

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÀRIA
UNIVERSITAT DE LLEIDA



Aproximación de química genómica para el entendimiento de la respuesta defensiva vegetal frente a patógenos: Identificación de moléculas antagonistas y agonistas de la regulación transcripcional en el mutante *ocp1* de *Arabidopsis thaliana*.

Sabina Porcar Centelles

Julio 2012

Director: Dr. Pablo Vera Vera (IBMCP)

Cotutora: Dra. Pilar Muñoz Odina (UDL)

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Pablo Vera Vera haberme permitido compaginar la realización de este proyecto con mi trabajo en el laboratorio. Gracias a sus conocimientos y correcciones he podido llevar a cabo este proyecto.

En segundo lugar quiero mostrar mi agradecimiento a la Dra. Pilar Muñoz Odina por acceder a tutorar este proyecto sin conocerme con anterioridad y por la ayuda brindada.

También agradezco a todos los compañeros del laboratorio y a Fernando la ayuda y compañía prestadas durante este tiempo, especialmente a Javi, porque sin él no hubiera empezado mi estancia en el laboratorio. Gracias por haber sido maestro y asesor, por tener tanta paciencia y buen humor y, cómo no, por las andanzas vividas en Lleida durante la época de estudiante.

Agradecer a mis padres y a mi hermana su apoyo y paciencia cuando la presión me hace explotar. Gracias por estar ahí.

Finalmente, agradecer de manera muy especial a Fernando, por estar a mi lado de manera incondicional y aguantarme siempre. Gracias por tu apoyo, por tus risas y por todo lo vivido.

Resumen

La genética química en plantas constituye una poderosa herramienta en auge. Para profundizar en el entendimiento de los mecanismos defensivos vegetales frente al ataque de microorganismos patógenos se realizó un rastreo de moléculas moduladoras de la expresión del gen Ep5C, que se activa en respuesta a la aplicación de H₂O₂ y al ataque de *Pseudomonas syringae*. Para ello se utilizó el mutante *ocp1* de *Arabidopsis thaliana* obtenido por mutagénesis a partir de plantas transgénicas pEp5C::GUS. Conocida la relación de Ep5C con la RdDM gracias a la implicación funcional de OCP1 y OCP11, se identifica a MOD18, MOD2 y MOD1 como moléculas potenciales implicadas en esta ruta. Además se identifica a MOD1 como molécula activadora de las defensas a través de la ruta mediada por ácido salicílico.

Resum

La genètica química en plantes constitueix una poderosa ferramenta en auge. Per a profunditzar en l'enteniment dels mecanismes defensius vegetals front a l'atac de microorganismes patògens es va realitzar un rastreig de molècules moduladores de l'expressió del gen Ep5C, que s'activa en resposta a l'aplicació de H₂O₂ y a l'atac de *Pseudomonas syringae*. S'ha utilitzat el mutant *ocp1* d'*Arabidopsis thaliana*, obtés per mutagènesi a partir de plantes transgèniques pEp5C::GUS. Coneguda la relació d'Ep5C amb la RdDM gràcies a la implicació funcional d'OCP1 i OCP11, s'identifica a MOD18, MOD2 i MOD1 com a potencials molècules implicades en aquesta ruta. A més a més, s'identifica a MOD1 com a molècula activadora de les defenses a través de la ruta mediada per àcid salicílic.

Summary

Chemical genetics in plants is a powerful tool booming. To deepen the understanding of plant defense mechanisms against pathogen attack, we performed a screening to find modulatory molecules of expression of Ep5C gene, which is activated in response to application of H₂O₂ and attack by *Pseudomonas syringae*. We used *ocp1 Arabidopsis thaliana* mutant, obtained by mutagenesis from pEp5C::GUS transgenic plants. Known the relationship between Ep5C and RdDM through the functional involvement of OCP1 and OCP11, we identified MOD18, MOD2 and MOD1 as potential molecules involved in this pathway. Furthermore, we identified MOD1 as a defenses enhancer through salicylic acid mediated pathway.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Interacción planta-patógeno	1
1.1.1. Aspectos generales de la interacción planta-patógeno	1
1.1.2. Barreras preformadas	2
1.1.3. Percepción del patógeno por parte de la planta	2
1.1.4. Respuestas inducidas a nivel local	6
1.1.5. Señalización hormonal	8
1.1.6. Respuestas inducidas sistémicas	11
1.2. Antecedentes del proyecto	12
1.3. Introducción a la genética química	15
1.3.1. Genética química directa y genética química reversa	16
1.3.2. Ventajas y desventajas	17
1.3.3. Genética química en plantas	18
2. Objetivos	20
3. Material y Métodos	21
3.1. Material vegetal	21
3.1.1. Ecotipos utilizados	21
3.1.2. Cultivo <i>in vitro</i>	21
3.1.3. Germinabilidad y Amplificación de semillas	22
3.2. Librería de compuestos	23
3.3. Rastreo de moléculas	23
3.4. Actividad β -glucuronidasa	24
3.5. Confirmación de las moléculas identificadas	24
3.6. Efecto de las moléculas seleccionadas sobre los mutantes <i>ocp</i> y su línea parental	25
3.7. Implicación de los compuestos moduladores en la respuesta defensiva dependiente de ácido salicílico	27

4. Resultados y discusión	31
4.1. Puesta a punto del método experimental	31
4.2. Rastreo de moléculas antagonistas y agonistas de la regulación transcripcional del mutante <i>ocp1</i>	33
4.2.1. <i>Compuestos moduladores de la expresión de Ep5C</i>	37
4.2.2. <i>Confirmación de los compuestos moduladores de la expresión de Ep5C</i>	38
4.3. Efecto de las moléculas moduladoras de la expresión de Ep5C sobre los mutantes <i>ocp</i> y su línea parental	43
4.4. Implicación de los compuestos moduladores de la expresión de Ep5C en la respuesta defensiva dependiente de ácido salicílico	51
5. Conclusiones	54
6. Bibliografía	55

Abreviaturas

- ABA: ácido abscísico
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AGO4: argonauta 4
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNsi: pequeños ARN interferentes
- Avr: factores de avirulencia
- Col-0: ecotipo silvestre Columbia
- EMS: metano-sulfonato de etilo
- ET: etileno
- ETI: Inmunidad Activada por Efectores
- ETS: susceptibilidad mediada por efectores
- GUS: β -glucuronidasa
- H₂O₂: peróxido de oxígeno
- HCl: ácido clorhídrico
- HR: respuesta hipersensible
- IBMCP: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
- ISR: resistencia sistémica inducida
- JA. ácido jasmónico
- LATCA: Library of Active Compounds on Arabidopsis
- MAMPs: patrones moleculares asociados a microbios Microbe-Associated Molecular Patterns
- MAPK: Mithogen Activated Protein Kinase
- MES: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
- MS: Murashige & Skoog
- npr1: nonexpressor of PR genes
- NP40: Nonidet P40
- ocp: overexpressor cationic peroxidase
- PAMPs: patrones moleculares asociados a patogenos Pathogen-Associated Molecular Patterns
- PDF1.2.: plant defensin 1.2.
- PR: proteínas relacionadas con la patogénesis
- PRR: Pattern Recognition Receptors
- PRX: peroxidasa
- PTI: Inmunidad activada por PAMPs
- RdDM: RNA-directed DNA methylation

ROS: especies reactivas de oxígeno

RP: proteínas R

SA: ácido salicílico

SAR: Respuesta sistémica adquirida

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane

Tween 20: Polyoxyethylenesorbitan monolaurate

WIR: Resistencia inducida por herida

wt: wild type

1. Introducción

1.1. Interacción planta-patógeno

Las plantas están obligadas a discriminar entre los diferentes retos que les plantea su entorno y responder a ellos. Estas respuestas a su ambiente biótico y abiótico les permiten la mejor distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse. Frente a la llegada de un microorganismo patógeno las plantas han desarrollado una gran variedad de estrategias de actuación que confieren a la planta la posibilidad de responder de la forma más adecuada en cada caso.

Antes de la era de la clonación genética, la investigación en plantas con flores se centraba en especies de interés agronómico y hortícola, tales como tomate, maíz, cebada, etc. (Somerville & Koornneef, 2002). Sin embargo, en los últimos 20 años gran parte de la investigación de plantas ha girado en torno a una pequeña planta de la familia de las *Brassicaceae*, sin interés comercial, denominada *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Somerville & Koornneef, 2002). *A. thaliana* como sistema modelo es significativamente más manejable que otras especies, y además muestra los más importantes tipos de respuesta de defensa descritos en otras plantas (Glazebrook *et al.*, 1997). Por tanto, *A. thaliana* constituye la herramienta ideal para el estudio de la interacción planta-patógeno (Revisado en Dobón, A., 2010).

1.1.1. Aspectos generales de la interacción planta-patógeno

En su entorno natural, las plantas coexisten con multitud de microorganismos patógenos, pudiendo ser infectadas por patógenos con distintos estilos de vida. Los dos grupos principales son los patógenos biotrofos y los patógenos necrotrofos (Agris, 2005).

Los patógenos biotrofos se han especializado en alimentarse y crecer en el interior de tejidos vegetales vivos, habiendo desarrollado la mayoría de ellos una íntima relación con sus hospedadores vegetales. De forma opuesta, los patógenos necrotrofos presentan una relación menos íntima con sus hospedadores vegetales. Antes de la colonización, necesitan para desarrollarse

provocar heridas, debilitamiento, envejecimiento o incluso la muerte del tejido vegetal. (Agrios, 2005).

A pesar de la existencia de tantas especies de organismos colonizadores, la enfermedad constituye una excepción, ya que las plantas poseen multitud de mecanismos de defensa. Algunos de estos mecanismos son constitutivos, estando presentes en la planta antes de la llegada del patógeno; mientras que otros se inducen tras la percepción del mismo y proporcionan protección no sólo a nivel local en el sitio de infección, sino sistémicamente a lo largo de toda la planta (Shah *et al.*, 1999).

1.1.2. Barreras preformadas

Las barreras preformadas constituyen un mecanismo que, dada su efectividad frente a microorganismos de diversa naturaleza, confieren resistencia inespecífica del patógeno (Heath, 2000).

Los microorganismos patógenos deben conseguir entrar en el tejido vegetal de la planta hospedadora, ya sea penetrando de forma directa las superficies foliar o radicular, o bien a través de heridas (existentes o realizadas por el propio patógeno) o aperturas naturales como los estomas. Una vez en el interior de la planta, deben superar la compleja pared celular vegetal (Chisolm *et al.* 2006).

1.1.3. Percepción del patógeno por parte de la planta

- INMUNIDAD ACTIVADA POR PAMPs (PTI, del inglés PAMP-triggered immunity)

La PTI se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares conservados en patógenos (MAMPs, de Microbe-Associated Molecular Pattern; o bien, PAMPs de Pathogen-Associated Molecular Patterns) por parte de un conjunto de receptores situados en la membrana plasmática de la célula vegetal (PRRs, de Pattern Recognition Receptors) (figura 1).

Este reconocimiento dispara una señal intracelular mediada por MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), y que tiene como consecuencia la producción de especies reactivas del oxígeno, la deposición de callosa para reforzar la pared celular en los sitios de infección y la activación transcripcional de determinados

genes de respuesta a patógenos; todo ello, con el objetivo de prevenir el crecimiento microbiano (Chisholm *et al.*, 2006).

Así, los PAMPs deben ser moléculas con estructuras altamente conservadas en un amplio rango de microorganismos, pero no presentes en el hospedador.

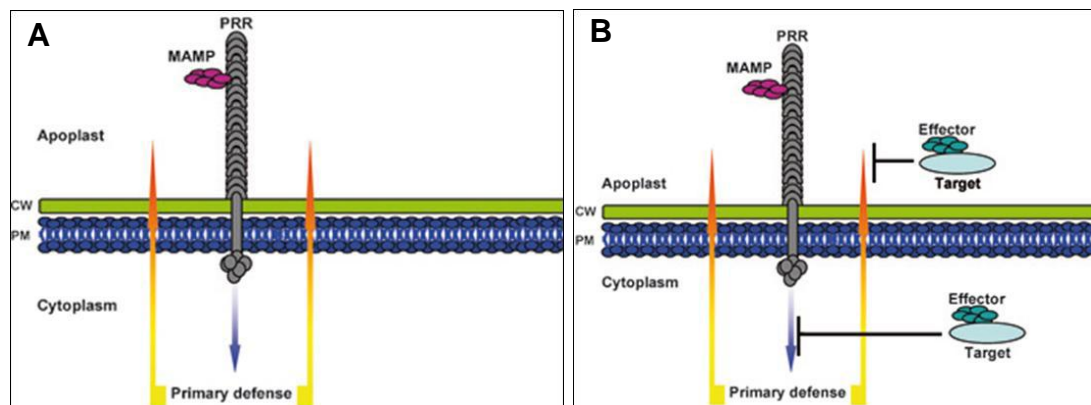


Figura 1: Inducción y supresión de la respuesta inmune primaria PTI en plantas por parte de microorganismos patógenos. (A) Moléculas conservadas en distintos microorganismos (PAMPs o MAMPs) son reconocidas a través de receptores transmembrana (PRR) por la planta, tras lo que se dispara una respuesta defensiva primaria con el objetivo de proteger a la planta frente al ataque de potenciales patógenos. (B) Los patógenos verdaderos, son capaces de secretar moléculas efectoras que interfieren con la respuesta defensiva primaria PTI, permitiéndoles escapar a ella e infectar de manera exitosa. (Extraído de De Wit, 2007)

- INMUNIDAD ACTIVADA POR EFECTORES (ETI, del inglés Effector Triggered Immunity)

La ETI implica el reconocimiento directo o indirecto de estas moléculas efectoras a través de proteínas vegetales de resistencia denominadas proteínas R (RPs) (Figura 2.A). Este reconocimiento activa una serie de señales que culminan en una respuesta hipersensible (HR), la cual implica una muerte celular programada y asociada a la inducción local de genes de defensa en el lugar de la infección, con el objetivo de frenar el crecimiento del patógeno. Aunque la detección de los efectores o sus perturbaciones es altamente específica, la HR inducida es común a múltiples patógenos.

Los efectores se pueden definir como moléculas derivadas del patógeno con la intención de promover la virulencia mediante la interacción con la planta. El conjunto de efectores que porta un patógeno es altamente específico, llegando a ser característico de determinadas cepas.

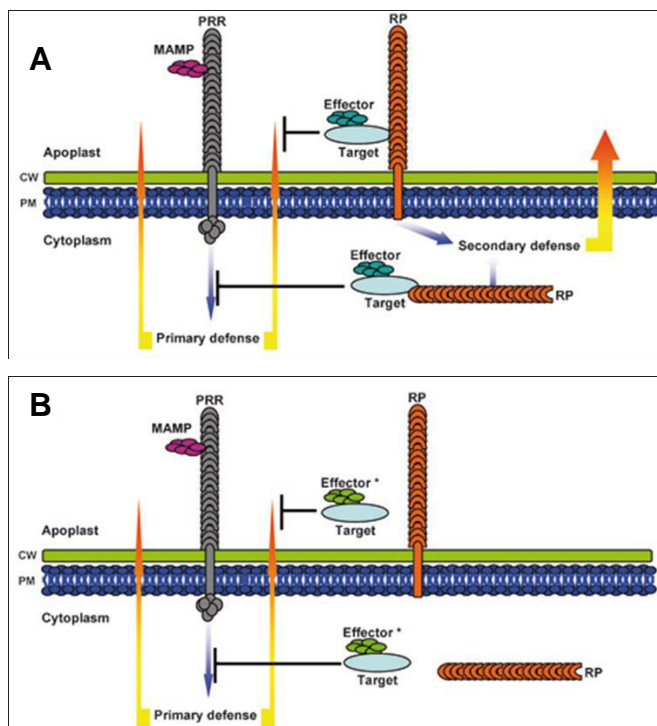


Figura 2: Inducción y supresión de la respuesta inmune secundaria ETI en plantas por parte de microorganismos patógenos.

(A) Las plantas resistentes poseen sistemas de detección de efectores o de sus perturbaciones a través de proteínas que actúan de guardianes (RPs) de la defensa vegetal. Tras la detección de los efectores se activa la respuesta ETI que impide el desarrollo de una infección satisfactoria por parte del patógeno.

(B) Como adaptación, los patógenos han eliminado o bien modificado efectores detectados por RPs y en ocasiones desarrollado otros efectores indetectables por las RPs de la planta, evadiendo de nuevo la respuesta defensiva.

(Extraído de De Wit, 2007)

En las primeras etapas del conocimiento en la respuesta ETI, Flor, en 1971, enunció la hipótesis de la resistencia gen a gen. En ella se exponía que las plantas portan genes de resistencia que codifican proteínas R capaces de detectar proteínas del patógeno denominadas proteínas Avr o factores de avirulencia. En el caso de producirse una interacción planta-patógeno, las proteínas R reconocerían a los factores de avirulencia desencadenando una respuesta inmunitaria en las plantas que detendría la infección (interacción incompatible). Si no se produce el reconocimiento, el patógeno sería capaz de infectar la planta desarrollando la enfermedad, considerándose la planta susceptible y la cepa del patógeno virulenta (interacción compatible).

En 1998, Van der Biezen y Jones dieron paso a una adaptación algo más sofisticada de este modelo, enunciando la hipótesis del gen guardián. Esta hipótesis enuncia que muchas proteínas R son capaces de reconocer efectores sin una interacción física directa. Así, las proteínas R estarían encargadas de monitorizar el estado de distintos componentes defensivos vegetales, siendo capaces de detectar su alteración por parte de los efectores.

De hecho, el reconocimiento indirecto de los efectores por parte de las proteínas R, se ha demostrado más común que el reconocimiento por interacción física directa (Chisholm et al., 2006; Jones & Dangl, 2006).

- TEORÍA DEL ZIG-ZAG

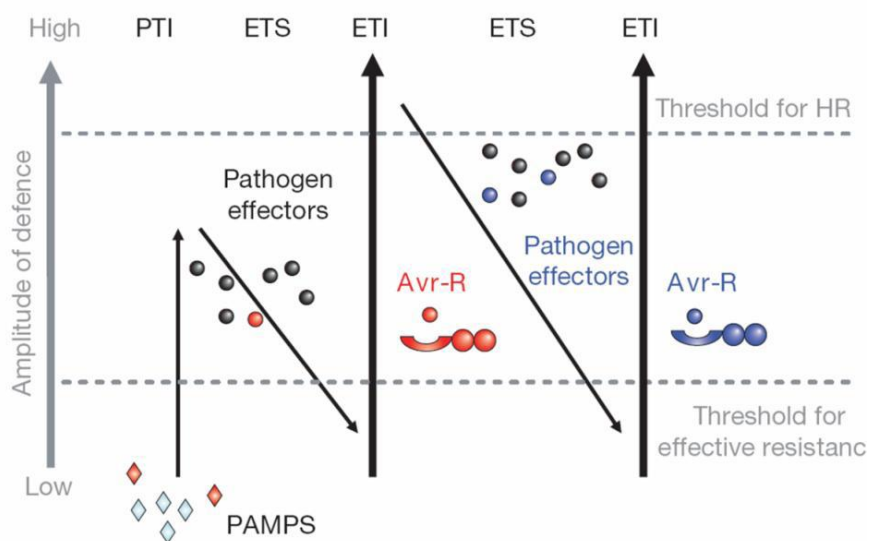


Figura 3: Esquema de la teoría del Zig-Zag.

El diagrama representa las distintas etapas en las que se produce el ataque patológico y las consecuentes respuestas defensivas vegetales. En una primera etapa el ataque de los microorganismos patógenos es detectado a través del reconocimiento de PAMPs que disparan la PTI. En una segunda etapa, los patógenos evaden la PTI mediante la secreción de moléculas efectoras lo que desemboca en una susceptibilidad mediada por efectores (ETS: Effector Triggered Susceptibility). En la tercera etapa, las plantas son capaces de reconocer determinados efectores o sus alteraciones mediante proteínas que actúan de guardianas del sistema inmunitario vegetal, tras lo que se desencadena la respuesta ETI. La ETI es más rápida y contundente que la PTI llegando a sobrepasar el umbral de la respuesta hipersensible (HR). En una cuarta etapa, los patógenos han perdido o modificado efectores reconocidos por RPs, incluso podrían haber desarrollado nuevos efectores no reconocidos por las RPs del hospedador, o bien mecanismos para evadir el reconocimiento, logrando escapar a la ETI y siendo capaces de causar enfermedad. En etapas posteriores, mecanismos adaptativos conllevarían la percepción de nuevos efectores por parte de la planta para desencadenar ETI (Extraído de Jones & Dangl, 2006).

Parece claro que existen en esencia dos niveles en el sistema inmunitario vegetal. El primero utiliza moléculas transmembrana (PRR) capaces de reconocer patrones moleculares conservados en un amplio espectro de patógenos (MAMPs o PAMPs). En principio, las plantas, con el objetivo de detectar un amplio rango de patógenos y ser capaces de defenderse de los mismos desarrollaron este primer nivel de inmunidad denominada “Inmunidad disparada por PAMPs” o PTI. En su lucha por la supervivencia, ciertos patógenos desarrollaron la capacidad de generar y secretar moléculas efectoras que manipulasen al hospedador, evadiendo la respuesta PTI. Así, en su coevolución, las plantas desarrollaron un segundo nivel de respuesta, en esta ocasión más específica, rápida y de mayor contundencia; es la denominada “Inmunidad disparada por efectores” o ETI. En ella encontramos proteínas de resistencia R (Dangl & Jones, 2001). Las proteínas R se comportan como sensores o guardianes del estado defensivo y, en el caso de detectar elicitores o las perturbaciones que ellos provocan, median la puesta

en funcionamiento de la ETI. La ETI culmina con la resistencia de la planta y normalmente con una respuesta hipersensible que implica muerte celular programada en el sitio de la infección. No obstante, la selección natural dirige a los patógenos a evadir de nuevo los mecanismos defensivos vegetales, diversificando, adquiriendo o eliminando efectores con el fin de suprimir la ETI.

1.1.4. Respuestas inducidas a nivel local

La detección del patógeno por parte de la planta, ya sea en la PTI o bien en la ETI, desencadena una gran cantidad de cambios en el interior de las células del hospedador. La velocidad, intensidad o magnitud con la que se desarrollen dichos cambios son cruciales para determinar la eficacia de la respuesta. Además, aunque la percepción del patógeno depende de complejos mecanismos que pueden llegar a resultar altamente específicos, los cambios que tienen lugar tras dicho reconocimiento son similares e independientes del patógeno o efector que medie su activación (Felix, 1999).

Entre los eventos tempranos tras el reconocimiento del patógeno encontramos: cambios en el flujo de iones tales como el calcio, la activación de las vías de señalización donde tienen especial relevancia proteín-quinasa, alteraciones en los patrones transcripcionales, la alcalinización de los espacios extracelulares y la síntesis rápida y transitoria de especies reactivas de oxígeno (ROS, de *Reactive Oxygen Species*) y nitrógeno (Kotchoni & Gachomo, 2006).

Tras estos cambios inmediatos, en la mayoría de los casos se produce una segunda etapa de alteraciones que activan dos vías de señalización diferentes. Por un lado, se inducen cambios celulares que concluyen con la muerte celular programada de las células infectadas con el objetivo de delimitar la infección a nivel local, lo que se conoce como respuesta hipersensible (HR de Hypersensitive Response). Por otro lado, se inducen complejos mecanismos de resistencia tanto locales como sistémicos.

- ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS):

Son moléculas de gran importancia en diversos procesos biológicos, como por ejemplo los radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. Se originan como consecuencia de procesos catabólicos en todos los seres vivos, así como en

situaciones de estrés como el frío, la alta salinidad, la sequía o las infecciones por patógenos.

Debido a su alta reactividad, la acumulación excesiva de ROS puede ocasionar acusados daños celulares, entre los que se incluyen la peroxidación de lípidos de membrana, la alteración de proteínas y daños a nivel del ADN, que conducen al envejecimiento celular y pueden llegar a provocar la muerte del tejido (Scandalios, 1997). Por ello, existen distintos sistemas detoxificadores de ROS.

Los ROS están implicados en multitud de respuestas adaptativas, participando tanto en procesos de resistencia a estreses abióticos como bióticos. En concreto, en las respuestas vegetales frente a organismos patógenos se pueden definir dos funciones cruciales de los ROS dependiendo de sus niveles de concentración. A altas concentraciones los ROS producen graves daños que conducen a la muerte celular, relacionándose con la HR, mientras que a concentraciones moderadas se comportan como mensajeros secundarios implicados en la transducción de la señal de defensa, participando en la activación de proteín-quinasa o regulando directamente la expresión de algunos genes relacionados con defensa (Kotchoni & Gachomo, 2006).

- PROTEÍN-QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENO (MAPKs):

Actúan generalmente en forma de cascadas de activación. La cascada de MAPKs comienza con la activación mediante fosforilación de una MAP quinasa denominada MAPKKK, tras lo que se encuentra en disposición de fosforilar y por lo tanto activar, a los siguientes elementos en la cascada, las MAP quinasa MAPKK. De la misma manera las MAPKKs activas fosforilan a MAPKs (la tercera MAP quinasa de la cascada) que una vez activas pueden ser transportadas al núcleo donde activaran otros componentes de la señalización tales como factores de transcripción, regulando la expresión de genes de respuesta al estímulo.

En las interacciones planta-patógeno se han descrito multitud de evidencias que apuntalan la importancia de las cascadas de MAPK en las respuestas defensivas. Se ha propuesto que la percepción de distintos tipos de patógenos, así como el desarrollo de las diferentes respuestas defensivas (tanto PTI como ETI), confluyen en la activación de cascadas conservadas de MAPK (Asai *et al.*, 2002).

- RESPUESTA HIPERSENSIBLE o HR:

Generalmente, en el desarrollo de la ETI, se produce una respuesta defensiva que incluye la muerte celular programada de las células que están en contacto con el patógeno, proceso que se conoce bajo el nombre de Respuesta Hipersensible o HR.

En el caso de infecciones producidas por patógenos biotrofos, la necrosis del tejido en el lugar de infección podría frenar el avance del microorganismo ya que tales huéspedes requieren de células vivas para su desarrollo; pero al hablar de agentes hemibiotrofos y necrotrofos el papel de la HR resulta menos evidente, habiéndose descrito casos donde incluso favorece el desarrollo de la infección, como ocurre con el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*, que utiliza la HR para ampliar la zona de necrosis requerida para su nutrición (Govrin & Levine, 2000).

En cualquier caso, la HR está asociada a una serie de procesos que acontecen en la secuencia defensiva, como la generación de ROS, los cambios en la polaridad y permeabilidad de membrana, el intercambio iónico, el reforzamiento de la pared celular, la fosforilación-defosforilación de proteínas, y la acumulación de determinadas moléculas como el ácido salicílico y las proteínas relacionadas con la patogénesis (Talarczyk & Henning, 2001).

1.1.5. Señalización hormonal

En el estudio de las respuestas defensivas que se ponen en funcionamiento tras la percepción del patógeno, y la transmisión de la señal, se identificaron dos rutas mayores de señalización; una de ellas es dependiente del ácido salicílico (SA), y la otra es dependiente del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET). Así, la concentración de las fitohormonas SA, JA y ET es crucial a la hora de modular la respuesta defensiva vegetal. Desde esta visión clásica de la señalización hormonal, la activación de la ruta dependiente de SA tiene como consecuencia la puesta en funcionamiento de las defensas efectivas frente a patógenos de carácter biotrofo, tales como las especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* e *Hyaloperonospora*. Por otro lado, la activación de la ruta regulada por JA/ET se relaciona mayoritariamente con los mecanismos defensivos ligados a patógenos necrotrofos como los del género *Botrytis* y *Erwinia* (revisado en Glazebrook, 2005).

Las dos rutas no son totalmente independientes sino que existe una regulación cruzada de ambas a través de una compleja red de interacciones que determina la respuesta defensiva más adecuada frente a un patógeno específico (Kunkel & Brooks, 2002).

Además, cada vez son más numerosas las evidencias que avalan la contribución de otras hormonas en la resistencia. De esta manera se han descrito interacciones de las dos rutas mayores con auxinas, giberelinas, brasinólidos y el ácido abscísico (ABA).

- ÁCIDO SALICÍLICO (SA):

El SA está involucrado en diversos procesos vegetales, habiéndose identificado su papel como regulador del crecimiento celular (Vanacker *et al.*, 2001), floración (Martínez, *et al.*, 2004) o la termogénesis (Shah *et al.*, 1999).

Así mismo son numerosas las observaciones que asignan al SA funciones clave en la defensa de las plantas tanto a nivel local como sistémico. Se observó que los niveles de SA aumentan en los tejidos infectados y que aplicaciones exógenas de dicha molécula o determinados análogos incrementan la resistencia a un amplio espectro de patógenos. Existen estudios que demuestran el requerimiento del SA en la inducción rápida de defensa tanto del tipo PTI como ETI. Además, un aumento en los niveles de SA es esencial para el establecimiento de resistencias a nivel sistémico, implicándose en la resistencia sistémica adquirida o SAR (Kunkel & Brooks, 2002).

La activación de la ruta del SA se relaciona con la expresión de un grupo de proteínas denominadas proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PR) (revisado en Van Loon *et al.*, 2006). Se distinguen dos grupos de PRs. Por un lado las PR básicas que son inducidas localmente alrededor de la HR y aparentemente no implicadas en SAR (Brederode *et al.*, 1991). Por otro lado, las PR ácidas (como PR-1 y PR-2), que responden al SA y análogos de manera contundente y de forma tanto local como sistémica. Por ello, algunos genes PR cuya inducción es dependiente de SA se han utilizado clásicamente como marcadores del correcto funcionamiento de la vía, así como del establecimiento de SAR.

La caracterización de mutantes de *A.thaliana* defectivos en la señalización hormonal del SA ha permitido una disección parcial de la vía, identificando elementos concretos, así como su relación con la respuesta defensiva.

- ÁCIDO JASMÓNICO (JA):

Se ha relacionado con diversas funciones biológicas en las que encuadramos el desarrollo del polen y las semillas, así como la defensa frente a herida, ozono, insectos y microorganismos patógenos (Browse, 2005).

En este caso, los mecanismos defensivos mediados por el JA se muestran efectivos frente al ataque de patógenos necrotrofos, cuya estrategia de infección implica la muerte de las células hospedadoras con el objetivo de obtener nutrientes. De forma paralela a lo que ocurre con los genes *PR* en el caso de la señalización mediada por SA, han sido identificados algunos genes cuya expresión es inducida por JA como *PLANT DEFENSIN 1.2 (PDF1.2)*; Penninckx *et al.*, 1998).

Así mutantes de *A. thaliana* afectados en la producción o percepción de dicha molécula manifiestan una marcada susceptibilidad frente al ataque de organismos necrotrofos así como una reducción en los niveles de expresión de los genes inducibles por JA.

Se han descrito mutantes que muestran una hiperactivación de esta ruta, acompañada de la inducción de *PDF1.2* y resistencia a hongos necrotrofos como *ocp3* (overexpressor of cationic peroxidase; Coego *et. al.*, 2005b).

- ETILENO (ET):

De manera clásica se ha relacionado al ET con la resistencia mediada por JA, ya que el ET es capaz de inducir algunos genes dependientes de JA como son *PDF1.2*. Además, el correcto funcionamiento de ambas vías (JA y ET) es necesario para el establecimiento de la respuesta sistémica inducida (ISR; Pieterse & Van Loon, 2004). Estos datos apuntaban a una vía común para ambas moléculas, teniendo el JA y ET efectos sinérgicos. Sin embargo, una vez más, esta visión podría matizarse con un posible cruce de ambas vías (Kunkel & Brooks 2002). La idea más extendida hoy en día se basa en que el ET podría regular la aparición y el desarrollo de sintomatología de manera positiva o

negativa de forma específica en función de la interacción planta-patógeno establecida (Van Loon *et al.*, 2006).

1.1.6. Respuestas inducidas sistémicas

Además de las respuestas defensivas que se activan en el lugar de infección, los organismos vegetales han desarrollado diversas respuestas defensivas que se activan (tras el comienzo de una infección local) en toda la planta de manera sistémica, con el objetivo de aumentar la velocidad y magnitud de la defensa. Estas respuestas proporcionan protección de larga duración frente al posible ataque posterior de patógenos invasores (Delaney, 2000).

Entre las respuestas sistémicas mejor estudiadas hasta la fecha se encuentran la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), activada por patógenos necrotizantes; la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), disparada tras la colonización de las raíces vegetales por parte de determinadas cepas de rizobacterias no patógenas; y la Resistencia Inducida por Herida (WIR), que tiene lugar tras el daño de los tejidos ocasionado por herbívoros (Pieterse *et al.*, 2004).

- RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR):

La Resistencia Sistémica Adquirida es la respuesta sistémica más estudiada hasta la fecha. Es conocido que para el establecimiento de SAR es necesario un aumento tanto local como sistémico de los niveles de SA, que conlleva la expresión de genes relacionados como las proteínas PR ácidas. Sin embargo, aunque la importancia del SA en SAR es evidente, no se conoce cuál es la señal móvil que activa SAR en los tejidos distales, aunque no parece ser el propio SA (Vernooij *et al.*, 1994).

En la vía de señalización del SA se encuentra la proteína NPR1, requerida para la expresión de las PR asociadas. Así, se relaciona la inducción de SAR con la activación de NPR1 y la expresión de los genes *PR*, pero no es descartable la existencia de componentes adicionales independientes (Mayda, *et al.*, 2000).

- RESPUESTA SISTÉMICA INDUCIDA (ISR):

Para el correcto desarrollo de la ISR es necesario el funcionamiento de las señalizaciones mediadas por JA y ET. Así, mutantes defectivos en las rutas de

señalización o síntesis de estas hormonas son incapaces de establecer una ISR eficaz (Pieterse *et al.*, 1998).

Por otro lado, la inducción de tal respuesta se ha demostrado independiente de la acumulación de SA y la expresión de genes *PR*. Aunque numerosos estudios postulan que las respuestas SAR e ISR compartirían elementos comunes (como el regulador de defensa NPR1) y protegen a la planta frente a rangos solapantes de patógenos. Sin embargo, requieren rutas de señalización diferentes para su activación, mientras SAR requiere la ruta del SA, ISR requiere la del JA/ET (revisado en López, 2010).

1.2. Antecedentes del proyecto

La respuesta de las plantas al ataque de microorganismos patógenos implica cambios en la transcripción de numerosos genes. Entre estos genes se encuentra el gen *Ep5C* de tomate, que codifica una peroxidasa catiónica extracelular (Gadea *et al.*, 1996; Hiraga *et al.*, 2001)

En plantas se pueden encontrar numerosas peroxidasas (PRX), la mayoría de ellas localizadas a nivel extracelular o en vacuola (Carpin *et al.*, 1999). En general, las PRX catalizan muchas reacciones redox en presencia de H₂O₂, el cuál funciona como oxidante. La transcripción de los genes *PRX* se puede inducir por una variedad de estímulos que contemplan herida (Price *et al.*, 2003), patógenos (Lamb & Dixon, 1997), y desarrollo (de Marco *et al.*, 1999).

En tomate, la expresión del gen *Ep5C* se induce en respuesta a la infección causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* así como por peróxido de hidrógeno, de forma rápida y específica. (Coego *et al.*, 2005). La ausencia de *Ep5C* confiere a la planta resistencia contra *P.syringae*. Dicha resistencia no va acompañada de alteraciones en las vías de defensa clásica dependientes de SA o JA/ET, sino que está basada en la pérdida de función de *Ep5C* (Agorio and Vera, 2007)

Debido a tales características se consideró a *Ep5C* como una herramienta de gran utilidad en posteriores investigaciones que contribuyesen a dilucidar los mecanismos implicados en la defensa vegetal.

Para tal fin, se aisló el promotor de *Ep5C* de tomate y se fusionó al gen marcador β -glucuronidasa (GUS). Con esta construcción (pEp5C::GUS) se generaron plantas transgénicas en el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* (en concreto se seleccionó la línea 5.2). Tales transgénicas estables mostraban una tinción histoquímica GUS positiva únicamente cuando eran estimuladas por inductores del gen *Ep5C* de tomate (aplicación de peróxido de hidrógeno e infección por *Pseudomonas syringae*).

A partir de una población de semillas transgénicas *pEp5C::GUS* se procedió a una mutagénesis utilizando como agente químico mutágeno el metano-sulfonato de etilo (EMS) que provoca mutaciones puntuales por sustitución de nucleótidos. Tras la mutagénesis se obtuvo una colección de mutantes que mostraban expresión constitutiva (alterada) del gen marcador *GUS*, a los que se denominó *ocp* (*overexpressor of cationic peroxidase*). Dichos mutantes podrían presentar lesiones en genes implicados en la regulación de *Ep5C* y por tanto en las vías de señalización que median la respuesta de las plantas frente al ataque de patógenos (Coego *et al.*, 2005a). Entre estos mutantes han sido identificados y caracterizados con éxito los mutantes *ocp3*, *ocp11* y *ocp1*.

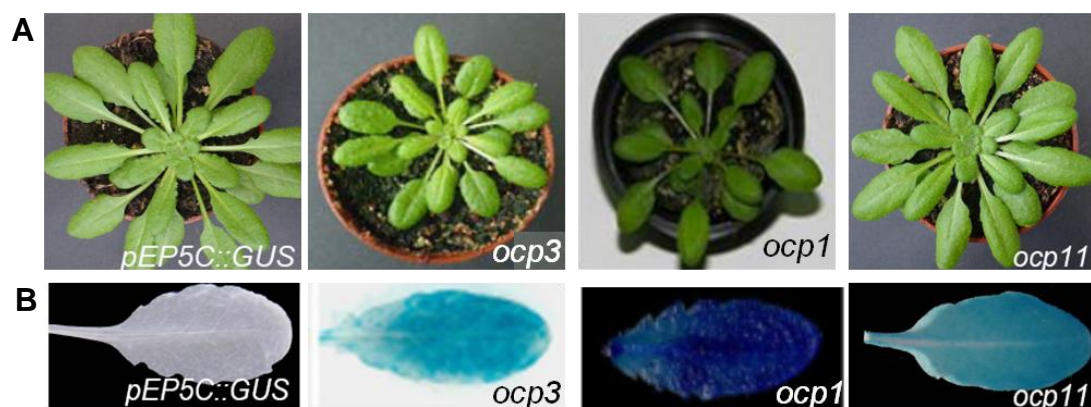


Figura 4. Características fenotípicas de los mutantes *ocp* respecto a su línea parental silvestre portadora de *PEp5c::GUS* (línea 5.2).

(A) Fenotipo morfológico de plantas adultas de cinco semanas de edad. **(B)** Tinción histoquímica GUS en hoja expandida de plantas adultas de 35 días de crecimiento. (Extraído de Agorio and Vera, 2007; Coego *et al.* 2005b; López *et al.*, 2011)

El mutante *ocp3* muestra una resistencia aumentada a los hongos necrotrofos, mientras que la respuesta a patógenos biotrofos no se ve alterada. Se comprobó que *ocp3* codifica un factor transcripcional miembro de la familia de los Homeobox (Coego *et al.*, 2005b). En este caso la caracterización fenotípica

del mutante posiciona a la proteína OCP3 como un regulador negativo implicado tanto en la resistencia de la planta frente a hongos necrotrofos (Coego *et al.*, 2005b), como en la resistencia de las plantas a periodos de sequía (Ramírez *et al.*, 2009). Tales datos nos permiten hablar de una integración de la vía de señalización del ácido jasmónico (implicado en la respuesta a necrotrofos) y el control de la apertura estomática mediada por ABA (Coego *et al.*, 2005b; Ramírez *et al.*, 2009, García-Andrade, *et al.*, 2011). Además, OCP3 representa un punto de control específico en la deposición de calosa regulada por JA (García-Andrade, *et al.*, 2011).

El mutante *ocp11* tiene disminuida la resistencia frente a patógenos necrotrofos y biotrofos. La hipersusceptibilidad a patógenos tan distintos no parece estar asociada a defectos en las vías clásicas de defensa mediadas por SA o JA/ET. Este mutante porta una mutación en el gen ARGONAUTA4 (AGO4), componente de la ruta de metilación de ADN mediada por pequeños ARN interferentes (ARNsi) (Agorio and Vera, 2007). Esta ruta de metilación conocida como RdDM (RNA-directed DNA methylation), es un proceso descubierto en plantas; en el que, a través de toda una compleja maquinaria molecular se generan pequeños ARN que median la metilación y el silenciamiento génico de sus secuencias complementarias en el genoma (Zaratiegui *et al.*, 2007).

El análisis fenotípico de *ocp11* (renombrado con posterioridad *ago4-2*) indica que AGO4 es esencial para la respuesta de las plantas al ataque de microorganismos biotrofos tales como la bacteria *Pseudomonas syringae*, relacionando así la vía de RdDM con la respuesta defensiva de las plantas.

Esta vía se ha perfilado en los últimos años como una nueva forma de regulación de la expresión génica de gran relevancia e interés. Sin embargo, pese a ser muy estudiada, dada su complejidad y reciente conocimiento, los papeles biológicos en los que se ha implicado hasta el momento son escasamente entendidos (revisado en Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009) por lo que actualmente estudios que aporten alelos para los genes de la ruta así como fenotipos asociados siguen teniendo un gran interés.

El mutante *ocp1* muestra una alteración en la ruta de señalización del JA, hormona clave en la defensa vegetal frente a hongos necrotrofos, lo que

imposibilita una respuesta correcta frente a tal clase de organismos patógenos, mostrando así una susceptibilidad ligeramente incrementada respecto a plantas silvestres. Se ha comprobado que *ocp1* muestra una hipometilación del promotor *pEp5C*, lo que provoca la expresión desregulada de la construcción *pEp5C:GUS*. Además, se ha constatado que *ocp1* presenta una alteración en la proteína NRPD2. (López *et al.*, 2011).

NRPD2 corresponde a la segunda subunidad mayor de las polimerasas IV y V recientemente identificadas como específicas de plantas e implicadas en la vía de metilación de ADN dirigida por ARN pequeños interferentes (RdDM). Se constató que el mutante *ocp1* mimetiza fenotípicamente a *nrpd2-2* pudiendo ser considerado como el alelo *nrpd2-53*, y que *nrpd2-2* fenocopia la sobreexpresión de *pEp5C* mostrada por *ocp1*. Además, *ocp1* muestra una desmetilación en las dianas típicas de la RdDM (gen *SUPERMAN*, genes *5S* y elemento *AtSN1*) similar a la que presenta *nrpd2-2*. Aun siendo ambos alelos de pérdida de función con fenotipos similares, *ocp1* muestra ciertas diferencias respecto a *nrpd2-2*, lo que revaloriza al alelo como herramienta de gran utilidad para facilitar la disección y entendimiento de la vía RdDM así como la regulación de las polimerasas IV y V (López *et al.*, 2011).

1.3. Introducción a la genética química

El universo químico, el cuál engloba todas las moléculas orgánicas de bajo peso molecular (<800 Daltons; de ahora en adelante moléculas pequeñas) incluyendo aquéllas presentes en los procesos biológicos, abarca tal magnitud de compuestos que sólo una pequeña parte ha sido explorada. Sin embargo, estas investigaciones han mejorado notablemente el entendimiento de los sistemas biológicos y han permitido el descubrimiento de gran parte de las drogas y principios activos utilizados hoy en día (Dobson, 2004).

El uso de moléculas pequeñas como reguladores del crecimiento, herbicidas o como inductores de resistencia a patógenos es una práctica común en agricultura. En muchas ocasiones el uso indiscriminado de estos compuestos provoca efectos no deseados debido a la pérdida de especificidad frente a la diana molecular o por una disminución en su actividad biológica. Por todo esto,

resulta imprescindible la identificación de nuevas moléculas bioactivas y altamente específicas para un determinado proceso biológico (Lokey, 2003).

El uso de moléculas pequeñas con el fin de inducir o modelar ciertos fenotipos y permitir diseccionar determinados procesos biológicos a través de la identificación de sus dianas (proteínas y genes) se conoce como **genética química**. La genética química extendida a escala del genoma completo se conoce como **genómica química**.

La genética química se caracteriza por cuatro grandes rasgos: 1) librería de compuestos químicos; 2) escrutinio (screening) para la búsqueda de compuestos bioactivos; 3) identificación de las proteínas diana; y 4) uso de químicos como herramienta para entender la función de las dianas y descubrir nuevas redes de funcionamiento (Robert, et al., 2009).

Actualmente existen numerosas colecciones de compuestos químicos activos biológicamente utilizados para realizar escrutinios de genética química, como por ejemplo Asinex, Chembridge, LATCA o Microsource Spectrum. Sin ir más lejos, en el IBMCP (centro donde se ubica el laboratorio en el que se ha desarrollado el presente proyecto) se ha instalado una plataforma de genética química con diversas colecciones de compuestos que superan los 25.000 compuestos. Este macroproyecto, al que se ha denominado Chemiplanta (www.chemiplanta.org), abarca la realización de diversos proyectos entre los que se encuentra el presente proyecto.

1.3.1. Genética química directa e indirecta

Al igual que en la genética clásica, la cual usa la mutagénesis para investigar las relaciones existentes entre genes y fenotipos (efectos fisiológicos), la genética química puede dividirse en dos tipos de aproximaciones, la genética química directa y la indirecta (O'Connor et al., 2011).

La genética química directa (Figura 5.A.) utiliza moléculas pequeñas para modular la función de las proteínas. Aquellos compuestos que inducen un fenotipo interesante son seleccionados y después se procede a la identificación de su proteína diana (O'Connor et al., 2011). Es decir, opera del fenotipo a la proteína (Spring, 2004).

Por otro lado, la genética química indirecta (Figura 5.B) implica el uso de librerías de moléculas pequeñas para buscar un ligando que perturbe la función de una determinada proteína. Una vez identificado, se introduce en una célula o un organismo con tal de estudiar los cambios que provoca en el fenotipo; es decir, el ligando se utiliza para mimetizar el efecto de una mutación genética. (O'Connor et. al., 2011). Opera de la proteína al fenotipo (Spring, 2004).

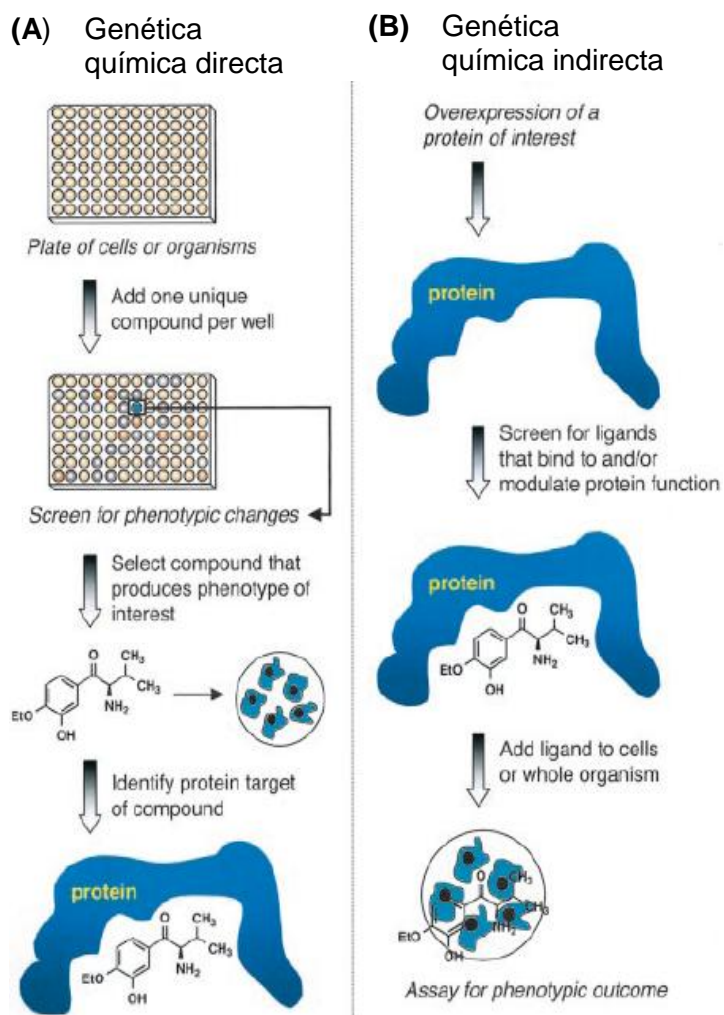


Figura 5. Esquema general de los procesos de genética química.

(A) La genética química directa supone el escrutinio de librerías de moléculas pequeñas en células o organismos en busca de cambios fenotípicos, la selección de aquella molécula que induce un fenotipo de interés y la identificación de la proteína diana de dicha molécula.

(B) La genética química indirecta supone la sobreexpresión de una proteína de interés, el escrutinio de una colección de moléculas pequeñas en busca de un ligando que module la función de la proteína y el uso de este ligando para determinar las consecuencias fenotípicas de alterar la función de la proteína en un organismo o a nivel celular.

Las células azules indican un determinado cambio fenotípico y las moléculas se refieren a un compuesto genérico de una librería. (Extraído de Blackwell & Zhao, 2003)

1.3.2. Ventajas y desventajas de la genética química

Existen numerosas ventajas de la genética química respecto a la genética clásica. Por un lado, el uso de moléculas pequeñas en un determinado proceso biológico es rápido, provocando una serie efectos de manera inmediata que pueden ser caracterizados. Además, la mayoría de estos efectos son reversibles. Por otro lado, las moléculas pequeñas pueden ser añadidas en cualquier

momento y en la cantidad deseada, lo que supone un control temporal y cuantitativo absoluto, que no ofrece la genética clásica (Blackwell & Zhao, 2003; Spring, 2004; O'Connor et al., 2011).

La limitación actual más importante de la genética química es que no se puede aplicar de un modo general. En un principio, cualquier gen puede ser manipulado genéticamente; sin embargo, la genética química requiere una determinada molécula selectiva de la proteína objeto de estudio. Actualmente, sólo una pequeña parte de las proteínas conocidas tienen un ligando identificado, por lo que resulta necesario explorar el universo químico de las moléculas bioactivas y así permitir que la química genómica sea una realidad.

1.3.3. Genética química en plantas

Las técnicas de genética química constituyen una poderosa herramienta para el entendimiento de los procesos biológicos en plantas por diversas razones. En primer lugar, todos los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas pequeñas y sus efectos han sido estudiados intensamente utilizando la genética clásica y aproximaciones bioquímicas (Roberts & Hooley, 1988;). Además, los protocolos experimentales para analizar estos reguladores del crecimiento están bien definidos y son fácilmente adaptables para realizar rastreos con compuestos que modulen un determinado proceso de interés. En segundo lugar, el genoma de la planta modelo *Arabidopsis* está totalmente secuenciado y existe una gran variedad de herramientas de genética y genómica a disposición de la comunidad científica. Finalmente, el sistema radicular de las plantas ha evolucionado para permitir una eficiente absorción de minerales y nutrientes, por lo que se trata de una excelente vía para la captación de moléculas pequeñas. (Blackwell & Zhao, 2003).

Aunque el objetivo final de la genética química es conocer en mayor profundidad los mecanismos biológicos mediante el uso de moléculas bioactivas, también está estrechamente relacionada con el descubrimiento de nuevos productos agroquímicos. Entre los objetivos generales de la genética química en plantas encontramos los siguientes (Hicks & Raickel, 2012):

- Incrementar la gama de fenotipos para descubrir nuevos genes y nuevas funciones de las proteínas.

- Permitir el conocimiento directo de rutas desarrolladas a nivel celular y sus relaciones con el organismo.
- Acceder a procesos dinámicos in vivo que ocurren en un corto período de tiempo, como por ejemplo las respuestas al ataque de patógenos o las respuestas frente a hormonas vegetales.

El número de estudios de genética química realizados para diseccionar el entendimiento de los procesos biológicos vegetales ha aumentado considerablemente en los últimos años. Estos ensayos se engloban en cuatro grandes temas de estudio que son: la pared celular, las hormonas vegetales, el tráfico endomembrana y la respuesta inmune vegetal (Hicks & Raickel, 2012). Es dentro de este último campo, donde se enmarca el presente proyecto.

2. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es contribuir a profundizar en el entendimiento de los mecanismos defensivos vegetales frente al ataque de microorganismos patógenos. Dentro de este objetivo general se incluyen los siguientes objetivos específicos:

- Identificación de moléculas con potencial agroquímico que tengan como diana la regulación transcripcional del gen *Ep5C* sobre el fondo genético *ocp1* de *Arabidopsis thaliana*.
- Efecto de las moléculas identificadas sobre los fondos genéticos *ocp3*, *ocp11* y wild type (línea parental 5.2.).
- Efecto de alguno de los compuestos seleccionados sobre la ruta defensiva mediada por ácido salicílico.

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal

3.1.1. Ecotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizados

Para la realización del rastreo de moléculas antagonistas y agonistas de la regulación transcripcional de rutas relacionadas con la defensa vegetal se utilizó el mutante *ocp1*. En estos experimentos se utilizó como control positivo de actividad β -glucuronidasa el mutante *ocp3* y como control de crecimiento el tipo silvestre Columbia (Col-0).

Una vez identificadas las moléculas sobre el mutante *ocp1*, se ensayaron sobre el resto de mutantes *ocp* (*ocp3* y *ocp11*) así como sobre plantas transgénicas Ep5C.

Tal y como se ha explicado anteriormente (ver Apartado 1.3. Antecedentes del proyecto), el promotor del gen Ep5C de tomate se aisló y se fusionó al gen marcador β -glucuronidasa (GUS). Con esta construcción (pEp5C::GUS) se generaron plantas transgénicas utilizando plantas del ecotipo silvestre Columbia (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*, en concreto se seleccionó la línea 5.2. Tales transgénicas estables muestran una tinción histoquímica GUS positiva únicamente cuando son estimuladas por inductores del gen *Ep5C* de tomate (aplicación de peróxido de hidrógeno e infección por *Pseudomonas syringae*).

A partir de una población de estas semillas transgénicas *PEp5C:GUS* se procedió a una mutagénesis utilizando como agente químico mutágeno EMS. De esta mutagénesis se obtuvo la colección de mutantes *ocp* (*overexpressor of cationic peroxidase*), que presentan expresión constitutiva (alterada) del gen marcador *GUS*.

3.1.2. Cultivo in vitro

El cultivo in vitro se realizó en placas con medio Murashige y Skoog (MS), en estado sólido o en estado líquido, según el caso. El medio MS se prepara añadiendo 2,2 g de MS con vitaminas, 5 g de sacarosa y 0.1 g de MES monohidrato por litro de agua Mili-Q. El pH se ajusta a 5'9 mediante la adición de KOH. Para solidificar el medio se añade agar a razón de 6 g/L.

Antes de la siembra, se esterilizan las semillas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (300 semillas por tubo aproximadamente) al que se añade 1ml de SDS (dodecil sulfato sódico) + etanol 70%. Después de agitar durante 3 minutos, se elimina la solución de SDS y se añade 1ml de etanol 96°C. Se vuelve a agitar durante 15 segundos y se vierten las semillas y el etanol sobre papel de filtro esterilizado. Una vez secas las semillas se colocan en un tubo nuevo con 1ml de agua Mili-Q estéril y se estratifican a 4°C en oscuridad durante 72 horas antes del momento de la siembra.

Una vez hecha la siembra, las placas sellan correctamente con parafilm y se llevan a la cámara de cultivo in vitro. Allí crecen en condiciones de elevada intensidad lumínica (22000 lux), un fotoperíodo de día largo con 16h horas de luz y 8 de oscuridad, una humedad relativa del 85% y una temperatura de 23°C durante el día y 19°C durante la noche.

Según el experimento a realizar se utilizaron placas multipocillos de 96 pocillos (pocillos de 6 mm de diámetro) o placas multipocillos de 6 pocillos (pocillos de 35 mm de diámetro). También se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro.

3.1.3. Germinabilidad y amplificación de semillas

Antes de iniciar el estudio y con el fin de asegurar que el porcentaje de germinación de las semillas del mutante *ocp1* era adecuado, se sembraron 100 semillas previamente esterilizadas y estratificadas (*ver apartado anterior*) en placa petri con medio MS al que se añadió kanamicina 50 mg/L, como señal de la presencia del promotor *pEp5C::GUS* (Coego *et al.*, 2005a).

Una vez comprobado que el porcentaje de germinación era adecuado (superior al 90%) y que todas las plántulas eran resistentes al antibiótico y por tanto presentaban la expresión constitutiva del promotor *pEp5C::GUS*, se procedió al trasplante de dichas plántulas a sustrato con el fin de obtener semillas.

Las plántulas se trasplantaron a las dos semanas de la siembra a un sustrato compuesto por turba, perlita y vermiculita (2:1:1) en macetas de plástico de 50 ml. Allí crecieron en condiciones de elevada intensidad lumínica (22000 lux), fotoperíodo de día largo con 16h horas de luz y 8 de oscuridad, humedad relativa

del 85% y temperatura de 23°C durante el día y 19°C durante la noche. Se regaron a demanda con agua.

Transcurridos 2 meses y medio del trasplante, las plantas se dejan de regar y se embolsan con bolsas de papel de forma individual. Una vez secas, se recogen las bolsas y se tamiza el contenido para obtener las semillas libres de restos de tallos y flores. Las semillas se mantienen en viales estériles, correctamente identificados y refrigerados a 4° C.

3.2. Librería de compuestos

Para la identificación de moléculas antagonistas y agonistas de la regulación transcripcional de rutas relacionadas con la defensa vegetal se realizó un primer rastreo de moléculas sobre *ocp1*, utilizando aproximadamente 4000 compuestos elegidos de entre la librería de compuestos disponible en el laboratorio. Esta colección está formada por compuestos de diversas librerías junto con otras moléculas con carácter herbicida, hormonas vegetales y otros compuestos de síntesis reciente.

Los compuestos se encuentran disueltos a una concentración de 2,5 mM en DMSO (dymethyl sulfoxide).

3.3. Rastreo de moléculas

El rastreo de moléculas se realizó en placas multipocillo de 96 pocillos con medio MS sólido. A cada pocillo se añadió 1µl del compuesto directamente desde la colección y 100µl de medio MS, quedando el compuesto a una concentración final de 25 µM. Se sembraron 3 semillas por pocillo, previamente esterilizadas y estratificadas, y se dejaron crecer durante una semana en la cámara de cultivo in vitro (*ver apartado 3.1.2. Cultivo in vitro*).

Al séptimo día se procedió a realizar la detección de la actividad β-glucuronidasa, tal y como se describe en el apartado siguiente.

Como control se utilizó *ocp1* tanto en 100µl de medio MS sólido como en 100µl de medio MS sólido con DMSO al 1%, dado que los compuestos de la colección están disueltos en DMSO. Además, también se utilizó como control de crecimiento el ecotipo silvestre Col-0 y como control positivo de actividad β-

glucuronidasa el mutante *ocp3*. La distribución final de los controles en la placa se observa en la siguiente figura.

<i>ocp1</i> MS										<i>ocp1</i> MS+DMSO
<i>ocp3</i> MS										<i>ocp3</i> MS+DMSO
Col-0 MS										Col-0 MS+DMSO
<i>ocp1</i> MS+DMSO										<i>ocp1</i> MS
<i>ocp3</i> MS+DMSO										<i>ocp3</i> MS
Col-0 MS+DMSO										Col-0 MS
<i>ocp1</i> MS										<i>ocp1</i> MS+DMSO
<i>ocp3</i> MS										<i>ocp3</i> MS+DMSO

Figura 6: Diseño de las placas de 96 pocillos para el rastreo de moléculas moduladoras de la expresión de Ep5C. Las columnas de los extremos se reservan para los controles con los genotipos *ocp1*, *ocp3* y Col-0, sembrados en medio MS con o sin adición de DMSO. En el resto de pocillos se prueban los distintos compuestos de la colección.

3.4. Actividad β -glucuronidasa

La actividad β -glucuronidasa se detecta infiltrando el tejido fresco mediante 20 minutos de vacío con solución GUS hasta alcanzar una infiltración total. A continuación, se incuba toda la noche a 37 °C en oscuridad y posteriormente se hacen sucesivos lavados con etanol 96 % (v/v).

La solución GUS se prepara con 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc) 0'5 mg/mL, tampón fosfato pH 7'2 100 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 0'5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 0'5 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM, Triton X- 100 0'1% (v/v) y metanol 10 % (v/v).

Cuando las plántulas han sido crecidas en placas multipocillos de 96 pocillos la tinción histoquímica GUS se realiza en la misma placa, en el resto de casos la tinción GUS se realiza en tubos de microcentrífuga de 2 ml. En ambos casos se añade el volumen suficiente para cubrir el tejido vegetal.

3.5. Confirmación de las moléculas identificadas

Una vez adquiridos los compuestos seleccionados se preparó una solución stock con DMSO de cada uno de ellos a una concentración de 10mM (almacenaje a -80°C) y otra a 2'5 mM (solución de trabajo), igual que en la colección.

Para comprobar si los compuestos seleccionados eran buenos candidatos se volvieron a probar a la misma concentración de 25 μM (1x) y además se preparó una dilución seriada a 1/10 (2.5 μM), 1/100 (250 nM) y 1/1000 (25 nM). Se realizaron tres repeticiones. La confirmación de los compuestos identificados se realizó en placas multipocillo de 96 pocillos con medio MS sólido. De esta manera en cada placa se pueden probar un total de cuatro compuestos quedando los pocillos externos con únicamente MS para evitar la desecación de los pocillos con las plántulas, y las columnas centrales para los controles (Figura 7).

Se siembran 3 semillas por pocillo, previamente esterilizadas y estratificadas, y se dejan crecer durante 7 días en la cámara de cultivo in vitro (ver apartado 3.1.2. *Cultivo in vitro*). Al séptimo día se procede a realizar la detección de la actividad β -glucuronidasa (ver apartado anterior) y a continuación se analizan los resultados obtenidos de forma visual.

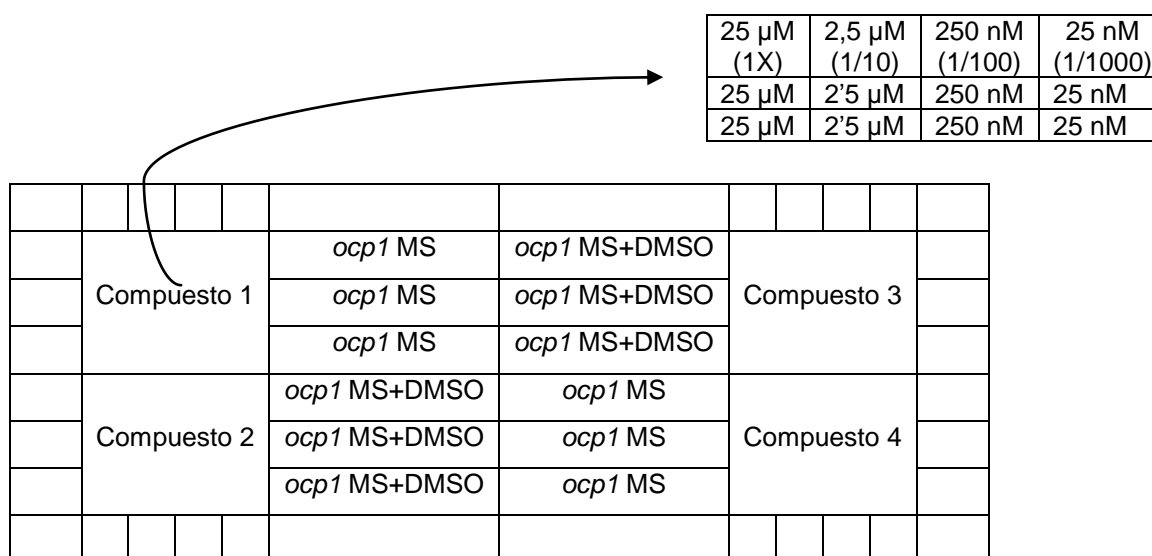


Figura 7: Diseño de las placas multipocillo para la confirmación de los compuestos seleccionados en el rastreo de moléculas moduladoras de la expresión de Ep5C. En los pocillos externos se añade únicamente el medio MS. En las columnas centrales se siembran los controles en medio MS con o sin adición de DMSO.

3.6. Efecto de las moléculas seleccionadas sobre los mutantes *ocp* y su línea parental

Una vez confirmados los compuestos se probaron sobre su línea parental (línea 5.2.), *ocp1*, *ocp3* y *ocp11* a la concentración de 25 μM y 50 μM .

Para ello se utilizan placas multipocillo de seis pocillos. Se siembran 20 semillas por pocillo, previamente esterilizadas y estratificadas, sobre papel de filtro esterilizado y éste, a su vez, sobre medio MS sólido con DMSO 1%. Las placas se llevan a la cámara de cultivo in vitro donde permanecen siete días (ver apartado 3.1.2. *Cultivo in vitro*). Se sembraron un total de cuatro placas por genotipo y dos placas como control (Figura 8.A.)

Al séptimo día se procede a trasplantar las plántulas con el papel de filtro a placas multipocillo de 6 pocillos con medio MS sólido y el compuesto a 25 μ M o 50 μ M, obteniendo un total de tres placas por genotipo (Figura 8.B). Se utilizó el papel de filtro para evitar daños en la raíz en el momento del trasplante.

Al cuarto día de crecimiento en contacto con el compuesto (plántulas de 11 días de edad) se procede a la detección de la actividad β -glucuronidasa de un total de seis plántulas en tubos de microcentrifuga de 2ml (ver apartado 3.4. Actividad β -glucuronidasa). Una vez realizada la tinción, se analizan los resultados de forma visual.

A

Medio MS + DMSO 1%	Medio MS + DMSO 1%	
Medio MS + DMSO 1%	Medio MS + DMSO 1%	

B

Medio MS + MOD1 25 μ M	Medio MS + MOD2 25 μ M	Medio MS + MOD3 25 μ M
Medio MS + MOD1 50 μ M	Medio MS + MOD2 50 μ M	Medio MS + MOD3 50 μ M

Medio MS + MOD4 25 μ M	Medio MS + MOD5 25 μ M	Medio MS + MOD6 25 μ M
Medio MS + MOD4 50 μ M	Medio MS + MOD5 50 μ M	Medio MS + MOD6 50 μ M

Medio MS + MOD7 25 μ M	Medio MS + MOD8 25 μ M	Medio MS + MOD9 25 μ M
Medio MS + MOD7 50 μ M	Medio MS + MOD8 50 μ M	Medio MS + MOD9 50 μ M

Figura 8. Diseño de las placas multipocillo para conocer el efecto de las moléculas moduladores de la expresión de Ep5C (MOD1-MOD9) sobre los mutantes *ocp* y su línea parental.

(A) Diseño de las placas control
(B) Diseño de las placas con los compuestos (MOD1-MOD9)

3.7. Implicación de los compuestos moduladores en la respuesta defensiva dependiente de ácido salicílico

Para evaluar la ruta mediada por ácido salicílico (SA) se utilizó como marcador la expresión de la proteína PR1. Para ello, se realizó la aplicación de los compuestos MOD1 y MOD2 (25 μ M) y SA (100 μ M) sobre la línea 5.2.

En primer lugar, se sembraron, con 100 semillas por placa, placas Petri de 9 cm de diámetro con medio MS sólido (ver apartado 3.1.2. Cultivo in vitro).

A los 7 días de crecimiento, se realizó el trasplante a medio MS líquido con o sin compuesto. Para ello, se utilizaron placas multipocillo de seis pocillos a los que se añadió 7 ml de medio. Se trasplantaron 35 plántulas por pocillo y se mantuvieron las placas en la cámara de cultivo in vitro en continua agitación, utilizando para ello un agitador orbital.

Al cuarto día de estar las plántulas en contacto con el compuesto, se añadió el SA, previamente disuelto en agua Mili-Q.

Se realizó un primer muestreo antes de realizar el tratamiento con SA (0h) (Figura 9.A) y tres muestreos más para cada uno de los dos compuestos, a las 12, 24 y 48 horas de la aplicación del SA (Figura 9.B). Las plantas se secan con papel absorbente evitando cualquier tipo de daño y se congelan con nitrógeno líquido de forma inmediata para ser conservadas a -80°C hasta el momento de su procesado.

A			B		
MS	MS + MOD1 25 μ M	MS + MOD2 25 μ M	MS	MS + MOD1 25 μ M	MS + MOD2 25 μ M
			MS + SA 100 μ M	MS + MOD1 25 μ M + SA 100 μ M	MS + MOD2 25 μ M + SA 100 μ M

Figura 9: Diseño de las placas multipocillo para conocer la implicación de los compuestos moduladores de Ep5C MOD1 y MOD2 en la respuesta defensiva dependiente de ácido salicílico.

(A) Diseño de la placa para el muestreo realizado antes de la aplicación con ácido salicílico (SA). **(B)** Diseño de las placas para los muestreos realizados a las 12h, 24h y 48h de la aplicación de ácido salicílico.

Para realizar la inmunodetección de la proteína PR1 se procedió a realizar un Western Blot. A continuación se describen los pasos realizados:

1) Extracción y cuantificación de proteínas

Extracción de las proteínas de aproximadamente 100 mg de tejido vegetal previamente machacado. Se añaden 3 µl/mg del siguiente buffer de extracción: Tris HCl pH 7'8 150mM, KCl 150mM, NP40 (Nonidet P40) 1%, EDTA 1mM, MgCl₂ 5mM, DTT (dithiothreitol) 10mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0'5mM e inhibidor de proteasas Sigma[®] a razón de 5-10 µl/mL. Después de homogeneizar bien, se centrifuga durante 20 minutos a 4°C, obteniendo la fracción proteica en el sobrenadante.

A continuación se cuantifican las proteínas por el método Bradford, basado en la unión de las proteínas a una solución ácida del colorante Comassie Brilliant Blue G-250, contenida en el reactivo de Bradford. Este método es sensible, simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. En primer lugar se prepara la solución Bradford diluyendo el reactivo de Bradford a partes iguales con agua Mili-Q. Seguidamente, a partir del stock de BSA (albúmina bovina) se preparan soluciones a las concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µg de proteína/ml; se les añade 1ml de la solución Bradford; se agita, se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 595nm con el espectrofotómetro. Con estos datos se elabora la recta patrón y se calcula la ecuación de la recta de regresión. A continuación, se mide de la misma manera la absorbancia de cada una de las muestras añadiendo 1 ml de la solución Bradford a 0'5 µl de proteína diluidos en 9'5 µl de agua Mili-Q. Con los valores obtenidos y la ecuación de la recta de regresión se calcula la concentración de proteínas de cada una de las muestras.

2) Electroforesis en gel SDS-PAGE

Una vez hecha la cuantificación, se preparan las muestras con tampón de carga SDS-PAGE (Tris-HCl pH 8'0 85 mM, Glicerol 10%, SDS 6%, Azul de bromofenol 0'25%) y 2-mercaptoetanol (20µl/ml), ajustando con el tampón de extracción para tener el mismo volumen proteico de cada muestra. Para desnaturalizar las proteínas, las muestras ya preparadas se han incubado durante 4 minutos a 95°C, quedando listas para cargar en el gel de 12% poliacrilamida, formado por un gel acumulador y un gel separador. La composición de los geles se recoge en la Tabla 1. Como marcador se ha utilizado Prestained Protein Ladder (Sigma[®]).

	gel separador	gel acumulador
H2O Mili-Q	5'25 ml	6'1 ml
30% acrilamida líquida	6 ml	1'3 ml
Tris 1'5 M – 0'4 % SDS pH 8,8	3'75 ml	-
Tris 0'5 M – 0'4 % SDS pH 6,8	-	2'5 ml
TEMED	20 µl	20 µl
20% APS	50 µl	50 µl

Tabla 1: Composición para 2 geles SDS-PAGE

Una vez separadas las proteínas por tamaños, se deja incubar el gel durante 10 minutos en tampón Western (Tris HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0'03%, Metanol 20%).

3) Electrotransferencia y tinción Ponceau

A continuación, se realiza la transferencia de las proteínas desde el gel de poli(acrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Whatman®), utilizando para ello una corriente eléctrica y el tampón de transferencia Western.

Tras la transferencia, se tiñe la membrana con la solución Ponceau (colorante Ponceau-S 2% (p/v) y ácido acético 1% (v/v)), para comprobar que el material proteico ha pasado a la membrana y que todas las muestras contienen la misma cantidad de proteínas (control de carga). Se destiñe la membrana con agua Mili-Q.

4) Bloqueo y Detección

Después de transferir las proteínas a la membrana es necesario bloquear los lugares de unión que han quedado libres para lo que se deja incubar la membrana durante 1 hora con leche en polvo 5% (p/v) y TBS (Tris 6'1 g/L, NaCl 9 g/L, pH 7'6) con Tween 20 0'1% (v/v). Una vez hecho el bloqueo, se lava la membrana con el mismo tampón.

A continuación, con tal de permitir la detección de la proteína PR1 se incuba la membrana durante toda la noche con el anticuerpo primario a una dilución 1/5000 en leche en polvo 2% y tampón TBS + Tween 20 0'1%. Al día siguiente, se realizan dos lavados de 15 minutos con el mismo tampón y seguidamente se deja incubar la membrana 1 hora con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG, HRP) a una dilución 1/25000 con leche en polvo 2% y tampón TBS + Tween 20 0'1%.

Una vez transcurrido este tiempo se realizan dos lavados de 15 minutos cada uno con el mismo tampón.

5) Análisis

Para analizar la cantidad de proteína PR1 de cada muestra, se deja incubar la membrana durante 10 minutos con el sustrato, el cuál emitirá luminiscencia. La luz emitida ha sido captada por una cámara CCD obteniendo así una imagen digital del Western Blot.

4. Resultados y discusión

4.1. Puesta a punto del método experimental

La búsqueda de pequeñas moléculas que ejerzan un efecto en la expresión genética de determinados genes de interés, como por ejemplo genes relacionados con la respuesta a factores bióticos o abióticos, así como la identificación de sus dianas directas, es lo que se ha establecido como genética química. Es por ello, que esta disciplina ha adquirido una gran importancia en el estudio de la biología vegetal, como ya se ha descrito anteriormente

Sin embargo, para poder aprovechar al máximo las ventajas del uso de esta técnica y obtener unos resultados representativos, es igual de importante y necesario realizar una correcta puesta a punto del protocolo experimental a seguir. Por eso, este ha sido el punto de partida del presente trabajo. Se realizaron diversos ensayos con tal de establecer una serie parámetros a utilizar durante el rastreo de moléculas.

En primer lugar, para facilitar el desarrollo de esta búsqueda y hacer una primera selección de compuestos, se decidió utilizar placas multipocillo de 96 pocillos las cuáles permiten probar de manera simultánea 80 compuestos químicos, dejando la primera y la última columna libres de compuestos para poder diseñar correctamente los controles. Además, se optó por no realizar réplicas en este primer rastreo y sólo realizarlas una vez hecha la primera selección de compuestos, agilizando así el proceso de búsqueda inicial.

Por otro lado, se decidió realizar el estudio en plántulas de 7 días de edad, ya que este período es suficiente para que las plántulas desarrollen los cotiledones e inicien el desarrollo del primer par de hojas verdaderas. Debido a esto y con tal de facilitar la realización de las tareas experimentales, se decidió añadir el compuesto desde el momento de la siembra y directamente al medio de cultivo. Para minimizar el posible impacto en la germinación ocasionado por esta temprana aplicación del compuesto, se decidió estratificar las semillas en agua antes de la siembra.

Al tratarse de placas multipocillo con pocillos de 6 mm de diámetro y considerando que las plántulas alcanzarían la semana de edad, se decidió añadir 100 μ L de medio MS sólido y sembrar 3 semillas por cada pocillo. La cantidad de medio sería suficiente para el correcto desarrollo de las tres plántulas y se evitaría la aparición de posibles síntomas de anoxia. Además, la aplicación de este volumen de medio sólido facilitaría la aplicación a cada pocillo de la solución para detectar la actividad enzimática del gen GUS.

Otro punto importante a discutir fue la concentración de sacarosa a usar en el medio de cultivo, dada la importancia de este nutriente. Se optó por la adición de 5g/l, al comprobarse que mayores dosis provocaban síntomas de estrés como el aumento en la producción de antocianinas.

Por último, se llevó a cabo otra prueba previa en la que se probó el efecto que podía tener el disolvente de los compuestos (DMSO) sobre el desarrollo de las plántulas y principalmente en la inducción de la actividad enzimática del gen reportero. Para ello, se probaron diversas concentraciones de DMSO en los diferentes genotipos de estudio, sin observarse cambio alguno en el nivel de expresión del gen GUS respecto al control (sin disolvente). De esta forma, los posibles candidatos que se seleccionaran no serían falsos positivos debidos a un efecto del disolvente.

Una vez establecidos todos los parámetros, se procedió a la realización del escrutinio con el mutante *ocp1*. La detección de moléculas candidatas se basó en la expresión de la actividad β -glucuronidasa (GUS) mediante tinción histoquímica del tejido vegetal fresco. Una vez realizada la tinción, se realizó una comparación visual de la expresión del gen marcador GUS en plántulas control con la expresión en plántulas crecidas en presencia del compuesto.

Como ya se ha dicho anteriormente (ver apartado 1.3. Antecedentes del proyecto), *ocp1* presenta expresión constitutiva del gen pEp5C::GUS. Por tanto, se considerarán moléculas agonistas de la mutación *ocp1* aquellas que presentan una mayor intensidad azul en la tinción histoquímica GUS respecto a las plántulas control, y moléculas antagonistas aquellas que presentan un menor grado de tinción que las plántulas control, todo ello determinado de manera visual.

Aunque se tiene constancia que científicamente sería más correcto realizar una cuantificación numérica del grado de expresión del gen GUS, con tal de poder conocer si las diferencias observadas son estadísticamente significativas, se ha optado por realizar una determinación visual al tratarse de un proyecto final de carrera donde el objeto final radica en la adquisición por parte del estudiante de una formación adecuada para poder realizar correctamente la programación de objetivos, el diseño experimental y el desarrollo científico así como interpretar correctamente los resultados obtenidos.

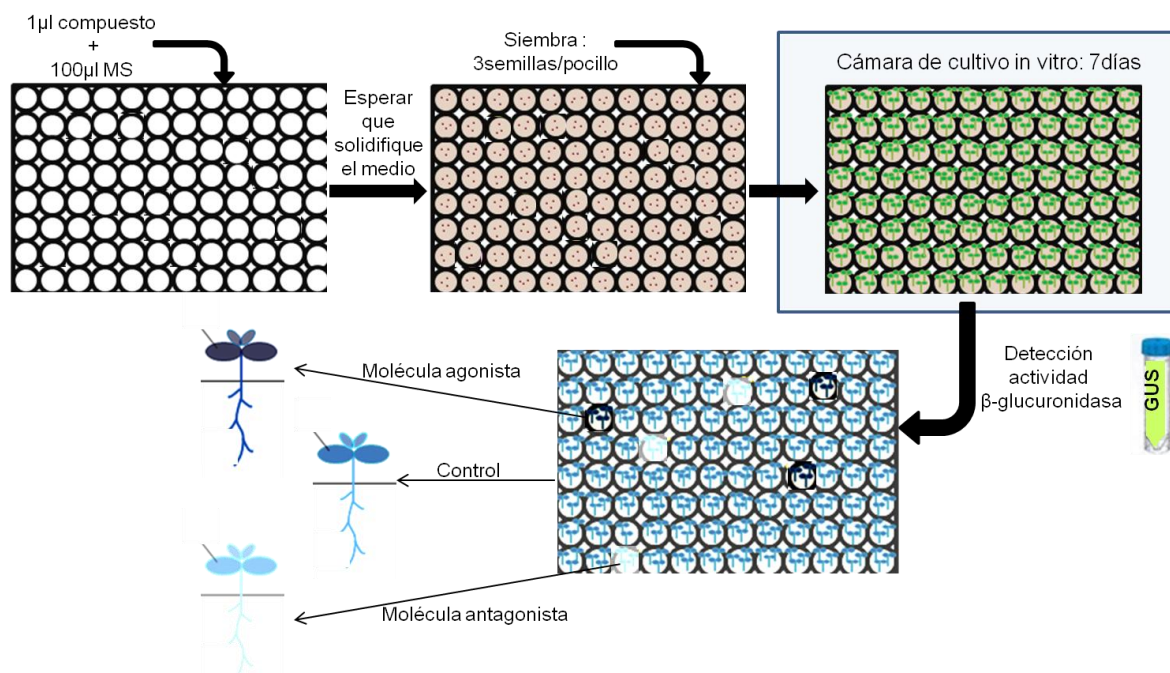


Figura 10. Esquema de los pasos realizados durante el escrutinio de moléculas antagonistas y agonistas

Se añade 1 µl del compuesto correspondiente por pocillo y 100 µl de MS y se deja solidificar. Una vez ha solidificado el medio, se siembran 3 semillas por pocillo y se llevan las placas a la cámara de cultivo in vitro. Tras 7 días de crecimiento, se procede a la detección de la actividad de la enzima β-glucuronidasa mediante tinción histoquímica del tejido vegetal fresco. Finalmente, se comparan visualmente los resultados obtenidos frente a las plántulas control con tal de identificar posibles moléculas agonistas u antagonistas de la expresión del gen GUS.

4.2. Rastreo de moléculas antagonistas y agonistas de la regulación transcripcional del mutante *ocp1*

Para la identificación de moléculas antagonistas y agonistas de la regulación transcripcional del mutante *ocp1* se realizó un primer rastreo utilizando aproximadamente 4.000 compuestos químicos de la colección disponible en el

laboratorio. La detección de moléculas candidatas se basó en la expresión de la actividad β -glucuronidasa (GUS) mediante tinción histoquímica del tejido vegetal fresco. Se realizó una comparación visual de la expresión del gen *pEp5C::GUS* en las plántulas control con la expresión del mismo gen en las plántulas crecidas en presencia del compuesto a 25 μ M. Las plántulas control se crecieron en medio MS, con o sin adición de DMSO 1%. Se añadió DMSO 1%, puesto que en la colección los compuestos están disueltos en DMSO. Pese a no haber observado diferencias visuales en el crecimiento y en el nivel de expresión del gen delator *GUS* en las plántulas crecidas en MS a las crecidas en MS con DMSO, se decide utilizar en los próximos experimentos MS con DMSO 1% como control, con tal de aportar en todo momento la misma cantidad de DMSO al medio de cultivo.

Una vez finalizado el escrutinio, se obtuvieron un total de 21 moléculas candidatas capaces de modular la activación del gen *Ep5C* en comparación con las plántulas control. Debido al este efecto modulador en la activación del gen *pEp5C::GUS*, las moléculas candidatas se denominarán con el prefijo MOD.

Se ha considerado más oportuno no mencionar ninguna característica química de los compuestos seleccionados, al no resultar relevante para el desarrollo de este proyecto. Hay que tener en cuenta que el presente proyecto está incluido dentro del proyecto Chemiplanta, por lo que sería posible que los resultados obtenidos fuesen susceptibles de ser patentados.

Las 21 moléculas candidatas pueden dividirse en dos grupos atendiendo al efecto causado en el nivel de expresión del gen *pEp5C::GUS*.

Por un lado, tenemos un grupo de moléculas (MOD1- MOD7, ver Figura 11) que causan todas ellas el mismo efecto tanto en el crecimiento de las plántulas como en la expresión del gen marcador GUS. Estas moléculas provocan un fuerte arresto del crecimiento e impiden el correcto desarrollo de los cotiledones, quedando totalmente blancos. No se observa expresión del gen *pEp5C::GUS* en los cotiledones (molécula antagonista) y en cambio la expresión del gen en raíces es mayor que en las plántulas control (molécula agonista). Este doble efecto observado podría ser debido a que la molécula actuaría de una forma u otra según el tipo de tejido vegetal (hojas o raíces) afectado. O bien, que la pérdida de clorofila en los cotiledones indica una alteración que impide la expresión del gen

pEp5C::GUS. Para poder inclinarlos por una u otra opción resulta necesario repetir la aplicación y corroborar que los resultados obtenidos se confirman.

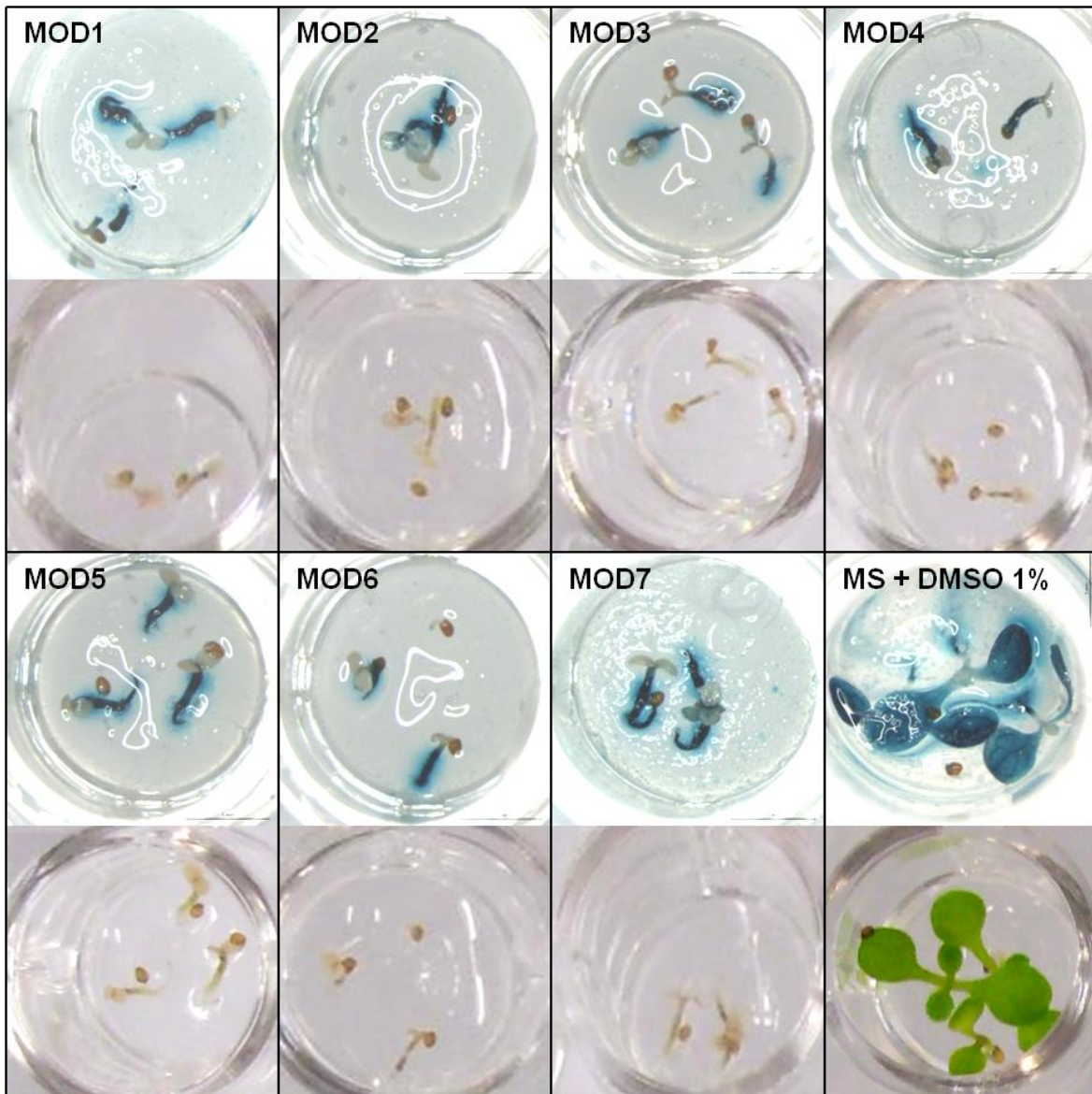


Figura 11. Efecto de las moléculas MOD1 a MOD7 sobre el crecimiento y la tinción histoquímica GUS de plántulas *ocp1* de siete días de crecimiento, comparado con plántulas control crecidas en MS con DMSO 1%.

Por otro lado, tenemos un segundo grupo de moléculas (MOD8 - MOD21, Figuras 12-13) cuya aplicación produce que las plántulas tengan una menor expresión del gen *pEp5C::GUS* respecto a las plántulas control, por lo que se consideran moléculas antagonistas de la mutación *ocp1*. Esta disminución en la expresión del gen varía según el compuesto, siendo más acentuada en las plántulas crecidas en presencia de MOD12, MOD14, MOD18, MOD19 y MOD20.

El efecto de este grupo de moléculas en el crecimiento varía también según el compuesto de que se trate. De este modo, observamos una disminución del crecimiento respecto a las plántulas control, en las plántulas crecidas en presencia de las moléculas moduladora excepto en las moléculas MOD8, MOD10 (Figura 12) y MOD17 (Figura 13). Además los compuestos MOD9, MOD16 y MOD18, producen un ligero amarilleamiento en cotiledones (Figuras 12 y 13).

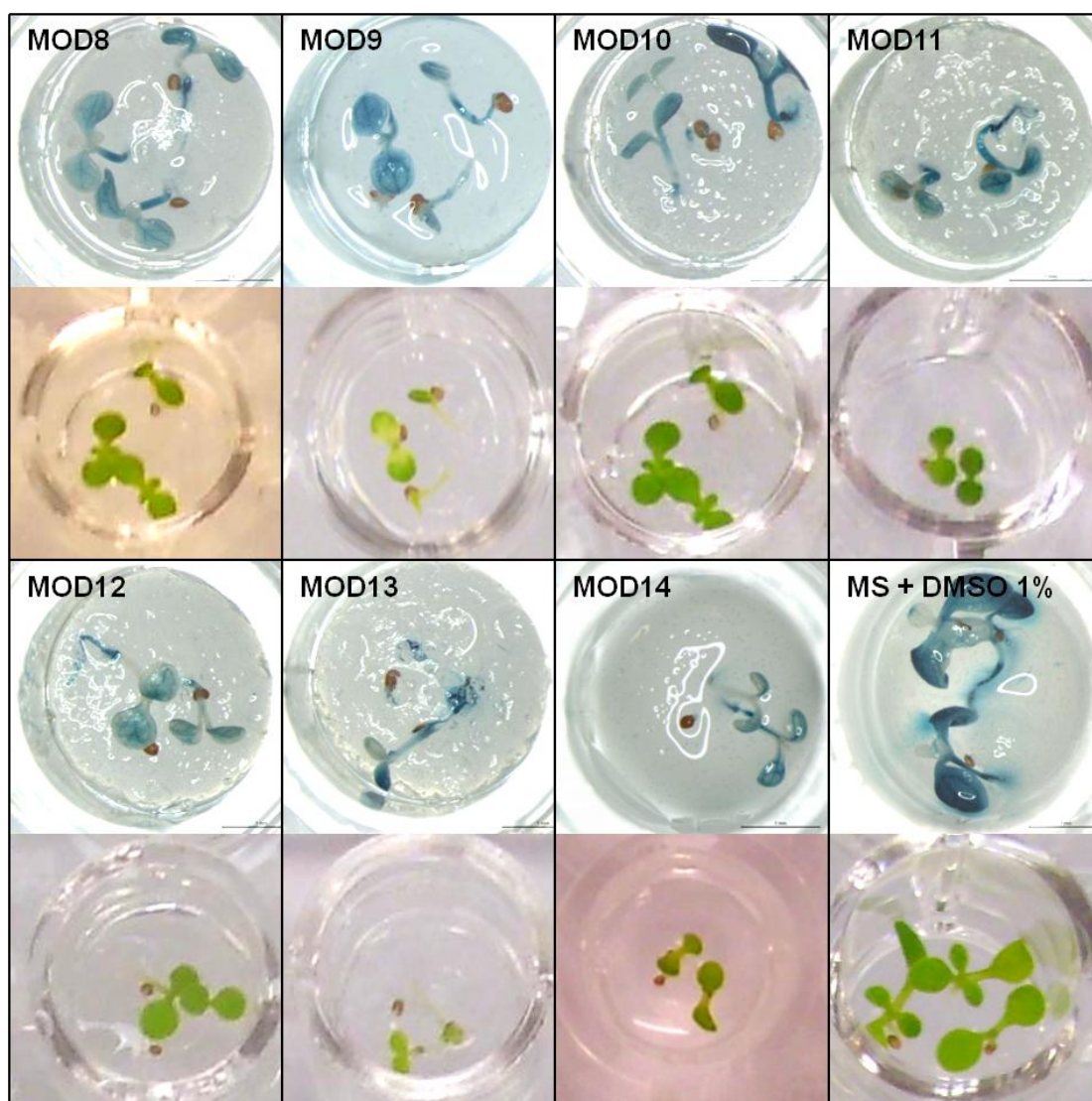


Figura 12. Efecto de las moléculas MOD8 a MOD14 sobre el crecimiento y la tinción histoquímica GUS de plántulas *ocp1* de siete días de crecimiento, comparado con plántulas control crecidas en MS con DMSO 1%.

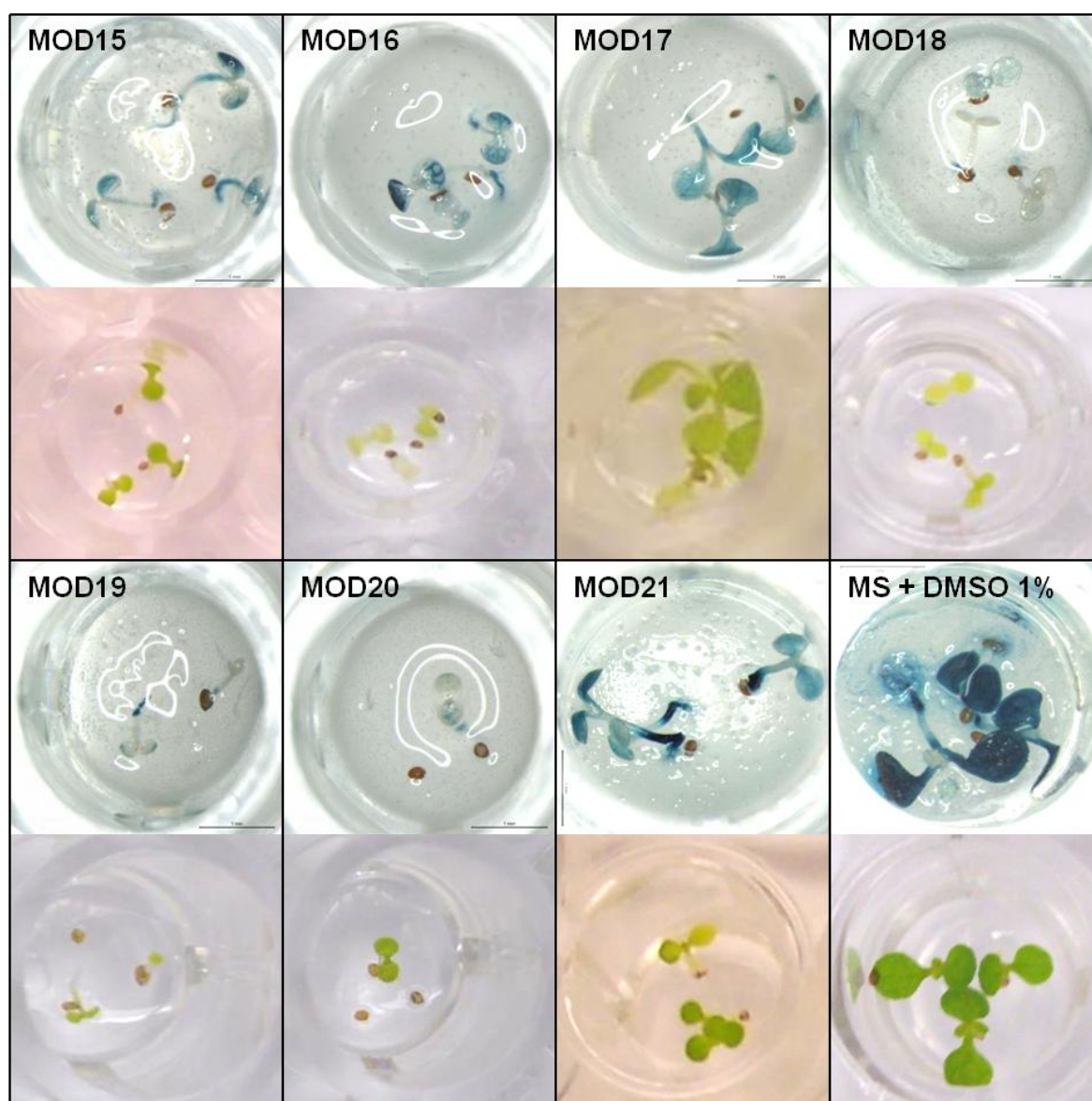


Figura 13. Efecto de las moléculas MOD15 a MOD21 sobre el crecimiento y la tinción histoquímica GUS de plántulas *ocp1* de siete días de crecimiento, comparado con plántulas control crecidas en MS con DMSO 1%.

4.2.1. Compuestos moduladores de la expresión de *Ep5C*

Dado que trabajar con 21 moléculas así como adquirirlas no era factible, se optó por seleccionar un número menor de compuestos con los que continuar trabajando.

En el apartado anterior hemos clasificado las moléculas candidatas en dos grupos según los efectos que producen en las plántulas. El primer grupo está formado por 7 moléculas que provocan el mismo efecto tanto en el crecimiento como en la activación del gen *pEp5C::GUS*. Se decidió elegir dos moléculas de

este grupo optando por aquellas más económicas, al no observar diferencias en los efectos producidos.

De las 14 moléculas restantes se decidió elegir un máximo de 10. Se seleccionaron aquellas moléculas que provocan una disminución más acentuada de la expresión del gen pEp5C::GUS. Dado que se realiza una determinación visual, en algunos casos, esta selección de moléculas puede resultar un poco subjetiva, pero hay que considerar que las moléculas no seleccionadas no quedan descartadas para futuros estudios y que esta selección se realizó principalmente para facilitar el trabajo y por razones de índole económica.

Los compuestos seleccionados finalmente son los siguientes:

- MOD1 (Figura 11)
- MOD2 (Figura 11)
- MOD8 (Figura 12)
- MOD9 (Figura 12)
- MOD12 (Figura 12)
- MOD14 (Figura 12)
- MOD15 (Figura 13)
- MOD16 (Figura 13)
- MOD17 (Figura 13)
- MOD18 (Figura 13)
- MOD19 (Figura 13)
- MOD20 (Figura 13)

Una vez seleccionados se procedió a la adquisición de los compuestos. No fue posible adquirir MOD17 por no estar disponible en la casa comercial.

4.2.2. Confirmación de los compuestos moduladores de la expresión de *Ep5C*

Con tal de corroborar los resultados observados hasta el momento y dado que no se realizaron réplicas en el rastreo de moléculas, resultó necesario realizar una verificación de los compuestos seleccionados bajo las mismas condiciones de crecimiento (25 μ M y 7 días de crecimiento), pero realizando esta vez tres repeticiones. Además de aplicar el compuesto a 25 μ M, se preparó una dilución seriada a 1/10 (2.5 μ M), 1/100 (250 nM) y 1/1000 (25 nM), con tal de comprobar si el compuesto es efectivo a menores concentraciones.

Se utilizó como control el mutante *ocp1* crecido en MS con DMSO al 1%.

Como se ha comentado en el apartado anterior, MOD1 y MOD2 se consideran moléculas agonistas de la mutación en la parte radicular. Debido a esto, cabría esperar que aplicados sobre la línea parental 5.2, las plántulas

mostrarán una tinción histoquímica GUS positiva en la parte radicular. Con tal de confirmar esta hipótesis y validar los resultados obtenidos, se decidió probar ambos compuestos tanto sobre *ocp1* como sobre la línea 5.2. En el resto de compuestos, al tratarse de moléculas antagonistas de la mutación *ocp1*, la verificación se realizó únicamente sobre el mutante *ocp1*.

En la verificación de MOD1 y MOD2 puede observarse, a diferencia de lo inicialmente visto en el rastreo, que la mayor expresión del gen *Ep5C* no sólo se da en la parte radicular de las plántulas, sino que también se ve reflejada en la parte aérea (Figuras 14-15). Además, las plántulas de la línea parental muestran también una tinción histoquímica GUS positiva, confirmando la hipótesis anteriormente formulada, lo cual nos indicaría que tanto MOD1 como MOD2 están implicados en alguna de la respuesta inmune vegetal. En *ocp1* los compuestos parecen ser efectivos únicamente a 25 μ M, mientras que en la línea parental 5.2. observamos unainducción de la expresión de *Ep5C* a 25 μ M y a 2'5 μ M. También hay que reseñar, que la aplicación de estas dos moléculas a 25 μ M y 2'5 μ M reduce el crecimiento tanto de *ocp1* como de 5.2..

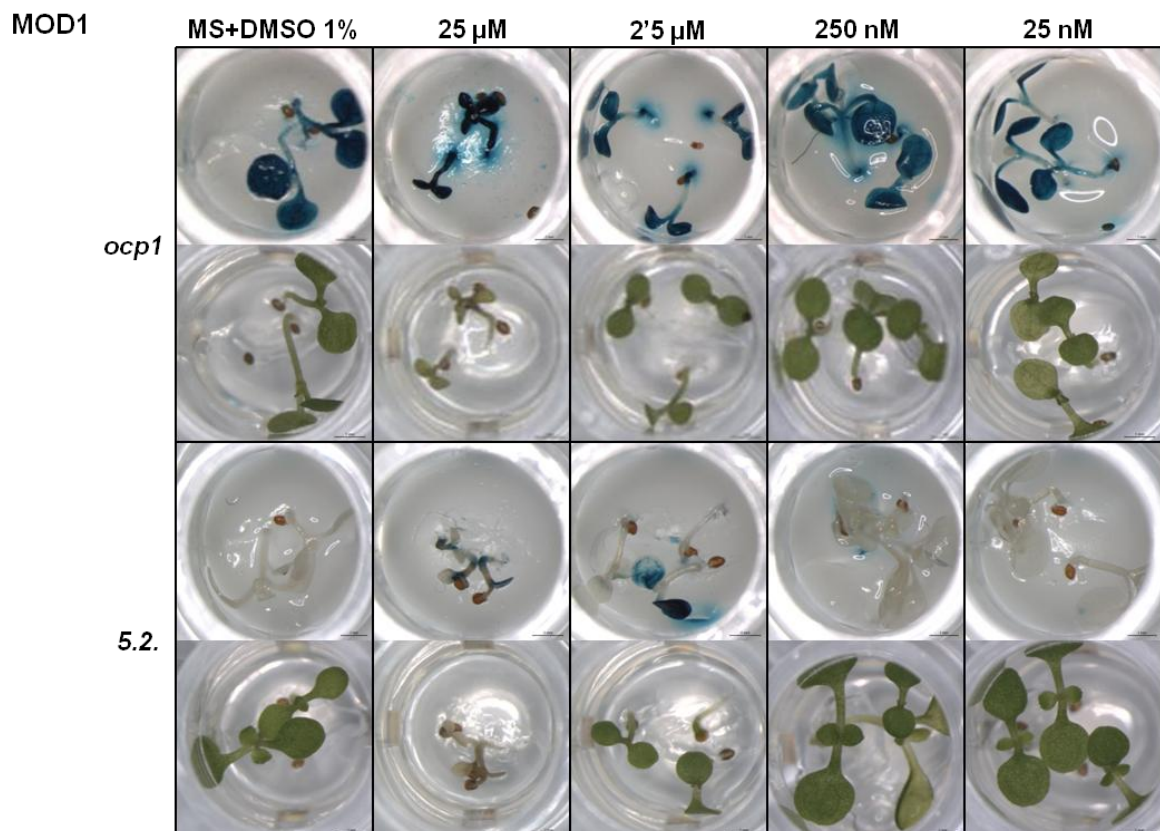


Figura 14. Efecto de MOD1 sobre el crecimiento y expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1* y su línea parental 5.2. de siete días de crecimiento.

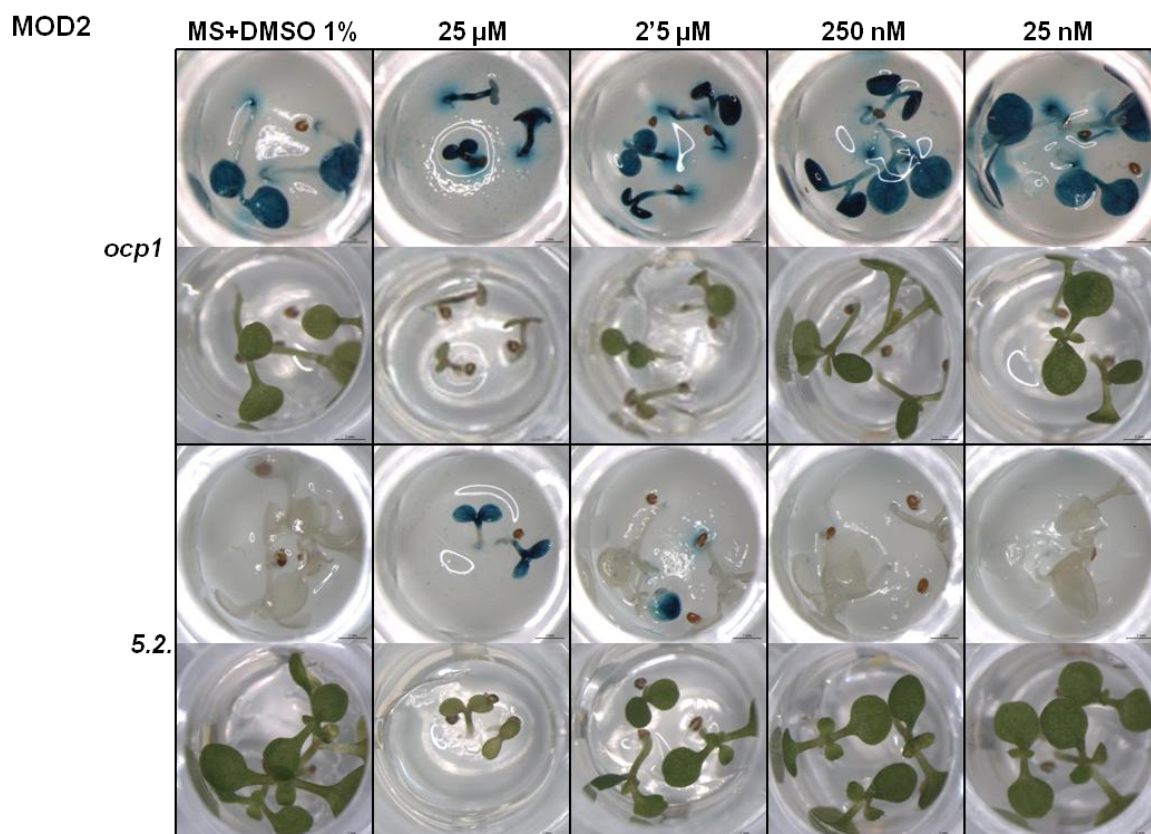


Figura 15. Efecto de MOD2 sobre el crecimiento y expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1* y su línea parental 5.2. de siete días de crecimiento.

Al igual que ocurre en MOD1 y MOD2, ninguno de los restantes compuestos (Figuras 16,17,18) ha presentado efectividad a una concentración inferior a 25 μ M.

Las semillas sembradas en presencia de MOD8 (Figura 16) a 25 μ M no han germinado en ninguna de las tres repeticiones, por lo que será necesario plantear otro experimento en el que la aplicación del compuesto no se realice desde el momento de la siembra, permitiendo así la germinación de las semillas y la posterior evaluación del efecto de la aplicación.

En la verificación de MOD9 (Figura 16) y MOD18 (Figura 18), vemos como los resultados obtenidos hasta el momento se corroboran, dado que en las tres repeticiones en presencia de estos compuestos a 25 μ M las plántulas han presentado una menor inducción del gen *pEp5C::GUS* respecto al control.

Respecto a MOD12 (Figura 16) y MOD19 (Figura 18), al realizar la confirmación no se observaron diferencias a nivel de tinción respecto a sus

respectivos controles, por lo que ambos compuestos quedan descartados para futuros estudios.

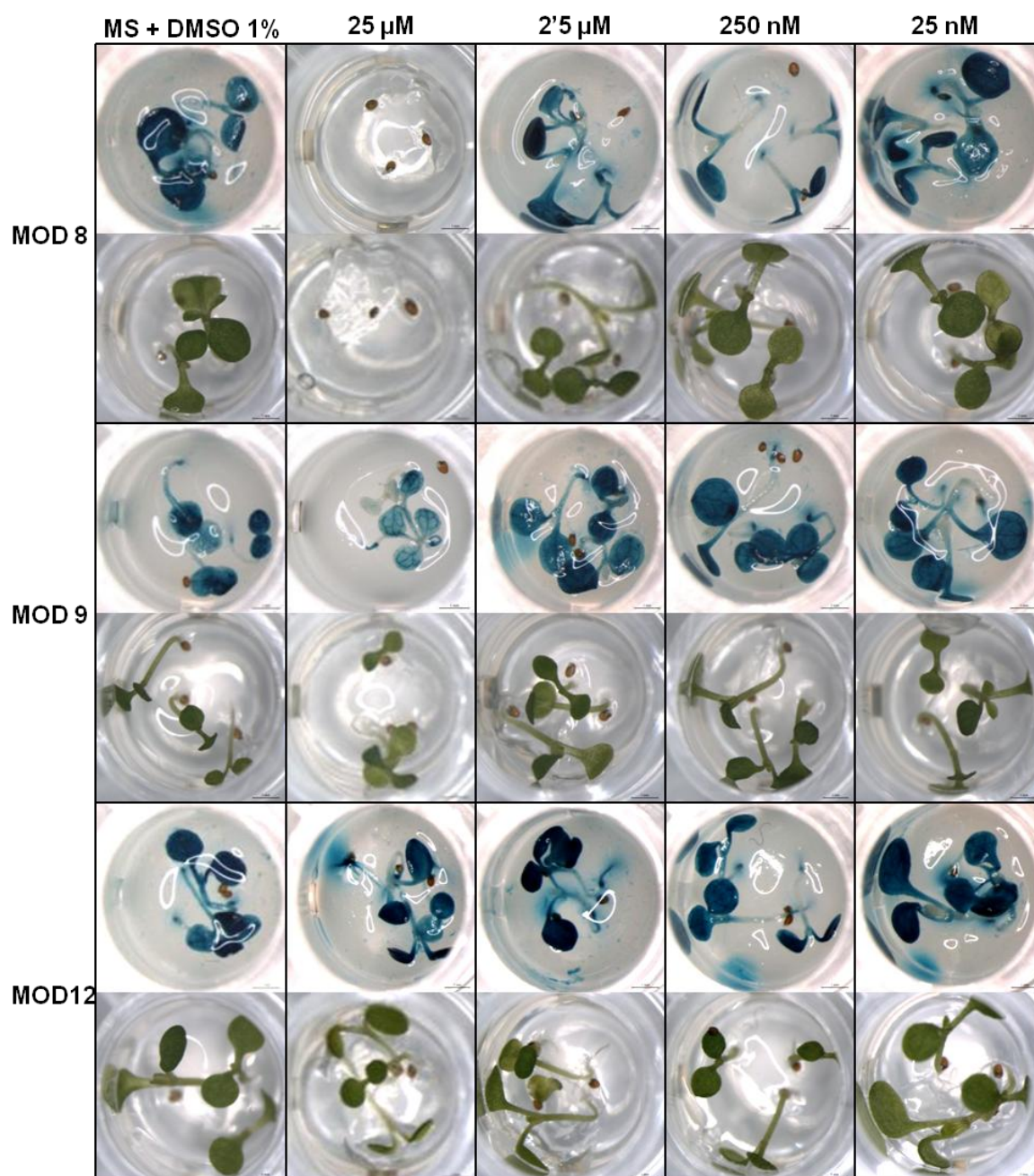


Figura 16. Efecto de MOD8, MOD9 y MOD12 sobre el crecimiento y expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1* de siete días de crecimiento.

En el caso de MOD14 y MOD15 (Figura 17) y MOD 20 (Figura 18), las plántulas de un mismo pocillo presentan diferentes niveles de tinción, por lo que se consideró necesario volver a realizar aplicaciones de este compuesto a 25 μ M, para poder determinar su efectividad.

El compuesto MOD16 (Figura 17) ha afectado al crecimiento de las plántulas, originando plántulas sin coloración verde. Es por esto, que se consideró necesario realizar de nuevo la aplicación del compuesto en condiciones similares a las planteadas para MOD8; es decir, aplicando el producto una vez producida la germinación e inicial desarrollo de las plántulas.

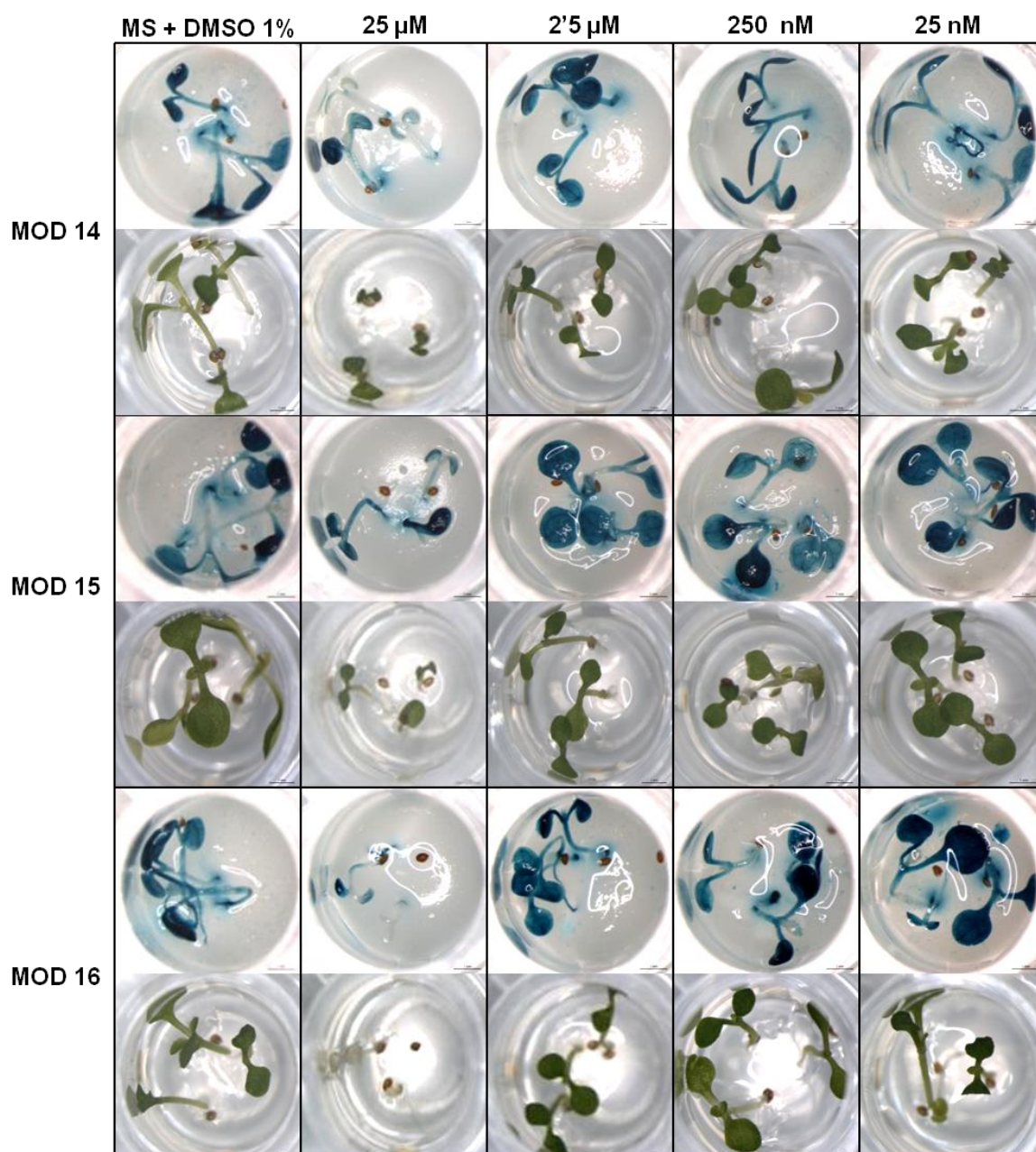


Figura 17. Efecto de MOD14, MOD15 y MOD 16 sobre el crecimiento y expresión del gen marcador GUS en plántulas *ocp1* de siete días de crecimiento.

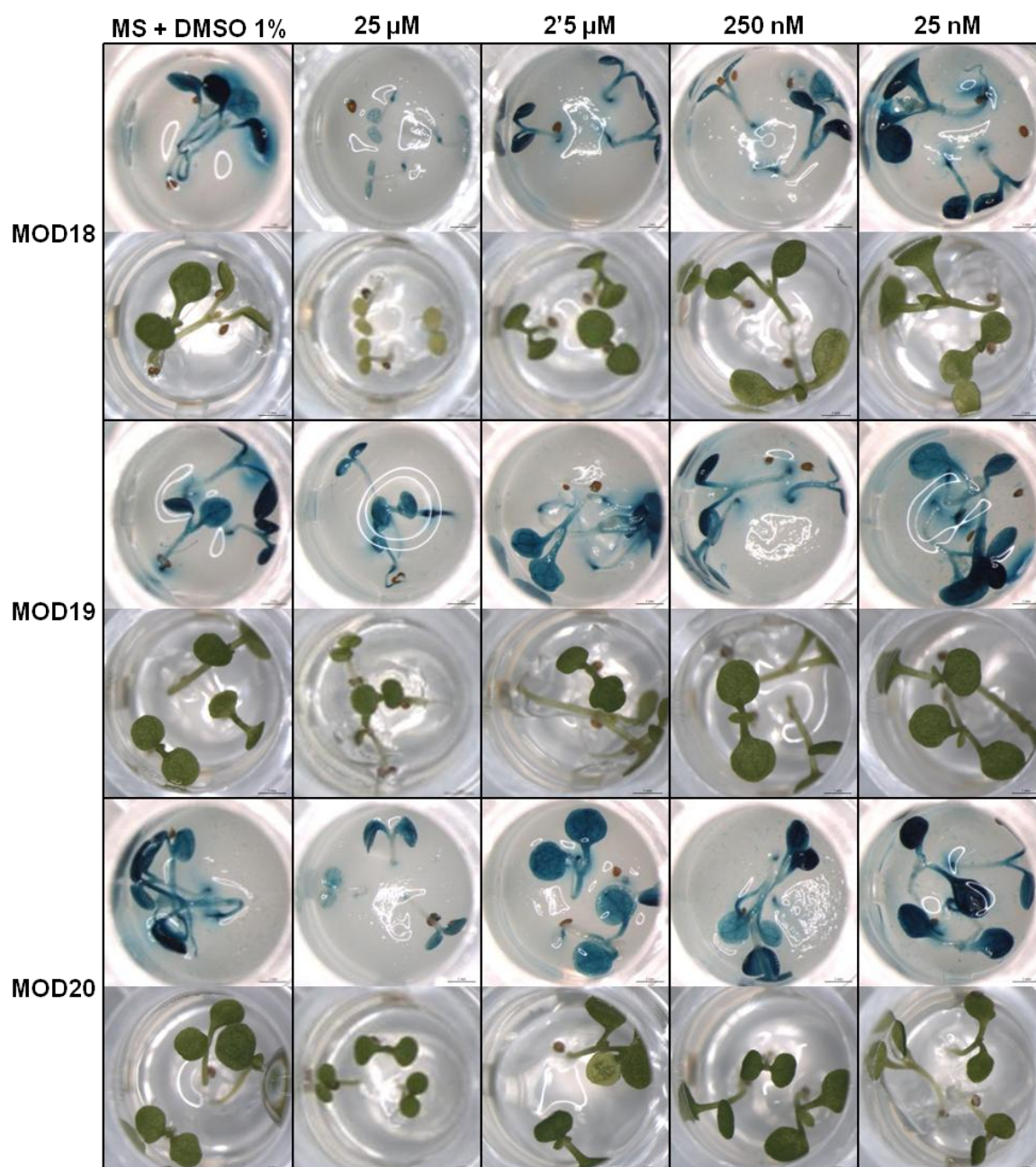


Figura 18. Efecto de MOD18, MOD19 y MOD20 sobre el crecimiento y expresión del gen marcador GUS en plántulas *ocp1* de siete días de crecimiento.

4.3. Efecto de las moléculas moduladoras de la expresión de *Ep5C* sobre los mutantes *ocp* y su línea parental

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, una vez realizada la confirmación de los compuestos se consideró necesario plantear nuevas condiciones experimentales.

Por un lado, se planteó aplicar todos los compuestos sobre el resto de mutantes *ocp* y sobre su línea parental, para comprobar si el efecto que producen los compuestos sobre *ocp1* también se observa en estos fondos genéticos.

Por otro lado, tras la realización de diversos ensayos se planteó aplicar los compuestos sobre plántulas de una semana de edad y evaluar el efecto producido en la tinción histoquímica GUS al cuarto día de la aplicación, es decir, cuando las plántulas tengan once días de edad. De este modo, los problemas observados en la germinación (MOD8, Figura 16) y en el crecimiento inicial (MOD1, Figura 14; MOD2, Figura 15; y MOD16, Figura 17) se verían minimizados. Hay que reseñar que en este estadio de desarrollo las plántulas ya empiezan a desarrollar el segundo par de hojas verdaderas, a excepción de *ocp3* que presenta un retraso en el crecimiento respecto a su línea parental y el resto de mutantes *ocp*.

Finalmente, dado que la aplicación de los compuestos a concentraciones inferiores a 25 μM no produce ningún efecto sobre *ocp1*, se optó por aplicar los compuestos a 25 μM y a 50 μM . De este modo se podría comprobar si el efecto observado hasta el momento resultaba aditivo a mayores concentraciones o si por el contrario, este efecto se mantenía constante con el aumento de la concentración aplicada.

En todos los casos, se procedió a la tinción de seis plántulas, adjuntándose en las siguientes figuras (figura 19-27) los resultados obtenidos más representativos. Se ha estimado oportuno no adjuntar datos sobre el crecimiento de las plántulas, dado que no se observaron diferencias en el crecimiento de las plántulas tratadas respecto a las plántulas control crecidas en MS con DSMO.

En las figuras 19 a 27 podemos observar como el nivel de expresión del gen pEp5C::GUS se mantuvo constante e independiente de la concentración aplicada del compuesto; es decir, la respuesta observada en ambas concentraciones (25 μM y 50 μM) fue prácticamente la misma.

En la figura 19 vemos como el compuesto MOD1 induce una mayor expresión del gen Ep5C en todos los genotipos estudiados. Lo mismo ocurre al aplicar el compuesto MOD2 (Figura 20), aunque en este caso la inducción de la expresión del gen en la línea 5.2. no resulta tan evidente. Este resultado difiere del obtenido en la confirmación de compuestos donde la aplicación de MOD1 y

MOD2 a 25 μ M producía el mismo efecto inductivo en la expresión de Ep5C en la línea 5.2. Esto nos hace pensar que el efecto producido por el compuesto MOD2 podría estar relacionado con el estadio de desarrollo de la planta en el momento de la aplicación o con el período de tiempo que permanece la planta en contacto con el compuesto, lo cuál nos abre las puertas a nuevos experimentos a realizar en futuras investigaciones.

El gen *Ep5C* se activa en presencia de peróxido de oxígeno o frente a infecciones causadas por *Pseudomonas syringae*. Podríamos decir que los compuestos MOD1 y MOD2 mimetizan este efecto, por tanto podrían estar directamente implicados en rutas relacionadas con la respuesta defensiva vegetal frente a patógenos. Es por esto, que se consideró necesario realizar un nuevo experimento en el que demostrar si existe alguna relación entre estos compuestos y alguna de las rutas de señalización hormonal ya conocidas como es la ruta mediada por ácido salicílico.

Ep5C está relacionada con la ruta de metilación de ADN mediada por pequeños ARN interferentes (RdDM), gracias a la implicación funcional de OCP1 y OCP11 a través de la RNA Pol V y AGO4, respectivamente. El hecho que MOD1 y MOD2 induzcan la activación de Ep5C nos puede indicar que estén actuando como potenciales reguladores de esta ruta, por lo que futuros estudios con estos compuestos permitirían aportar información sobre el funcionamiento de esta compleja ruta.

En las figuras 21 a 27, se adjuntan los resultados obtenidos para aquellas moléculas consideradas hasta el momento antagonistas de la expresión de *Ep5C* en *ocp1*. Hay que recordar que los resultados obtenidos en el rastreo para los compuestos MOD9 y MOD18 han sido corroborados en la confirmación, mientras que en los cinco compuestos restantes (MOD8, MOD14, MOD15, MOD16 y MOD20) los datos obtenidos en el ensayo de verificación no permiten alcanzar ninguna conclusión siendo necesario realizar un nuevo experimento.

Los compuestos MOD9 (Figura 22) y MOD14 (Figura 23), podemos decir que no existen diferencias en el nivel de expresión del gen *pEp5C::GUS* en las plántulas tratadas respecto a las plántulas sin tratamiento, por lo que descartamos estos compuestos para futuros estudios.

En cuanto a MOD18 (Figura 26) se observa que inhibe la tinción histoquímica GUS tanto en *ocp1* como en *ocp11*, en cambio el efecto producido en *ocp3* es distinto. En *ocp3*, parece que induzca una mayor expresión del gen *Ep5C::GUS* en hidátodos y una menor expresión en el resto del cotiledón.

Como se ha comentado en el apartado introductorio (ver apartado 1.2. Antecedentes del proyecto), OCP11 codifica AGO4 y OCP1 ha sido identificada como NRPD2, proteína que codifica la segunda unidad mayor de la polimerasa V (Pol V). Tanto AGO4 como Pol V están implicadas en la vía de metilación de ADN dirigida por pequeños ARN interferentes (RdDM). Por tanto, OCP1 y OCP11 permiten relacionar directamente la RdDM con la respuesta de la planta frente a patógenos. Atendiendo a los resultados obtenidos podríamos pensar que MOD18 estaría actuando como un revertiente de la mutación *ocp1* y *ocp11*, y por tanto, estaría implicado directamente en la respuesta de las plantas frente a patógenos a través de la RdDM. Esta hipótesis abre las puertas a la realización de futuros estudios con tal de intentar identificar potenciales reguladores de esta ruta de silenciamiento.

En el resto de compuestos, MOD8 (Figura 21), MOD15 (Figura 24), MOD16 (Figura 25) y MOD20 (Figura 27), sólo se han observado diferencias en el nivel de expresión de *pEp5C::GUS* en el genotipo *ocp11*. Tanto en *ocp1* como en *ocp3*, las plántulas tratadas presentan a nivel visual el mismo nivel de expresión del gen que las plántulas control. Si estos resultados fueran corroborados en posteriores ensayos, podríamos decir que estamos ante una serie de potenciales compuestos implicados en la vía de metilación de ADN dirigida por pequeños ARN interferentes (RdDM) a través de AGO4, proteína codificada por OCP11 e implicada en la regulación de esta ruta. Pero, como ya hemos dicho, para poder confirmar esta hipótesis sería necesario realizar nuevos experimentos utilizando el fondo genético *ocp11*.

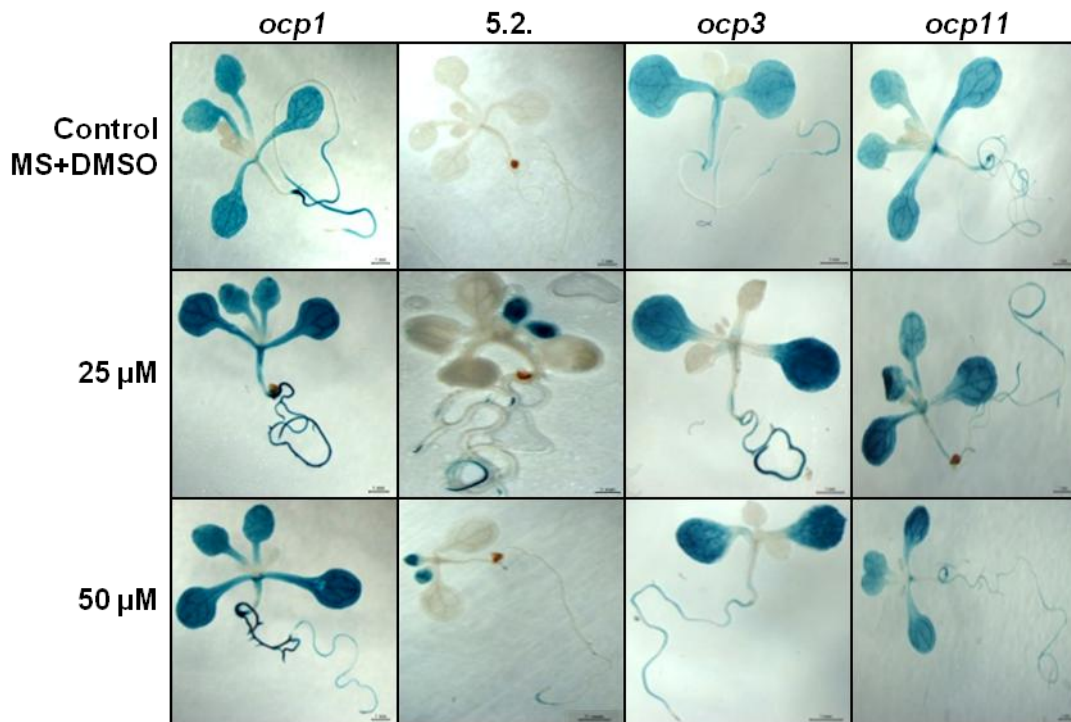


Figura 19. Efecto de MOD1 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

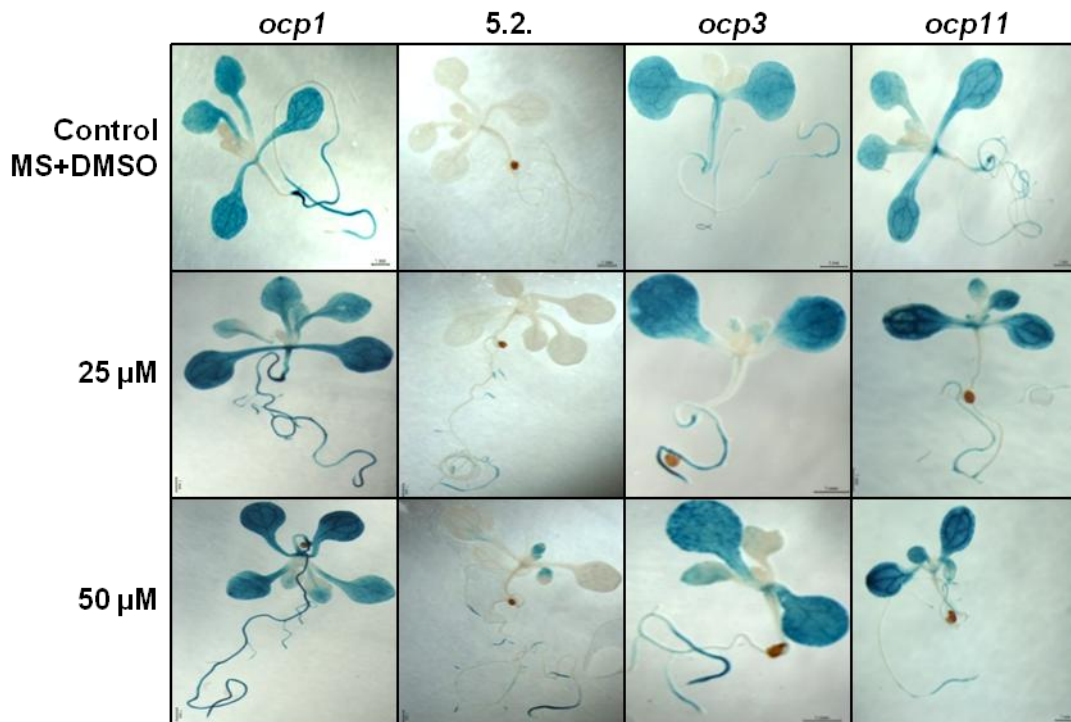


Figura 20. Efecto de MOD2 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

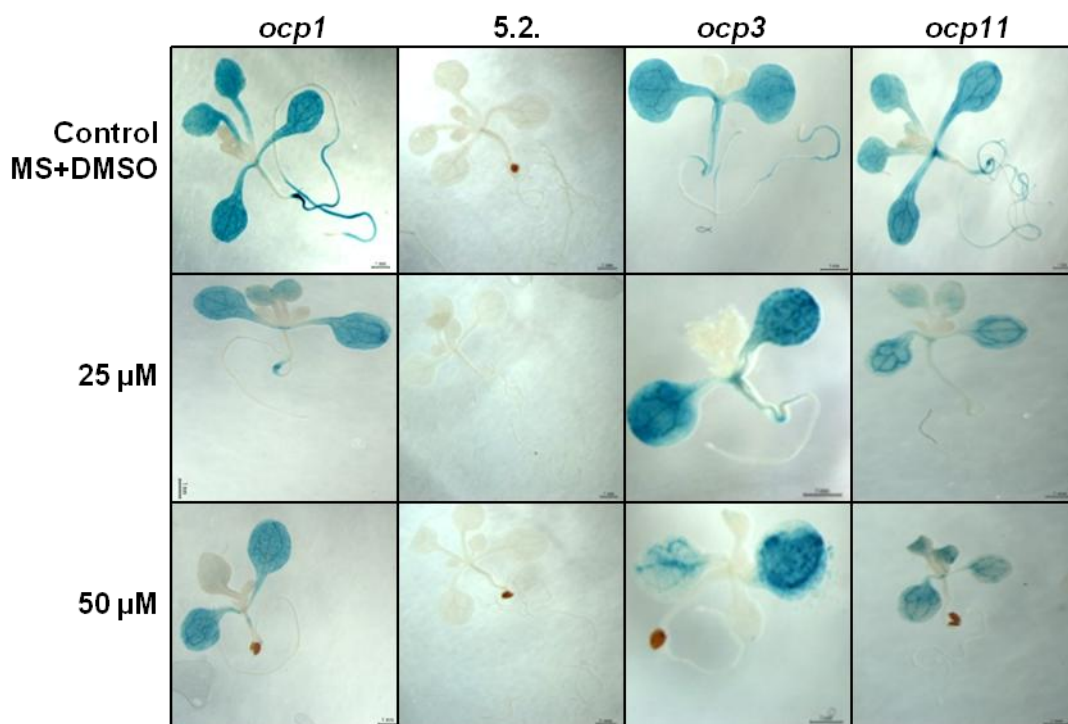


Figura 21. Efecto de MOD8 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

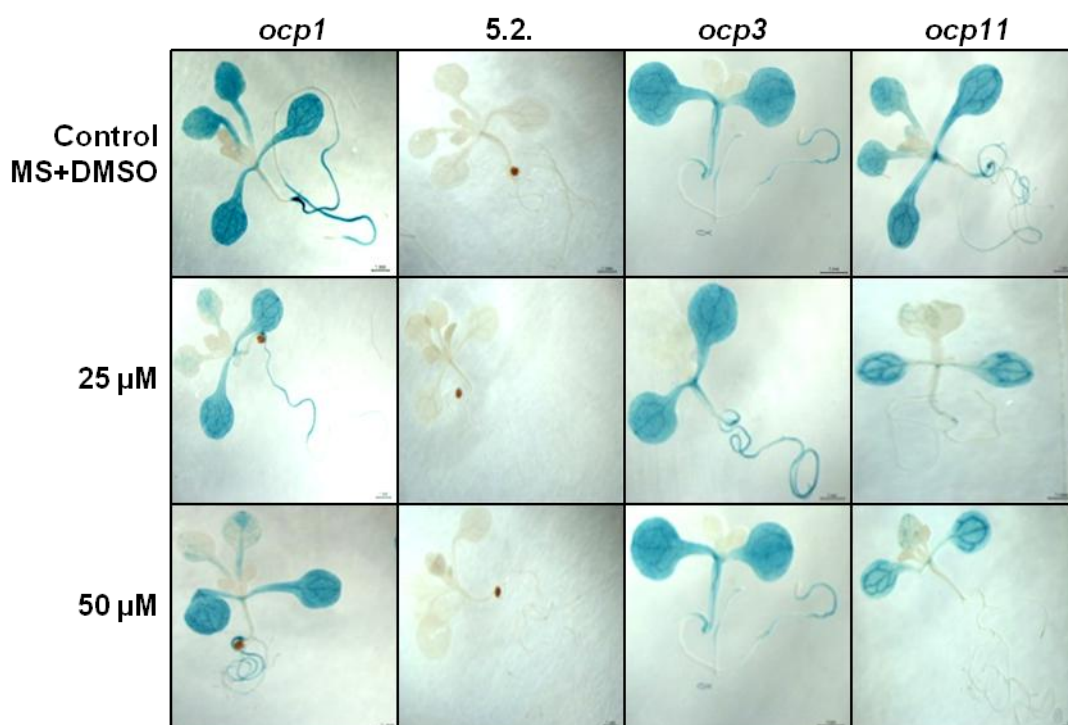


Figura 22. Efecto de MOD9 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

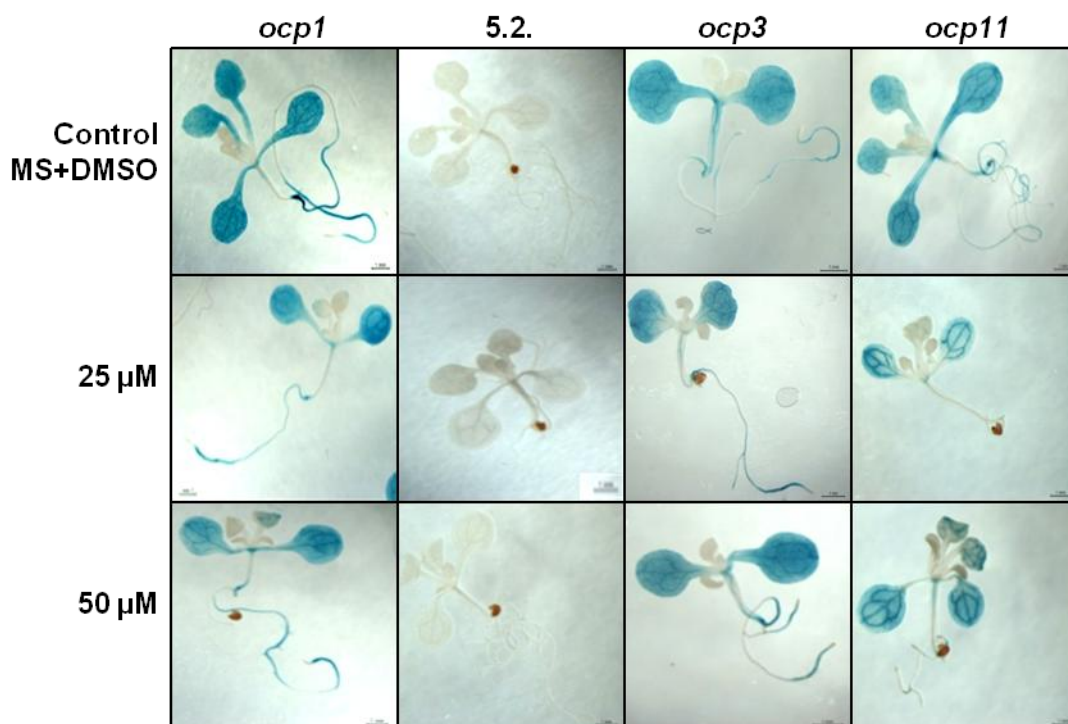


Figura 23. Efecto de MOD14 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

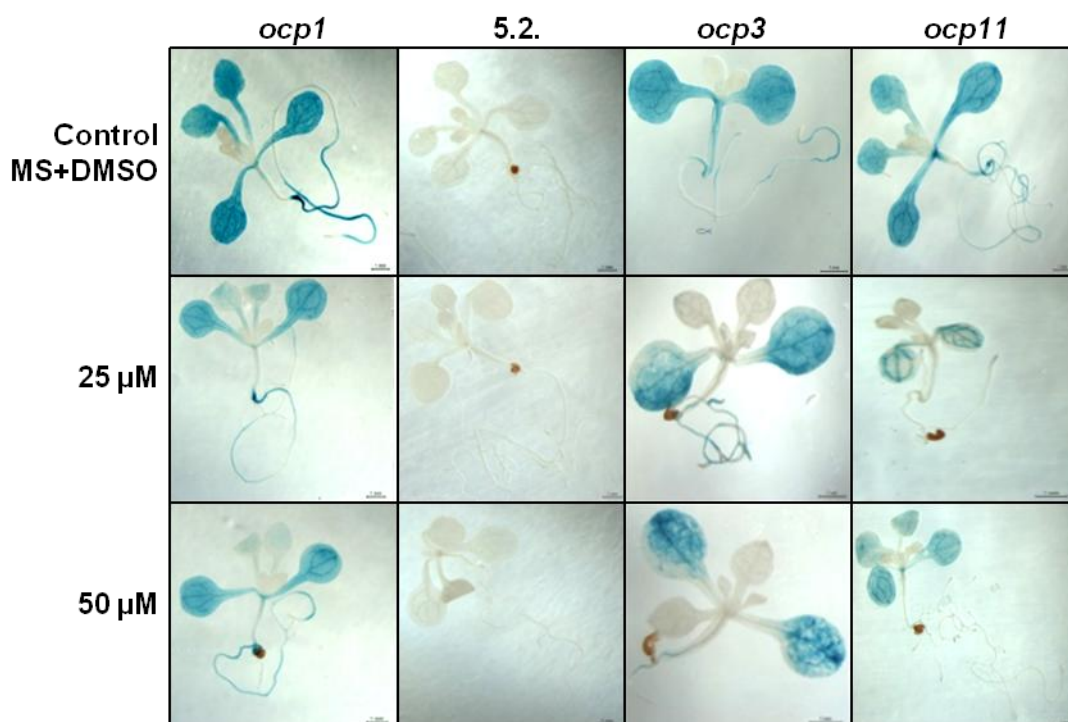


Figura 24. Efecto de MOD15 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

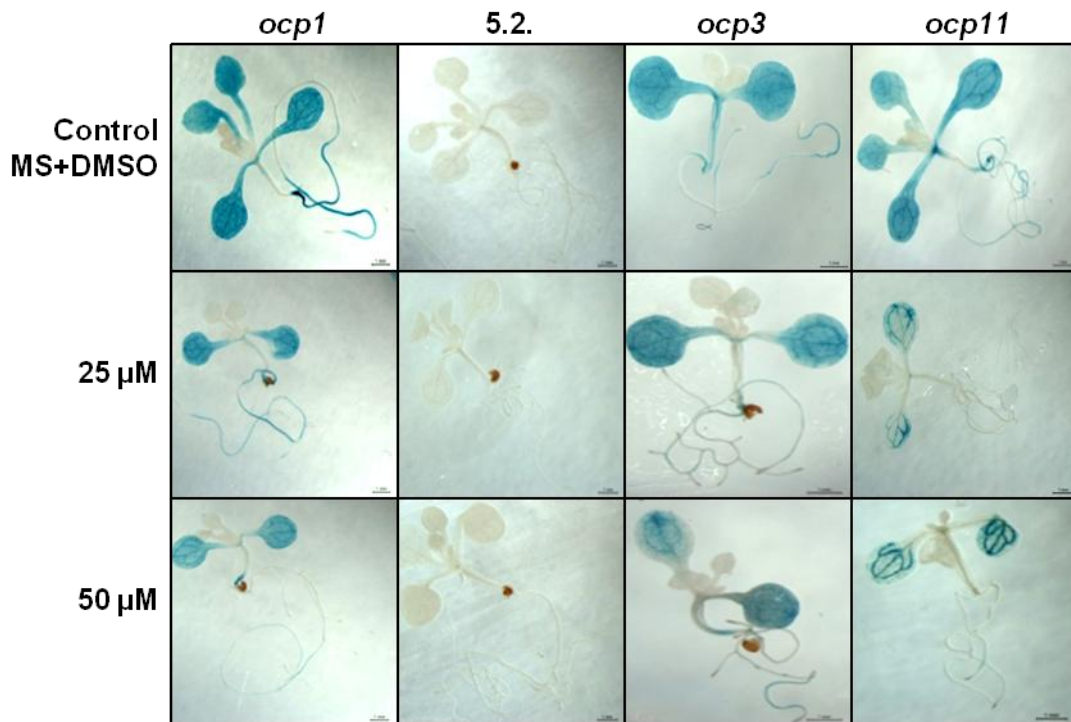


Figura 25. Efecto de MOD16 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

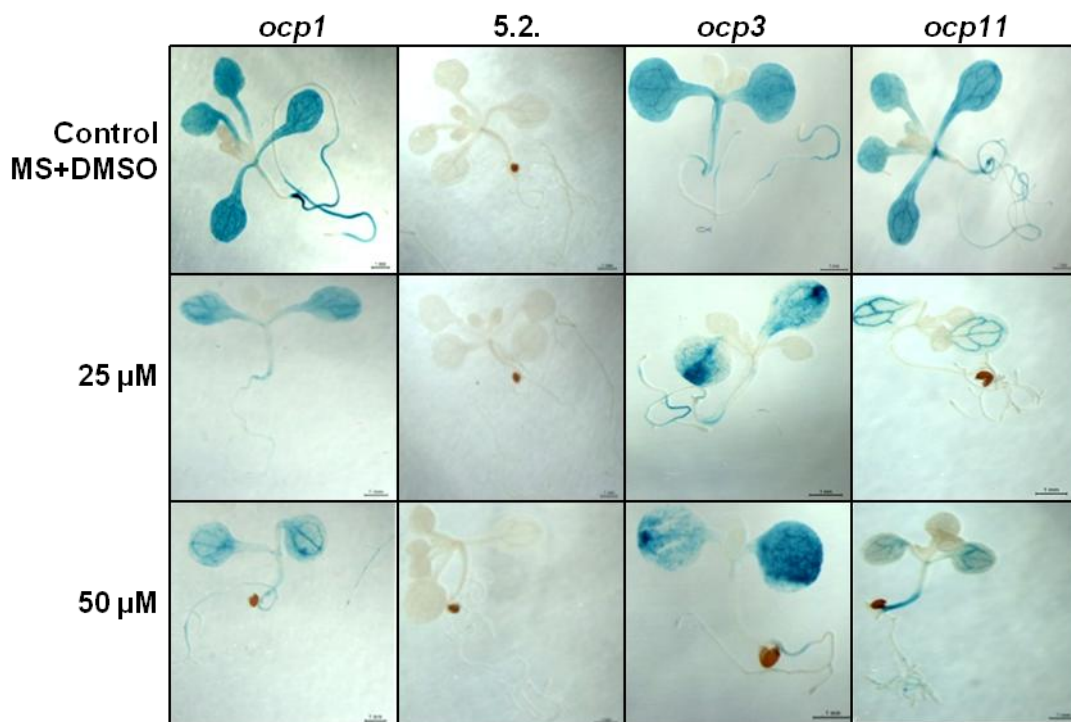


Figura 26. Efecto de MOD18 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

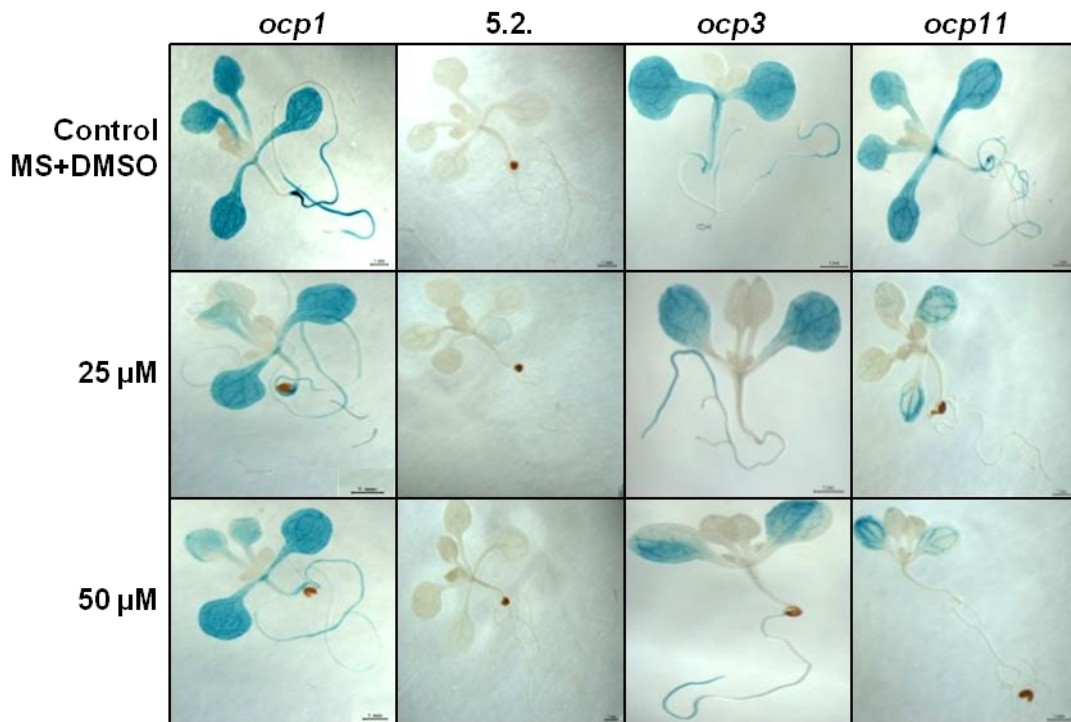


Figura 27. Efecto de MOD20 sobre la expresión del gen *pEp5C::GUS* en plántulas *ocp1*, *ocp3*, *ocp11* y la línea 5.2. de once días de crecimiento.

4.4. Implicación de los compuestos moduladores de la expresión de Ep5C en la respuesta defensiva dependiente de ácido salicílico

El gen *Ep5C* se activa en presencia de peróxido de oxígeno o frente a infecciones causadas por *Pseudomonas syringae*. Podríamos decir que los compuestos MOD1 y MOD2 mimetizan este efecto, por tanto podrían estar directamente implicados en rutas relacionadas con la respuesta defensiva vegetal frente a patógenos. Es por esto, que se consideró necesario realizar un nuevo experimento en el que demostrar si existe alguna relación entre estos compuestos y alguna de las rutas de señalización hormonal ya conocidas como es la ruta mediada por ácido salicílico.

Para evaluar la ruta mediada por ácido salicílico, se utilizó como marcador la expresión de la proteína PR1, ya que los niveles de PR1 aumentan en respuesta a aplicaciones exógenas de ácido salicílico. Esta mayor expresión de PR1 está directamente relacionada con la respuesta SAR.

Los compuestos MOD1 y MOD2 se aplicaron sobre plántulas 5.2. de 7 días de edad a una concentración de 25 μM . Al cuarto día de crecimiento en presencia del compuesto, se añadió ácido salicílico (100 μM), realizándose muestreos periódicos a las 12, 24 y 48 horas del tratamiento. Con estas muestras se procedió a la detección de la proteína PR1 por Western Blot.

Está demostrado que la aplicación exógena de diversos compuestos químicos como el ácido salicílico, induce la activación de diversos genes implicados en defensa, lo que desemboca en una respuesta más rápida y eficaz por parte de la planta al verse expuesta a algún tipo de estrés biótico o abiótico. Este fenómeno se conoce como 'priming' (figura 28). La aplicación de estos compuestos potenciadores de las defensas afecta negativamente a parámetros productivos como el crecimiento o la fructificación, pero estos efectos negativos se ven superados por los beneficios que se obtienen frente a una determinada situación de estrés. Es por esto, que el priming ofrece nuevas posibilidades en el campo de la protección de cultivos (revisado en Conrath, 2009).

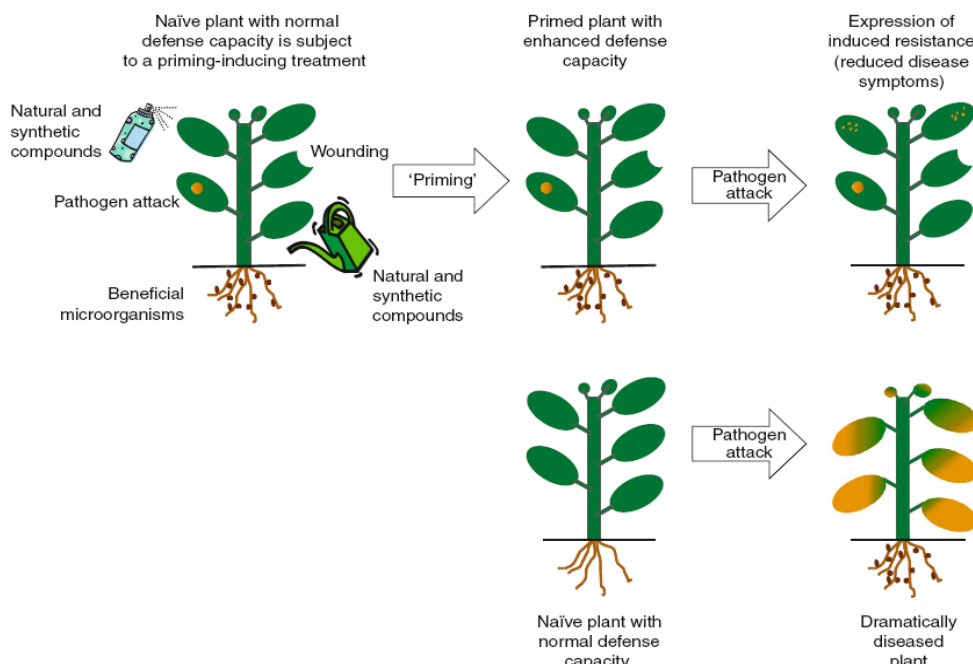


Figura 28. Vías de inducción de priming y la resistencia a estreses bióticos y/o abióticos en plantas.

Tratamientos con compuestos naturales o sintéticos, heridas o la colonización de las raíces por microorganismos beneficiosos induce priming en la planta. En este estado, la planta es capaz de responder con mayor robustez y/o inducir más rápido las respuestas defensivas frente al ataque de patógenos. El priming provoca una reducción en los síntomas de la enfermedad gracias a una inducción de la resistencia que no se observa en plantas sin priming (Extraído de Conrath, 2009).

En la figura 29 se observa como la aplicación de ácido salicílico, efectivamente, induce la activación de PR1. Sin embargo, el tratamiento con MOD1 y MOD2 no induce tal expresión. En cambio, si podemos observar como la aplicación de ácido salicílico sobre plantas tratadas previamente con MOD1 induce un mayor nivel de expresión de PR1, respecto a las plántulas tratadas únicamente con ácido salicílico, efecto no observable en las plantas tratadas previamente con MOD2.

Esto nos estaría indicando que el compuesto MOD1 actúa como potenciador de las defensas a través de la ruta del ácido salicílico, y, por tanto, podemos pensar que este fenómeno de 'priming' observado puede inducir resistencia frente a patógenos biotrofos como *Pseudomonas syringae*. Es por esto que podríamos considerar a MOD1 como una posible molécula potenciadora de las defensas de la planta que podría ser utilizada en el campo de la protección de cultivos, lo cual nos abre las puertas a futuras investigaciones.

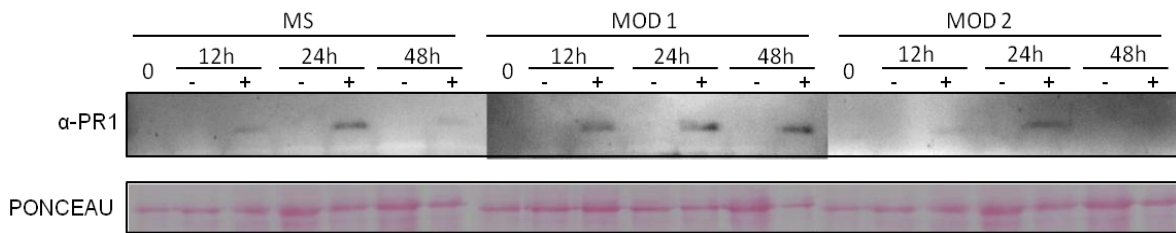


Figura 29. Expresión de la proteína PR1 en plántulas 5.2.

Análisis Western Blot de la inducción de la proteína PR1 por ácido salicílico y los compuestos MOD1 y MOD2 en plántulas 5.2. Las plántulas con una semana de edad fueron tratadas con MOD 1 (25 μ M) o MOD2 (25 μ M) y al cuarto día de dicho tratamiento se aplicó ácido salicílico 100 μ M (+ indica tratamiento de ácido salicílico y – no tratamiento). El muestreo se realizó a los tiempos indicados.

5. Conclusiones

- 1) Se ha puesto a punto un método para el rastreo de moléculas químicas que pueden modular la acción de genes implicados en defensa.
- 2) Mediante el método indicado se ha permitido identificar un número determinado de moléculas que actúan sobre la regulación transcripcional de *Ep5C*, en el fondo genético *ocp1* de *Arabidopsis thaliana*.
- 3) Se ha identificado a MOD1 y MOD2 como moléculas activadoras de la expresión del gen *Ep5C*, y por tanto, relacionadas con la respuesta defensiva vegetal, tal y como revela el estudio realizado sobre los mutantes *ocp* y su línea parental.
- 4) Se ha identificado a MOD18 como molécula potencial que pudiera estar implicada en la RdDM, tal y como revela el estudio realizado sobre los fondos genéticos *ocp1* y *ocp11*.
- 5) Se ha identificado a MOD1 como molécula que podría ser utilizada como activador de las defensas de la planta a través de la ruta mediada por el ácido salicílico, tal y como se desprende de los análisis químicos realizados en fondo genético 'wild type'.

6. Bibliografía

Agorio, A. and Vera, P. (2007). ARGONAUTE 4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 3778-3790.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Academic Press, London.

Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.-L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M. and Sheen J., 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415, 977-83.

Blackwell, H.E. and Zhao, Y. (2003). Chemical genetics approaches to plant biology. *Plant Physiology*, 133: 448-455.

Brederode, F.T., Linthorst, H.J. and Bol, J.F. (1991). Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology*, 17: 1117-25.

Browse, J. (2005). Jasmonate: An Oxylipin Signal with Many Roles in Plants. *Vitamins and Hormones*, 72: 431-456.

Carpin, S., Crevecoeur, M., Greppin, H. & Penel, C. (1999). Molecular cloning and tissue-specific expression of an ainoionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiology*, 120: 799-810

Chisholm, S.T., Dahlbeck, D., Krishnamurthy, N., Day, B., Sjolander, K. and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803-814.

Coego, A., Ramirez, V., Ellul, P., Mayda, E. and Vera, P. (2005a). The H₂O₂-regulated Ep5C Gene Encodes a Peroxidase Required for Bacterial Speck Susceptibility in Tomato. *Plant Journal*, 42: 283-293.

Coego, A., Ramirez, V., Gil, M.J., Flors, V., Mauch-Mani, B. and Vera, P. (2005b). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor OCP3 mediates resistance to infection by necrotrophic pathogens. *Plant Cell*, 17: 2123-2137.

Conrath, U. (2009) Priming of Induced Plant Defense Responses. *Advances in Botanical Research*, 51: 361-395.

- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.
- De Marco, A., Guzzardi, P. and Jamet, E. (1999). Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiology*, 120: 371-382.
- De Wit, P.J.G.M. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 2726-2732.
- Delaney, T. P. (2000). New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends in Plant Science*, 5: 49-51
- Dobón, A. (2010). Interacción de LRA5 con genes asociados a defensa en *Arabidopsis*. *Tesis doctoral*. UPV.
- Dobson, C.M. (2004). Chemical space and biology. *Nature*, 432: 824-828.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18: 265-276.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol*, 9: 275-296.
- Gadea, J.; Mayda, M.E.; Conejero, V., y Vera P. (1996). Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 9: 409-415.
- García-Andrade, J., Ramírez, V., Flors, V., and Vera, P. (2011). *Arabidopsis ocp3* mutant reveals a potentiation mechanism linking ABA and JA for pathogen-induced callose deposition. *Plant Journal*, 67: 783-794.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205-227.
- Glazebrook J., Rogers E.E. and Ausubel F.M. (1997). Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics*, 31: 547-69.

- Govrin, E.M. and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biology*, 10: 751-7
- Heath M.C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 315-9.
- Hicks G.R. and Raikhel N.V. (2012). Small molecules present large opportunities in plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 261-282.
- Hiraga, S.; Sasaki, K.; Ito, H.; Ohashi, Y., y Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* May;42(5):462-8.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-9.
- Kotchoni, S. O. and Gachomo, E. W. (2006). The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of biosciences* 31, 389-404
- Kunkel, B. N. & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 325-331.
- Lamb, C. and Dixon, R.A. (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 251- 275.
- Lokey, R.S. (2003). Forward chemical genetics: progress and obstacles on the path to a new pharmacopoeia. *Chemical biology*, 7: 91-96.
- López, A. (2010) Nuevas implicaciones de la RdDM: Estudio del mutante *ocp1* de *Arabidopsis thaliana*. *Tesis doctoral*. UPV.
- Lopez, A., Ramirez, V., Garcia-Andrade, J., Flors, V. and Vera, P. (2011). The RNA Polymerase V Is Required for Plant Immunity. *PLoS Genetics*, 7(12): e1002434.
- Martinez, C., Pons, E., Prats, G. and Leon, J. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant Journal* 37, 209-217.
- Mayda, E., Mauch-Mani, B. and Vera, P. (2000). Arabidopsis *dth9* mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. *Plant Cell* 12, 2119-2128.

- O'Connor C.J., Laraia, L. and Spring, D.R. (2011). Chemical Genetics. *Chem. Soc. Rev.*, 40: 4332-4345.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P. and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 2103-2113.
- Pieterse, C.M. and van Loon, L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 456-464.
- Pieterse, C. M., van Wees, S. C., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. and van Loon, L. C. (1998). A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580
- Price, N. J., Pinheiro, C., Soares, C. M., Ashford, D. A., Ricardo, C. P. & Jackson, P. A. (2003). A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extension peroxidase from lupin. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41389-41399.
- Ramirez, V., Coego, A., Lopez, A., Agorio, A., Flors, V. and Vera, P. (2009). A disease resistance regulator determines drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 58: 578-591.
- Robert, S., Raikhel, N.V. and Hicks, G.R. (2009). Powerful patterns: *Arabidopsis* and Chemical Genomics. *The Arabidopsis Book*, 7: e0109.
- Roberts, J.A. and Hooley, R. (1988). Plant growth Regulators. *Blackie and Son Ltd.* Glasgow.
- Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology* 60, 485-510.
- Scandalios, J. G. (1997). Oxidative stress and defense mechanisms in plants: General Introduction. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 471-472.
- Shah, J., Kachroo, P. and Klessig, D.F. (1999). The *Arabidopsis* *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11, 191-206.
- Somerville C. and Koornneef M., 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat Rev Genet*, 3, 883-9.

Spring, D. R. (2004). Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights. *Chemical Society Reviews*, 34: 472-482.

Talarczyk, A. and Henning, J. (2001). Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. *Cellular & Molecular Biology Letters* 6, 955-970.

Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D. (1998). Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochemical Sciences* 23, 454-456.

Van Loon, L. C., Geraats, B. P. and Linthorst, H. J. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11, 184-191.

Vanacker, H., Lu, H., Rate, D. N. and Greenberg, J. (2001). A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in Arabidopsis. *Plant Journal* 28, 209-216.

Vernooij, B., Uknes, S., Ward, E. and Ryals, J. (1994). Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 275-9.

Zaratiegui, M., Irvine, D. V. and Martienssen, R. A. (2007). Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* 128, 763-776.