cebador reverso y directo para la secuencia a amplificar, 5 μ l de dNTPs a 2.5 mM, 5 μ l de tampón de reacción 10X y 2 unidades de DNA polimerasa termoestable (Netzyme, N.E.E.D.). Para llevar a cabo la PCR se utiliza un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

El programa de temperaturas efectuado por el termociclador consta de las siguientes etapas: un paso inicial de desnaturalización (1 min a 94 °C), seguido de 25 ciclos de amplificación, que constan a su vez de una fase de desnaturalización (1 min a 94 °C), una fase de hibridación de los cebadores (1 min a 55 °C) y una tercera fase de elongación de la cadena (1 min a 72 °C). Finalmente, la reacción termina con una etapa de extensión (20 min a 72 °C).

III.4.6 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

El análisis de fragmentos de DNA de distintos tamaños, así como la verificación de la calidad del RNA, se realizaron mediante separación electroforética en geles de agarosa al 1% y al 1.2% respectivamente, tal y como se describe a continuación.

Se disolvieron 1 g o 1.2 g de agarosa de baja electroendósmosis (Pronadisa) en 100 ml de tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) hirviéndolo en microondas. Seguidamente, se añadieron en campana 25 μ g de bromuro de etidio por cada 50 ml y se vertió la solución en el molde, dejándolo en reposo hasta su gelificación. Una vez obtenido el gel, se colocó en la cubeta de electroforesis, que fue rellena con un volumen suficiente de tampón TAE 1X y se cargaron las muestras de DNA, a las que previamente se les había añadido 1/6 volúmenes de tampón de carga (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.2%). Como patrón de la longitud en pares de bases de las secuencias de DNA, se utilizó el marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (Fermentas). La electroforesis se desarrolló a 80-100 V, dependiendo del tamaño del gel, durante un tiempo que asegure la separación electroforética, en este caso se correspondía con un avance del colorante de unas $\frac{3}{4}$ partes del gel. Una vez producida la separación, se extrajo el gel del molde cuidadosamente, se visualizó el DNA o el RNA por exposición a luz UV y se obtuvo un registro de las imágenes obtenidas mediante el uso de un documentador de geles Syngene G:BOX.

III.5. Recursos informáticos

Se efectuaron rastreos de secuencia empleando las herramientas disponibles en la base de datos del TAIR (The Arabidopsis Information Resource, www.arabidopsis.org). También se llevaron a cabo análisis mediante el algoritmo BLAST de las bases de datos NCBI (The National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del Proyecto Internacional de Secuenciación del Genoma de Tomate (<http://www.solgenomics.net/tomato>).

Para el diseño del cebador específico de la secuencia del posible gen *S5H* se utilizó el servicio Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). La edición de las secuencias se realizó utilizando el programa Editseq. Los alineamientos de secuencias y la elaboración de los árboles filogenéticos se realizaron empleando el programa MegAlign. Ambos programas pertenecen a la suite bioinformática DNASTAR Lasergene.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el laboratorio donde ha sido realizado el presente Trabajo Fin de Grado, se han obtenido resultados que indican que el ácido gentísico (GA) podría jugar un papel señalizador complementario al del ácido salicílico (SA) en la activación de la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos en interacciones de tipo compatible (Bellés *et al.*, 1999, 2006; Lisón *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014). Por otro lado, una investigación sobre la senescencia foliar ha puesto de manifiesto un elegante mecanismo catabólico para el SA por el cual plantas de *Arabidopsis thaliana* regulan los niveles de este compuesto mediante su conversión a 2,3-DHBA, evitando así la sobreacumulación de SA. El enzima responsable de dicha regulación, la salicilato 3-hidroxilasa (S3H), es capaz también de convertir el SA en GA *in vitro* (Zhang *et al.*, 2013).

El presente proyecto tiene como objetivo contribuir al conocimiento de la ruta metabólica de ambos compuestos y del papel señalizador de los mismos en la respuesta defensiva de las plantas. Para ello, se pretende, por una parte, caracterizar el fenotipo metabólico de plantas transgénicas *Nagl*, previamente obtenidas en este laboratorio (TFC, Ana Hernández Buendía, 2010). Por otra parte, se estudiará si el ortólogo del gen *S3H* de *Arabidopsis thaliana* en tomate, podría ser el responsable de la conversión de SA en GA, esto es, si presenta actividad salicilato 5-hidroxilasa (S5H) *in vivo* en plantas de tomate. Para ello, se estudiará su patrón de expresión en diferentes infecciones patogénicas donde se ha descrito la acumulación de GA, así como en plantas transgénicas de tomate *NahG* y *Nagl*, que degradan SA y GA, respectivamente, sometidas a diferentes tratamientos exógenos con compuestos fenólicos implicados en su biosíntesis.

IV.1. Análisis del comportamiento de plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* sometidas a tratamientos exógenos de diferentes compuestos fenólicos implicados en la síntesis de SA y GA

Con el fin de caracterizar el fenotipo metabólico de las plantas transgénicas *Nagl*, se realizaron tratamientos exógenos a plantas de tomate Moneymaker (MM), *NahG* y *Nagl* con ácido salicílico (SA), ácido genticónico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (*o*-CU). Dichos tratamientos proporcionan el sustrato necesario para analizar la actividad genticato-1,2-dioxigenasa (GDO) codificada por el gen *Nagl*, y la actividad salicilato 5-hidroxilasa (S5H), posiblemente codificada por el ortólogo del gen *S3H* de *Arabidopsis thaliana*.

Como ya se ha comentado anteriormente, el SA es el precursor inmediato del GA. Por tanto, al tratar exógenamente las plantas con SA y sus precursores BA y *o*-CU, una parte del SA absorbido por la planta se convertiría a GA por la actividad del enzima salicilato-5-hidroxilasa, tal y como se describe en Bellés *et al.* (1999), pudiendo así evaluar la actividad de este enzima. Mediante los tratamientos exógenos con los metabolitos empleados se aportaría a las plantas *Nagl* el sustrato de la GDO, siendo posible el análisis del comportamiento de tales plantas en cuanto a la acumulación de GA se refiere. Se pretende observar una disminución de GA acumulado en las plantas de tomate *Nagl* frente al GA presente en las plantas control (Moneymaker) como consecuencia de la actividad GDO.

La aplicación exógena de tales metabolitos se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado III.1.2.). Se observaron las diferencias fenotípicas existentes entre las hojas de las plantas genotípicamente diferentes (MM, *NahG* y *Nagl*) y se tomaron las muestras a las 24h del tratamiento.

IV.1.1. Estudio de la sintomatología de plantas de tomate *NahG*, *Nagl* y Moneymaker tratadas de forma exógena con SA, GA, BA y *o*-CU

En la Figura 6 se muestran hojas representativas de cada tipo planta tratada con cada uno de los distintos compuestos. Como se puede observar, tanto las plantas transgénicas *NahG* como las *Nagl*, de forma general, mostraron una menor susceptibilidad a los tratamientos que las plantas Moneymaker.

Las hojas de plantas MM embebidas en SA presentaron una necrosis elevada en comparación con las plantas transgénicas *Nagl* y *NahG*, siendo estas últimas las que resultaron ser las menos susceptibles a dicho tratamiento. En el caso de las plantas *NahG*, dicho comportamiento podría deberse a la capacidad de estas plantas para transformar el SA en catecol, eliminado así su posible toxicidad provocada por la alta concentración aplicada (1mM). En el caso de las plantas *Nagl*, su sintomatología menos pronunciada que las MM podría deberse a que la capacidad de estas plantas de eliminar el GA

produciría un descenso en los niveles de su precursor, el SA. Esta posibilidad se analiza en detalle en apartados posteriores.

Con respecto al tratamiento realizado con GA, las plantas transgénicas *Nagl* son las que mejor respuesta ofrecieron a dicho tratamiento, no presentando apenas sintomatología. Esto puede ser debido al efecto que tiene la GDO al romper el anillo aromático del GA convirtiéndolo en maleil-piruvato y eliminando así su posible efecto tóxico. Por su parte, las plantas MM y *NahG*, ambas sin actividad GDO, desarrollaron una leve clorosis, en el caso de las MM, y la aparición de tonalidades oscuras intervenales, en el caso de las *NahG*.

En cuanto a los tratamientos con BA y *o*-CU, los folíolos de todas las plantas presentaron una leve clorosis y una pronunciada epinastia, apreciándose con mayor intensidad en las plantas MM. Puesto que ambos metabolitos, BA y *o*-CU, son precursores del SA, las plantas *NahG* presentaron una menor susceptibilidad a los tratamientos con dichas moléculas que las plantas MM y *Nagl*. Esto podría deberse a que el tratamiento con estos metabolitos se detoxificara por su conversión a SA y consiguiente transformación a catecol en las plantas transgénicas *NahG*.

En general, nuestros resultados parecen indicar que las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* presentan una menor susceptibilidad a los tratamientos exógenos con SA, GA, BA y *o*-CU, debido al efecto detoxificante que produce la expresión de los transgenes sobre dichos tratamientos. Además hemos observado que dicha susceptibilidad es menos pronunciada en las plantas transgénicas *NahG* en el caso de los tratamientos con SA, BA y *o*-CU, mientras que las plantas *Nagl* son las menos susceptibles al tratamiento con GA.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de un enzima que degrada un determinado compuesto fenólico parece afectar no sólo a la acumulación de éste, sino también a la acumulación de sus precursores, indicando que el metabolismo de estos compuestos está estrechamente relacionado y complejamente regulado.

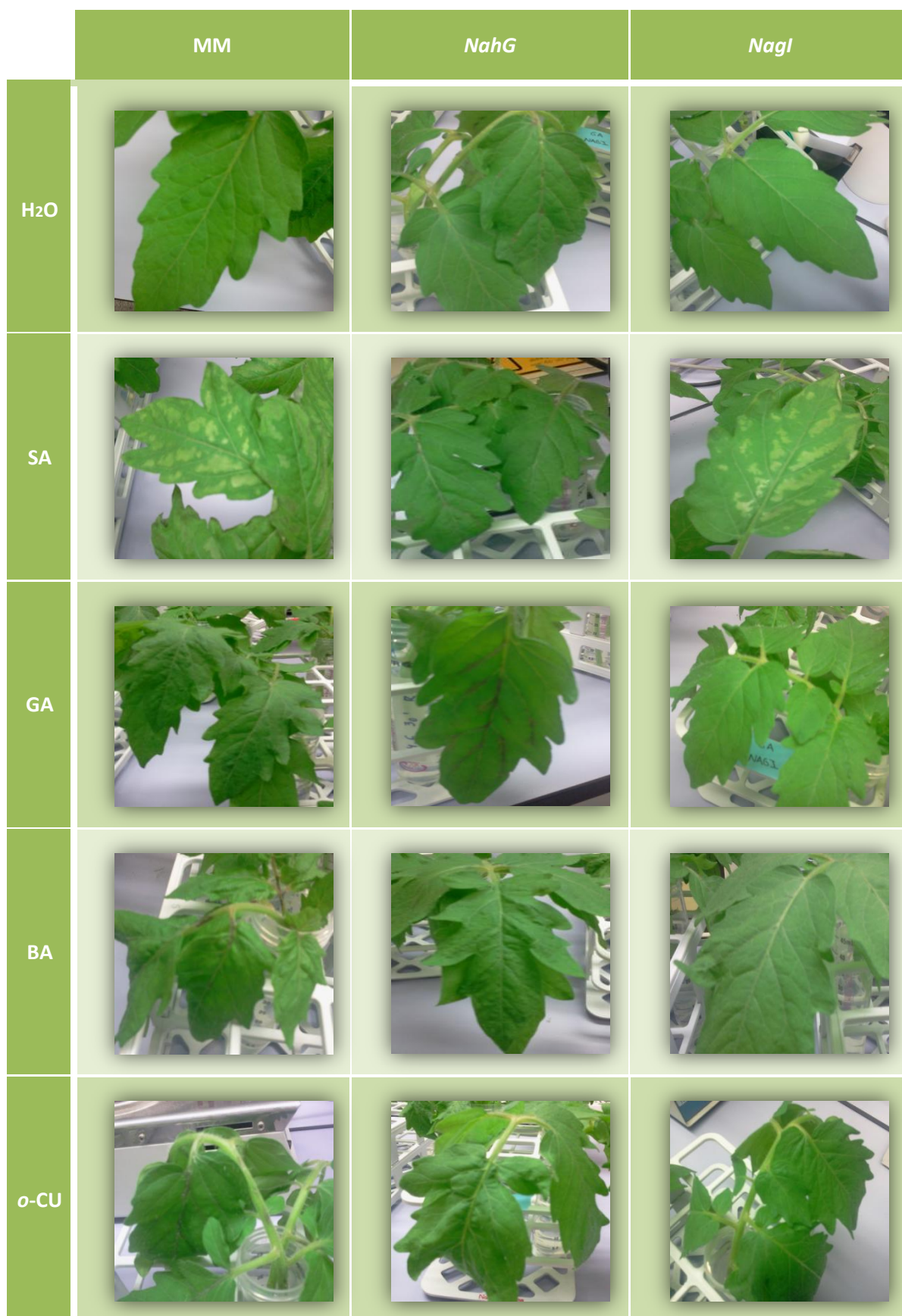


Figura 6. Sintomatología representativa de hojas de plantas de tomate Moneymaker, *NahG* y *Nagl* tratadas con H₂O, SA, GA, BA y o-CU, a las 24 horas.

IV.1.2. Análisis de la acumulación de compuestos fenólicos en plantas de tomate *NahG*, *Nagl* y Moneymaker tratadas de forma exógena con SA, GA, BA y o-CU

Puesto que se habían observado diferencias fenotípicas entre las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* y su fondo genético Moneymaker, se procedió al estudio de los niveles de acumulación de los ácidos salicílico (SA) y gentísico (GA) en dichas plantas sometidas a los diferentes tratamientos.

Normalmente, el GA y SA se encuentran en muy pequeña cantidad en forma libre en la planta, ya que se ha comprobado que éstos son rápidamente conjugados a azúcares. El GA es xiloso por la acción del enzima tipo glicosiltransferasa (GAGT, Tárraga *et al.*, 2010), mientras que el SA es glicosilado por el enzima SA glucosil transferasa (SAGT, Gerardo *et al.*, 2010). Para conocer los niveles totales de dichos metabolitos acumulados en planta, es necesario analizar los niveles de compuesto tanto en forma libre como en forma conjugada, correspondiendo el total a la suma de ambas formas (ver Materiales y Métodos, apartado III.2).

En las Figuras 7 y 8 se muestran los niveles de SA y GA libres y totales que se acumulan en las plantas correspondientes a los tres genotipos (MM, *NahG* y *Nagl*) a las 24 h después de un tratamiento exógeno con SA, GA, BA y o-CU, así como de sus correspondientes controles tratados con agua. En las Figuras A2 y A3 (ver Anexos), se representan detallados los valores de acumulación de SA y GA total correspondientes a los tratamientos con ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU).

La comparación de las Figuras 7 y 8 muestra que la actividad conjugadora de GA a xilosa es mucho mayor que la de SA a glucosa, tal y como se describe en Tárraga *et al.* (2010), puesto que la diferencia entre los niveles libres y conjugados es mucho mayor para el caso del GA. Por otra parte, se observa que tanto la acumulación de SA como la de GA resultó ser indetectable por HPLC, para los tres tipos vegetales, en los tratamientos control.

En lo que respecta a la gráfica de acumulación de SA (Figura 7 y A2), en los tres tipos de plantas (MM, *NahG* y *Nagl*) tratadas con SA, BA y ácido o-CU se aprecia una acumulación de SA. El hecho de que el BA y o-CU sean precursores del SA explica la acumulación de dicha fitohormona en plantas tratadas con BA y o-CU. Sin embargo, los niveles de SA que se acumulan como consecuencia de los tratamientos con BA y o-CU son despreciables en comparación con los niveles de dicho metabolito presentes en estas mismas plantas bajo la aplicación exógena de SA. Por otro lado, los tratamientos exógenos realizados con GA no generaron acumulación de SA en ningún tipo de planta en estudio. Esto es debido, presumiblemente, a que la reacción que convierte SA en GA es prácticamente irreversible.

Por otra parte, se observa que las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl*, en comparación con las Moneymaker, mostraron una disminución en los niveles de SA al ser tratadas con dicho metabolito, o con sus precursores BA y o-Cu. Esta reducción, para los tres tratamientos, fue mucho más pronunciada en las

plantas *NahG* puesto que estas plantas llevan a cabo la conversión de SA en catecol, impidiendo así la acumulación de esta molécula.

Por su parte, las plantas transgénicas *Nagl* poseen la capacidad de transformar GA, producido a partir de SA, en maleil-piruvato. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el enzima GDO, codificado por el gen *Nagl*, carece de actividad frente al SA (TFC, Mayte Castellano Pérez, 2012). Por lo tanto, el hecho de que se observe una reducción de SA en las plantas *Nagl* tratadas con este mismo compuesto, podría deberse a que la disminución de GA en estas plantas produjera un desplazamiento en el equilibrio hacia la formación de GA a partir del SA, provocando, por tanto, una disminución en los niveles de SA. Estos resultados confirmarían la actividad GDO in vivo en plantas de tomate.

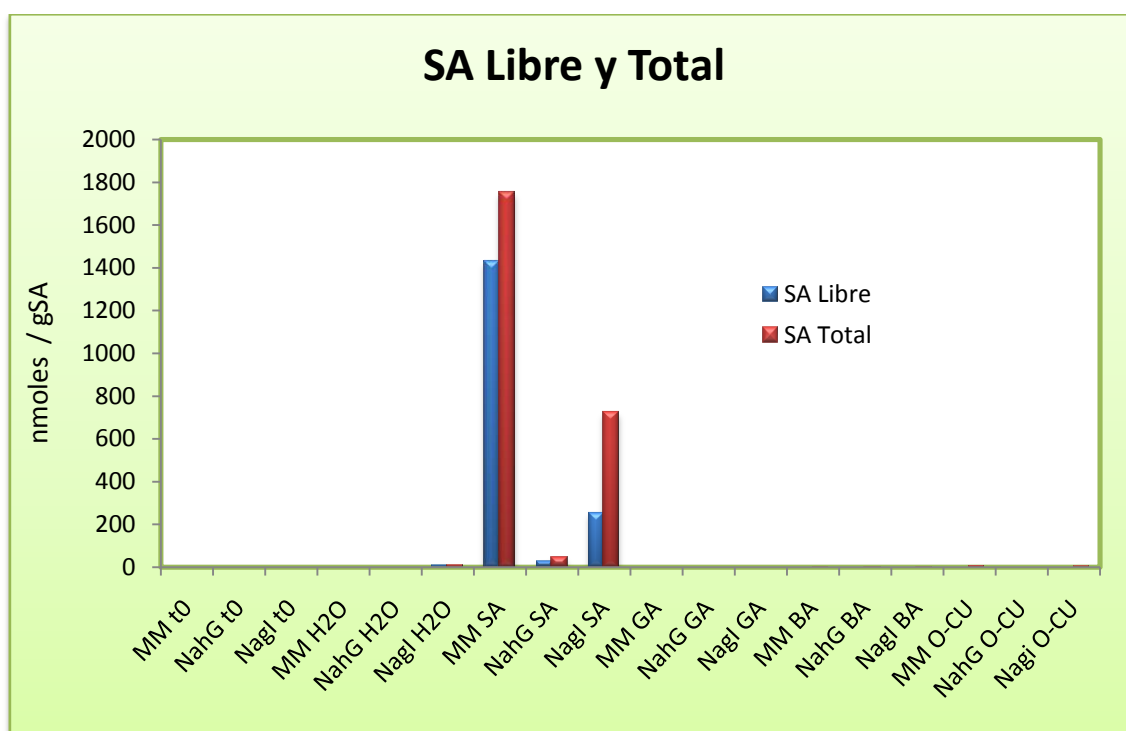


Figura 7. Acumulación de SA libre y total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas *NahG* y *Nagl*, tratadas con ácido salicílico (SA), ácido gentísico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU) y sus correspondientes controles a las 24 horas de su aplicación exógena. Se muestran los resultados de una repetición biológica representativa de los tres experimentos realizados.

En cuanto a la gráfica de acumulación de GA (Figura 8 y A3), se aprecia una acumulación de GA en los tres tipos de plantas (MM, *NahG* y *Nagl*) tratadas con SA, GA, BA y ácido o-CU. Los resultados obtenidos se corresponden con los esperados al visualizarse la acumulación de GA en plantas tratadas con dichos metabolitos, puesto que estos tres compuestos son precursores del GA. Por otro lado, los

niveles de GA acumulado presente en los tres tipos de plantas tratadas con este metabolito son mucho mayores que los existentes en las plantas tratadas con SA, BA y *o*-CU, tal y como cabría esperar.

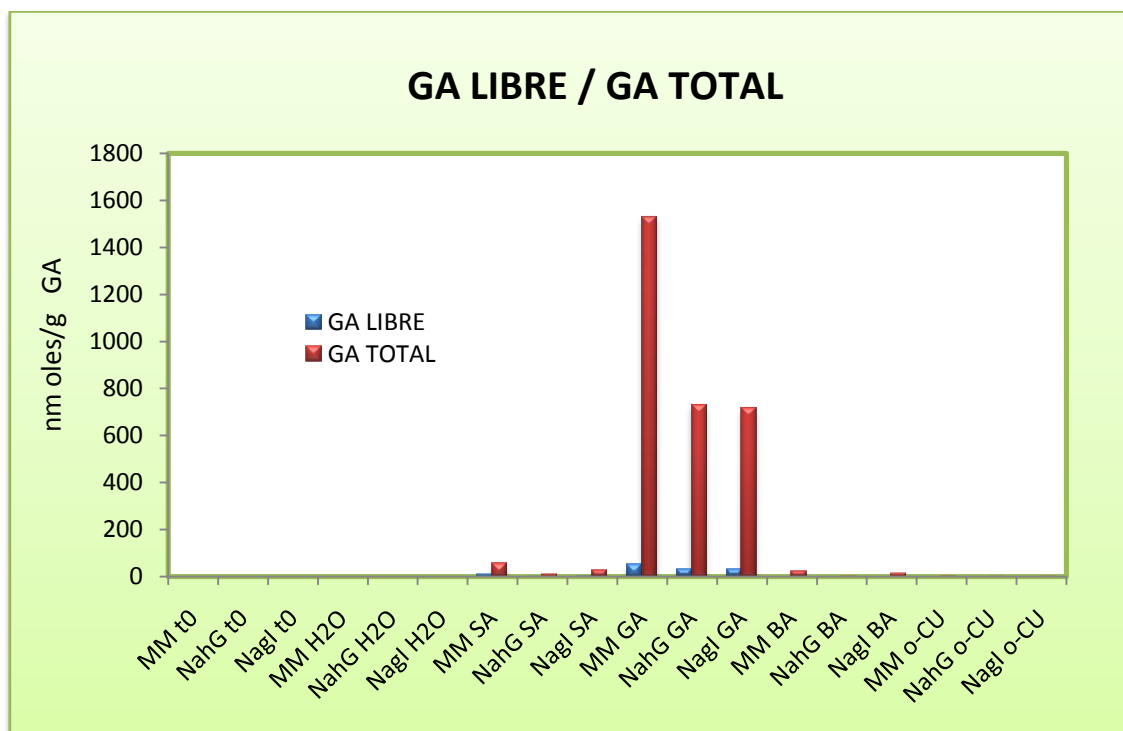


Figura 8. Acumulación de GA libre y total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas *NahG* y *NagI*, tratadas con ácido salicílico (SA), ácido gentsílico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (*o*-CU) y sus correspondientes controles a las 24 horas de su aplicación exógena. Se muestran los resultados de una repetición biológica representativa de los tres experimentos realizados.

Tras la aplicación exógena con GA, las plantas *NagI* y *NahG* presentaron una reducción apreciable en los niveles de este metabolito, en comparación con las Moneymaker. Como se ha mencionado anteriormente, las plantas *NagI* tienen la capacidad de transformar GA en maleil-piruvato, reduciendo así los niveles de esta fitohormona. Por tanto, los menores niveles de GA detectados en estas plantas cuando son tratadas con este mismo metabolito confirmarían la actividad GDO *in vivo* en plantas de tomate *NagI*. Resultados similares se obtuvieron en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* o por expresión transitoria en *Nicotiana Benthamiana* (TFC, Ana Hernández Buendía, 2010).

Las plantas *NahG* no poseen la capacidad de destruir el GA y, sin embargo, redujeron el GA total aproximadamente a la mitad. Con el fin de discutir este resultado, se determinó la acumulación de catecol en dichas plantas transgénicas para analizar si el GA que se reducía era finalmente convertido en este compuesto. Los valores de catecol obtenidos tras el HPLC permiten afirmar que en las plantas *NahG* parte del GA acumulado es convertido a SA, siendo éste totalmente convertido en catecol (Figura 9). Por

tanto, estos resultados parecen indicar que la reacción llevada a cabo por la S5H es reversible en el caso de las plantas *NahG*.

Por otra parte, las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl*, en comparación con las Moneymaker, mostraron una disminución en los niveles de GA al ser tratadas con SA, GA, BA y *o*-CU. Esta reducción, para los tratamientos con SA, BA y *o*-CU fue más pronunciada en las plantas *NahG* puesto que estas plantas expresan constitutivamente la salicilato hidroxilasa que les permite llevar a cabo la conversión de SA en catecol, impidiendo así la acumulación de GA al reducir los niveles de SA. Las plantas *Nagl*, que convierten el GA en maleil-piruvato, presentan niveles reducidos de GA en comparación con las Moneymaker cuando son tratadas con SA, BA y *o*-Cu. Estos resultados de nuevo confirman la actividad GDO *in vivo* en plantas de tomate *Nagl*.

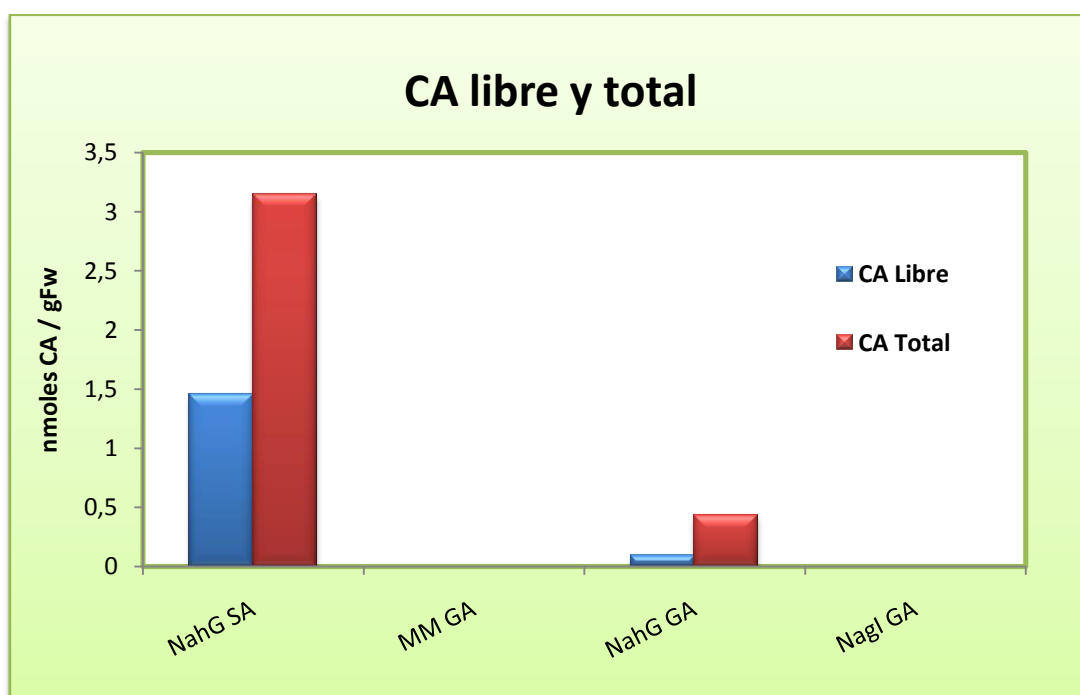


Figura 9. Acumulación de catecol (CA) libre y total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas *NahG* y *Nagl*, tratadas con ácido gentísico (GA) y, también con ácido salicílico (SA) en el caso de *NahG*. Se muestran los resultados de una repetición biológica representativa de los tres experimentos realizados.

Por lo tanto, los resultados correspondientes al estudio de los niveles de acumulación de SA y de GA en plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* y plantas Moneymaker control sometidas a tratamientos con SA, GA, BA y *o*-CU, confirman las diferencias fenotípicas previamente observadas. Así pues, la menor sintomatología producida por los tratamientos que presentan las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl*, se correlaciona con menores niveles de acumulación, tanto de SA como de GA, en ambas plantas transgénicas.

En la Tabla 2 se muestran los resultados en porcentajes de reducción de SA y GA para los tres genotipos analizados y para todos los tratamientos, correspondientes a la media de las repeticiones biológicas realizadas. Como puede observarse, la reducción de las fitohormonas defensivas SA y GA en las plantas transgénicas *NahG* es mayor que en las plantas transgénicas *Nagl* en los tratamientos con SA, BA y *o*-Cu. Sin embargo, en la aplicación exógena de GA, las plantas transgénicas *Nagl* presentan una mayor reducción de dicho metabolito que las *NahG*.

			REDUCCIÓN (%)			
			LIBRES		TOTALES	
			SA	GA	SA	GA
TRATAMIENTOS	SA	<i>NahG</i>	96,41 ± 0,3%	97,27 ± 3,8%	98,20 ± 0,02%	83,82 ± 12,2%
		<i>Nagl</i>	36,34 ± 0,3%	63,41 ± 11%	61,03 ± 10,08%	48,64 ± 4,6%
	GA	<i>NahG</i>	-	33,91 ± 5,88%	-	52,33 ± 3,4%
		<i>Nagl</i>	-	39,7 ± 1,95%	-	53,31 ± 6,4%
	BA	<i>NahG</i>	-	-	74,65 ± 7,57%	94,91 ± 7,2%
		<i>Nagl</i>	-	-	26,07 ± 10,96%	43,44 ± 10,7%
	<i>o</i> -CU	<i>NahG</i>	-	-	80,89 ± 6,82%	78,41 ± 4,04%
		<i>Nagl</i>	-	-	5,45 ± 0,85%	30,89 ± 6,15%

Tabla 2. Reducción (%) de los niveles de SA y GA libres y totales en plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* tras la aplicación exógena de diferentes metabolitos. Datos correspondientes a la media de las repeticiones biológicas realizadas.

Por otra parte, hemos confirmado que la alteración en los niveles de un determinado compuesto fenólico parece afectar a la acumulación de sus precursores, ya que hemos observado una disminución de SA en las plantas *Nagl* tratadas con este metabolito, así como una disminución de GA en las plantas transgénicas *NahG* tratadas con GA. Variaciones en los niveles de los precursores también se han descrito en un estudio en donde se observó que el aumento del nivel de SA libre generado tras la inoculación de plantas de tabaco *Xanthi-nc* con TMV, conlleva un aumento en los niveles de BA libre en dicha hoja inoculada (León *et al.*, 1993). En otra investigación se demostró que los niveles conjugados de

SA, así como los de sus precursores BA y *o*-CU, aumentaron en hojas de maíz tras el tratamiento con cadmio (0, 10, 25 y 50 M) (Pál *et al.*, 2005).

El estudio de la regulación del gen responsable del paso de SA a GA en las plantas transgénicas *Nagl* resulta de especial interés.

IV.2. Rastreo del gen de tomate ortólogo al *S3H* en *Arabidopsis*

El gen salicilato 3-hidroxilasa (*S3H*) está implicado en el catabolismo del SA durante la senescencia de la hoja. Se induce por SA y es un enzima clave en el sistema de regulación por retroalimentación negativa de los niveles de SA durante la senescencia. El enzima convierte el SA en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y 2,5-DHBA (GA) *in vitro*. Tanto mutantes *s3h*, como líneas de sobreexpresión para este gen, han confirmado además la actividad conversora a 2,3-DHBA *in vivo*, ya que estas plantas presentan menores y mayores niveles de acumulación de este compuesto, respectivamente. Así pues, el enzima *S3H* regula los niveles de SA mediante su conversión a 2,3-DHBA durante la senescencia de las hojas en *Arabidopsis*, para evitar así la sobreacumulación de tal metabolito (Zhang *et al.*, 2013).

Decidimos efectuar una prospección en busca del gen de tomate ortólogo al *S3H* del anterior estudio implicado en el catabolismo de SA en *Arabidopsis*. Para ello, se recurrió a la base de datos de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org), donde se buscó la secuencia de interés cuyo número de acceso es At4g10500. Tras obtener la secuencia de dicho gen, se obtuvo su proteína y se realizó un análisis BLAST tanto en el NCBI como en la base de datos de solanáceas (www.solgenomics.net). El resultado de las búsquedas dió lugar en el primer caso a un conjunto de secuencias proteicas de diferentes especies, de entre las cuales se eligieron las tres de tomate con *e-value* más favorable; en el segundo caso mediante el BLAST realizado en solanáceas se obtuvo una serie de secuencias proteicas de tomate, de entre las cuales se escogieron las tres con mejor *e-value*.

Se empleó el programa MegAlign para realizar alineamientos entre las secuencias proteicas obtenidas de los BLAST y la secuencia proteica del gen de partida de *Arabidopsis*. Como soporte adicional, se elaboró un árbol filogenético a partir de los alineamientos de secuencia para determinar qué secuencia mostraba una mejor correspondencia con la de *Arabidopsis* (Figura 10). A partir de la secuencia nucleotídica correspondiente a dicha secuencia proteica (NM_001246911.1) se procedió a la elaboración de cebadores específicos para la secuencia escogida.

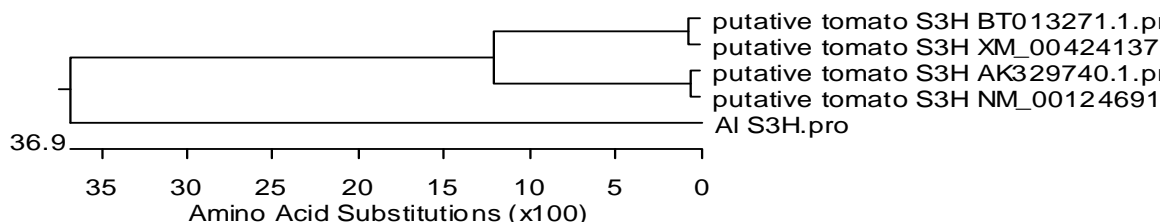


Figura 10. Árbol filogenético de la secuencia proteica S3H de *Arabidopsis thaliana* y sus posibles correspondencias en tomate.

Con el fin de corroborar las búsquedas, la secuencia obtenida fue sometida a análisis BLAST, esta vez contra la base de datos de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org). Se concluye mediante este estudio que la secuencia identificada correspondiente al posible gen S3H en tomate (NM_001246911.1) debería corresponder, con toda probabilidad, con su ortóloga descrita en *Arabidopsis thaliana*.

IV.3. Estudio de la expresión del posible gen S5H en diferentes infecciones patogénicas de tomate Moneymaker

Con el fin de estudiar si el ortólogo del gen S3H de *Arabidopsis thaliana* en tomate, presenta actividad salicilato 5-hidroxilasa (S5H) *in vivo* en plantas de tomate, es decir, si es el responsable de la conversión del SA en GA, realizamos un estudio de la cinética de inducción de dicho gen a lo largo del desarrollo de la enfermedad ocasionada por viroide y bacteria. En ambas infecciones se ha descrito que tiene lugar la acumulación de GA, por lo que debería producirse la inducción de este gen (Bellés *et al*, 1999; TFC, Ana Ruíz Pastor, 2013). Para ello, se analizaron muestras, previamente generadas en el laboratorio, de plantas de tomate Moneymaker infectadas con el viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) y de plantas de tomate Rio Grande infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae pv tomato AvrPto*, que da lugar a una interacción de tipo *incompatible* (o avirulenta) e inoculadas con la cepa de bacteria virulenta $\Delta avrPto$, que da lugar a una interacción *compatible* (virulenta), con el consiguiente desarrollo de la enfermedad. En el caso de la infección por bacteria se recogieron muestras a los 10, 18, 24 y 48 días después de su inoculación, mientras que para el estudio de infección por viroide, las muestras fueron recogidas a las 2, 2.5, 3 y 4 semanas post-inoculación. Para ambas infecciones se recogieron los controles (plantas sin infectar) correspondientes a los tiempos mencionados.

Se llevó a cabo la extracción de RNA de dichas muestras y se analizaron por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para los genes RPL2 y S5H (ver Materiales y Métodos). Las amplificaciones del gen constitutivo RPL2 fueron empleadas como control (Fleming *et al.*, 1993).

Como se observa en las Figuras 11 y 12, *S5H* se indujo como consecuencia de la infección viroidal y bacteriana en tomate. En el caso del experimento realizado con bacteria, dicha inducción fue detectable a los 10 días después de haber realizado la inoculación, siendo también visible a los 18, 24 y 48 días post-inoculación. En interacciones de tipo *compatible* la inducción del gen *S5H* fue más acusada que en las de tipo *incompatible* y los controles (Figura 10). Estos datos concuerdan con los previamente obtenidos en nuestro laboratorio en los que hemos observado que el GA se acumula como consecuencia de esta infección bacteriana, siendo dicha acumulación mayor en la infección de tipo *compatible* (TFC, Ana Ruíz Pastor, 2013).

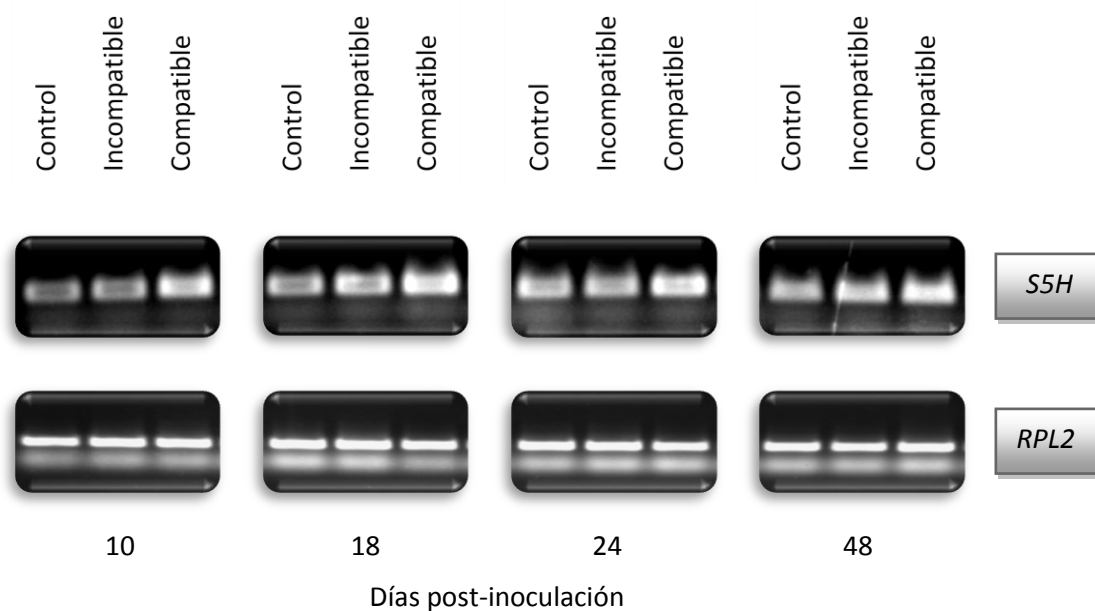


Figura 11. Efecto de la infección bacteriana sobre la expresión del posible gen *S5H* de tomate obtenido por homología de secuencia a partir del genoma de *Arabidopsis*. Se muestran las amplificaciones de transcritos mediante RT-PCR, realizadas a partir de RNAs de plantas de tomate infectadas con bacteria *Pseudomonas syringae pv tomato*. Las muestras fueron recogidas a los 10, 18, 24 y 48 días después de la inoculación. Las PCRs del gen *RPL2* se usaron como control de la transcripción reversa (Fleming et al, 1993).

Los resultados obtenidos para el caso de infección con CEVd de plantas MoneyMaker, muestran una inducción del gen *S5H* en todas las muestras infectadas tomadas a las 2, 2.5, 3 y 4 semanas de la inoculación, con respecto a las muestras correspondientes a plantas sanas (Figura 12). De nuevo, la acumulación de la posible *S5H* se correlaciona con la presencia de GA, pues se ha descrito que dicho metabolito se acumula muy fuertemente en plantas de tomate infectadas por viroide (Bellés *et al.*, 1999), siendo el conjugado de GA a xilosa el compuesto que se acumula de manera mayoritaria en esta infección (López-Gresa *et al.*, 2010).

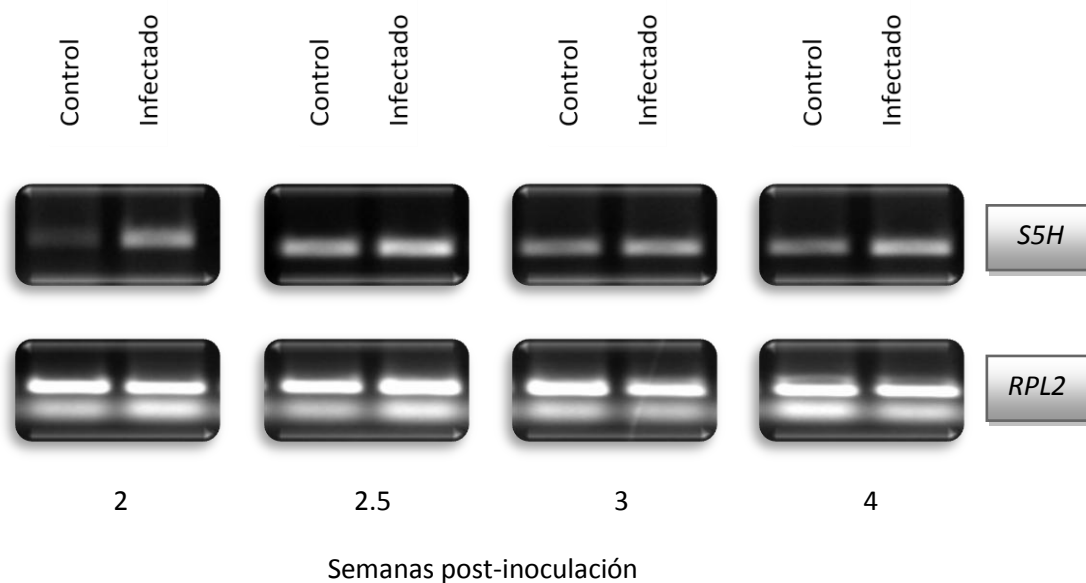


Figura 12. Efecto de la infección viroidal sobre la expresión del posible gen *S5H* de tomate obtenido por homología de secuencia a partir del genoma de *Arabidopsis*. Se muestran las amplificaciones de transcritos mediante RT-PCR, realizadas a partir de RNAs de plantas de tomate infectadas con el viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd). Las muestras fueron recogidas a las 2, 2.5, 3 y 4 semanas post-inoculación. Las PCRs del gen *RPL2* se usaron como control de la transcripción reversa.

Así pues, hemos observado que el ortólogo del gen *S3H* de *Arabidopsis thaliana* en tomate se induce en infecciones en las que tiene lugar la acumulación de GA, siendo dicho patrón de inducción compatible con la función *S5H* propuesta en tomate.

IV.4. Estudio de la expresión del posible gen *S5H* en plantas de tomate Moneymaker, *NahG* y *Nagl* sometidas a diferentes tratamientos exógenos

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis del patrón de expresión del posible gen *S5H* en plantas Moneymaker infectadas con bacteria y viroide y tras la determinación de la acumulación de compuestos fenólicos descrita anteriormente, decidimos estudiar la expresión diferencial de dicho gen en las distintas líneas transgénicas *NahG* y *Nagl* sometidas a tratamientos exógenos con SA, GA, BA y o-CU.

Con este estudio principalmente se pretende analizar si los menores niveles de SA observados en las plantas transgénicas *Nagl* tratadas con estos compuestos fenólicos se corresponden con un aumento en la expresión del gen propuesto como *S5H*, codificante del enzima encargado de realizar la transformación de SA a GA.

Con dicho fin, se analizaron por RT-PCR las muestras foliares de plantas Moneymaker y plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* sometidas a los tratamientos exógenos con SA, GA, BA y *o*-CU, así como sus respectivos controles, empleando oligonucleótidos específicos para *RPL2* y *S5H* (Figura 12). De nuevo, las amplificaciones del gen constitutivo *RPL2* fueron empleadas como control (Fleming *et al.*, 1993).

Como se observa en la Figura 13, las muestras control antes de realizar el tratamiento (t_0) así como las tratadas con agua (H_2O), no presentaron apenas inducción del gen *S5H*. Los pequeños niveles que se aprecian en las plantas tratadas con agua podrían deberse a la pequeña producción de SA generada como consecuencia de la activación de una respuesta defensiva causada por la herida o daños físicos existentes en los tejidos de la planta tras su tratamiento (Collinge *et al.* 2001).

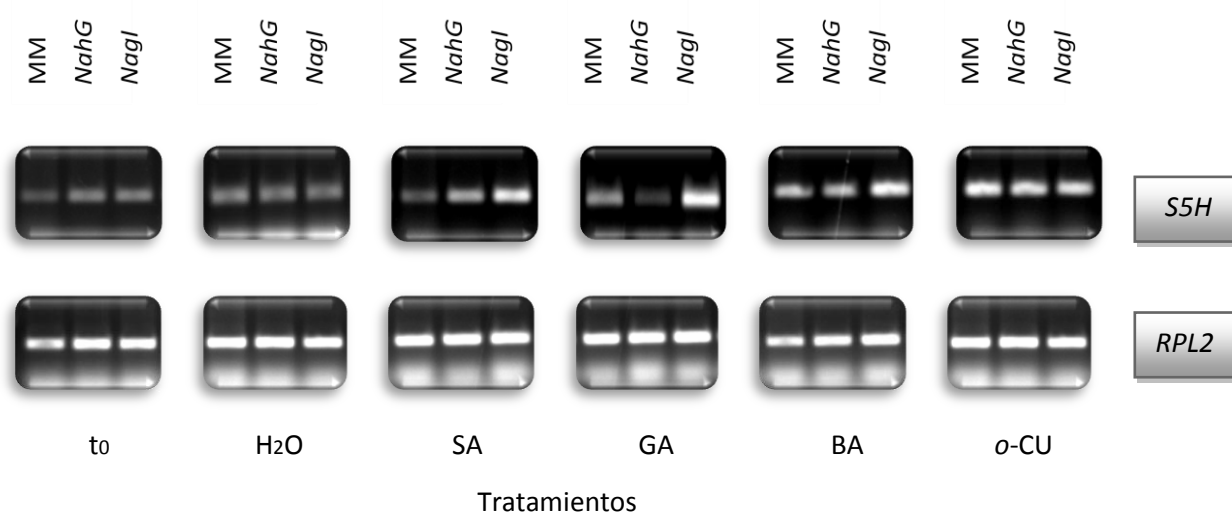


Figura 13. Estudio de la expresión de los genes *RPL2* y *S5H* en plantas Moneymaker (MM), *NahG* y *Nagl* sometidas a aplicación exógena de ácido salicílico (SA), ácido genticónico (GA), ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (*o*-CU), a las 24 horas después del tratamiento. Además de los tratamientos mencionados, se presentan los controles llevados a cabo, los cuales consisten en muestras sin tratamiento (t_0) y muestras tratadas con agua (H_2O).

Numerosos estudios demuestran que los genes que codifican la síntesis de enzimas se ven inducidos por los sustratos de las mismas, siendo un claro ejemplo de ello la inducción de las proteínas PR por parte del SA (Fraser *et al.*, 1981; Lotan *et al.*, 1990; Yalpani *et al.*, 1991) o la inducción de BA2H por la aplicación exógena de BA (León *et al.*, 1993). En ese sentido, hemos observado que las muestras tratadas con SA presentaron una clara inducción del gen *S5H*, en los tres tipos de planta, tal y como cabía esperar. Asimismo, en las plantas transgénicas *Nagl* se observó una mayor inducción de dicho gen. Estas plantas transgénicas estarían convirtiendo el GA, generado a partir del SA, a maleil-piruvato, favoreciendo que tenga lugar una mayor transformación de SA a GA y promoviendo de este modo una mayor actividad del enzima *S5H* (Figura 13).

Por otra parte, la aplicación exógena con GA produjo una expresión diferencial del gen en estudio en los distintos tipos de especies vegetales. Las plantas *NahG* no presentaron de forma apreciable inducción del gen *S5H* comparada con la inducción observada en las plantas Moneymaker (Figura 13). Hemos observado que los niveles de GA se reducen en estas plantas como consecuencia de una posible activación de la reacción de transformación de GA en SA, debida a la eficacia del enzima SA hidroxilasa que convierte el SA en catecol. Por tanto, en estas plantas la transformación de SA a GA será muy reducida y consiguientemente la actividad del enzima *S5H*. Finalmente, las plantas *Nagl* mostraron la mayor inducción del gen *S5H* (Figura 13). Estos resultados confirmarían nuestra hipótesis de que en las plantas *Nagl*, la disminución de GA produciría un aumento en la expresión del gen *S5H* y por consiguiente un desplazamiento en el equilibrio hacia la formación de GA a partir del SA, provocando así una disminución en los niveles de SA.

Los resultados obtenidos del tratamiento exógeno con BA también muestran una inducción del gen *S5H* en los tres tipos de planta cuando se comparan con las plantas control a tiempo cero o tratadas con agua. Aparentemente, las plantas Moneymaker y *NahG* no presentan una inducción diferencial, mientras que las *Nagl* parecen mostrar la mayor inducción del *S5H*, aunque poco apreciable en este caso. Esto es debido a que las plantas *Nagl* transforman el GA a maleil-piruvato favoreciendo un leve incremento de la actividad del *S5H* (Figura 13).

Por último, la aplicación exógena de *o*-CU provoca la inducción de *S5H* en Moneymaker, *NahG* y *Nagl*. Sin embargo, la inducción visible en los resultados obtenidos para cada tipo de planta no permite afirmar que existe una inducción diferencial del gen en estudio entre ellas (Figura 13). Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que el *o*-CU no es un precursor directo del GA, por lo que el posible efecto de la sobreexpresión de GDO podría perderse en estos tratamientos. Resultaría interesante realizar más estudios al respecto.

Todos nuestros resultados obtenidos con las plantas transgénicas *Nagl* parecen confirmar tanto la actividad GDO como la actividad *S5H in vivo*. Así pues, tratamientos con GA o con cualquiera de sus precursores (SA, BA y *o*-CU) producen una reducción en los niveles de GA, llevada a cabo por GDO. Por otra parte, el tratamiento con SA de estas plantas produce una disminución en los niveles de este metabolito, provocada por un aumento en la expresión del enzima propuesto como *S5H* (Figura 14). Estos resultados confirman la actividad observada para el gen *S3H* de *Arabidopsis*, capaz de formar 2,5-DHBA (GA) a partir del SA *in vitro* (Zhang *et al.*, 2013).

Por otra parte, hemos observado que las plantas transgénicas *NahG*, que no poseen la capacidad de destruir el GA, reducen el GA total cuando son tratadas con este metabolito. En estas plantas, parte del GA acumulado es convertido a SA, siendo éste rápidamente y totalmente convertido en catecol. Por tanto, estos resultados parecen indicar que la reacción llevada a cabo por la S5H es reversible en el caso de las plantas *NahG*, estando dicha actividad alterada en estas plantas (Figura 14).

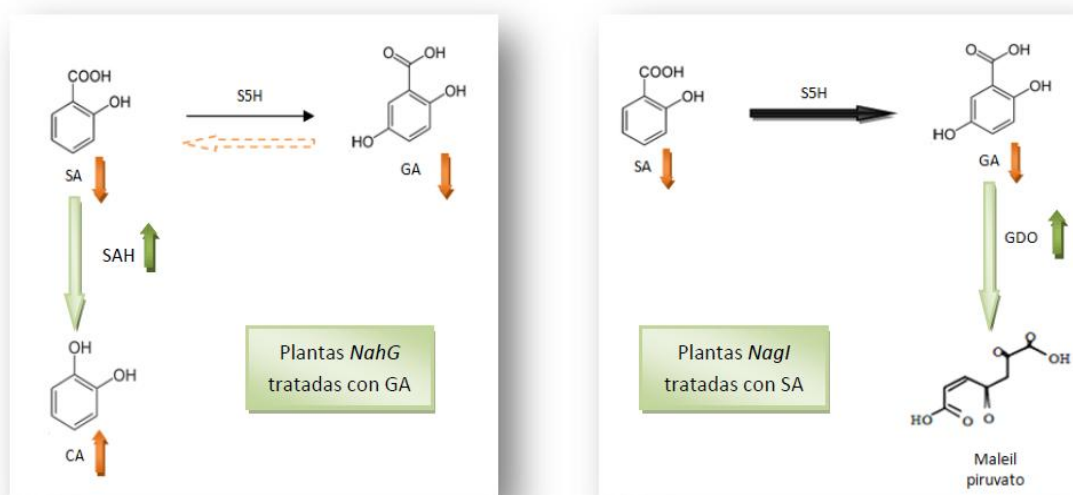


Figura 14. Modelo del comportamiento de los diferentes metabolitos y enzimas que participan en su ruta metabólica, en plantas transgénicas *NahG* y *NagI* tratadas con GA o SA, respectivamente. La salicilato hidroxilasa (SAH), codificada por el gen *NahG*, lleva a cabo la conversión de ácido salicílico (SA) en catecol (CA). La gentisato-1.2-dioxigenasa (GDO), codificada por el gen *NagI*, rompe el anillo aromático del ácido gentísico (GA) convirtiéndolo en maleil-piruvato. La salicílico 5-hidroxilasa (S5H) produce la hidroxilación del SA para dar lugar al GA.

A modo de resumen, hemos observado que tratamientos con metabolitos de naturaleza fenólica de plantas transgénicas con sobreexpresión de genes que producen la alteración en los mismos, pueden afectar también a la acumulación de sus precursores y, por tanto, modificar los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de dichos precursores.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Nuestro laboratorio está desarrollando una aproximación multidisciplinar (Bioquímica, Biología Molecular, Genómica, Proteómica y Metabolómica) para esclarecer el significado del ácido gentísico en la interacción planta-patógeno. Las plantas transgénicas *Nagl* constituyen un excelente sistema para el estudio del papel que juega el GA en la respuesta defensiva de las plantas, del mismo modo que lo suponen para el SA las plantas transgénicas *NahG*, incapaces de acumular dicho metabolito (Brading et al., 2000).

A lo largo de este trabajo, hemos comprobado que estas plantas presentan un fenotipo metabólico, puesto que presentan menores niveles de SA y de GA cuando son tratadas exógenamente con estos metabolitos, resultando ser menos susceptibles a dichos tratamientos. Con el fin de estudiar si este fenotipo metabólico va acompañado de un fenotipo de una mayor susceptibilidad, se infectarán estas plantas con patógenos que provoquen la acumulación de GA, tales como *Pseudomonas syringae* o CEVd. Se analizarán si estas plantas transgénicas presentan menores niveles de estos compuestos fenólicos como consecuencia de la infección, y si ello produce una mayor susceptibilidad a dichos patógenos, confirmando así el papel señalizador defensivo del GA. Se estudiarán las posibles bases moleculares que subyacerían a esta hipersusceptibilidad, analizando si las plantas transgénicas *Nagl* acumulan menores niveles de la proteína marcadora de defensa PR1 o de los genes relacionados con el silenciamiento génico, cuando son infectadas por patógenos que causan infecciones compatibles. Por último, se analizará el comportamiento del gen *S5H* como consecuencia de las infecciones en las plantas transgénicas *Nagl*.

Todo ello, conllevaría un enriquecimiento del conocimiento acerca del papel del SA y GA en la respuesta defensiva de las plantas provocada por estreses de tipo biótico y abiótico. Será igualmente interesante estudiar otros posibles efectos pleiotrópicos de la menor acumulación de SA y GA en dichas plantas.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* presentan una menor susceptibilidad a tratamientos exógenos con SA, GA, BA y *o*-CU, con respecto a las plantas control Moneymaker, siendo las plantas transgénicas *Nagl* las menos susceptibles al tratamiento con GA.
2. La menor sintomatología observada en las plantas transgénicas *NahG* y *Nagl* tras aplicaciones exógenas con SA, GA, BA y *o*-CU se correlaciona de manera general con una menor acumulación tanto de SA como de GA, con respecto a las plantas control Moneymaker, indicando que la expresión de los transgenes produce un efecto detoxificante sobre dichos tratamientos y confirmando la actividad GDO *in vivo* en las plantas transgénicas de tomate *Nagl*.
3. La disminución de SA que tiene lugar en las plantas *Nagl* tratadas con este metabolito, así como la disminución de GA en las plantas transgénicas *NahG* tratadas con GA, indica que la alteración en los niveles de un determinado compuesto fenólico puede afectar a la acumulación de sus precursores y, por lo tanto, producir modificaciones en los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de los mismos.
4. El gen de tomate ortólogo al gen *S3H* de *Arabidopsis thaliana*, se induce como consecuencia de infecciones de tipo compatible causadas por viroide y por bacteria, en las que tiene lugar la acumulación de GA en tomate, siendo dicho patrón de inducción compatible con la función *S5H* propuesta para dicho gen.
5. Las plantas transgénicas *Nagl* muestran una mayor inducción del posible gen *S5H* de tomate, que las plantas Moneymaker y *NahG*, tras los tratamientos exógenos con SA, GA y BA.
6. La disminución en los niveles de SA observada en las plantas transgénicas *Nagl* sometidas a un tratamiento con SA, podría deberse a un aumento en la expresión del gen propuesto como *S5H* en tomate, que produciría un desplazamiento en el equilibrio hacia la formación de GA a partir del SA, confirmando la función de *S5H in vivo* en estas plantas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 1665-1681.
- Ament K, Krasikov V, Allmann S, Rep M, Takken FL, Schuurink RC (2010) Methyl salicylate production in tomato affects biotic interactions. *Plant J*. Epub ahead of print.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 721-733.
- Balaji V, Sessa G (2008) Activation and manipulation of host responses by a Gram-positive bacterium. *Plant Signal Behav.* 3:839-41.
- Balbi V, Devoto A (2008) Jasmonate signaling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* 177: 301-318.
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 694:473-488.
- Bartsch M, Bednarek P, Vivancos PD, Schneider B, von Roepenack-Lahaye E, Foyer CH, Kombrink E, Scheel D, Parker JE. (2010) Accumulation of isochlorogenic acid-derived 2,3-dihydroxybenzoic 3-O-beta-D xyloside in Arabidopsis resistance to pathogens and ageing of leaves. *J Biol Chem* 285(33):25654-25665.
- Beckers GJ, Spoel SH (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol. (Stuttgart)* 8: 1-10.
- Bellés JM, Garro R, Navarro P, Primo J, Conejero V (1999) Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 227-235.
- Bellés JM, Garro R, Pallás V, Fayos J, Rodrigo I, Conejero V (2006) Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant pathogen interactions. *Planta* 223: 500-511.
- Blumwald E, Aharon GS, Lamb BCH (1998) Early signal transduction pathways in plant pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 3: 342-346
- Boatwright JL1, Pajeroska-Mukhtar K. (2013). Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. *Mol Plant Pathol.* 14(6):623-34.
- Brading PA, Hammoud-Kosack KE, Parr A, Jones JDG (2000) Salicylic acid is not required for Cf-2 and Cf-9- dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.* 233: 305-318.
- Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MFC, Cammue BPA (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 393-416
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2002). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Pages 1102-1156 in: *Response to plant pathogens* y pages 1250-1318 in: *Natural products (secondary metabolites)* Ed: American Society of Plant Physiologists (Rockville, Maryland).

- Campos L, Granell P, Tárraga S, López-Gresa P, Conejero V, Bellés JM, Rodrigo I, Lisón P. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol Biochem.* 77:35-43.
- Collinge, DB; Borch, J; Madriz-Ordeñana, K; Newman. (2001). The responses of plants to pathogens. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment.*
- Conejero V, Bellés JM, García-Breijo F, Garro R, Hernández-Yago J, Rodrigo I, Vera P (1990) Signaling in Viroid Pathogenesis. *Recognition and Response in Plant-Virus Interactions* 233- 263 Springer-Verlag. Heidelberg.
- Dangl JL, Dietrich RA, and Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793–1807.
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 441: 826:833.
- Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221:287-96.
- Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K., Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, and Lamb C (1994) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Desender S, Andrivon D, Val F (2007) Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cellular Microbiology* 9: 21-30.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JL (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386: 855-858.
- Dorais M, DL Ehret, AP Papadopoulos (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, Springer.
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185-209.
- Ebel J, Cosio EG (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148: 1–36.
- Fayos J, Bellés JM, López-Gresa MP, Primo J, Conejero V (2006) Induction of gentisic acid 5-O-D xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry* 67: 142-148.
- Fleming AJ, Mandel T, Roth I y Kuhlemeier C (1993) The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell* 5: 297-309.
- Flor H (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:257-296.
- Fraser, R. S . S. (1981). Evidence for the occurrence of the "pathogenesis-related" proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiol. Plant Pathol.* 19:69-76.
- Fuenmayor SL, Wild M, Boyes AL, Williams PA (1998) A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2. *J Bacteriol.* 180: 2522-30.

- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Ukness S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Gao QM1, Kachroo A, Kachroo P. (2014). Chemical inducers of systemic immunity in plants. *J Exp Bot.* 65(7):1849-55.
- Gerardo Rangel Sánchez, Elda Castro Mercado, Elda Beltran Peña, Homero Reyes de la Cruz y Ernesto García Pineda (2010) El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 12(2): 90-95.
- Glazebrook J (1999) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 280-286.
- Horvath DM, Chua NH (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* 31: 1061-1072.
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 2.1-2.27.
- Hunt, M., and Ryals, J. (1996). Systemic acquired resistance signal transduction. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 583-606.
- Jones JDG, Dangl J (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kachroo A, Robin GP. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Curr Opin Plant Biol.* 16(4):527-33.
- Lawton K, Uknes S, Friedrich L, Gaffney T, Alexander D, Goodman R, Metraux JP, Kessmann H, Ahl Goy P, Gut Rella M, Ward E, Ryals J (1993) The molecular biology of systemic acquired resistance. In B Fritig, M Legrand, eds, *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp 422-432.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals, J (1995) Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 863-87.
- León Jose, Nasser Yalpani, Ilya Raskin, and Michael A. Lawton (1993). Induction of Benzoic Acid 2-Hydroxylase in Virus-Inoculated Tobacco. *Plant Physiol.* 103: 323-328.
- Lisón Purificación, Susana Tárraga, Pilar López-Gresa, Asunción Saurí, Cristina Torres, Laura Campos, José M. Bellés, Vicente Conejero and Ismael Rodrigo (2013). A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *PROTEOMICS* Volume 13, Issue 5, pages 833-844.
- López-Gresa MP, Maltese F, Bellés JM, Conejero V, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2010). Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochem. Anal.* 21: 89-94.
- Lorrain S, Vailliau F, Balague C, Roby D (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* 8: 263-271.
- Lotan, T., Fluhr, R. (1990). Function and regulated accumulation of plant pathogenesis related proteins. *Symbiosis* 8:33-46.
- Ma W, Qi Z, Smigel A, Walker RK, Verma R, Berkowitz GA. 2009. Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 20995-21000.

- Mackowiak PA (2000) Brief history of antipyretic therapy. *Clin. Infect. Dis.* 31: S154-S156.
- Magda Pál, Eszter Horváth, Tibor Janda, Emil Páldi and Gabriella Szalai (2005). Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays*) plants. *Physiologia Plantarum* Volume 125, Issue 3, pages 356–364.
- Mur LAJ, Bi YM, Darby RM, Firek S, Draper J (1997) Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV infected tobacco. *Plant J.* 12: 1113-1126.
- Neuenschwander, U., Lawton, K., and Ryals, J. (1996). Systemic acquired resistance. In *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1, G. Stacey and N.T. Keen, eds (New York: Chapman and Hall), pp. 81-106.
- Nürnberg T (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 167–182.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198: 249–266.
- O'Donnell PJ, Schemelz EA, Moussatche P, Lund ST, Jones JB, Klee HJ (2003) Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant J.* 33: 245-257.
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116.
- Pennell RI, Lamb C (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9: 1157:1168.
- Peralta, I.E. and D.M. Spooner. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). pp 1-27. In: *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*, Vol. 2: Tomato. M.K. Razdan and A.K. Mattoo (eds.), Science Publishers, Enfield, USA.
- Pierpoint WS (1997) The natural history of salicylic acid: plant product and mammalian medicine. *Interdisciplinary Science Reviews* 22: 45-52.
- Pieterse CMJ, Ton J, van Loon LC (2001) Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotech Net.* 3.
- Restrepo S, Myers KL, del Pozo O, Martin GB, Hart AL, Buell CR, Fry WE, Smart CD (2005). Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 913–922.
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 372-379.
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., del Río, L.A., Sandalio, L.M. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂- and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell and Environment* 27:1122-1134.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Scheel D (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 305-310.

- Schwessinger B, Zipfel C (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 389-395.
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-367.
- Staal J, Dixelius C (2007) Tracing the ancient origins of plant innate immunity. *Trends Plant Sci.* 12: 334-342.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- Tárraga S, Lisón P, López-Gresa MP, Torres C, Rodrigo I, Bellés JM, Conejero V (2010). Molecular cloning and characterization of a novel tomato xylosyltransferase specific for gentisic acid. *J. Exp. Bot.* 61(15): 4325-38.
- Thilmony R, Underwood W, He SY (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* 46: 34–53.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141: 373: 378.
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X, Holuigue L (2004) NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 17: 34-42.
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 245-264.
- van Loon LC, van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Vleeshouwers VGAA, van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT (2000). The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance with *Phytophthora infestans*. *Planta* 210:853-864
- Willdermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature* 414: 562-565.
- Wise RP, Mouscou MJ, Bogdanove AJ, Whitham SA (2007) Transcript profiling in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol* 45: 329-369.
- Xiang C, Miao Z, Lam E (1997) DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 34: 403-415.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M. A., Kleier, D.A., Raskin I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3:809-18.
- Yalpani N, León J, Lawton M, Raskin I (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315-321.

Yang T, Poovaiah BW (2002). A clamodulin-binding/CGCG box DNA binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol. Chem.* 277: 45049-45058.

Zhang Kewei, Halitschke Rayko, Yin Changxi, Liu Chang-Jun and Gan Su-Sheng (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. Departments of a Horticulture, Ecology and Evolutionary Biology, and Plant Breeding and Genetics.

VII. ANEXOS

VII. ANEXOS

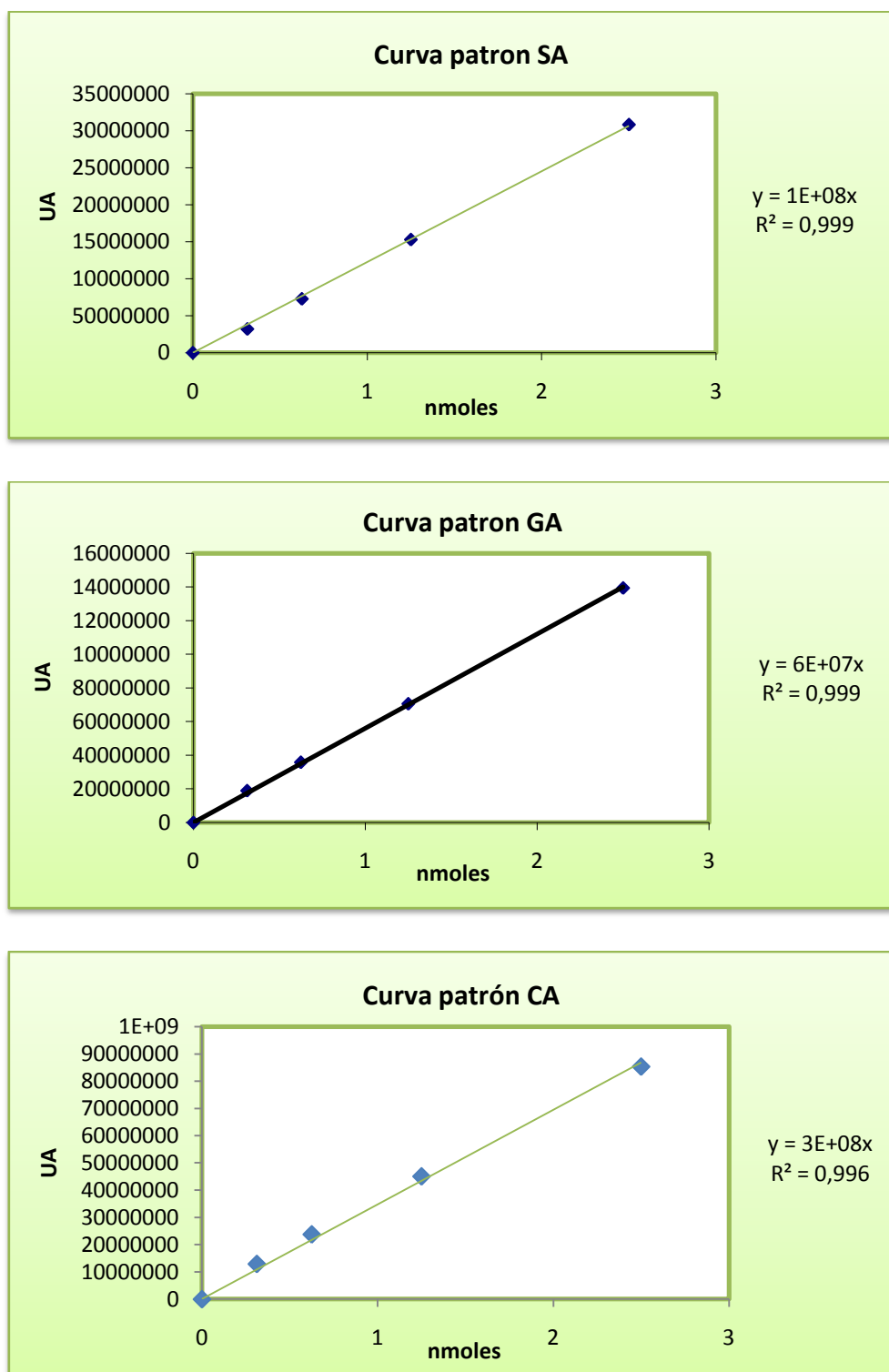


Figura A1. Curvas patrón para ácido salicílico (SA), ácido gálico (GA) y catecol (CA). Las gráficas se obtuvieron a partir de 5 muestras de concentración conocida de SA, GA y CA, respectivamente. Dichos compuestos se detectaron por fluorescencia, empleando una λ de excitación de 313 nm y una λ de emisión de 405 nm para el caso del SA y GA; mientras que para la detección del CA se utilizó una λ de excitación de 270 nm y un λ de emisión de 330 nm.

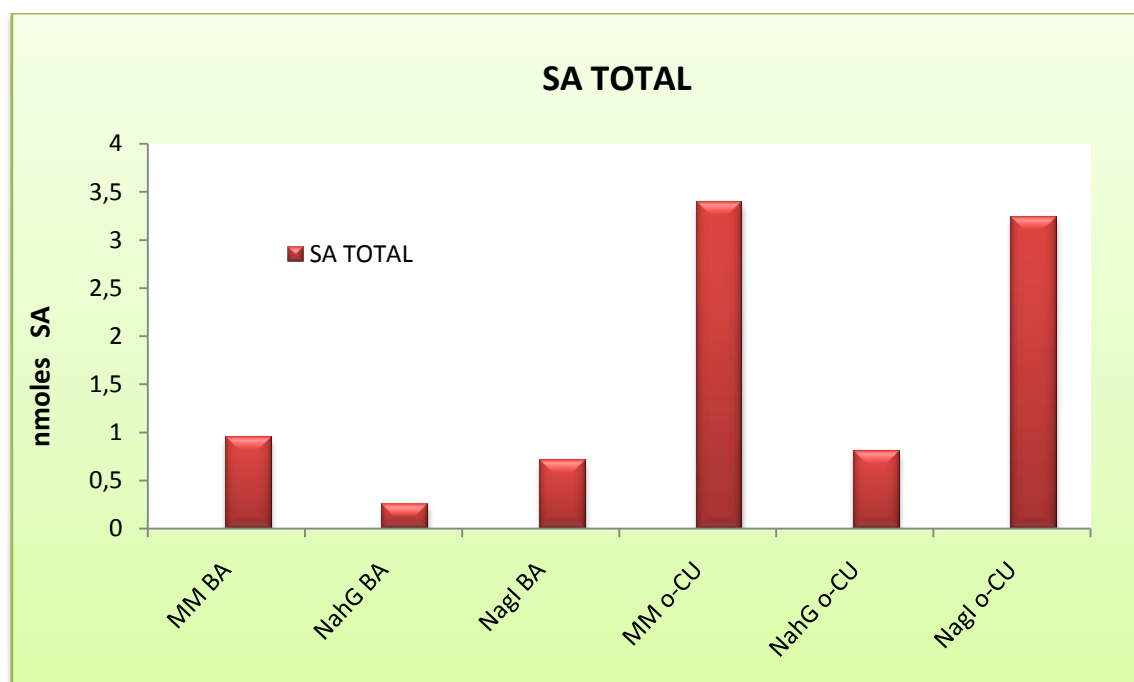


Figura A2. Acumulación de SA total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas *NahG* y *NagI*, tratadas ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU) a las 24 horas de su aplicación exógena.

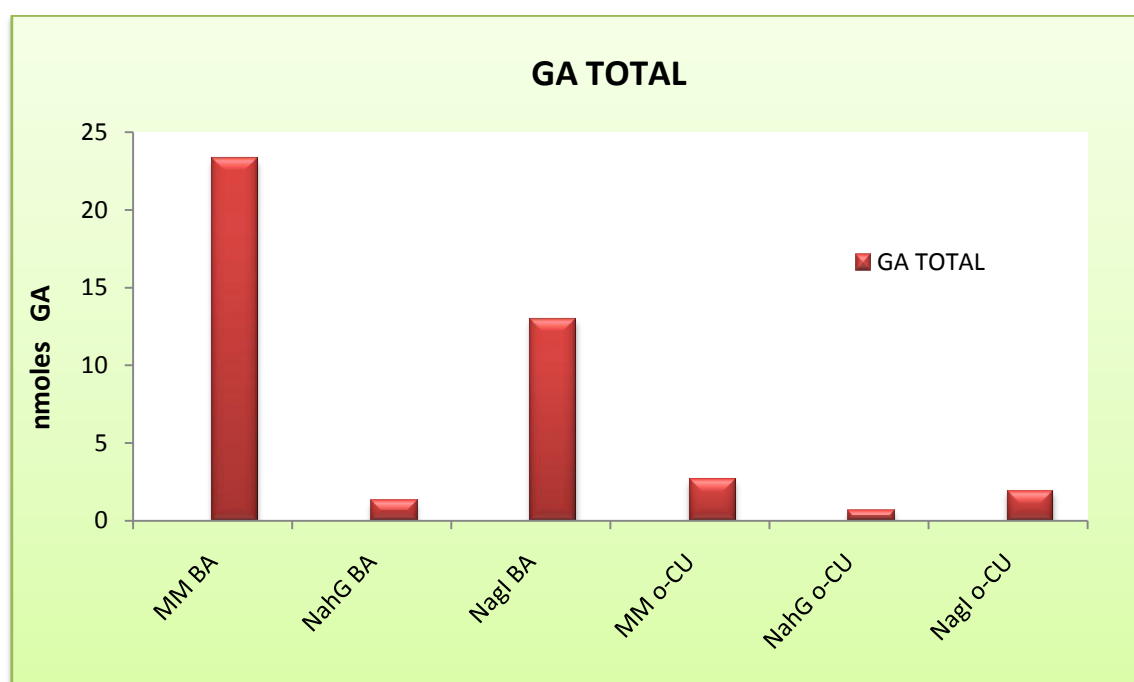


Figura A3. Acumulación de GA total en plantas de tomate Moneymaker (MM), y transgénicas *NahG* y *NagI*, tratadas con ácido benzoico (BA) y ácido orto-cumárico (o-CU) a las 24 horas de su aplicación exógena.