



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Determinación de marcas **epigenéticas** en **genes**
implicados en la respuesta temprana a *Botrytis cinerea*
de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum*



Tesis doctoral

Presentada por: **Óscar Crespo Salvador**

Dirigida por: **Dra. Carmen González Bosch**

Junio de 2018



Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Carmen González Bosch, catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia,

INFORMA QUE:

La presente memoria titulada "Determinación de marcas epigenéticas en genes implicados en la respuesta temprana de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* a *Botrytis cinerea*" ha sido realizada bajo su supervisión por el Licenciado en Biología, Óscar Crespo Salvador, en el laboratorio del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, situado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) y que reúne los requisitos necesarios para ser defendida como tesis doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente en Paterna el 8 de junio de 2018.

Fdo.: Carmen González Bosch

Fdo.: Fernando Aniento Company

“Como Marx nunca llegó a decir del todo: Si queremos cambiar el mundo, primero debemos entenderlo (*As Marx didn't ever quite say: If we want to change the world, we first need to understand it*)”

Helena Cronin (filósofa darwinista y racionalista)

Agradecimientos

Una tesis doctoral no es solo un excelente catalizador de problemas mentales (Levecque et al., 2017) o un inacabable infierno burocrático, es también como una vida en miniatura, puesto que llegas sin estar preparado (excepto si ya te habías formado en el laboratorio), fracasas constantemente, independientemente del esfuerzo que hagas (la “suerte” tiene un papel mucho más protagonista) y aprendes muchísimas cosas que, en su mayoría, no te servirán absolutamente para nada del objetivo final que te has planteado, el cual, además no suele ser estable. Durante esos años, la lección más sólida y reiterada que se me ha grabado en la memoria podría resumirse en: “el universo tiene unas normas y las va a cumplir a rajatabla te guste o no, y tú también”.

Pero los seres humanos somos animales organizadores, algunos hasta un extremo patológico, y desafiamos al universo con nuestro incesante anhelo por organizar y categorizar cosas que no son susceptibles de ello, de ahí en parte nació la ciencia que, irónica y redundantemente, también hemos querido organizar (incluso estos agradecimientos me he visto inclinado a ordenarlos). Haciendo caso a esta jerarquía humana se podría decir que, durante los años que ha durado esta tesis, he trabajado como un biólogo en el campo de la genética, epigenética, botánica, micología, bioquímica, microbiología y ecología; por otro lado, como científico, he sido estadístico, informático, físico y matemático y, finalmente, en general también he ejercido de fotógrafo, jardinero, electricista, profesor, contable, carpintero, dibujante, costurero, restaurador, mecánico y, de lejos, lo peor de todo... burócrata.

Teniendo todo esto en cuenta, me gustaría dar las gracias especialmente, nº 1, *top one* a M^a Isabel, a la que llamo Marisa, Maribel, M-bel, madre, mamá... depende del día y la hora, la coautora de casi todo lo que he hecho en mi vida, incluido esto. Por extensión a mi maravillosamente peculiar y anacrónica abuela, prácticamente una segunda madre, que siempre ha estado ahí, enseñándome todo tipo de cosas que uno no esperaría aprender de alguien así y de la que, por lo visto, he heredado mi parte más indómita y menos dada a rendirse (con consecuencias variables). Por supuesto a Mara y Dani, mis primos, que en realidad son mis hermanos (aunque genéticamente hablando, son mis primos), a los que siempre he admirado y, de hecho, han sido constantemente la versión futura a la que he querido aspirar, en cuatro y dos años, respectivamente; al menos sé que una ridícula porción de su talento está en mí. También, aunque la distancia sea ya enorme, quiero dar las gracias a mi padre† (alguien tan especial como mi madre, de hecho, combinados al parecer sobrepasan el límite saludable: yo), así como a mi numerosa familia paterna en general, con la que quizá algún día me reúna y de la que, sin duda, he heredado como mínimo tres dedos de mi “mano verde”.

A mis amigos, por orden cronológico, Dani Sr., Javi, Víctor, Dani (sí, dos veces, tres contando a mi primo, no es redundancia sino consecuencia de ser el top 3 de los nombres de moda en España, datos del INE, en los años 80 y 90) y Pablo, todos con alguna característica a la que han tenido que adaptarse o superar y que, en mayor o menor medida, comparten una capacidad extraordinaria para tolerarme a largo plazo. Literalmente imposible olvidar a mis amigos, aunque eso siempre ha sido más complicado *because of hetero-reasons*, (también por orden cronológico) Noemi, Gema, Laura, Fani, Patricia, Nuria, recientemente Mónica y alguna que otra *padawan*, personas muy diferentes e increíbles a las que envidio en muchos

aspectos, pero cuya capacidad de tolerarme palidece un poco frente a los XY, pero es lógico, puesto que es algo incompatible tolerar a un chico como yo, cuando: A) tienes novio (o novia) o B) tienes buen gusto en hombres.

A la gente de mi laboratorio empezando por Carmen, mi directora *no matter what*, que siempre tiene un plan B y C, por mucho que me ofusque yo en el A y ella confíe en que puedo lograrlo, de una inteligencia y capacidad de organización con la que no puedo ni soñar. A Iván que, en el corto periodo en que coincidí con él, me enseñó a desenvolverme en un nuevo laboratorio y un nuevo edificio y a no tomarme demasiado en serio nada. Poco después, conocí a Carlos, con el que compartí laboratorio poco tiempo, pero con el que pasé grandes ratos en verano y aprendí mucho sobre protocolos y como debo siempre apuntarlo TODO. Por último, llegó Jaime, la amabilidad hecha ser humano, cuya enorme experiencia en este campo se combinó finalmente con mis ganas de desafiar a la autoridad y cambiar las normas, con esa curiosa cooperación conseguimos grandes cosas durante varios años. No debo olvidar a Carolina, mi encantadora profesora del máster que me ayudó a acceder a esta aventura y cuya majez rivaliza con la de mi propia madre. Y claro está, durante estos años, al igual que yo fui el *padawan* de mi gran maestro Sergio, en otro lugar, yo acabé por convertirme en maestro también de mis propios y queridos *padawans*, correlativamente: Paula, Mónica, Alejo, Javi, Belén, Ester, MJ y Lorena, la ciencia es intensa en muchos de ellos; en general, son un grupo de lo más heterogéneo con el que me he divertido muchísimo (no pondré aquí los motes de cada uno, ni las cagadas que cometieron y a las que he nombrado en su honor; no en vano también hay una con mi nombre) y he aprendido aún más, de ciencia y de humanos. Además, he conseguido algunos buenos amigos.

En el IATA y la UV, también hay compañeros a los que agradecer cosas. A Gerardo, debo gran parte de mis conocimientos prácticos sobre cromatina y sonicación. La mera presencia del personal de nuestro antiguo laboratorio siamés (302), hacía los duros días de continuos fracasos más llevaderos, sobre todo por Ceci, Marta, Helena y Agustín, el hombre que siempre tiene la respuesta. Y, por supuesto, no puedo dejar de mencionar al personal del IATA, que ha llegado a acostumbrarse a mis horarios extremadamente vespertinos y a mis excéntricos experimentos por todo el edificio a tales horas; especialmente merece mi agradecimiento Vicky, con la que siempre puedo hablar porque siempre me entiende, siempre lo entiende todo.

Abreviaturas

Por motivos de practicidad, salvo en casos de coincidencia, todas las abreviaturas están en su versión inglesa. Cuando aparecen por primera vez, se escriben traducidas de su origen (tanto siglas, acrónimos como símbolos) y entrecomilladas; con la abreviatura correspondiente entre paréntesis. A partir de ahí, excepto cuando lo requiera el término, se utilizan siempre las abreviaturas; por otro lado, de haber varias iguales, en las que solo cambie un número, solo se mostrará el origen de la abreviatura citada la primera vez. No se describirán abreviaturas del sistema internacional o elementos químicos, aunque sí, algunas de moléculas sencillas.

A continuación, se incluye una relación de las más importantes (en el texto se incluyen también sus versiones en plural añadiendo una "s" al final), exceptuando genes (escritos en cursiva) y proteínas, por ser excesivamente numerosas.

Abreviatura	Significado
3'-UTR	Región no traducida 3'
5'-UTR	Región no traducida 5'
aa	Aminoácidos
ABA	Ácido abscísico
AUX	Auxinas
BME	β -Mercaptoetanol
bp	Pares de bases
BR	Brasinoesteroide
cDNA	DNA complementario
CDS	Secuencia de DNA codificante
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
ChIPqPCR	qPCR con cromatina inmunoprecipitada
CK	Citoquinina
CTL	Condición control
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ET	Etileno
ETI	Inmunidad desencadenada por efector

ETS	Susceptibilidad desencadenada por efector
GA	Giberelina
H3	Histona 3
H3K27me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 27
H3K36me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 36
H3K4me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 4
H3K9ac	Histona 3 acetilada en la lisina 9
HAMP	Patrón molecular asociado a herbívoros
hpi	Horas post infección
HR	Respuesta hipersensible
INF	Condición infectada
IP	Inmunoprecipitación
JA	Ácido jasmónico
LAR	Respuesta local adquirida
MAMP	Patrón molecular asociado a microbios
NB-LRR	Dominio de unión a nucleótidos y repetición rica en leucina
NO	Óxido nítrico
OPDA	Ácido 12-oxo-fitodienoico
ORF	Pauta de lectura abierta
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar de patata y dextrosa
PI	Inhibidor de proteasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	Relacionada con patogénesis
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PTI	Inmunidad desencadenada por PAMPs
qPCR	PCR cuantitativa
RCF	Fuerza centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retro transcripción
RTqPCR	qPCR con retro transcripción
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SDS	Dodecilsulfato sódico
TF	Factor de transcripción
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
TTS	Sitio de terminación de la transcripción

Índice general

1.	Introducción	1
1.1.	Plantas: origen y características diferenciales.....	1
1.1.1.	Similitudes con animales	3
1.1.2.	Similitudes con hongos.....	5
1.1.3.	Implicaciones y estrategias de vida	7
1.2.	Estreses.....	8
1.2.1.	Bióticos	8
1.2.2.	Abióticos	12
1.3.	Relación entre planta y patógeno: mecanismos de defensa	12
1.3.1.	Defensas constitutivas.....	14
1.3.2.	Defensas inducibles	16
1.4.	Detección del patógeno.....	18
1.4.1.	Modelo gen por gen	19
1.4.2.	Hipótesis del guardián	20
1.4.3.	Modelo del zig-zag.....	20
1.5.	Respuesta al patógeno	24
1.5.1.	Primera etapa: respuesta hipersensible.....	24
1.5.2.	Segunda etapa: resistencia local adquirida	26
1.5.3.	Tercera etapa: resistencia sistémica	27
1.5.4.	Papel de las ROS	30
1.5.4.1.	RNS.....	32
1.5.5.	Papel de las hormonas.....	35
1.5.5.1.	Cinco grandes clases.....	37
1.5.5.2.	SA.....	45
1.5.5.3.	JA.....	50
1.5.5.4.	Diálogo ente rutas hormonales	54
1.5.6.	Papel de otras moléculas.....	58
1.5.6.1.	Camalexina	60

1.6.	Patógeno: <i>B. cinerea</i>	62
1.6.1.	Capacidad infectiva.....	63
1.6.2.	Genética.....	64
1.6.3.	Ciclo vital.....	65
1.6.4.	Infeción	68
1.6.4.1.	Mecanismos de penetración	69
1.6.4.2.	Mecanismos de toxicidad	71
1.6.4.3.	Respuesta de la planta.....	73
1.6.5.	Síntomas	75
1.7.	Hospedadores.....	76
1.7.1.	<i>A. thaliana</i>	78
1.7.1.1.	Características generales.....	78
1.7.1.2.	Uso en investigación.....	80
1.7.2.	<i>S. lycopersicum</i>	81
1.7.2.1.	Características generales.....	82
1.7.2.2.	Uso en investigación.....	84
1.8.	Epigenética	85
1.8.1.	DNA.....	88
1.8.2.	Histonas	89
1.8.2.1.	Modificaciones de histonas	91
1.8.2.2.	Sustitución de histonas.....	98
1.8.3.	RNA	101
1.9.	Antecedentes.....	102
1.10.	Objetivos.....	103
2.	Materiales y métodos.....	107
2.1.	Mantenimiento y crecimiento del patógeno y de los hospedadores... 108	
2.1.1.	Generación de hongos.....	108
2.1.2.	Generación de plantas.....	110
2.1.2.1.	<i>A. thaliana</i>	110

2.1.2.2.	<i>S. lycopersicum</i>	115
2.2.	Realización de los experimentos de infección.....	117
2.2.1.	Preparación del inóculo de <i>B. cinerea</i> e infección.....	117
2.2.1.1.	Variaciones en la inoculación de plantas de <i>S. lycopersicum</i>	120
2.2.2.	Muestreo y entrecruzamiento.....	122
2.2.2.1.	Variaciones en <i>S. lycopersicum</i>	126
2.3.	Protocolo de extracción de cromatina	127
2.3.1.	Visualización de fragmentos.....	133
2.3.2.	Validación del entrecruzamiento	134
2.3.3.	Variaciones en <i>S. lycopersicum</i>	135
2.4.	Protocolo de CHIP	136
2.4.1.	Variaciones para <i>S. lycopersicum</i>	140
2.5.	Purificación de ácidos nucleicos	141
2.5.1.	Extracción de DNA mediante kit de columnas	141
2.5.2.	Extracción fenólica de DNA	141
2.5.3.	Extracción de RNA	142
2.6.	Retrotranscripción.....	143
2.7.	RTqPCR y ChIPqPCR	143
2.8.	Diseño de oligos.....	146
2.8.1.	Características de los oligos.....	149
2.8.2.	Validación y cálculo de eficiencias.....	151
2.8.3.	Oligos utilizados.....	153
2.9.	Normalización e interpretación de resultados	160
2.9.1.	RTqPCR.....	160
2.9.2.	ChIPqPCR	161
2.10.	Medición del nivel de infección.....	164
3.	Resultados y discusión.....	166
3.1.	Protocolos iniciales.....	167
3.1.1.	Infección y muestreo	168
3.1.2.	Extracción de cromatina	168

3.1.3.	ChIP.....	170
3.2.	Modificaciones en los protocolos.....	173
3.2.1.	Primeras modificaciones: purificación y medición del DNA.....	181
3.2.2.	Segundas modificaciones: homogenización, filtrado, ChIP y anticuerpos.....	183
3.2.2.1.	Homogenización y filtrado.....	184
3.2.2.2.	Método de ChIP y anticuerpos	184
3.2.3.	Terceras modificaciones: patosistema y distintos anticuerpos....	191
3.2.3.1.	Homogeneidad de las plantas	192
3.2.3.2.	Esporulación de hongo	193
3.2.3.3.	Modo de infección: inoculación por espray	194
3.2.3.4.	Cuantificación del grado de infección	197
3.2.3.5.	Anticuerpos a utilizar.....	199
3.2.4.	Cuarta modificación: elución ácida de la cromatina	199
3.2.5.	Quintas modificaciones: entrecruzamiento a vacío y muestreo en paralelo	204
3.2.5.1.	Comprobación del entrecruzamiento.....	206
3.2.5.2.	Fundamento del entrecruzamiento a vacío	209
3.2.6.	Modificaciones generales introducidas en la puesta a punto de los distintos protocolos.....	213
3.2.6.1.	Componentes de los tampones.....	213
3.2.6.2.	Sonicación.....	216
3.2.7.	Resumen de las modificaciones introducidas y protocolos finales	219
3.3.	Determinación de modificaciones epigenéticas plantas de en <i>A. thaliana</i> infectadas con <i>B. cinerea</i>	221
3.3.1.	Análisis de H3K4me3	221
3.3.2.	Análisis de H3K4me3, H3K9ac, H3K27me3 y H3K36me3 en <i>PR1</i>	224
3.3.3.	Análisis de H3K4me3, H3K9ac y H3K27me3 en otros genes	227
3.3.3.1.	Caracterización de la expresión de los genes en el nuevo sistema de infección	227

3.3.3.2.	Estudio epigenético de CYP71A13, ELI3, BGLU23, EXL7 y VSP2	233
3.4.	Determinación de modificaciones epigenéticas en plantas de <i>S. lycopersicum</i> infectadas con <i>B. cinerea</i>	240
3.4.1.	Análisis de la expresión de los genes en el nuevo sistema de infección	241
3.4.2.	Modificaciones realizadas en los distintos protocolos	247
3.4.3.	Estudio epigenético de <i>EF1α</i> , <i>DES</i> , <i>DOX1</i> , <i>LOXD</i> , <i>PR2</i> , <i>WRKY53</i> y <i>WRKY75</i>	252
3.5.	Análisis conjunto de los resultados en ambos cultivos	259
4.	Conclusiones	261
5.	Bibliografía	263

Índice de figuras

Figura 1 Macromoléculas diferenciales entre plantas y opistocontos.....	1
Figura 2 Tipos de relaciones entre plantas y otros organismos	9
Figura 3 Árbol de agentes que atacan a las plantas	11
Figura 4 Condiciones de compatibilidad con la enfermedad	13
Figura 5 Esquema de la epidermis de una planta.....	15
Figura 6 Diagrama del modelo zig-zag.....	23
Figura 7 Esquema de HR, LAR y SAR en el tejido vegetal	28
Figura 8 ROS, generación y procesamiento.....	30
Figura 9 Equilibrio redox.....	31
Figura 10 RNS y su generación	33
Figura 11 Clases de hormonas vegetales.....	36
Figura 12 Esquema de la síntesis del ET	41
Figura 13 Ruta de señalización del ET	43
Figura 14 Ruta de señalización del SA	48
Figura 15 Degradación de NPR1 mediada por NPR3 y NPR4	49
Figura 16 Ejemplo de la ruta de señalización del JA con VSP2.....	52
Figura 17 Inducción de PDF1.2	55
Figura 18 Interacción de cuatro hormonas	58
Figura 19 Síntesis de la camalexina	61
Figura 20 Ciclo vital de <i>B. cinerea</i>	66
Figura 21 Imágenes de <i>B. cinerea</i>	75
Figura 22 Árbol filogenético de varias plantas modelo	77
Figura 23 Comparación de <i>A. thaliana</i> y <i>S. lycopersicum</i>	79
Figura 24 Esquema de la estructura de la hoja de <i>S. lycopersicum</i>	83
Figura 25 Interacción entre las tres moléculas de la epigenética	86
Figura 26 Estructura del gen, zonas aledañas y mRNA	87
Figura 27 Modificaciones de histonas en el nucleosoma.....	91

Figura 28 Distribución de las modificaciones de histonas.....	94
Figura 29 Distribución de las variantes de histonas	99
Figura 30 Disposición de propagadores en la cámara durante el crecimiento	113
Figura 31 Recolocación de plantas para minimizar la variabilidad	114
Figura 32 Características de una cámara de Neubauer.....	119
Figura 33 Muestreo y entrecruzamiento.....	122
Figura 34 Esquema del protocolo de extracción de cromatina.....	127
Figura 35 Esquema del protocolo de CHIP.....	136
Figura 36 Esquema de muestreo original.....	168
Figura 37 Esquema de la primera etapa original de la extracción de cromatina .	169
Figura 38 Esquema de la fase diferencial del protocolo original de CHIP	172
Figura 39 Resultados de los experimentos iniciales.....	174
Figura 40 Electroforesis con varias condiciones de sonicación y de extracción de DNA en <i>A. thaliana</i>	181
Figura 41 Ejemplo de los primeros resultados obtenidos tras la ChIPqPCR.....	182
Figura 42 Comparación entre cromatina y DNA de la misma muestra en una electroforesis.....	183
Figura 43 Posibles escenarios de combinación dynabeads-anticuerpo-cromatina	187
Figura 44 Resultados de la inmunoprecipitación de H3 y RNAPII	189
Figura 45 Sonicación tras las modificaciones en la homogenización y filtrado ...	190
Figura 46 Enriquecimiento de H3K4me3 y H3K27me3 en PR1	191
Figura 47 Comparación de infección por gota y por spray.....	194
Figura 48 Infección por spray control y con medio Gamborg	195
Figura 49 Infección por spray con diversos medios	196
Figura 50 Rectas patrón <i>B. cinerea</i> / <i>A. thaliana</i>	197
Figura 51 Inmunoprecipitación con H3K4me3	198
Figura 52 Inmunoprecipitación con H3K36me3	199
Figura 53 Electroforesis con 16 condiciones distintas de extracción de DNA.....	201

Figura 54 Resultados ChIPqPCR de elución ácida.....	204
Figura 55 Esquema de entrecruzamiento a vacío	205
Figura 56 Validación del entrecruzamiento.....	206
Figura 57 Ajuste de las condiciones de sonicación tras el entrecruzamiento a vacío	207
Figura 58 Muestreo en paralelo para ChIP y RT	208
Figura 59 Entrecruzamiento de lisina con citosina	210
Figura 60 Reacción de la glicina con el formaldehído	211
Figura 61 Funcionamiento teórico del entrecruzamiento a vacío y su detención	212
Figura 62 Imágenes del protocolo de extracción de cromatina.....	215
Figura 63 Comprobación de la fragmentación de la cromatina tras la sonicación	216
Figura 64 Esquema simplificado de los tres protocolos principales.....	220
Figura 65 Enriquecimiento de H3 y H3K4me3 en genes constitutivos y esquemas de los mismos.....	221
Figura 66 Enriquecimiento de H3 y H3K4me3 en PR1 y esquemas del mismo....	223
Figura 67 Resultados epigenéticos obtenidos con PR1	224
Figura 68 Resultados de H3 y H3K36me3 con PR1.....	226
Figura 69 Caracterización del nivel de infección y de la expresión de genes de <i>A. thaliana</i> en el nuevo sistema de infección por spray	229
Figura 70 Genoma de <i>A. thaliana</i> con la localización de los genes estudiados....	230
Figura 71 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen CYP71A13.....	233
Figura 72 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen ELI3.....	235
Figura 73 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen EXL7.....	236
Figura 74 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen BGLU23	238
Figura 75 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen VSP2	239
Figura 76 Genoma de <i>S. lycopersicum</i> con los genes estudiados indicados.....	243
Figura 77 Rutas principales de oxidación de ácidos grasos en plantas	244

Figura 78 Nivel de infección y niveles de inducción de los genes estudiados en <i>S. lycopersicum</i>	246
Figura 79 Análisis de la cromatina entrecruzada y sonicada en <i>S. lycopersicum</i> .	248
Figura 80 Análisis de la marca epigenética H3K4me en <i>S. lycopersicum</i>	249
Figura 81 Resultados de la inmunoprecipitación con H3 y H3K4me en <i>S. lycopersicum</i> tras modificar el protocolo.....	250
Figura 82 Estudio epigenético de H3 en <i>S. lycopersicum</i>	251
Figura 83 Esquema y resultados de EF1a	252
Figura 84 Esquema y resultados de DES.....	253
Figura 85 Esquema y resultados de DOX1	254
Figura 86 Esquema y resultados de LOXD	255
Figura 87 Esquema y resultados de PR2.....	256
Figura 88 Esquema y resultados de WRKY53	257
Figura 89 Esquema y resultados de WRKY75	258

Índice de tablas

Tabla 1 Resumen de las características generales de <i>A. thaliana</i> y <i>S. lycopersicum</i>	85
Tabla 2 Trabajos consultados relacionados con el estudio de estreses abióticos o bióticos en plantas mediante ChIP	105
Tabla 3 Composición del medio PDA modificado.....	109
Tabla 4 Condiciones de crecimiento de <i>A. thaliana</i>	111
Tabla 5 Condiciones de crecimiento de <i>S. lycopersicum</i>	115
Tabla 6 Composición de tampones usados en el muestreo para el entrecruzamiento	123
Tabla 7 Composición de tampones usados en el protocolo de extracción de cromatina	128
Tabla 8 Parámetros de sonicación en la extracción de cromatina	131
Tabla 9 Tampones y demás preparados para la electroforesis de agarosa	133
Tabla 10 Velocidades de centrifugación de <i>S. lycopersicum</i> para extraer cromatina	135
Tabla 11 Composición de tampones usados en el protocolo de ChIP	137
Tabla 12 Características de la qPCR.....	144
Tabla 13 Criterios numéricos para el diseño de oligos.....	149
Tabla 14 Criterios categóricos para el diseño de oligos	150
Tabla 15 Modificación de criterios numéricos para el diseño de oligos	151
Tabla 16 Oligos de <i>A. thaliana</i>	154
Tabla 17 Oligos de <i>S. lycopersicum</i>	157
Tabla 18 Oligos de <i>B. cinerea</i>	159
Tabla 19 Composición de tampones de ChIP	171
Tabla 20 Comparación de protocolos de extracción de cromatina y ChIP.....	176
Tabla 21 Características de las dynabeads y los anticuerpos.....	186

Tabla 22 Combinaciones de cantidades anticuerpo y cromatina y, sus diferencias	188
Tabla 23 Tampones utilizados en la prueba de elución ácida	200
Tabla 24 Detalles de las 16 condiciones distintas de extracción de DNA	202
Tabla 25 Modificaciones en protocolos y sus consecuencias	219
Tabla 26 Genes estudiados en <i>A. thaliana</i>	231
Tabla 27 Descripción de los genes estudiados en <i>S. lycopersicum</i>	242
Tabla 28 Resumen de las diferencias entre los protocolos de <i>A. thaliana</i> y <i>S. lycopersicum</i>	247

1. Introducción

Plantas y hongos son organismos muy distantes evolutivamente, por lo que para comprender cómo una planta responde a una invasión por parte de un hongo patógeno es necesario conocer la biología básica de ambos. Especialmente en esta tesis es preciso describir los mecanismos defensivos de la planta y cómo son regulados, tanto a nivel genético como epigenético.

1.1. Plantas: origen y características diferenciales

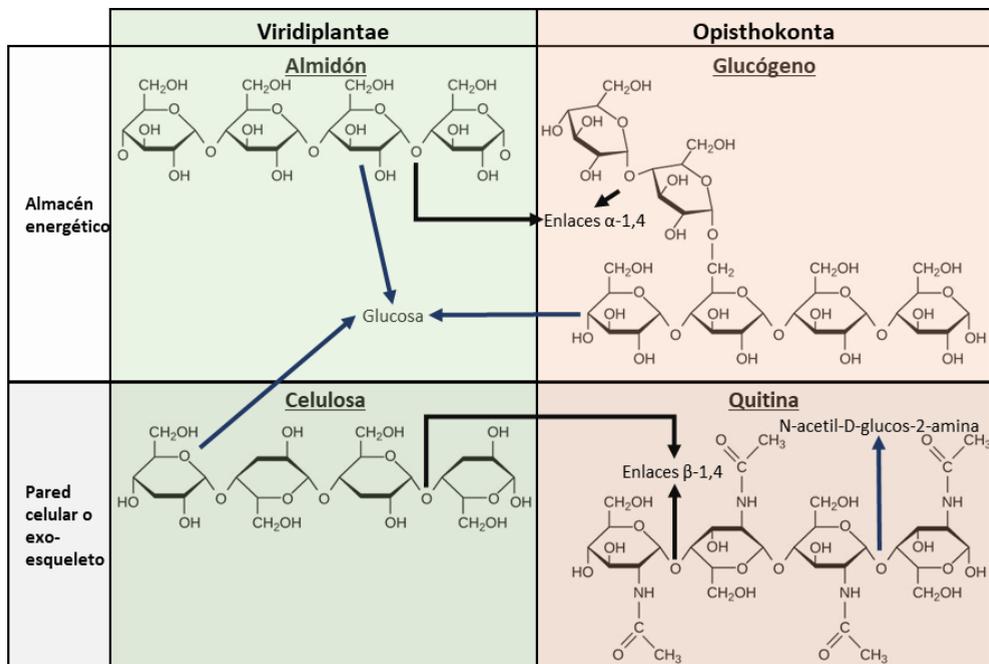


Figura 1 Macromoléculas diferenciales entre plantas y opistocontos

En la figura no se muestran las uniones entre fibras de celulosa mediante enlaces de hidrógeno ni las ramificaciones que posee el almidón.

Las plantas son un conjunto de organismos multicelulares cuyos 350000 miembros forman el reino viridiplantae (Arthur, 2009). Pertenecen a su vez al dominio Eukarya (eucariotas) junto con los reinos Animalia y Fungi (animales y hongos). Como

Introducción

eucariotas, son el resultado de una endosimbiosis producida hace, aproximadamente, 1600 a 2100 millones de años, entre una arquea probablemente relacionada con el actual superfilo Asgard (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017) y una proteobacteria que acabó dando lugar a las actuales mitocondrias (Emelyanov, 2003). El organismo resultante de dicha unión fue capaz de metabolizar el oxígeno atmosférico, tóxico para la mayoría de seres vivos de la época (Holland, 2006).

Aunque pertenezcan al mismo dominio, los tres reinos presentan importantes diferencias, no en vano su divergencia se data en unos 1000 millones de años (Strother et al., 2011) y, de hecho, animales y hongos se asemejan más entre ellos formando el clado Opisthokonta (opistocontos). A nivel molecular, las plantas pueden diferenciarse claramente según estos criterios:

- Pared celular → Es una estructura que envuelve a la membrana celular y se basa en celulosa, un polímero de cadenas de glucosa. Las moléculas de glucosa se unen entre sí por enlaces β -1,4 y las cadenas se enlazan mediante puentes de hidrógeno. Se diferencia de la pared fúngica en que esta última se basa en la quitina, un polímero de N-acetil-D-glucosa-2-amina, unido mediante enlaces β -1,4 (figura 1). Asimismo, algunos animales como los artrópodos poseen quitina, pero la acumulan en su exoesqueleto, pues no tienen pared celular.
- Almacén energético → Las plantas usan almidón (figura 1), un polímero de glucosa con uniones lineales en α -1,4 y ramificaciones en α -1,6. Está compuesto por amilosa, que no posee ramificaciones, y amilopectina, con ramificaciones cada 24 a 30 glucosas. Esto las diferencia de los opistocontos (y las bacterias) que utilizan el glucógeno, muy similar a la amilopectina del almidón, pero con ramificaciones más abundantes, cada 8-12 glucosas. La posición y número de estas ramificaciones influye en la solubilidad de estos homopolímeros, haciendo que la celulosa no sea soluble, el almidón poco y el glucógeno mucho. Además, los enlaces α -1,4 son fácilmente hidrolizables por enzimas, mientras que los β -1,4 no.

- Pigmentos fotosintéticos → Las plantas poseen basalmente clorofila a y b, moléculas compuestas por una cadena hidrofóbica de fitol, que las mantiene integradas en la membrana, y un anillo de porfirina con magnesio, que les permite absorber la energía luminosa. Actúan captando luz en la fotosíntesis, estando completamente ausentes en los otros dos reinos.

Esta última diferencia es esencial a la hora de distinguir entre plantas y opistocontos, dado que deriva de una segunda endosimbiosis ocurrida hace entre 1200 y 1600 millones de años. En este caso, una eucariota fagocitó o fue parasitada por una cianobacteria que poseía dichos pigmentos, permaneciendo finalmente en su interior para convertirse en los actuales cloroplastos (Margulis, 2011).

Los cloroplastos confieren a las plantas la habilidad de efectuar la fotosíntesis, proceso consistente en fijar carbono atmosférico en forma de CO_2 , utilizando la energía luminosa del Sol capturada por las clorofilas. Empleando el oxígeno del H_2O , como aceptor de electrones, los productos finales de esta reacción son la glucosa y el O_2 , que es liberado a la atmósfera; gracias a esto las plantas son seres fotoautótrofos.

Como ya se ha mencionado, hongos y animales mantienen una relación mutua más cercana que con las plantas. Sin embargo, en el pasado los hongos fueron considerados parientes más cercanos de ellas y, teniendo en cuenta sus características, es comprensible. De hecho, en muchos casos, las plantas terrestres (superfilo de las embriofitas) y especialmente las plantas con flores (subdivisión de las angiospermas), presentan características que parecen intermedias entre los miembros más complejos de estos dos opistocontos.

1.1.1. Similitudes con animales

Intercambio de gases, sólidos y líquidos

Las plantas poseen órganos especializados para la extracción de nutrientes y agua del suelo, las raíces, y pueden eliminar residuos a través de las hojas mediante

Introducción

diseminación gaseosa (H_2O , CO_2 , O_2 ...). También acumulan residuos que expulsan pasivamente cuando mueren. Además, tienen la capacidad de almacenar residuos en estructuras como los troncos, donde no les resultan nocivos. Sin embargo, en los animales se han especializado tres sistemas: respiratorio, digestivo y excretor. Los hongos, por su parte, son mucho más rudimentarios y cada una de sus células debe realizar estos intercambios individualmente, aunque son capaces de transportar moléculas de una célula a otra.

Sistema circulatorio

Se basa en un fluido llamado savia, que se mueve a través de vasos diferenciados para el transporte de su forma bruta (xilema) y elaborada (floema). El movimiento se basa en potenciales hídricos, que controlan mediante la apertura y cierre de pequeños orificios en la epidermis de las hojas, llamados estomas. No es tan potente como el sistema animal, movido de una forma más activa por un sistema de bombas, siendo capaz de transportar células; esta incapacidad en las plantas hace que sean muchos menos susceptibles a desarrollar tumores y que no desarrollen cáncer (Doonan and Sablowski, 2010). En el caso de los hongos, éstos deben transportar las moléculas a través de sus hifas, usando únicamente mecanismos moleculares.

Sistema reproductor

Las plantas, al igual que los animales, poseen dos sexos con órganos sexuales bien diferenciados y especializados (flores y frutos en el caso de los vegetales), aunque las plantas necesitan valerse de animales o condiciones ambientales para superar las limitaciones que les produce su naturaleza sésil y, de esta manera, reproducirse con individuos distantes, y posteriormente diseminarse. Curiosamente los animales superiores son mayoritariamente gonocóricos (dioicos en términos vegetales), mientras que las plantas más complejas suelen ser monóicas (hermafroditas en términos animales), en consecuencia, aunque éstas sean producto de una

reproducción sexual, a menudo poseen un solo progenitor. Ambos reinos suelen desarrollar la mayor parte de su vida con más de un juego de cromosomas en sus células (diploidía o poliploidía). Los hongos, por otra parte, habitualmente pasan la mayor parte de su vida con un único juego de cromosomas (forma haploide) y, aunque disponen de la capacidad de reproducirse sexualmente, no suelen hacerlo (Nieuwenhuis and James, 2016). No es habitual que a ellos se les aplique el término sexo y, en todo caso, pueden tener más de dos.

Sistema inmune

Está presente en cada célula que, en principio, debe ser capaz de detectar y responder al patógeno por sí sola. Es sofisticado, constando de varias líneas de defensa, siendo capaz de adaptarse a diferentes ataques, aunque no llega a compararse con la eficacia y versatilidad del animal. El sistema inmune de animales superiores está centralizado y jerarquizado, basado en células muy especializadas; su gran adaptabilidad se debe a los anticuerpos o inmunoglobulinas. Estas proteínas se producen de forma específica con el fin de reconocer moléculas de nuevos patógenos y, de esta forma, combatirlos de forma efectiva (Berr et al., 2012). Por otro lado, los hongos tienen un sistema inmune innato más sencillo que el vegetal, denominado sistema de incompatibilidad vegetativa, que les permite reaccionar frente a patógenos (Uehling et al., 2017), sin embargo, ambos reinos coinciden en que cada célula debe poder, en principio, ser capaz de detectar y responder al patógeno por sí sola.

1.1.2. Similitudes con hongos

Intercambio de información

Plantas y hongos utilizan hormonas para intercambiar información entre distintas partes del organismo e, incluso, entre distintos individuos. Los animales también

Introducción

poseen sistemas hormonales, pero centralizados en diversos órganos y, un sistema de acción rápida capaz de integrar información, el sistema nervioso.

Sistema locomotor

Es una de sus características más definitorias y que diferencia, en mayor medida, a los dos reinos del animal. Son incapaces de realizar movimientos voluntarios o coordinados, consecuencia en parte de la ausencia de un sistema nervioso. Debido a esto, no pueden desplazarse de manera autónoma, convirtiéndoles en seres sésiles. Aunque es cierto que hongos y plantas sí pueden realizar algunos movimientos, éstos se limitan a crecimientos dirigidos, o movimientos muy concretos, generados por cambios en tamaños celulares por desplazamiento de fluidos.

Envoltura celular

Como ya se ha mencionado, ambos reinos comparten una pared celular que está ausente en los animales. Aunque la naturaleza molecular de ambas difiera, están basadas en glucosa, por lo que ambos seres necesitan un buen suministro de este glúcido. Esta necesidad podría explicar la presencia del ciclo del glioxilato en todas las plantas y muchos hongos, pues les permite generarlos a partir de ácidos grasos, y que está prácticamente ausente en animales (Kondrashov et al., 2006). La pared celular confiere a estos organismos varias funciones, que van desde defensa a sostén para sus estructuras. Para esta última función los animales usan endo o exoesqueletos especializados, mientras que en hongos y plantas funciona, en primera instancia, a nivel celular.

Diferenciación celular

Esta característica es de vital importancia puesto que, aunque presentan células altamente diferenciadas como los animales, al contrario que éstos no pierden definitivamente su totipotencia, salvo excepciones muy concretas (Lyndon, 1998).

Esto las acerca a los hongos, seres prácticamente compuestos por células totipotentes (Money, 2002), aunque estos apenas presenten diferenciación celular. La totipotencialidad de sus células hace que plantas y hongos no vean tan limitada su supervivencia por el deterioro de ciertos órganos y tejidos, como ocurre en animales, ya que son todos potencialmente reemplazables.

1.1.3. Implicaciones y estrategias de vida

Esta particular combinación de características hace que algunas plantas puedan vivir durante mucho tiempo. Por un lado, la robustez proporcionada por su complejidad las hace versátiles y resistentes a cambios; por otro, la totipotencialidad de sus células permite una gran capacidad de recuperación frente a daños. Además, el ser autótrofas les proporciona estabilidad siendo, en muchos casos, capaces de almacenar una inmensa cantidad de nutrientes. De hecho, en algunas plantas no existe un límite biológico para su longevidad, sin embargo, suele haber límites en la duración de sus vidas, normalmente autoimpuestos. Esta característica divide a las plantas en dos grupos (Amasino, 2009):

1. Monocárpicas o semélparas → Crecen hasta tener las reservas suficientes para conseguir reproducirse, produciendo muchas semillas y muriendo a continuación. Comúnmente estas plantas viven uno o dos años, aunque hay casos en los que tardan décadas en alcanzar la madurez sexual.
2. Policárpicas o iteróparas → Crecen hasta conseguir reproducirse, pero administran sus recursos para lograr sobrevivir y reproducirse más veces. No todas estas plantas son biológicamente inmortales, ya que en ocasiones hay límites estructurales en su longevidad, como la altura y anchura de los troncos en el caso de algunos árboles. Pero aquellas que consiguen solventar estos problemas, si parecen tener una esperanza de vida ilimitada (Mock et al., 2008).

1.2. Estréses

Las plantas están expuestas a condiciones ambientales severas y fluctuantes, además, deben enfrentarse a una amplia gama de ataques por parte de herbívoros y microbios patógenos (Berr et al., 2012).

1.2.1. Bióticos

El hecho de ser seres fotoautótrofos, sésiles, con una gran capacidad de regeneración y una considerable esperanza de vida, convierte a las plantas en la base de las cadenas tróficas de los ecosistemas donde habitan. Esta posición las hace el blanco de ataques de una enorme variedad de organismos y estructuras orgánicas, incluidas otras plantas; estos ataques son denominados estréses bióticos en contraposición a los abióticos, producidos por cualquier otra causa. Ambos estréses producen una presión selectiva constante, que ha propiciado el desarrollo de una amplia gama de defensas.

Los estréses bióticos pueden clasificarse en función de la estrategia ofensiva del agente atacante (la clasificación más habitual) o, en función de la naturaleza del mismo; en cualquier caso, las defensas vegetales pueden mostrar respuestas especializadas.

Respecto a la estrategia ofensiva (figura 2), los estréses bióticos se engloban mayoritariamente dentro de un tipo de relación entre organismos denominada “explotación”, en la que un individuo es perjudicado mientras que el otro es beneficiado, pero también se consideran estréses bióticos las relaciones de competición (ambos salen perjudicados, común entre plantas en un mismo nicho) o amensalismo (la planta es dañada sin beneficio para la otra parte, a veces con efectos similares a estréses abióticos).

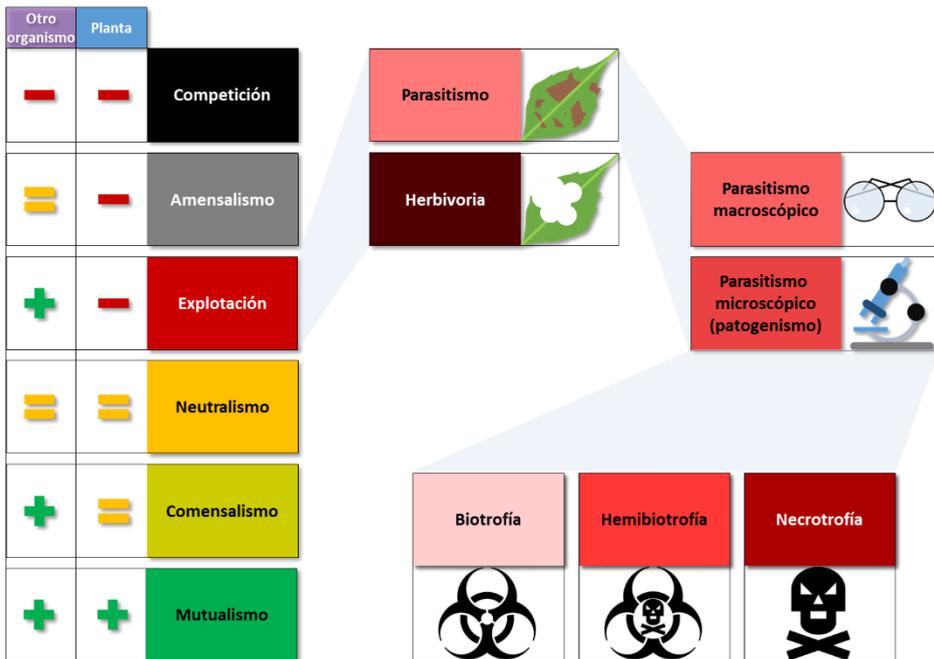


Figura 2 Tipos de relaciones entre plantas y otros organismos

En el lado izquierdo se muestra con signos que organismo (a la izquierda cualquiera que se relacione con la planta y a la derecha ésta) sale beneficiado (+), perjudicado (-) o indiferente (=) en cada tipo de relación. Se muestran más detalles de la explotación, dentro de la cual se encuentra el parasitismo, siendo la necrotrofia un tipo del mismo y el tipo de relación estudiada en esta tesis: un organismo microscópico sale beneficiado (el hongo *Botrytis cinerea*) al alimentarse del tejido necrosado del otro, que es, obviamente, perjudicado (las plantas).

Dentro de los agentes que explotan a las plantas, se encuentran los:

- Herbívoros → Animales que se alimentan de los tejidos de la planta, también conocidos como fitófagos p. ej. especies de lepidópteros, como *Spodoptera exigua* o *Cacyreus marshalli*.
- Parásitos → A diferencia de los herbívoros se alimentan de menos individuos, normalmente de una sola planta, e incluyen a otras especies de plantas. Son animales y plantas como *Meloidogyne incognita* y *Nuytsia floribunda*, respectivamente.

Cuando los parásitos son microscópicos suelen denominarse patógenos y se subdividen en:

- Patógenos necrótrofos → Se alimentan de tejidos necrosados, por lo que crecen sobre tejido muerto, o necesitan matar las células. Incluyen

Introducción

bacterias y hongos como *Pectobacterium carotovorum* y *Botrytis cinerea*, respectivamente.

- Patógenos hemibiótrofos → Se alimentan de las células mientras están vivas y continúan una vez muertas. Son bacterias y hongos como *Pseudomonas syringae* y *Colletotrichum lindemuthianum*, respectivamente.
- Patógenos biótrofos → Sobreviven total o parcialmente en el interior de sus células, manteniéndolas con vida, p. ej. hongos del género *Podosphaera* (oídio) y todos los virus y viroides.

Al nivel celular al que actúan los patógenos, se podría decir que los necrótrofos son como depredadores verdaderos, los hemibiótrofos como parasitoides y los biótrofos como parásitos. Mientras que, a nivel del organismo, los herbívoros son análogos a los depredadores, ya sean del tipo micropredador (como los mosquitos de la familia culicidae) que es lo más común o, predador verdadero en el caso de matar a la planta, cosa que raramente ocurre. En medio se encuentran los parásitos propiamente dichos, que a su vez se subdividen en varios tipos; lo cual evidencia que en realidad existe cierto continuo entre todas estas estrategias, pues en ocasiones es difícil diferenciar un herbívoro de un parásito o un parásito de un patógeno. Todos estos organismos realmente tienen en común que se benefician de la planta mientras esta sale perjudicada (relación de explotación).

Por otro lado, atendiendo a la naturaleza del agente atacante; se encuentran representantes de los reinos Fungi, Animalia y del propio clado Viridiplantae (figura 3). Pero también lo hacen otros eucariontes (Schwelm et al., 2018) como son miembros del supergrupo Harosa (p. ej. el oomiceto *Phytophthora capsici* o el fitomíexo *Spongospora subterranea*)

que está, de hecho, más emparentado con las plantas que con los opistocontos, formando junto a otros grupos el clado Diaphoretickes. También existen miembros de otros clados de posición más incierta entre plantas y opistocontos, como Excavata (p. ej. *Phytomonas serpens*).

En general, entre las formas de vida que atacan a las plantas abundan las bacterias, pero no se han encontrado arqueas patógenas (al igual que entre el resto de organismos (Cavicchioli et al., 2003)). Finalmente, entre los agentes dependientes de vida, hay numerosos virus y viroides que pueden afectarlas (Scholthof et al., 2011) si bien, al contrario de lo que ocurre entre los opistocontos, no se han

encontrado priones en plantas, aunque estas podrían ser vectores de los mismos (Chernoff, 2016).

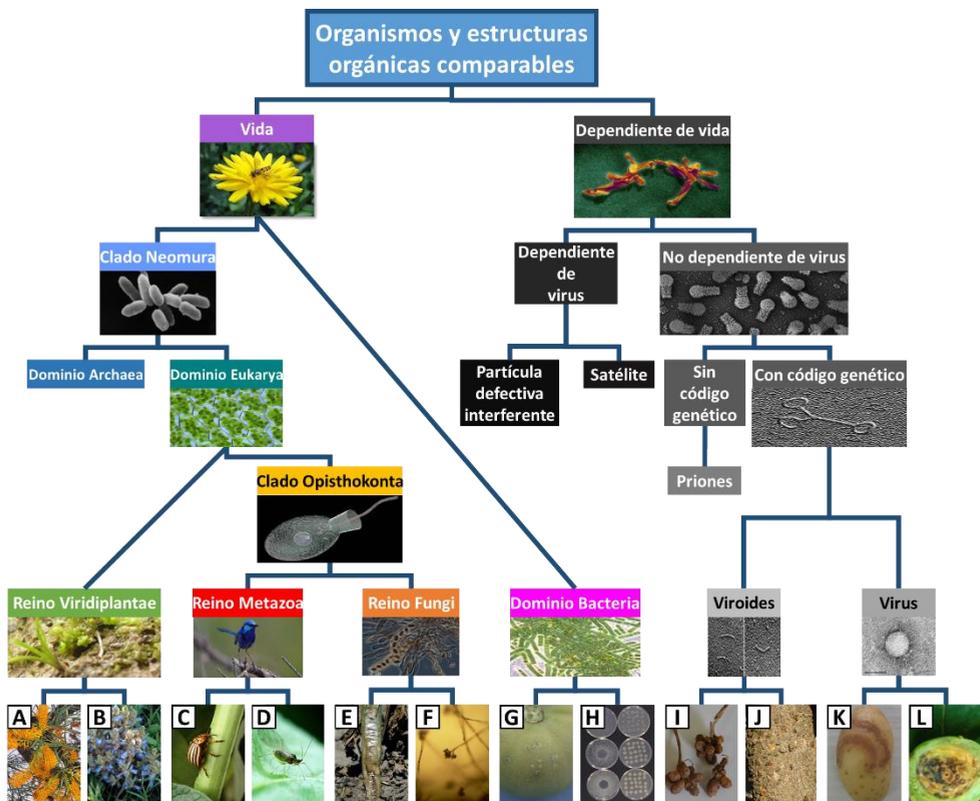


Figura 3 Árbol de agentes que atacan a las plantas

En la figura se muestra un esquema simplificado del árbol de la vida ejemplificando, con imágenes, un par de miembros de cada uno de los grupos que son capaces de provocar un estrés biótico en las plantas (al establecer una relación de tipo explotación). En la parte inferior, de izquierda a derecha: las plantas A) *Phelipanche ramosa* y B) *Nuytsia floribunda*; los animales C) *Leptinotarsa decemlineata* y D) *Myzus persicae*; los hongos E) *Verticillium dahliae* y F) *B. cinerea*; las bacterias G) *Clavibacter michiganensis* y H) *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*; los viroides I) *Potato spindle tuber viroid* y J) *Citrus bark cracking viroid* y, por último, los virus K) *Potato virus Y* y L) *Plum pox virus*. Se obvian las arqueas, los priones y las moléculas dependientes de virus porque no existen representantes.

Los estreses bióticos generalmente son propios de ciertas especies de plantas ya que, al ser provocados por seres vivos, que normalmente intentarán alimentarse de ellas, éstos deben presentar un cierto grado de compatibilidad.

Introducción

1.2.2. Abióticos

Al contrario que los bióticos, los estreses abióticos actúan indiscriminadamente en distintos tipos de plantas, aunque sus efectos sí varíen entre especies. A la hora de causar daños, pueden comportarse de forma sinérgica o antagónica entre ellos o con estreses bióticos. Por ejemplo, el viento dispersando esporas y contagiando otras plantas, altas temperaturas agravando los efectos de la sequía o, el frío produciendo la muerte de los insectos. Generalmente se dividen en categorías en las que el daño se da cuando se sale del equilibrio (Haak, et al. 2017):

- Hídrico → Inundación o sequía.
- Mecánico → Daños estructurales (pueden ser consecuencia de estreses bióticos, como los producidos por herbívoros o, por amensalismo, como plantas aplastadas por un animal al pasar).
- Químico → Exceso o falta de nutrientes u otras sustancias.
 - Oxidativo → Falta de oxígeno (puede ser producida por inundaciones) o desequilibrio de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Lumínico → Exceso o falta de luz visible, infrarroja o daños por luz ultravioleta.
- Térmico → Congelación o quemaduras.

1.3. Relación entre planta y patógeno: mecanismos de defensa

Incluso antes de que se produzca contacto físico entre el organismo atacante y la planta, ésta puede detectar, en ciertos casos, la amenaza a través de volátiles (Ton et al., 2007) o vibraciones (Appel and Coccoft, 2014). Sin embargo, lo más habitual es que la reacción se produzca una vez establecido dicho contacto (García-Brugger et al., 2006).

Pero para conseguir dañar a la planta, los organismos que la atacan deben estar preparados para hacerlo, dado que ésta opondrá resistencia. Normalmente se da mayor especialización, por parte del organismo atacante, hacia una especie concreta de planta cuanto más dependa de ésta, es decir, cuanto más parasitaria sea su naturaleza. Por ejemplo, los herbívoros suelen conseguir alimentarse de más especies de plantas que los patógenos.

Dentro de los patógenos, los biótrofos necesitan evadir el sistema inmune de sus hospedadores y desarrollar estructuras para vivir en su interior, sin producir su muerte, por lo que tienen que adaptarse más a ellos. Sin embargo, los necrótrofos son más oportunistas puesto que producen la muerte celular para alimentarse de los tejidos o, si estos ya están muertos, crecen sobre ellos siendo saprófitos facultativos (Laluk and Mengiste, 2010).

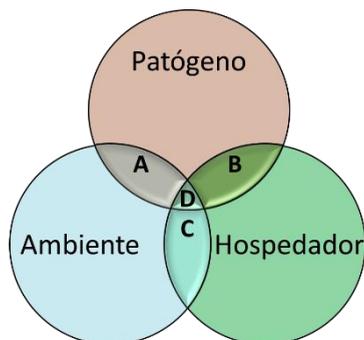


Figura 4 Condiciones de compatibilidad con la enfermedad

- A. Condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo del patógeno.
- B. Patógeno compatible con el hospedador.
- C. Condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo del hospedador.
- D. Condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo del patógeno y su hospedador compatible y, consecuentemente, propicias para que se produzca la infección.

Como se aprecia en la figura, estas condiciones al combinarse forman un área (D), en cuyo punto central se produciría la infección más virulenta. El hecho de que las condiciones reales, una vez se da la enfermedad, puedan estar en cualquier punto de esta área, explica la variabilidad obtenida en los experimentos. Aunque en la figura se hable de patógeno y hospedador, también es válido para otro tipo de relaciones.

Lo que determina que un patógeno pueda infectar y producir la enfermedad en una planta es la compatibilidad entre ambas especies, aunque este concepto engloba también el ambiente en el que se desarrolla la interacción (figura 4). Por muy adaptado que esté un patógeno a su hospedador, debe existir un ambiente

Introducción

favorable en lo que respecta a la temperatura, la humedad, e incluso el nivel de luz. Dándose unas condiciones compatibles entre estos tres factores, la más mínima variación de los mismos puede causar que, el proceso infectivo, y el desarrollo de la enfermedad, sean muy diferentes.

Evolutivamente hablando, las plantas tenderán a hacerse incompatibles con el patógeno (figura 4 C) para impedir, frenar o atenuar el ataque, o la enfermedad, por ejemplo, desarrollándose en un ambiente o época del año que dificulte el crecimiento del invasor. Sin embargo, en general, las plantas priorizan favorecer la incompatibilidad frente al organismo atacante, desarrollando defensas por encima de tener que cambiar de nicho. Estas defensas pueden ser preformadas o constitutivas, aquellas que están presentes cuando el organismo llega e, inducibles, que son las que se activan una vez se ha producido el contacto.

1.3.1. Defensas constitutivas

Pueden subdividirse en: defensas estructurales, si su mera presencia impide o interfiere físicamente en la acción del patógeno y defensas químicas, si se basan en reacciones que eviten su acción o le dañen.

Estructurales

Las plantas cubren algunas estructuras, como los tallos y troncos, con una capa llamada peridermis, a la que pertenece la corteza. La lignina está especialmente presente en esta capa, siendo muy difícil de penetrar para los patógenos y complicada de digerir para los herbívoros. Los tallos menos ricos en lignina pueden contar con espinas o púas, que dificultan la depredación.

Las estructuras sin peridermis, como las hojas, poseen otra capa llamada epidermis (figura 5), que al estar formada por células vivas es más delicada, pero estas segregan una cubierta protectora llamada cutícula. Esta cubierta se compone de varias capas: la más externa (capa epicuticular) está compuesta por ceras, bajo ésta

se encuentra otra que contiene cutinas (cutícula verdadera) y ambas descansan sobre una tercera (capa cuticular), que además posee pectinas y está en contacto directo con la pared celular de las células epidérmicas. Las ceras del exterior son excreciones altamente lipofílicas (y por lo tanto hidrófobas), que la impermeabilizan frente a patógenos y dificultan la acción de pequeños herbívoros.

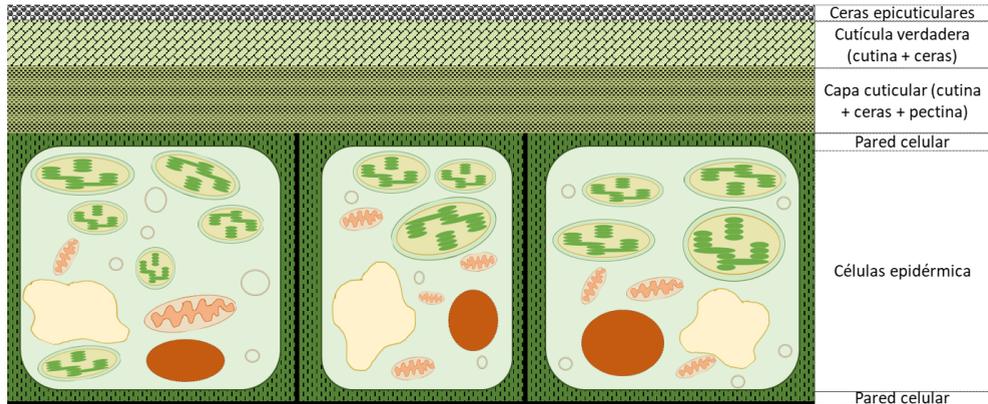


Figura 5 Esquema de la epidermis de una planta

Una importante estructura de la epidermis son los tricomas, protuberancias compuestas por una o varias células vivas o muertas en la etapa adulta, que también entorpecen los ataques con su mera presencia, obstaculizando la acción de pequeños herbívoros (si forman estructuras piliformes) o incluso perforando las patas de insectos, como en el caso de la planta *Phaseolus vulgaris* (Szyndler et al., 2013). Algunas plantas también son capaces de realizar movimientos rápidos, que les permiten replegarse al percibir el contacto de un posible herbívoro (Visnovitz et al., 2007).

Químicas

Muchos compuestos antimicrobianos se acumulan en distintas estructuras de las plantas, de forma que si los patógenos consiguen invadirlas deban lidiar con ellos. Pueden ser proteínas o compuestos antimicrobianos; inhibidores de enzimas degradativas de sus estructuras defensivas o enzimas vegetales detoxificantes, cuya finalidad es la neutralización de toxinas. En algunos casos, tras el contacto con

Introducción

los tricomas, se segregan compuestos irritantes como la histamina u otras sustancias tóxicas, como ocurre en las ortigas (Oliver et al., 1991). Finalmente, cuando el patógeno consigue sobrepasar o destruir las anteriores defensas, las células poseen, en sus membranas o citoplasma, proteínas receptoras para detectar e identificar la amenaza y así activar la siguiente línea de defensa.

1.3.2. Defensas inducibles

Este tipo de defensas entran en juego cuando el agresor ha conseguido atravesar las constitutivas, o ha aprovechado una lesión en la planta. Son mecanismos que ya involucran al sistema inmune propiamente dicho y, como se ha comentado anteriormente, al contrario de lo que ocurre en los animales, cada célula tiene que producir su respuesta inmune (sección 1.1.1.) que, posteriormente y a través de hormonas, puede coordinarse con otras células. Muchas de estas defensas suponen el reforzamiento de las constitutivas, por tanto, pueden volver a subdividirse en los dos mismos grupos:

Estructurales

Se refuerza la pared celular con el aumento de la deposición de sustancias, como la calosa o la suberina; de diversas proteínas de la pared o de la ya mencionada lignina (Dadakova et al., 2015).

La calosa es un polisacárido de glucosa, al igual que la celulosa o el almidón, pero se diferencia por sus enlaces β -1,3 (se le denomina por ello β -glicano), cuya función defensiva se produce al acumularse en la pared celular, concretamente en las placas cribosas y en el cuello de los plasmodesmos (canales que atraviesan la pared celular permitiendo el intercambio de sustancias entre células), reduciendo su diámetro. Esto limita la capacidad de transporte de moléculas por el simplasto (parte interior de las células). La suberina es una macromolécula formada por ácidos grasos unidos por enlaces éster, parecida a la cutina, ambas están presentes

en la cutícula que protege las hojas. A diferencia de la cutina, la suberina posee ácidos dicarboxílicos, se acumula en zonas más internas de la pared celular y es más abundante en las partes subterráneas. La acumulación de suberina dificulta el transporte por el apoplasto (parte exterior de las células).

También se regulan los estomas, unos poros formados por parejas de células que son capaces de regular el diámetro del orificio. Aunque su función principal es el intercambio de gases y de vapor de agua, los microorganismos patógenos pueden usarlos como vía de entrada a la planta. Normalmente al detectar a los patógenos la planta los cierra, pero algunos patógenos han evolucionado la capacidad de mantenerlos abiertos con análogos de la hormona jasmonato isoleucina (JA-Ile (Melotto et al., 2006)).

Químicas

En general, fruto de una reprogramación transcripcional se producen compuestos tóxicos antimicrobianos, o insecticidas, que no estaban presentes anteriormente (metabolitos secundarios) o, si lo estaban, se aumenta su presencia. Pueden clasificarse en:

- Proteínas → Como las defensinas, tioninas o “relacionadas con patógenos” (PRs). Dentro de éstas se sintetizan enzimas que pueden atacar a los patógenos, como quitinasas que degradan la pared celular de los hongos, β -glucanasas que hacen lo mismo con bacterias o peroxidases, las cuales eliminan el “peróxido de hidrógeno” (H_2O_2).
- ROS → Desempeñan un papel importante en la señalización y requieren de una fina regulación espacio-temporal (sección 1.5.4.), puesto que los patógenos también las producen.
- Hormonas → Moléculas señalizadoras de naturaleza variable, que desarrollan una labor clave en el control de la estrategia defensiva celular (sección 1.5.5.) y, además, son las responsables de informar a las otras zonas de la planta, o incluso a otras plantas (pueden ser volátiles).

Introducción

- Fitoalexinas → Compuestos antimicrobianos, también de naturaleza variada, antioxidantes en muchos casos, que se sintetizan de forma rápida y local tras la detección del patógeno, como, por ejemplo, la genisteína y la camalexina (sección 1.5.6.1.).
- Compuestos volátiles → Con ellos las células pueden comunicarse, ya sea con otras zonas del individuo, otras plantas o incluso otras especies. Hay casos en los que pueden reclutar depredadores de herbívoros (Turlings et al., 1995).

1.4. Detección del patógeno

Para poder montar una defensa adecuada la planta debe ser capaz de detectar, en primer lugar, que ha sido agredida. Pero, también debe poseer la facultad de identificar el tipo de agresión puesto que, como ya se ha mencionado, disponen de una amplia gama de mecanismos defensivos y muchos de ellos pueden ser ineficaces o, incluso ser contraproducentes en la situación equivocada. Por ejemplo, montar una defensa a nivel sistémico ante una herida ocasional sería un despilfarro de recursos, al igual que lo sería producir compuestos antidigestivos ante alteraciones abióticas como desnaturalización debida a temperaturas extremas. Dentro de los estreses bióticos, debe ser también capaz de determinar qué tipo de organismo es el responsable, ya que incluso para este subgrupo presenta una amplia variedad de respuestas. Un caso ampliamente estudiado es el de las diferentes respuestas producidas contra patógenos biótrofos y necrótrofos, puesto que son parcialmente opuestas y los huéspedes pueden aprovechar este hecho.

El sistema inmune de las plantas ha evolucionado hasta el punto de poder identificar distintas especies de patógenos. Se han propuesto diversos modelos para explicar el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, utilizando a menudo conceptos como:

- Elicitores → Conjunto de compuestos, sin relación estructural, que actúan como moléculas señaladoras de situaciones de peligro para las plantas. Éstas los reconocen específicamente para luego inducir sus defensas contra patógenos o herbívoros. Pueden ser endógenos o exógenos, derivando tanto del patógeno como de la planta.
- Efectores → De naturaleza típicamente proteica, son secretados por organismos patógenos al interior de la planta (en la célula o en el apoplasto). Pueden alterar la fisiología del hospedador y, así, suprimir su sistema inmune facilitando el desarrollo de la enfermedad. Con esta finalidad, algunos de ellos imitan a fitohormonas. No suelen estar conservados evolutivamente entre especies, excepto los denominados efectores centrales, caracterizados por su amplia distribución y su aportación a la virulencia del patógeno. De los efectores depende, en gran medida, la compatibilidad entre huésped y hospedador y se han desarrollado distintas formas para inocularlos en las plantas. Las bacterias generalmente lo hacen a través de los estomas de la planta, de heridas y del aparato de secreción tipo III. Los hongos biótrofos lo hacen a través de estructuras denominadas haustorios y los nematodos mediante estiletes.
- Receptores o sensores → Proteínas o complejos proteicos de la planta capaces de unirse a elicitores, o efectores, y transducir la señal. Pueden ser transmembrana o citoplasmáticos.

1.4.1. Modelo gen por gen

Es el más sencillo y se basa en una pareja de genes y las correspondientes proteínas que codifican: el gen de resistencia que pertenece a la planta, denominado *R* y su gen de avirulencia correspondiente, que pertenece al patógeno y se denomina *Avr*. Sólo en el caso de que ambos organismos posean los genes correspondientes se producirá la resistencia de la planta. En este modelo, la proteína producto del gen

Introducción

R sería el sensor y la del gen *Avr*, el elicitor. Este modelo tiene la desventaja de que solo en algunos casos se ha demostrado una interacción directa entre ambas proteínas (Flor, 1971).

1.4.2. Hipótesis del guardián

Este modelo propone la ausencia de interacción directa entre proteínas R y *Avr*, defendiendo que a lo que las proteínas R responden es a los efectos que el patógeno produce en la planta. Por lo tanto, la proteína *Avr* patogénica no sería un elicitor ya que, aunque interaccionaría con la planta, no lo haría con un receptor o sensor propiamente dicho (no habría transducción de señal). La detección, realmente, se produciría a través de elicitores derivados de sus interacciones (pudiendo pertenecer a la planta). Este mecanismo, explicaría que las plantas no sean tan vulnerables a que el patógeno evite ser detectado, mediante posibles mutaciones o enmascaramientos de las proteínas *Avr* (Ade et al., 2007).

1.4.3. Modelo del zig-zag

Este modelo integra parcialmente conceptos de los dos anteriores, ya que no son mutuamente excluyentes, pudiendo haber interacciones directas e indirectas (Jones and Dangl, 2006). Describe un sistema que, en principio, se basa en dos fases bien diferenciadas:

Primera fase

Se compone de dos elementos moleculares básicos (figura 6): unos receptores, que son proteínas transmembrana llamadas “receptores de reconocimiento de patrones” (PPRs) y sus dianas, unos elicitores denominados “patrones moleculares asociados” (con diversas siglas). De estos últimos existen varios tipos, cuyos nombres determinan sus siglas y las de los conceptos derivados:

- PAMPs: “patrones moleculares asociados a patógenos”, es el más utilizado por ser el más relacionado con la enfermedad. Posiblemente sea el que cuente con más representantes, puesto que la defensa frente a patógenos puede requerir de estrategias muy diferentes, dependiendo de la naturaleza de éstos.
- MAMPs: “patrones moleculares asociados a microbios”, el segundo más utilizado, principalmente porque todos los patógenos son microbios. Sin embargo, no debe olvidarse que no todos los microbios son patógenos, ya que muchos pueden ser neutrales o beneficiosos para la planta (figura 2), que debe ser capaz de detectarlos y diferenciarlos. Algunos pueden desencadenar respuestas defensivas, o incluso inducir *priming* (o precondicionamiento), un estado de preactivación de estas defensas.
- HAMPs: “patrones moleculares asociados a herbívoros”, quizá el menos utilizado, normalmente derivado de sustancias presentes en su saliva o sus feromonas. Las siglas son ambiguas pues también pueden hacer referencia a “patrones moleculares asociados a huéspedes”, que englobaría a las dos primeras de la lista.
- DAMPs: “patrones moleculares asociados a daño”. En este caso serían sustancias de la propia planta en un lugar inusual, como fragmentos de la pared celular en el citoplasma. Son los patrones que delatarían que se están produciendo lesiones tisulares causantes de muerte celular. En estreses bióticos aparecen inherentemente acompañados de los anteriores y, en caso de darse en solitario, la planta actuará como una agresión sin una causa biológica, por lo que entraría en el terreno de los estreses abióticos.

Estos elicitores son, a menudo, moléculas comunes y ampliamente distribuidas como lipopolisacáridos, peptidoglicanos, flagelinas, quitinas, u otros componentes de la pared celular, ya sea del huésped o del hospedador (De Lorenzo et al., 2011). Por tanto, en muchos casos son moléculas indispensables para ellos, siendo comunes entre especies y proviniendo de genes conservados. La respuesta inmune que la planta produce al detectar estos patrones moleculares, se denomina

Introducción

“inmunidad desencadenada por PAMPs” (PTI, o MTI si se refiere a MAMPs) para patógenos en particular (Berr et al., 2012).

Segunda fase

Se produce como consecuencia de la presión selectiva que sufren los patógenos para poder suprimir o sobrepasar la PTI y las plantas, con el objetivo de detectarlos y reforzar sus defensas. Para ello los patógenos desarrollan nuevos efectores, haciendo que las plantas nuevamente sean susceptibles, en lo que se denomina “susceptibilidad desencadenada por efector” (ETS).

De ser la planta capaz de detectar y contrarrestar estos efectores desarrollará la “inmunidad desencadenada por efector” (ETI). En este caso, la detección se da gracias a otros receptores, las proteínas R polimórficas (del modelo gen por gen) formadas por dos dominios que se denominan “dominio de unión a nucleótidos y repetición rica en leucina” (NB-LRR). Estas proteínas generalmente se encuentran en el interior de la célula, en contraposición a los “receptores de reconocimiento de patrones” PRR. Se subdividen en dos tipos: las que poseen un “receptor Toll de interleucina 1” (TIR) y las que tienen una “hélice superenrollada” (CC), denominándose TIR-NBS-LRR y CC-NBS-LRR, respectivamente (Ade et al., 2007).

Como parte de la carrera evolutiva, los patógenos desarrollan nuevos efectores que pueden sobrepasar esta segunda fase defensiva, que quizá la planta también podría detectar con nuevos receptores, dándose así más ciclos ETI-ETS (figura 6). Si la planta fracasa al identificar la amenaza, podría decantarse por una estrategia defensiva no adecuada (Williamson et al., 2007).

El modelo zig-zag propone una dicotomía PTI-ETI, basada en el reconocimiento de estructuras típicamente conservadas por parte de las PRR, que no realizan las NBS-LRR. De hecho, las respuestas producidas por la ETI se consideran más rápidas, fuertes y prolongadas que las de la PTI (Tsuda and Katagiri, 2010). Sin embargo, como resultado de la coevolución, los patógenos pueden variar los PAMPs

anteriormente conservados y, en contraposición, los efectores más exitosos pueden acabar haciéndose comunes (como en el caso de los efectores centrales), lo que torna más ambigua la clasificación de estas moléculas. Desde el punto de vista de la planta, es irrelevante la naturaleza u origen de la molécula que le permita detectar y reconocer al patógeno, siempre y cuando pueda realizarlo de manera rápida y eficaz.

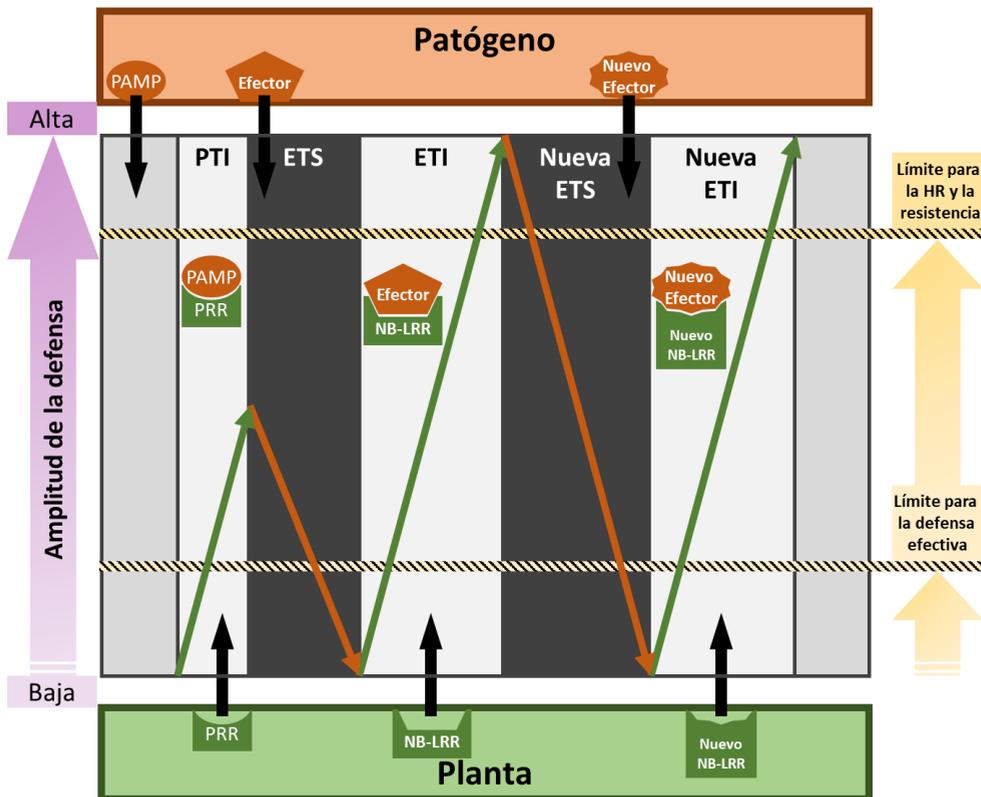


Figura 6 Diagrama del modelo zig-zag

Traducido y adaptado de Jones and Dangl (2006): En la figura se observa como el patógeno (arriba, en tonos marrones) envía moléculas que la planta (abajo, en tonos verdes) detecta produciéndose los distintos tipos de respuesta. En primer lugar, la mera presencia del patógeno y el inicio de la infección (campo gris a la izquierda de la figura) deben ser detectados por la planta para que se produzca la PTI (sombreado gris claro) y no quedar indefensa, mediante la unión de las PAMPs gracias a las PRRs. Como contramedida, el patógeno envía efectores que vuelven a hacer a la planta vulnerable, dándose la ETS (sombreado gris oscuro); si la planta los detecta mediante NB-LRRs podrá volver a defenderse, produciéndose la ETI. Esto último puede repetirse varias veces, gracias a la aparición de nuevos efectores patogénicos y NB-LRRs vegetales.

A la izquierda (en tonos morados) se indica la amplitud de la defensa desplegada por la planta y a la derecha (en tonos amarillos y mediante dos líneas que cruzan horizontalmente la figura), se muestran los límites a partir de los cuales se desata la defensa efectiva, así como la HR y otras resistencias.

1.5. Respuesta al patógeno

Tras el reconocimiento del patógeno, ya sea mediante la PTI inicial o una posterior ETI (figura 6), la planta desarrolla estrategias defensivas que se corresponden con la puesta en marcha de las defensas inducibles (sección 1.3.2.), que se pueden dividir en función de su acción espacio-temporal, en tres etapas:

1.5.1. Primera etapa: respuesta hipersensible

Como consecuencia de la percepción de la agresión se produce la “respuesta hipersensible” (HR), un rápido mecanismo que se da en las células circundantes a la zona afectada y provoca la muerte programada de éstas (figura 7). Este proceso es similar a la apoptosis animal ya que están involucradas las mitocondrias, se condensa la cromatina y el protoplasto (célula sin su pared), se produce la degradación nuclear y las células empaquetan sus componentes en fragmentos (vacuolas en el caso de las plantas). No se denomina igual debido a diferencias como las ocasionadas por la presencia de la pared celular y la ausencia de un sistema inmune basado en células que eliminen los residuos (Collazo et al., 2006). La HR se puede dividir, al igual que el modelo del zig-zag, en dos fases:

Primera fase

Sobreviene inmediatamente después del reconocimiento del patógeno y en ella se produce una fuerte despolarización de los potenciales de membrana, ocasionada por una pérdida de electrolitos como el K^+ y un incremento de H^+ ; esto podría generar una señalización eléctrica a larga distancia. También se da un incremento del influjo de iones Ca^{2+} tanto al citoplasma desde el apoplasto, como a las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas, siendo un proceso de gran importancia en los eventos posteriores.

Segunda fase

Producida como consecuencia de la transducción de los cambios producidos en la primera fase, especialmente la acumulación de Ca^{2+} . Este ion favorece un aumento transitorio de ROS, llamado estallido oxidativo, en el que se produce especialmente una rápida acumulación apoplástica de H_2O_2 . En este proceso también se producen especies reactivas de nitrógeno (RNS) que, de hecho, deben estar equilibradas con las ROS para que se pueda generar la HR (Zaninotto et al., 2006). ROS y RNS afectan a la función de la membrana celular, provocando que sus lípidos se peroxiden y se dañen (Matthews et al., 2007). El Ca^{2+} o las proteínas PRR también pueden producir una cascada de “proteínas quinasas activadas por mitógenos” (MAPKs). En esta cascada normalmente la MAPK que finalmente fosforila a la proteína diana, ha sido anteriormente fosforilada por una segunda MAPK (denominada MAPKK) que, a su vez, ha sido fosforilada por una tercera MAPK (denominada MAPKKK), la cual es la que interactúa con los receptores u otras señales (Moustafa et al., 2014).

El estallido oxidativo y la cascada de MAPKs, junto al aumento de Ca^{2+} , activan proteínas con efectos de transducción de señal, afectando a la actividad hormonal, sobre todo del ácido salicílico (SA) y, en menor medida, del ácido jasmónico (JA), que podrán alterar indirectamente la expresión génica. También activarán proteínas tipo “factor de transcripción” (TF), como las “proteínas con secuencia WRKY en N-terminal” (WRKY) que, directamente, modificarán la expresión de genes. Los genes activados, en gran medida, participarán en la producción de compuestos defensivos y facilitarán la transmisión de la información a células aledañas.

La eficacia de la HR en detener la propagación de la infección, como la de cualquier estrategia defensiva, depende mucho del tipo de patógeno (Govrin and Levine, 2000). Es especialmente útil contra patógenos biótropos, ya que elimina su actual fuente de alimento (las células vivas) y las cercanas, cortándoles el suministro de nutrientes. Sin embargo, contra herbívoros es ineficaz, puesto que son organismos macroscópicos a los que poco les afecta el hecho de que su fuente de alimento haya

Introducción

muerto recientemente. Finalmente, contra patógenos necrótrofos puede ser contraproducente, ya que puede ahorrarles el trabajo de matar las células, haciendo mucho más sencilla su propagación.

1.5.2. Segunda etapa: resistencia local adquirida

La muerte celular programada, producida por la HR, causa una lesión en el tejido vegetal alrededor de la cual se constituye un perímetro de células vivas, que han recibido las señales. Estas células desarrollan la denominada respuesta local adquirida (LAR) y sobreviven debido a que, con el fin de no producir una reacción en cadena interminable de muerte celular, las señales generadas, aunque se reproducen de una célula a otra, varían y pierden intensidad conforme se alejan de la zona invadida (figura 7).

Las células afectadas por la HR legan una serie de ventajas que protegen a sus compañeras. En primer lugar, los compuestos derivados de la necrosis celular, que el patógeno probablemente produciría, son tóxicos para las células, no así los liberados por la muerte celular programada. En segundo lugar, producen diferentes moléculas tóxicas para los patógenos, como proteínas PR, entre las que se incluyen antifúngicas (quitinasas, β -glucanasas, y taumatinas) y enzimas oxidativas (peroxidasas, oxidasas de polifenoles, lipooxigenasas). Además, se acumulan compuestos con actividades antimicrobianas, como las fitoalexinas. Finalmente, en la pared celular se producen cambios desencadenados por ROS como, por ejemplo, la deposición de lignina y de calosa; además del entrecruzamiento de compuestos como glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Pontier et al., 1998).

Todo esto crea una zona de exclusión reforzada por una barrera, donde la supervivencia es difícil por los compuestos tóxicos acumulados (figura 7). Los patógenos tendrán que enfrentarse a un entorno hostil (que dificultará su reproducción, retrasará su maduración y atacará a su pared celular y metabolismo)

en el que el movimiento será difícil, lo cual dificultará su acceso hacia células vivas, en caso de que necesiten acceder a ellas (biótrofos) o, simplemente, dificultará su supervivencia. Las células afectadas por la LAR, además, podrán establecer una defensa anticipada a la posible llegada del patógeno y segregarán compuestos antimicrobianos adicionales en esta zona de exclusión.

1.5.3. Tercera etapa: resistencia sistémica

Las señales producidas por la HR no son trasladadas únicamente a las células de la zona local, donde se produce la LAR (en conjunto denominadas defensas primarias), sino que ambas zonas envían señales al resto del organismo (figura 7). Esto provoca, horas después, una defensa de larga duración y amplio espectro denominada “respuesta sistémica adquirida” (SAR), que permitirá una mejor respuesta hacia el patógeno desencadenante, si no es detenido en la zona afectada, o hacia diferentes infecciones ocurridas incluso meses después (Conrath, 2006). La SAR, junto con las defensas primarias, constituye un mecanismo análogo a la respuesta inmune innata animal porque, aunque implica memoria, no llega a ser tan específica como la inmunidad adaptativa.

La transmisión de las señales entre las zonas afectadas y el resto de la planta se produce a través del sistema vascular, especialmente por el floema (Shah et al., 2014), aunque también pueden estar implicados mecanismos aéreos, o incluso eléctricos (Choi et al., 2016). Se pudo demostrar que exudados del floema de hojas de *Arabidopsis thaliana*, en las que la SAR había sido inducida, fueron capaces de inducirla en otros géneros y especies de plantas, lo que indica que no es un sistema específico (Chaturvedi et al., 2012). A nivel molecular se requiere de la acción del SA para que se produzca la respuesta, tanto en la zona afectada, como en la distal (Dixon et al., 1994); aunque un incremento temprano y local de la concentración de JA también puede activarla (Truman et al., 2006). En todo caso, son otras moléculas las responsables de la señalización a larga distancia (Pallas et al., 1996);

Introducción

entre ellas están el “metil éster del SA” (MeSA), el “dehidroabietinal” (DA), el “ácido azelaico” (AzA) y un factor dependiente del “glicerol-3-fosfato” (G3P). Los de naturaleza lipídica requieren de la acción de la proteína “deficiente en inducción de resistencia 1” (DIR1). También están implicados otros factores como la luz.

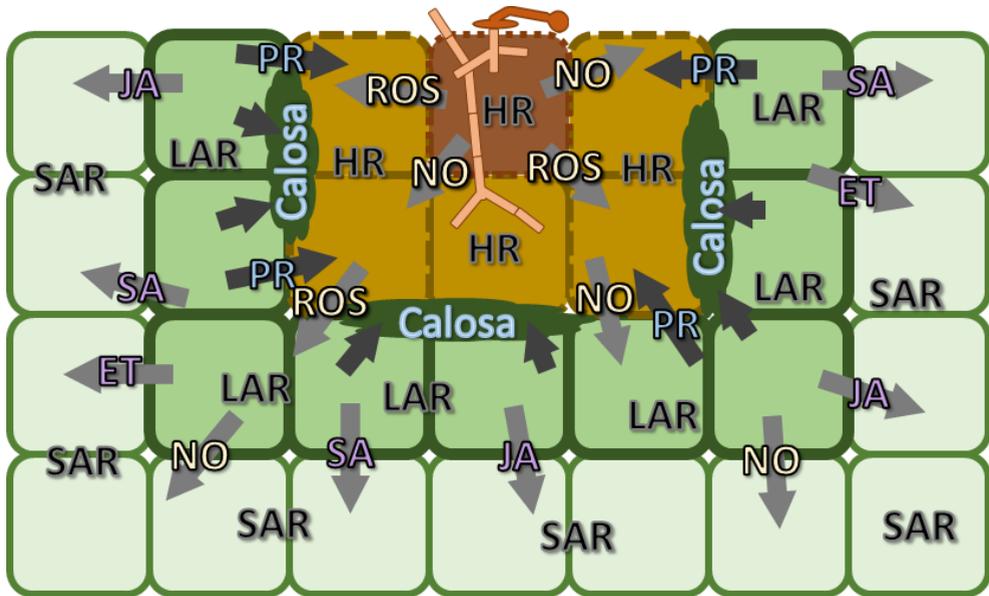


Figura 7 Esquema de HR, LAR y SAR en el tejido vegetal

En la figura se puede ver como las células atacadas por el patógeno (un hongo filamentoso en este caso) mueren, ya sea por HR, por la acción del patógeno o por una combinación de ambas. En cualquier caso, las células antes de morir envían mensajes a las que tienen cerca en forma de ROS y NO, provocando que estas células mueran mediante HR y envíen, a su vez, mensajes a las células aledañas. Estas células responden produciendo la LAR, en la que fortalecen sus defensas (reforzando la pared celular con calosa), enviando moléculas para atacar al patógeno (PRs) y, por otro lado, enviando a su vez señales (mediante hormonas como el JA, SA y ET y otras moléculas como el NO) a células más distantes al punto de ataque e incluso a toda la planta, dándose así la SAR.

La SAR es un mecanismo de amplio espectro que no requiere de la activación de genes tan específicos como las defensas primarias, capaces de responder a especies concretas, pero se producen numerosos compuestos antimicrobianos, los cuales una vez acumulados conferirán resistencia a varios patógenos. Se ha demostrado que sus efectos pueden ser transmitidos a la progenie (Luna et al., 2012). También desencadena un fenómeno de preactivación de las defensas, denominado *priming*,

que produce un estado de alarma o sensibilización durante el cual las plantas pueden actuar de manera más rápida y eficaz contra el patógeno, reduciendo así los costes y las consecuencias de la enfermedad (Conrath, 2011).

Sin embargo, los patógenos no son los únicos en poder producir un estado de defensa sistémica ya que existen otros dos fenómenos con características similares:

La “respuesta sistémica inducida” (ISR)

Es un mecanismo que se origina en las raíces, como consecuencia de la interacción entre la planta y los microorganismos mutualistas que viven allí. Por ejemplo, las bacterias del género *Rhizobacteria*, que además compiten por el nicho con otros microorganismos potencialmente patógenos, pueden producir una respuesta sistémica. La producción de ISR hace que, al igual que ocurre en la SAR, tejidos distantes de toda la planta entren en un estado de resistencia hacia una amplia variedad de patógenos, pudiendo desencadenar el *priming*. Las hormonas responsables en este caso son el JA y el “etileno” (ET), en lugar del SA. Ambos mecanismos (ISR y SAR) pueden producirse simultáneamente, mejorando la capacidad defensiva que realizan individualmente y ampliando el rango de patógenos frente a los que protegen. Algunos miembros de géneros de bacterias, como *Pseudomonas* y *Bacillus* también pueden producir ISR.

La “respuesta inducida por herida” (WIR)

Es un mecanismo que aparece como fruto de las heridas producidas por animales herbívoros (Gatehouse et al., 2002). De su regulación se ocupa principalmente el JA, aunque se ha observado la implicación del Ca^{2+} y las ROS. Generalmente, a diferencia de la SAR y la ISR, se considera que ofrece resistencia a herbívoros, pese a que se ha demostrado que las hojas que han sido heridas son más resistentes a necrótrofos, como el hongo *B. cinerea* (Beneloujaephajri et al., 2013).

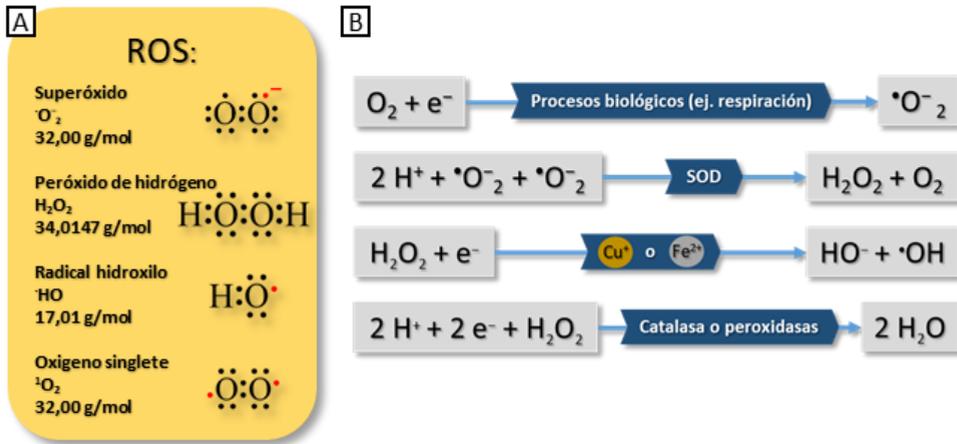


Figura 8 ROS, generación y procesamiento

(A) Ejemplos de las ROS más importantes: superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singlete. (B) Algunas de las reacciones que pueden generarlas.

Cuando la planta detecta al patógeno, como parte de la HR, se produce un estallido oxidativo, que consiste en un enorme, aunque transitorio, aumento de la concentración apoplástica de ROS (figura 8). Estas incluyen el “anión superóxido” ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el H_2O_2 , los “radicales hidroxilo” (OH^{\cdot}) y el “oxígeno singlete” ($^1\text{O}_2$), este último subproducto de la fotosíntesis (Laloi and Havaux, 2015). Su capacidad de alterar el equilibrio redox las habilita para atacar al patógeno, que normalmente se encuentra en el apoplasto. Además, las ROS pueden alertar de su presencia actuando como moléculas señalizadoras. Para esta última actividad, el H_2O_2 es el mejor capacitado al ser más estable, con una vida media de 1 ms en las células, lo que le permite actuar como señalizador intra e intercelularmente. Las ROS también favorecen el reforzamiento de la pared celular mediante su entrecruzamiento (Brisson et al., 1994) y lignificación (Baker and Orlandi, 1995). También tienen un papel activo en otras funciones de la planta fuera del campo de la defensa, como el crecimiento o la muerte celular programada (figura 9).

La producción de estas moléculas tiene lugar en la membrana plasmática, la pared celular, las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas. Varias enzimas y complejos enzimáticos catalizan este proceso, entre las que destacan los complejos NADPH oxidasas de membrana (conocidos como Nox en animales y en plantas como “homólogos de la oxidasa de estallido oxidativo” (Rboh (Torres and Dangl, 2005)); las oxidasas de pared celular y las amino oxidasas. Los receptores PTI inducen la actividad de estas enzimas, por ejemplo, en las Rboh gracias a la acción mediadora del “péptido de 22 aminoácidos de la flagelina” (fgl22). Estas enzimas, además, acoplan el sistema de señalización ROS con el del Ca^{2+} mediante sus dos “dominios estructurales hélice-bucle-hélice” (manos EF, (Kobayashi et al., 2007)) y la fosforilación de proteínas (Kadota et al., 2015).

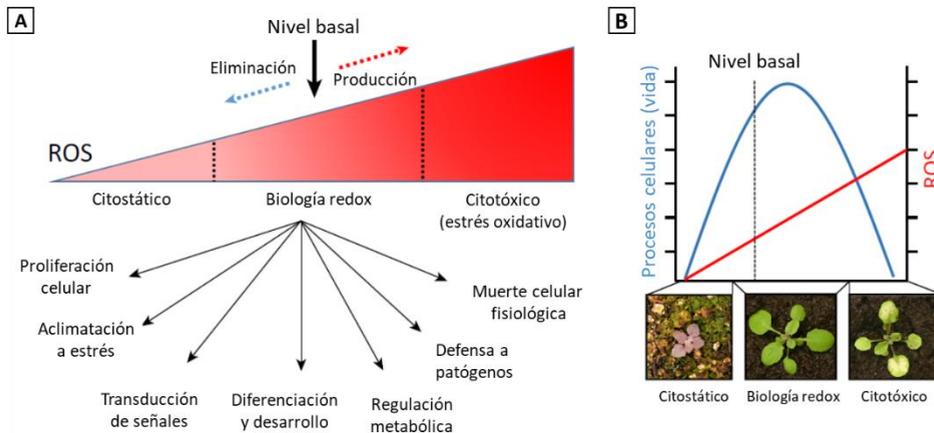


Figura 9 Equilibrio redox

Traducida de Mittler (2017). (A) Los niveles de ROS en la célula determinan el estado en el que esta se encuentra. A una concentración por debajo de un umbral dado, los procesos celulares involucrados se detienen, entrando en un estado citostático. Dentro del rango adecuado la célula es capaz de realizar diversos procesos, incluida la defensa frente a patógenos y, finalmente, cuando los niveles son excesivos se vuelven tóxicos y potencialmente letales. (B) Se hipotetiza que existe una curva, con forma de campana, que representa los niveles óptimos en los que la planta puede realizar todas sus funciones adecuadamente.

Aunque necesarias a baja concentración, las ROS son utilizadas contra los patógenos por ser tóxicas a altas concentraciones, ya que alteran el equilibrio redox; en presencia de un patógeno sus niveles suben por encima del nivel citostático (no habría cambios), pero deben mantenerse por debajo del nivel citotóxico que dañaría a la célula (Mittler, 2017). En consecuencia, la planta no debe

Introducción

acumularlas excesivamente en el interior de sus células, manteniéndolas equilibradas (figura 9). Con este fin, debe regularse la actividad de enzimas o complejos enzimáticos encargados de su producción y eliminación. Entre ellos son relevantes la “peroxidasa de ascorbato” (APX1), la “catalasa 1 y 2” (CAT1 y 2), la “peroxidasa de ascorbato tilacoidea” (tAPX), la “oxidasa de mitocondria” (AOX) y la “superóxido dismutasa” (SOD). Variantes de esta última enzima, que utilizan distintos metales como cofactores, están presentes en varios compartimentos de la célula y el apoplasto: la unida a Mn se encuentra en mitocondrias y peroxisomas, a Cu-Zn en el apoplasto y citoplasma, y a Fe y Cu-Zn en el cloroplasto. El hecho de que existan enzimas con la misma función, aunque usen distintos metales, podría explicarse por la disponibilidad de éstos en la biosfera cuando cada una surgió (Greene, 2002).

Por otro lado, antioxidantes de bajo peso molecular como el ascorbato, el “glutatión” (GSH) y el tocoferol, también actúan como reguladores de ROS, determinando su especificidad y tiempo de vida. Al ser eliminadas las ROS, se producirán O_2 y H_2O , moléculas inocuas para la planta.

En general, las enzimas productoras de ROS pueden actuar conjuntamente con distintas moléculas y hormonas para producir diversas respuestas defensivas. Por ejemplo, con el “ácido abscísico” (ABA) dan lugar al cierre de estomas; asimismo, podrían actuar sinérgicamente con el SA para desencadenar la SAR. Otras hormonas como el “metil jasmonato” (MeJA) y su homóloga estructural, la coronatina (producida por patógenos), inducen su acumulación de forma dependiente de las enzimas Rboh.

1.5.4.1. RNS

Las ROS tienen una relación especialmente estrecha con las RNS, entre las que destaca el “óxido nítrico” (NO), que combinada con el $^{\bullet}O_2^-$ puede dar lugar al

“peroxinitrito” (ONOO^-), perdiendo su actividad biológica. El ONOO^- , a su vez, se puede convertir en “ácido peroxinitroso” (ONOOH) uniéndose a un H^+ y, posteriormente, producir otras RNS como “dióxido de nitrógeno” ($\bullet\text{NO}_2$) y ROS como el $\bullet\text{OH}$ (figura 10).

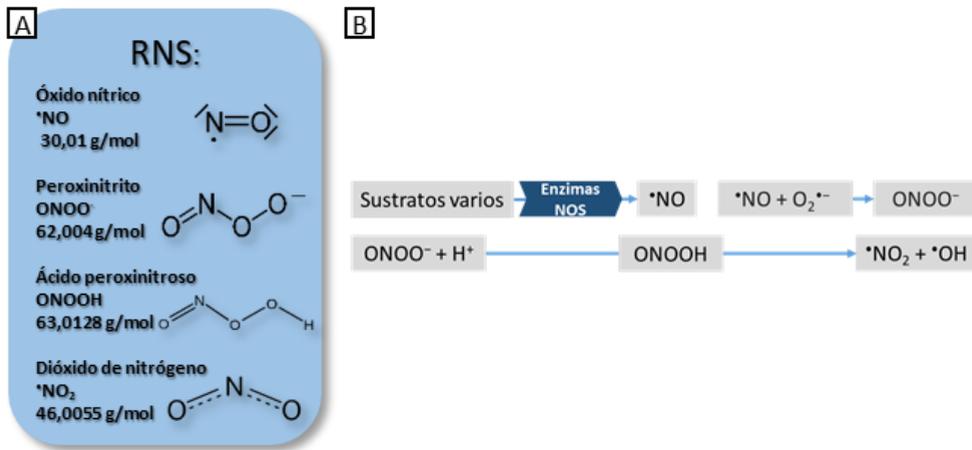


Figura 10 RNS y su generación

(A) Ejemplos de las RNS más importantes: óxido nítrico, peroxinitrito, ácido peroxinitroso y dióxido de nitrógeno. (B) Algunas de las reacciones que pueden generarlas.

El NO es una molécula que interactúa con hormonas, lo que le proporciona un papel en funciones como el control de las relaciones simbióticas (por ejemplo, en nódulos radicales de fijación de nitrógeno); la apertura de estomas; el control de pelos radicales y la formación de raíces adventicias. En plantas superiores, el NO se produce, en general, por las enzimas “sintasas de NO” (NOSs). Estas lo generan en rutas de oxidación dependientes de arginina o hidroxilamina, como la “proteína 1 asociada a NO” (NOA1), en un proceso que se da especialmente en cloroplastos y mitocondrias (Flores-Perez et al., 2008). También mediante reducción dependiente de nitrato y nitrito, como la “nitrato reductasa 1 y 2 [NADH]” (NIA1 y 2 respectivamente (Gupta et al., 2011)). El gen *NOA1* se ve inhibido bajo estreses, como las heridas o el ataque de herbívoros, pero se induce con SA (Diaz et al., 2003), por lo que la cantidad disponible de NO estará disminuida y aumentada, respectivamente.

Introducción

El “S-nitrosoglutatión” (GSNO) es el reservorio vegetal de NO (Sakamoto et al., 2002). La unión del GSH al NO parece darse mediante la citocromo C oxidasa, mientras que la “S-(hidroximetil) glutatión deshidrogenasa” (HOT5) sería la encargada de su eliminación junto con NADH, generando “glutatión sulfonamida” (GS(O)NH₂), que a su vez se convierte de forma espontánea en “glutatión disulfuro” (GSSG), hidroxilamina, ácido sulfínico de glutatión y amoníaco. Por otro lado, las “hemoglobinas no simbióticas 1 y 2” (AHB1 y 2, respectivamente) son, al igual que en animales, unas proteínas globulares capaces de unirse a O₂, pero también a otras pequeñas moléculas diatómicas como el NO, por lo que participan en su secuestro y posterior eliminación por las rutas mencionadas (Igamberdiev et al., 2004).

La producción de NO se asocia con la PTI, la HR y la defensa asociada a las deposiciones en la pared celular (Zeidler et al., 2004, Prats et al., 2005, Mur et al., 2008). Estos efectos se explican por la S-nitrosilación reversible en proteínas y la nitración reversible de las tirosinas, que se producen en las cascadas enzimáticas implicadas en la respuesta defensiva (Cecconi et al., 2009, Leitner et al., 2009). Por ejemplo, mutantes en la enzima “reductasa 1 de S-nitroglutatión” (GSNOR, encargada de revertir la S-nitrosilación que el NO produce en las proteínas) ven comprometidas sus defensas ETI y PTI (Wang et al., 2010b). Además, el NO interactúa con las rutas de hormonas como las auxinas (AUX) o las citoquininas (CK). Por ejemplo, en plantas de *A. thaliana* infectadas por *B. cinerea*, favorece la acumulación de ET mediante la inducción de sus genes de síntesis (Mur et al., 2012); también aumenta la producción de JA al S-nitrosilar sus enzimas de síntesis (Mur et al., 2013). Por su parte el ET y el JA, junto con el SA, parecen aumentar su nivel, puesto que, en respuesta a O₃ (que produce una muerte celular similar a la de la HR), la concentración de estas hormonas se eleva, para luego acumularse NO (Ahlfors et al., 2009).

El aumento de NO acompaña al de H₂O₂ en el estallido oxidativo (Besson-Bard et al., 2008). Adicionalmente pueden tener una función similar, por ejemplo, tras este estallido oxidativo se acumulan intracelularmente y señalizan conjuntamente cascadas enzimáticas, como la de las enzimas similares a caspasas, que se activan cuando NO y H₂O₂ liberan al citocromo C mitocondrial o la de proteínas MAPK. También existen proteínas que son afectadas por NO y H₂O₂, como la GADPH que tienen un papel en la señalización ROS, actividad que ambas son capaces de entorpecer (Lindermayr et al., 2005). De hecho, el NO puede ser muy perjudicial combinado con otras ROS pues produce ONOO⁻, una especie altamente reactiva que interacciona con gran variedad de moléculas como proteínas, lípidos o DNA. El NO puede afectar a la concentración de ROS, generalmente a través de la S-nitrosilación que provoca (Cecconi et al., 2009, Leitner et al., 2009). Esta reacción puede afectar a proteínas que controlan la producción de ROS (Wang et al., 2013), por ejemplo, la ya mencionada Rboh (Yun et al., 2011) o la “Peroxirredoxina II E” (PrxII E), encargada de reducir H₂O₂, hidroperóxidos y de detoxificar peroxinitritos (Romero-Puertas et al., 2007). Normalmente la actividad de las RNS repercute positivamente en la concentración de las ROS; sin embargo, bajo ciertas circunstancias, el NO puede eliminar el H₂O₂, protegiendo a las células del daño que éste produciría (Crawford and Guo, 2005).

1.5.5. Papel de las hormonas

El tipo de respuesta producida, como consecuencia de la identificación del patógeno, puede llegar a ser muy específica al basarse en una compleja interacción hormonal. Las hormonas vegetales o fitohormonas, son moléculas muy diferentes químicamente hablando; incluso dentro de cada clase existe bastante variedad, sobre todo entre especies de plantas. A diferencia de lo que ocurre con los animales, las plantas no poseen glándulas (órganos especializados en producirlas), por lo que, al igual que ocurre con el sistema inmune, todas sus células deben poder

Introducción

ser capaces de hacerlo. Además, las hormonas vegetales tienen muchos efectos, a diferencia de las animales, que están, a menudo, más especializadas en funciones concretas.

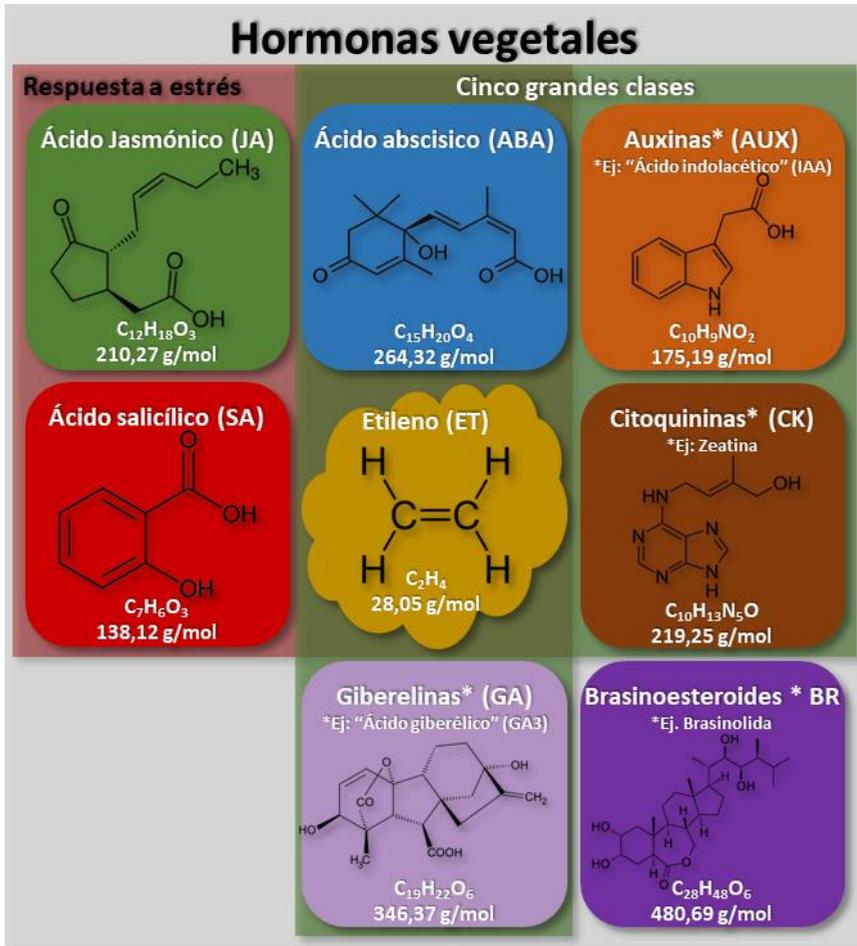


Figura 11 Clases de hormonas vegetales

Aunque existe una amplia variedad de hormonas vegetales, en la figura pueden observarse las cinco grandes clases (ABA, AUX, CK y ET) con fondo verdoso y las cuatro hormonas relacionadas con la defensa (ABA, ET, JA y SA) con fondo rojizo. El ABA y el ET pertenecen a ambos grupos, mientras que los BR (a veces considerados como la sexta gran clase de hormonas) están fuera de ambos, al igual que muchas de las otras moléculas que son consideradas hormonas.

En las plantas son responsables de regular todo tipo de procesos a lo largo de su vida, como la germinación, el crecimiento, la reproducción, la defensa y la muerte. Esto lo realizan a través de efectos directos, de su influencia en la expresión de genes y de la regulación de sus niveles de transcripción. Sus efectos se producen en

su célula de origen, o en otras, aunque pertenezcan a tipos de tejidos diferentes. Pueden transportarse a través del organismo mediante difusión, con los sistemas de transporte vascular, ya sea el xilema o el floema, o también por vía aérea, dado que algunas son volátiles. Para ejercer sus funciones, que pueden ser activadoras o inhibitorias, sus concentraciones suelen ser muy bajas (de 10^{-6} a 10^{-5} mol/L), lo que dificulta su estudio. A la hora de regular sus efectos, las plantas pueden variar la sensibilidad de ciertas células, diluirlas en el organismo, contrarrestarlas con otras hormonas, almacenarlas, inactivarlas o degradarlas.

En fisiología vegetal pueden clasificarse en dos grupos (figura 11): en primer lugar, las cinco grandes clases que contienen al ABA, las AUX, las CK, el ET y las giberelinas (GA) (Santner et al., 2009). En segundo lugar, las hormonas menores que engloban al resto, como los brasinoesteroides (BR), los péptidos, las poliaminas, las estrigolactonas... En este segundo grupo se encuentran también el SA y el JA, que, aunque en condiciones no estresantes tienen un papel menor, son capitales en respuesta a estreses bióticos y abióticos.

Dentro de los estreses bióticos, clásicamente se ha considerado al SA responsable de la respuesta a biótrosos y al JA a necrótrofos (Oliver and Solomon, 2010), pero esto se podría considerar como una simplificación excesiva (Robert-Seilaniantz et al., 2011). El ABA, y sobre todo el ET, pese a formar parte de las cinco grandes clases, son también muy importantes en estas respuestas (Pieterse et al., 2012). Normalmente, las hormonas que promueven el crecimiento tienen un impacto negativo sobre las que responden a estreses y viceversa.

1.5.5.1. Cinco grandes clases

ABA

Es un isoprenoide sintetizado en los cloroplastos por la vía del “2-C-metil-eritritol-4-fosfato” (MEP), teniendo como precursor el farnesil difosfato (FDP).

Introducción

Contrariamente a lo que indica su nombre, no causa abscisión de estructuras en casi ninguna planta.

En general se la conoce como una hormona inhibitoria, especialmente del crecimiento, por ejemplo, de los brotes. También inhibe la germinación de las semillas favoreciendo la dormancia (estado de letargo que puede durar años), en la que su concentración es alta, debiendo descender para que germinen y disminuir, más aún, con el fin de que la planta crezca. El nivel de ABA sólo volverá a subir cuando haya estructuras que deban dejar de crecer.

Sin embargo, tiene un efecto positivo en situaciones de estrés, como en el cierre de estomas en respuesta a la sequía. En esta situación, las raíces detectan la falta de agua y envían una señal a las hojas para que produzcan sus precursores. Estos se envían a las raíces que los convierten en ABA, que regresa a las hojas. El ABA interacciona con otras hormonas como el JA, con el que actúa en conjunto para activar ciertos genes, o con el ET, con una relación antagónica, siendo ambas capaces de inhibir la síntesis de la otra (Kumar et al., 2016).

El ABA también favorece la respuesta a herbívoros, probablemente debido a esto su papel en la regulación de la resistencia a patógenos es complejo, con efectos positivos y negativos (Ton et al., 2009).

- Positivos → Mutantes de *A. thaliana* deficientes en ABA son más susceptibles a los hongos *Pythium irregulare* (Adie et al., 2007) y *Alternaria brassicicola*, (Flors et al., 2008).
- Negativos → Aplicaciones exógenas de ABA sobre *Solanum lycopersicum* incrementan la infección de *B. cinerea*. Mutantes de *A. thaliana* incapaces de sintetizar o detectar ABA, son más resistentes al mismo hongo (AbuQamar et al., 2017).

Los animales y los hongos también pueden sintetizar ABA, estos últimos concretamente no lo hacen mediante la vía del MEP, sino que utilizan la del

mevalonato (MVA) (Kettner and Dörffling, 1995). Entre estos hongos se encuentran patógenos como *B. cinerea*, *Cercospora rosicola* y *Magnaporthe oryzae*.

AUXs

Son un conjunto de moléculas que tienen en común el poseer anillos aromáticos y un grupo ácido carboxílico. Se sintetizan en los ápices de los tallos y la más abundante y potente es el ácido indolacético (IAA) que, además, fue la primera en ser descubierta.

Fueron, además, las primeras hormonas en ser asociadas al crecimiento. Favorecen el aumento del tamaño celular, la ramificación, la diferenciación celular y el desarrollo de raíces. A baja concentración favorecen la elongación de tallos y cuando dejan de producirse se inicia el proceso de abscisión de hojas, u otras estructuras. Propician la regeneración de tejidos dañados, diferenciando tejidos vasculares y, asimismo, regulan el fototropismo y el gravitropismo (crecimiento de los tejidos aéreos hacia arriba y los subterráneos hacia abajo).

Son las responsables de la dominancia apical, proceso que hace que los tejidos por debajo de los brotes del tallo central crezcan menos que él. A baja concentración inhiben la senescencia de flores y frutos.

Se relacionan con las CK, junto con las que trabajan en funciones como la formación de flores o frutos, de hecho, mantienen una ratio constante con ellas. Pueden reprimir o inducir la síntesis de ET (a baja y alta concentración, respectivamente), contrarrestando una de sus principales funciones, la senescencia. Pueden también regular su propia síntesis mediante un bucle de retroalimentación positiva, siendo capaces de unirse y, como consecuencia, activar moléculas que degradan represores de unos TFs que estimulan sus genes de síntesis.

Como estimulantes del crecimiento, a priori, afectan negativamente a la defensa. Por ejemplo, su acción sobre la pared celular la hace más fácilmente penetrable, al aumentar la cantidad de expansinas (Cosgrove et al., 2002). Por otro lado, reprimen

Introducción

la síntesis de la hormona defensiva SA (Robert-Seilaniantz et al., 2011) que, a su vez, tiene capacidad para regularlas negativamente (Wang et al., 2007). Realmente su papel es complejo en la defensa, ya que se ha demostrado que mutantes en su señalización son más sensibles a *B. cinerea* (Llorente et al., 2008); además, favorecen la expresión de algunos genes de defensa de la ruta del JA (Qi et al., 2012) y son tóxicas para los microbios a alta concentración (Ludwig-Muller, 2015). Hongos y bacterias pueden sintetizarlas, bien para su propio uso, activando sus genes de patogenicidad o, como en el caso de *Agrobacterium tumefaciens* (Zupan and Zambryski, 1995), aprovechando el crecimiento vegetal que producen para generar tumores.

CKs

Moléculas derivadas de la adenina, con una cadena lateral de naturaleza aromática o isoprenoide, cuya síntesis se da mediante la ruta de la “isopentil transferasa” (IPT). Se producen en cualquier parte de la planta que esté experimentando diferenciación y división celular, pero su mayor producción ocurre en las raíces y pueden viajar a los tallos por el xilema.

Estimulan la división celular (proceso denominado citocinesis, del que deriva su nombre), la diferenciación de las raíces, la germinación y también el crecimiento de células, raíces y hojas.

Por otro lado, contrarrestan la senescencia y muchas de las actividades de las AUXs, por ejemplo, son antagónicas a la dominancia apical, produciendo el crecimiento de los brotes.

Probablemente debido a su capacidad de producir crecimiento, su papel defensivo es similar al de las AUXs (Robert-Seilaniantz et al., 2007); de hecho, pueden ser producidas por patógenos biótropos, como *Cladosporium fulvum*, *Blumeria graminis*, *Pyrenopeziza brassicae*, *Venturia inaequalis*, o *A. tumefaciens* (también benefician la formación de tumores), pero no se encuentran en necrótrofos (Fu and

Wang, 2011). En niveles moderados pueden resultar beneficiosas para los biótrofos, inhibiendo la HR (Robert-Seilaniantz et al., 2011), sin embargo, al elevarse activan las defensas mediadas por SA, a través de la proteína “no expresantes de genes relacionados con patogenicidad 1” (NPR1, Choi et al. (2010).

ET

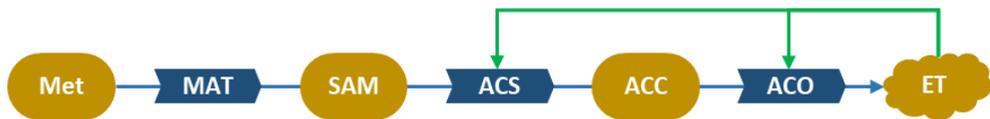


Figura 12 Esquema de la síntesis del ET

El ET es sintetizado a partir del aminoácido metionina (Met) mediante la acción de tres enzimas (MAT, ACS y ACO) (en color azul), estando las dos últimas reguladas positivamente por esta hormona (flechas verdes).

Es un alqueno, el más sencillo de ellos (C_2H_4), que se presenta en estado gaseoso y se sintetiza en todo tipo de tejidos vegetales. Su naturaleza gaseosa, e insoluble en agua, hace que las células no puedan acumularlo, teniendo que dispersarse entre células hasta que salga de la planta. Esto hace que para ser efectivo deba ser generado constantemente, lo que sucede mejor en tejidos en desarrollo y en ausencia de luz.

Es una hormona con un gran papel en todas las etapas del crecimiento normal de una planta desde la germinación, a la cual favorece. Está asociada con la senescencia de tejidos, como hojas y flores; en relación con esto, también propicia la abscisión de estructuras, al promover la degradación de la pared celular en los tejidos de unión al tallo. Es el responsable de que las células dejen de crecer cuando se topan con un obstáculo, lo que explica la capacidad de las raíces para introducirse en huecos. Tiene otros efectos en las raíces, como favorecer el crecimiento de pelos radiculares y de raíces adventicias (en condiciones de inundación). También permite que los troncos se endurezcan cuando son expuestos a estrés mecánico y favorece la maduración de los frutos, una vez las semillas acaban de formarse.

Introducción

Es de vital importancia en la respuesta a estreses bióticos y abióticos; en el caso concreto de los bióticos, como los producidos por patógenos, su papel es controvertido debido a que parece tener acciones opuestas, dependiendo del patógeno (van Loon et al., 2006). De hecho, puede agravar la enfermedad si se aplica tras la infección o ser inocuo o beneficioso, si se añade antes (Shakeel et al., 2013). Esto refleja la importancia de su regulación espacio-temporal.

La ruta de síntesis del ET (figura 12) está muy conservada en el mundo vegetal. Se denomina ciclo de Yang y comienza con el aminoácido metionina, que se condensa con un “trifosfato de adenosina” (ATP) para formar “S-adenosil metionina” (SAM), en una reacción catalizada por una enzima llamada “metionina adenosil transferasa” (MAT). SAM es entonces convertido en “ácido 1-aminociclopropano1-carboxílico” (ACC) por la enzima “ACC sintasa” (ACS). Este intermediario es importante pues es el último antes de la conversión final a ET y, tanto la enzima que lo produce como la que lo convierte en ET, llamada “oxidasa de ACC” (ACO), están reguladas por la hormona (Van de Poel and Van Der Straeten, 2014).

La forma en la que el ET es detectado y produce la expresión de genes de su ruta no se conoce completamente. No obstante, existen dos mecanismos que, activamente, reprimen la respuesta al ET en su ausencia (figura 13).

En primer lugar, en el retículo endoplasmático al menos cinco proteínas transmembrana (ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 y ERS2 (Shakeel et al., 2013)) son capaces de detectar la presencia del ET. En el caso de “responsable de etileno 1” (ETR1), la proteína está unida a otra llamada “triple responsable constitutiva 1” (CTR1), que parece fosforilar a otra proteína denominada “insensible al etileno 2” (EIN2), lo cual la mantiene secuestrada en el retículo endoplasmático.

En segundo lugar, las proteínas “insensible al etileno 3” (EIN3) y “similar a EIN3 1” (EIL1) son TFs que sufren una constante ubiquitinación por otras proteínas llamadas “caja F de unión a EIN3 1 y 2” (EBF1 y EBF2), produciendo su degradación en el

proteasoma nuclear. La ubiquitinación se da gracias a la proteína “skp, culina y caja F^{EBF1/2}” (SCF^{EBF1/2}), que interactúa con EBF1 y EBF2 (Van der Does et al., 2013).

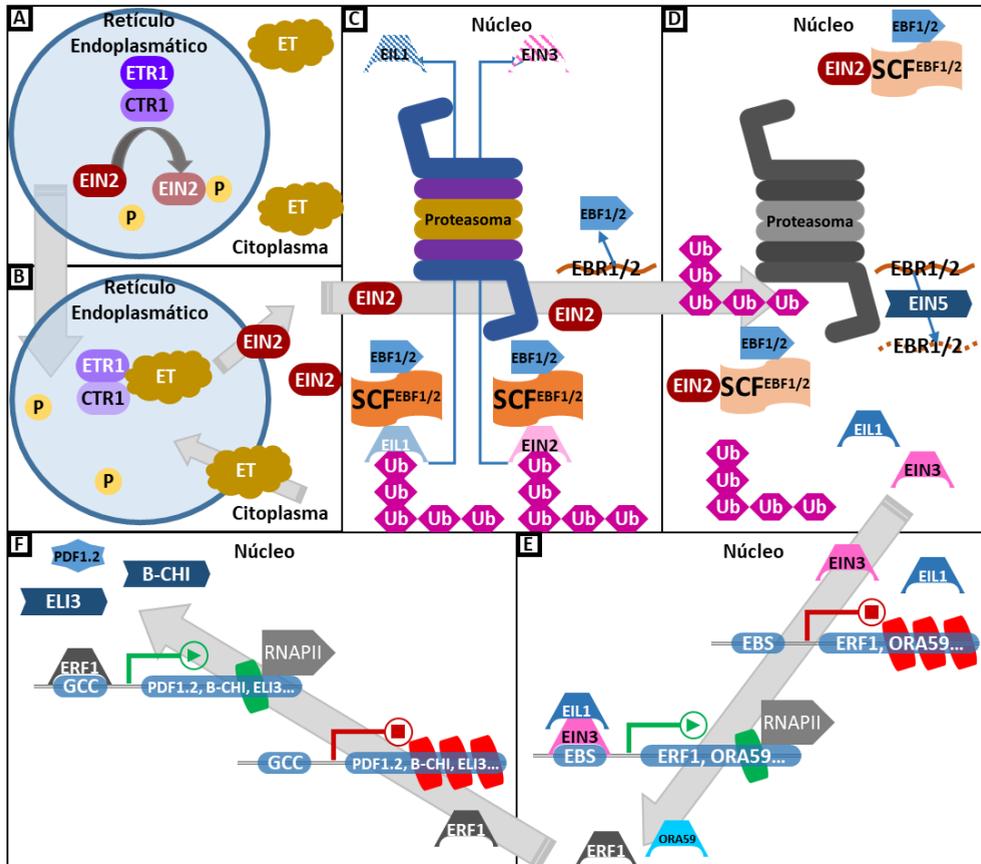


Figura 13 Ruta de señalización del ET

(A) ETR1 y CTR1 fosforilan, en ausencia de ET, a EIN2 dentro del retículo endoplasmático, impidiendo su salida. Cuando la hormona entra en el orgánulo (B), interacciona con estas proteínas que cesan su actividad y EIN2 puede salir y viajar hasta el núcleo. (C) Allí, el complejo proteico SCF^{EBF1/2} se encuentra unido a la proteína EBF1/2 (cuya expresión se da de forma continua), que lo mantiene activo, por lo que puede realizar su función, ubiquitinar a los TFs EIL1 y EIN2, que, como consecuencia, serán degradados vía proteasoma. (D) Al unirse EIN2 al complejo proteico SCF^{EBF1/2}, este se desactiva y, por ende, los TFs dejan de ser eliminados. Paralelamente, se incrementa la producción de la proteína EIN5, que degrada el mRNA de EBR1/2, lo que causa una caída en el nivel de esta proteína. (E) Los TFs EIL1 y EIN3 pueden unirse a los promotores de sus genes diana, que a su vez codifican para otros TFs como ERF1, (F) que se une al promotor de genes implicados en la defensa como *PDF1.2*.

Cuando el ET está presente se une a ETR1, que detiene la actividad de CTR1, por lo que se interrumpe la fosforilación de EIN2. Esto produce que se fragmente y su extremo C terminal se transloque al núcleo. Una vez allí, posiblemente con moléculas intermediarias, detiene la ubiquitinación de EIN3 y EIL1. Además, se

Introducción

produce un aumento de la síntesis de “insensible a etileno 5” (EIN5), una exorribonucleasa 5'-3', que degrada los niveles citoplasmáticos del mRNA de EBF1 y EBF2.

Estos procesos permiten que aumente la presencia de EIN3 y EIL1, los cuales, mediante la interacción con el elemento EBS (GAGGAA) del promotor, activan genes de la ruta del ET como “factor responsable del etileno 1” (ERF1). El producto de este gen es, a su vez, otro TF; pero, a diferencia de los anteriores, se une a la caja GCC (GCCGCC) del promotor de los genes a inducir, como por ejemplo “defensina de plantas 1.2” (PDF1.2), “quitinasa básica” (B-CHI) y “gen activado por elicitador 3” (ELI3, Cheng et al. (2013).

El ET, al igual que las AUXs y las CKs, es capaz de inducir su producción ((figura 12) en su caso, por ser un gas, lo puede hacer a distancia) y tiene efectos sobre varias hormonas. Por ejemplo, EIN2 regula el ABA y las hormonas relacionadas con el estrés y, también, es capaz de reducir los niveles de GAs bioactivas y de interferir con el transporte de las AUXs, si están muy concentradas.

GAs

Forman una enorme familia de hormonas que, químicamente son ácidos diterpénicos sintetizados por la vía terpenoide en el cloroplasto, el cual abandonan para madurar en el retículo endoplasmático y el citoplasma. Ejemplos de GAs son la “giberelina A1” (GA1) y el “ácido giberélico” (GA3). *Gibberella fujikuroi*, hongo epónimo de estas hormonas, es capaz de producirlas al igual que otros miembros del mismo reino y varias bacterias (Hedden and Sponsel, 2015). La activación de los genes de su ruta se produce porque se unen y, posteriormente, producen la degradación de las proteínas DELLA, las cuales actúan constitutivamente reprimiendo dichos genes (Harberd, 2003).

Provocan florecimiento, división celular, elongación de tallos (efecto antagónico al ABA) y de tubos de polen. Adicionalmente, son muy importantes en la germinación; cuando las semillas absorben agua las producen, estimulando la movilización de las reservas, gracias a la síntesis de enzimas.

Aunque las GAs también promuevan el crecimiento, en respuestas defensivas parecen tener un papel opuesto a las AUXs y CKs. Aumentando los efectos de las GAs, mediante la mutación de las proteínas DELLA, se incrementa la resistencia a biótrofos como *P. syringae*, a través de la potenciación de la ruta del SA. Simultáneamente se incrementa la susceptibilidad a necrótrofos, como *A. brassicicola*. Estos datos parecen indicar que, las proteínas DELLA, tienen un papel importante en el equilibrio entre las tres principales hormonas defensivas (Navarro et al., 2008).

1.5.5.2. SA

El ácido salicílico (SA; ácido 2-hidroxibenzoico) es un compuesto fenólico, regulador de muchos procesos vegetales como el crecimiento, la termogénesis o la respuesta a estreses, tanto bióticos como abióticos (Dempsey et al., 1999). Del mismo modo que su derivado, la aspirina (ácido acetilsalicílico), se utiliza con propósitos médicos. Está tradicionalmente relacionado con la respuesta a patógenos biótrofos (Glazebrook, 2005).

Tras la detección del patógeno se produce un aumento de los niveles de SA dependiente del Ca^{2+} , cuya acumulación se produce en un paso previo. El incremento de la concentración de este ion es detectado en el cloroplasto por las “proteínas receptoras sensibles a Ca” (CAS). Es en este mismo orgánulo donde se produce la síntesis del SA mediante las rutas del “isocorismato” (IC) y de la “fenilalanina amonio liasa” (PAL (figura 14)), necesitando ambas corismato para funcionar (Wildermuth et al., 2001, Dempsey and Klessig, 2012).

Introducción

- IC → Esta ruta es la principal responsable de la producción de SA en respuesta a patógenos (Shine et al., 2016). Utiliza el gen codificante de la “isocorismato sintasa” (ICS), con el fin de catalizar la conversión del corismato en isocorismato. Sin embargo, a diferencia de las bacterias, en plantas no se ha identificado aún el gen de la “isocorismato piruvato liasa” (IPL), enzima que convertiría el isocorismato en SA y piruvato.
- PAL → Por esta vía la fenilalanina se convierte en ácido transcinámico, pasando luego a SA a través de un compuesto intermediario llamado ácido ortocoumárico o ácido benzoico, dependiendo de la especie.

Pese a que aún falta por identificar un gen de su ruta de síntesis, se conoce mejor la regulación de la ruta del IC, en la que interviene la proteína “susceptibilidad mejorada a la enfermedad 1” (EDS1). Esta forma complejos en el núcleo y en el citoplasma con varias proteínas asociadas a la resistencia, como “deficiente 4 de fitoalexina” (PAD4). Durante la fase defensiva ETI se incrementa rápidamente el nivel nuclear de EDS1, lo que se corresponde con un incremento de su propia expresión, así como de PAD4 y de “isocorismato sintasa 1” (ICS1). Por otro lado, los represores transcripcionales de ICS1, “insensible a etileno 3” (EIN3) y “similar a insensible a etileno, 1” (EIL1), son TFs que regulan la ruta de señalización del etileno y del JA, por lo que podrían mediar en el diálogo entre estas rutas de señalización (Dempsey et al., 2011).

El SA pasa del cloroplasto al citoplasma mediante el transportador “mejorador 5 de la susceptibilidad a enfermedad” (ESD5), tras lo cual puede ser transformado en otras moléculas, entre las que destacan:

- SAG → “2-O-β-D-glicósido de ácido salicílico”, producto de la glicosilación en su grupo hidroxilo mediante la acción de la enzima “transferasa 74 F1 de UDP-glicosil” (UGT74F1). Se transporta y almacena en la vacuola y puede ser hidrolizado, liberando el SA, tras un ataque de patógenos.

- MeSA → “Metil salicilato”, producto de la metilación del SA catalizada por la enzima “superfamilia de proteínas metiltransferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina” (BSMT1). Es un compuesto volátil que permite su movimiento a través del floema. Sale de la zona infectada y al llegar a otros tejidos, se libera SA que activa la defensa SAR (Shah et al., 2014).

Otras modificaciones menores son la esterificación, la hidroxilación o su conjugación con aminoácidos, como el aspartato (SA-Asp). En general, las modificaciones del SA permiten inactivarlo temporalmente y poder reactivarlo con facilidad y rapidez. De mantenerlo activo en un nivel alto, la planta consumiría demasiados recursos en las defensas, en detrimento del crecimiento y la reproducción.

Una vez los niveles de SA han aumentado, su señal debe poder transducirse al núcleo para lograr activar los genes de su ruta de señalización (figura 14). De esta tarea parecen ser responsables los genes de la familia “no expresantes de genes relacionados con patogenicidad” (NPRs). Entre ellos destaca NPR1, una proteína que se mantiene en forma de oligómero en el citoplasma en condiciones normales. El SA activa a la enzima “tiorredoxina h3 o 5” (TRXh3 o TRXh5 respectivamente), la cual a su vez reduce al oligómero NPR1 liberando sus monómeros, que se translocan al núcleo donde interactúan directamente con TFs de la familia TGA y con la “proteína interactuante con NPR1/NIM-1” (NIMIN). Los TGAs se unen a la sucesión de nucleótidos “TGACG”, de la denominada “secuencia de activación 1” (as-1), del promotor de genes como “relacionado con patogénesis 1” *PR1*, induciendo su expresión. También se induce la transcripción de TFs tipo WRKY, reguladores de varios genes inmunitarios (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013). Hay zonas de unión para estos TFs en el promotor de *ICS1* y *NPR1*, (las denominadas “cajas W” que contienen una secuencia “TGAC”), por lo que la señalización de SA presenta una retroalimentación positiva (Klessig et al., 2016).

Introducción

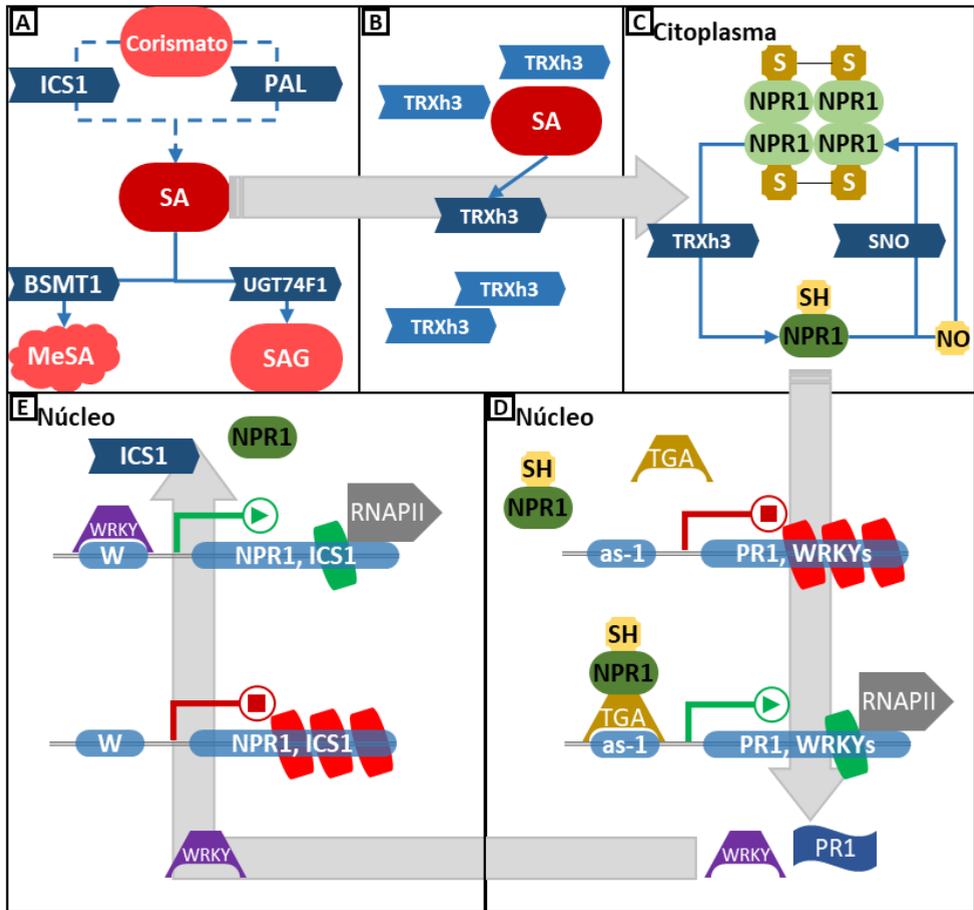


Figura 14 Ruta de señalización del SA

A) A partir del corismato, mediante enzimas como ICS1 y PAL, se sintetiza el SA que puede ser transformado en MeSA o SAG entre otras. El SA es la forma activa y (B) es capaz de activar a la enzima TRXh3, la cual, a su vez (C) reduce al oligómero de NPR1, liberando sus unidades que, a menos que vuelvan a oxidarse, (D) viajarán al núcleo donde se unirán a los TFs TGA, activándolos y permitiéndoles unirse al promotor de genes de defensa como PR1 y otros TFs, como los WRKY. (E) Los WRKY se unen, a su vez, a los promotores de sus genes diana, entre los que se encuentra el que codifica al propio *NPR1* o *ICS1*, por lo que la señal mediada por SA es capaz de retroalimentarse positivamente.

Para impedir la inducción inmunitaria inadecuada, además de su translocación al núcleo, NPR1 está regulado de otras formas (Kuai et al., 2015):

- La unión del SA a NPR1 es necesaria para activarlo. Cuando el SA está presente interactúa con NPR1 y permite que su zona activa quede expuesta, produciendo un cambio conformacional que la libera de otra zona de la proteína que la mantenía bloqueada, llamada “trans activadora” (TA).

- El proteasoma del núcleo puede degradar NPR1. Si los niveles de SA son extremos la hormona interacciona con una de las dos proteínas de la familia NPR que, a su vez, interaccionan con NPR1 produciendo su ubiquitinación y, como consecuencia, su degradación en el proteasoma. Si los niveles de SA son muy bajos, lo hará NPR4 y si son muy altos lo hará NPR3 (figura15).
- El glutatión (SNO) puede reoxidar al NPR1 libre en el citoplasma, lo que causará que vuelva a oligomerizarse (Tada et al., 2008).
- El NO produce la S-nitrosilación del NPR1 libre, lo que favorece su oligomerización (Yu et al., 2014).

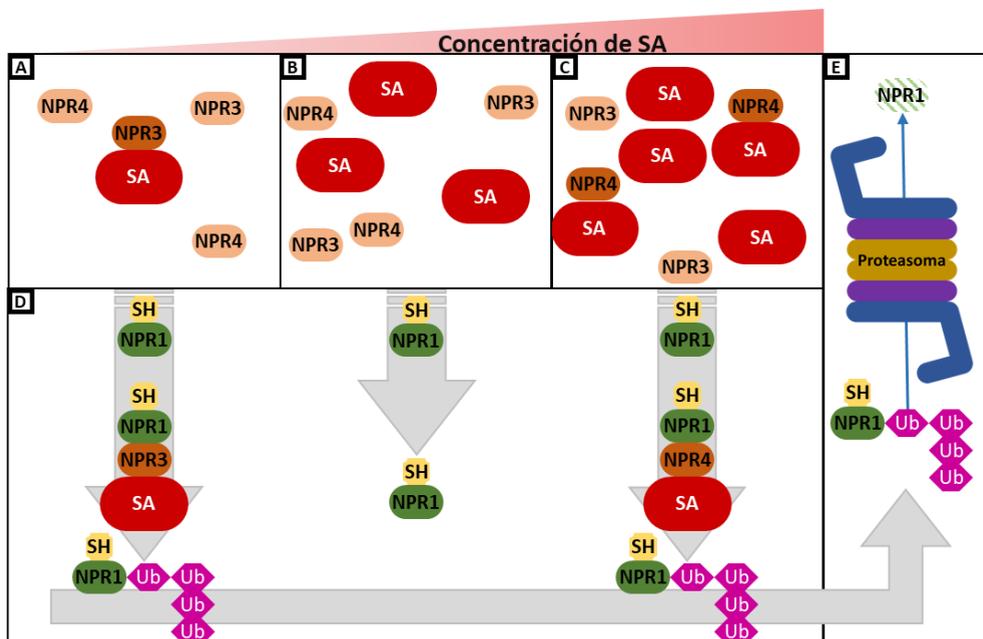


Figura 15 Degradación de NPR1 mediada por NPR3 y NPR4

(A) A baja concentración el SA se une a la proteína NPR3, (C) a alta a NPR4, mientras que a una intermedia (B) permanece libre. (D) En caso de unirse a cualquiera de estas proteínas, NPR1 se unirá al complejo formado y será ubiquitinado y (E) degradado vía proteasoma.

Existen también respuestas inmunitarias activadas por SA que no son dependientes de NPR1 y, probablemente, NPR1 no tenga efectos en las funciones del SA distintas a las defensivas. En estos casos se han propuesto una serie de “proteínas de unión a SA” (SABPs (Klessig et al., 2016)).

Introducción

1.5.5.3. JA

El ácido jasmónico (JA; ácido (1R, 2R)-3-oxo-2-(2Z)-2-pentenil-ciclopentanoacético), denominación que proviene de su descubrimiento en la planta *Jasmonium grandiflorum*, es una hormona lipídica de la familia de las oxilipinas, que también puede ser sintetizada por hongos como *Lasiodiplodia theobromae* (Tsukada et al., 2010). Se encarga de regular procesos como el crecimiento, la reproducción, la acumulación de proteínas de almacenamiento y también tiene un papel en la germinación de semillas y en el crecimiento de raíces. Es especialmente importante en la resistencia a estreses abióticos, como condiciones ambientales difíciles o heridas; y bióticos, como la defensa frente a herbívoros y patógenos. También está implicado en la relación con simbioses (Wasternack et al., 2012). En la respuesta a microorganismos patógenos es especialmente reconocido su papel en la activación de las defensas contra necrófitos (Attaran et al., 2009); en ocasiones en detrimento de las defensas contra biófitos, clásicamente atribuidas a la ruta del SA. Este hecho es aprovechado por algunos patógenos, como la bacteria hemibiótrófa *P. syringae* que inyecta en las células del hospedador la molécula coronatina, un isómero estructural de un derivado bioactivo del JA, desequilibrando el balance hormonal, decantándolo hacia la ruta del JA (Geng et al., 2014).

Sintetizada a través de la vía octadecanoide (Weber, 2002), esta hormona deriva de lípidos de membrana y tiene un precursor intermediario importante, el “ácido cis-(+)-12-oxo-fitodienoico” (OPDA), encargado de viajar del cloroplasto al peroxisoma, donde será transformado por la enzima “reductasa 3 de 12-oxofitodienoato” (OPR3) en “ácido oxo-2-(2'-[Z]-pentenil)ciclopentano-1-octanoico” (OPC-8:0) y a través de varios pasos más, se concluirá la síntesis (Satoh et al., 2014). El JA no es la forma activa de la hormona, ya que este papel lo desempeña el “jasmonato isoleucina” (JA-Ile). Para convertirse en esta molécula el

JA debe salir al citoplasma y conjugarse con el aminoácido isoleucina, en un proceso catalizado por la enzima “resistente al jasmonato 1” (JAR1; Howe et al. (2018).

Para impedir la actividad del JA-Ile la planta puede regular tanto su síntesis, como la del propio JA, o puede transformar ambos en formas inactivas mediante:

- **Conjugación** con otros aminoácidos como fenilalanina, leucina o valina (JA-Phe, JA-Leu o JA-Val, respectivamente), reacción que se da con el JA, pero no con el JA-Ile.
- **Hidroxilación** en varias posiciones de ambas moléculas, dando lugar al ácido 6-hidroxijasmónico (6-OH-JA) o el ácido 12-hidroxijasmónico isoleucina (12-OH-JA-Ile).
- **Glucosilación** de ambos compuestos o sus formas modificadas, como el 12-OH-JA-Ile (12-O-JA-Ile-Glc), que podría almacenarse en la vacuola. Alternativamente, el 12-OH-JA-Ile podría también oxidarse a 12-COOH-JA-Ile y luego conjugarse con la “coenzima A” (CoA), formando JA-Ile-SCoA que, teóricamente, se dirigiría al peroxisoma.
- **Unión con ACC**, el precursor del ET, formando JA-ACC, lo cual mantiene a ambos secuestrados e inactivos.
- **Metilación** tanto de JA como de JA-Ile, aunque la más importante es la que se produce sobre el primero formando MeJA, reacción catalizada por la enzima “metiltransferasa de carboxilo del JA” (JMT). Esta molécula, si bien es inactiva, es crucial por su naturaleza volátil que le permite escapar de la célula e incluso de la planta, teniendo un papel de señalizador sistémico y alertador de plantas vecinas (en las que tendrá que pasar a JA-Ile para tener efecto).

La regulación génica mediante JA es similar a la de las AUXs ya que, en ambos casos, cuando su concentración es baja existen complejos que reprimen la expresión de genes de sus rutas de señalización. Al aumentar su presencia son detectadas por una proteína que favorece la ubiquitinación de los complejos represores, que son degradados en el proteasoma.

Introducción

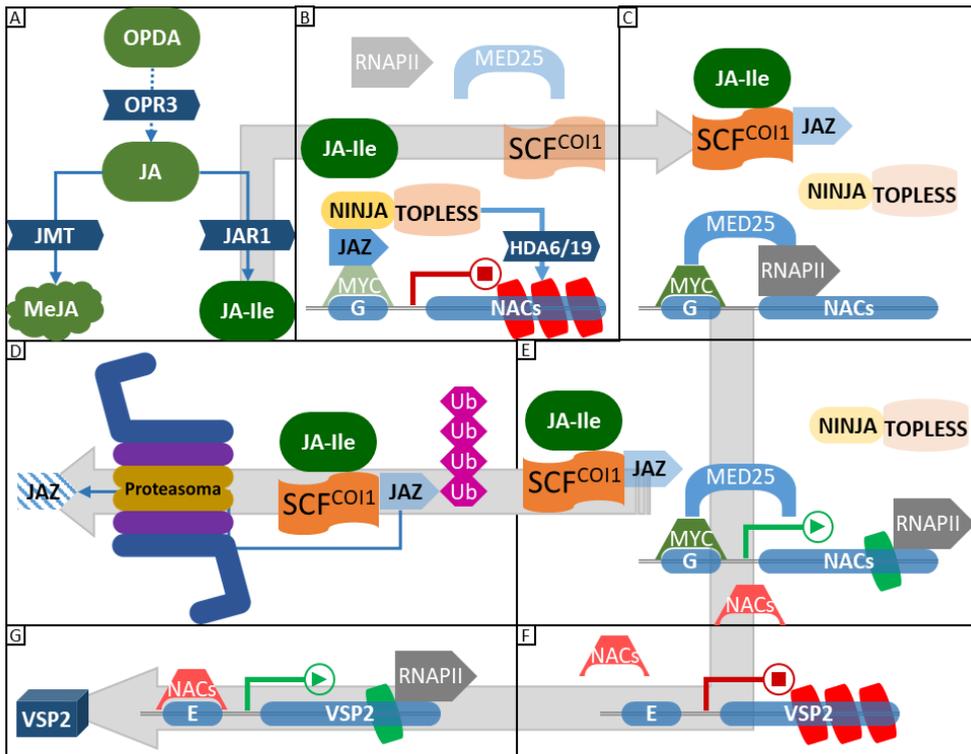


Figura 16 Ejemplo de la ruta de señalización del JA con VSP2

(A) Proveniente de ácidos grasos de membrana, el OPDA es transformado por varias enzimas, entre ellas OPR3, en JA. Entre otras, esta hormona, a su vez, puede convertirse en MeJA, su forma volátil, o en JA-Ile, su forma activa. (B) En el núcleo, la proteína JAZ se encuentra unida al TF MYC, bloqueándolo, además a JAZ se unen las proteínas NINJA y TOPLESS, lo cual produce la desacetilación de las histonas del gen, manteniendo la cromatina en un estado silencioso. (C) El complejo proteico SCF^{COI1} se encuentra inactivo hasta que llega el JA-Ile, que se une a él; el SCF^{COI1} activo, se une entonces a JAZ, haciendo que NINJA y TOPLESS se separen del gen y dejando a MYC libre del complejo. (D) JAZ es entonces ubiquitinado y, como consecuencia, degradado vía proteosoma, mientras que (E) a MYC se le une MED25, proteína necesaria para formar el complejo de iniciación de la RNAPII y, por ende, la transcripción de genes como los TFs NACs. (F) Estos TFs, al sintetizarse, viajan a los promotores de sus genes diana como VSP2 (G) provocando su expresión.

Si el JA logra convertirse en JA-Ile y éste permanece estable, podrá producir su efecto sobre la expresión génica con la participación de varias moléculas (figura 16):

- SCF^{COI1} → “Skp, culina y caja F^{insensible a la coronatina 1}”, es un complejo proteico con actividad ligasa E3 de ubiquitina. Interacciona con JA-Ile y ambas, a continuación, se unen al correpresor JAZ y SCF^{COI1} produce su ubiquitinación.
- JAZ → “Dominio ZIM de JA”, es una familia de proteínas correpresoras, entre las que destacan JAZ1 y JAZ6. JAZ forma parte del complejo de represión, siendo responsable de su desmantelamiento, al ser ubiquitinada y degradada en el

proteasoma. Interactúa con los genes mediante el TF de la familia MYC (nombre proveniente del virus de la mielocitomatosis).

- TOPLESS y TPRs → “Correpressor tipo 1 Groucho/Tup1” y “relacionadas con TOPLESS” respectivamente, son proteínas que también intervienen en la ruta de las AUXs. Forman parte del complejo represor y pueden reclutar enzimas modificadoras de histonas, como “desacetilasa 6 y 19 de histona” (HDA6 y HDA19 respectivamente), que producirían una conformación represora de la cromatina.
- NINJA → “Nuevo interactador de JAZ”, es la tercera proteína del complejo represor encargada de adaptar JAZ con TOPLESS.
- MYC → Familia de proteínas compuesta por MYC2, MYC3 y MYC4. Se unen a la caja G, una secuencia de nucleótidos localizada en el promotor de genes de la ruta del JA. Su función es la de reclutamiento de los componentes de la maquinaria de transcripción y los tres tienen actividad sumatoria (si falta uno, el efecto se mantendrá, pero con menor intensidad). Forman homo o heteropolímeros, y la abundancia de cada uno de ellos depende del tipo de tejido. MYC2, por su parte, tiene actividad represora sobre el correpressor JAZ, debido a lo cual se forma un bucle de retroalimentación negativa.
 - ERF → Familia de proteínas también encontradas en la ruta de señalización del ET. Realmente el JA tiene dos ramas en su ruta, la del MYC (figura 18), más estudiada y comúnmente asociada a heridas y herbívoros y, la del ERF, que se asocia más a patógenos necrótrofos y requiere la acción conjunta de JA y ET.
- MED25 → “Subunidad mediadora 25” es un coactivador transcripcional que se encarga de acoplar las proteínas MYC con la “polimerasa de RNA II” (RNAPII), encargada de transcribir los genes.

El complejo represor de JAZ, por tanto, actuaría al menos de dos formas. Por una parte, impidiendo la interacción de MYC2 (o ERF) con la maquinaria transcripcional y, por otra, remodelando la cromatina para hacerla menos permisiva a la

Introducción

transcripción. Entre los genes activados por esta vía existen TFs de la familia “NAM, ATAF y CUC” (NAC) que se unen a la caja E de los promotores (secuencia CATGTG) de genes efectores, entre los que destaca en la bibliografía la “proteína de almacenamiento vegetativo 2” (VSP2 (Kazan and Manners, 2013)).

El OPDA, además de ser un precursor biosintético del JA, puede activar genes de forma similar al mismo pero también sin necesidad de interactuar con SCF^{CO11} (Park et al., 2013). Por ejemplo, el gen PDF1.2, a través de TFs como ERF5 (Ribot et al., 2008). Como molécula transitoria en la ruta de síntesis del JA es una oxilipina, pero, a diferencia de este, también se le considera una “especie reactiva electrófila” (RES). Una RES es una molécula que tiene gran avidez por los pares de electrones, por lo que se ha propuesto que las oxilipinas RES pueden activar un conjunto de genes de defensa distintos a los dependientes de JA. Concretamente, OPDA induce la expresión de genes relacionados con detoxificación celular, respuesta a estrés y metabolismo secundario; siendo un 30% de estos genes dependientes de TFs de la clase TGA (Eckardt, 2008).

1.5.5.4. Diálogo ente rutas hormonales

ET y JA

Ambas hormonas están estrechamente relacionadas y tienden a aumentar su concentración mutuamente. El ET podría regular la síntesis del JA a través de la inducción del gen “sintasa de óxido de aleno” (AOS, (O'Donnell et al., 1996)), que codifica una enzima de su ruta de síntesis. Análogamente, el JA regula la síntesis de ET puesto que el MeJA induce la expresión del gen de la enzima ACO, que forma parte de la ruta de síntesis del ET (Hudgins and Franceschi, 2004).

Además, pueden corregular genes. El promotor de algunos genes dependientes de la ruta del JA, en lugar de tener una caja G a la que se unen los TFs MYC, posee una caja GCC a la que se une otro llamado “proteína 59 sensible a octadecanoide, con

dominio AP2/ERF de *Arabidopsis*” (ORA59). Pero algunos de estos genes, como PDF1.2 (que posee dos cajas GCC), pueden también unir a sus promotores el TF ERF1, más comúnmente asociado a la ruta del ET (figura 17). ORA59 y ERF1 son TFs cuyo aumento provoca mayor resistencia frente a *B. cinerea* (Lorenzo et al., 2003). Su transcripción depende de otros TFs, concretamente EIN3 y EIL1, cuya concentración se ve favorecida por la presencia de ET (figura 13). Por otro lado, aunque EIN3 y EIL1 estén presentes y se unan a los promotores de *ORA59* y *ERF1*, la acción del JA es necesaria para que se expresen. Esto es debido a que el complejo represor JAZ, aparte de a MYC, también puede unirse a EIN3 y EIL1, impidiendo que la maquinaria transcripcional interactúe con ellos y se dé la transcripción. Adicionalmente, MYC2 y EIN3 interactúan suprimiendo su función mutuamente (Song et al., 2013), por lo que los genes expresados en la ruta del JA pueden variar si el ET está presente. Por ejemplo, *VSP2* verá su transcripción inhibida a altas concentraciones de ET, mientras que la de *PDF1.2* aumentará.

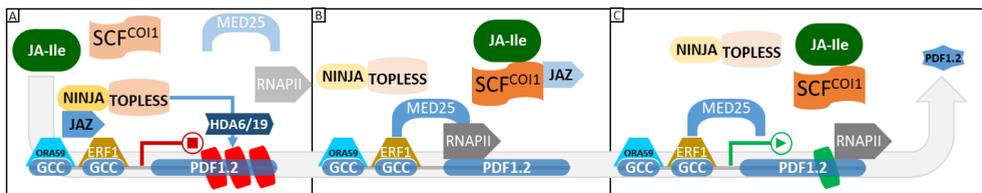


Figura 17 Inducción de PDF1.2

(A) Además de MYC, existen variantes de JAZ que se unen a otros TFs como ORA59 y ERF1 (B) cuando el JA-Ile se une al complejo SCF^{COI1}, este se une al JAZ liberando a estos TFs que pueden unir entonces a MED25 y (C) activar la transcripción de genes como PDF1.2.

El SA puede establecer un diálogo con estas dos hormonas a nivel transcripcional, puesto que parece utilizar las cajas GCC como dianas para sus efectos represores (Van der Does et al., 2013).

SA y JA

La interacción más estudiada es la que se da entre las rutas del SA y el JA (Koorneef and Pieterse, 2008). En general, los organismos biótrofos son más sensibles a las respuestas inducibles por SA, mientras que los que se benefician de la muerte

Introducción

celular (herbívoros y microorganismo necrótrofos) lo son a las inducibles por JA. Por otro lado, las respuestas generales a patógenos y a heridas (que también requieren de la participación de JA) parecen influirse negativamente; de igual modo, el silenciamiento de la enzima PAL (síntesis de SA) disminuye la SAR pero aumenta la respuesta a herbívoros, ocurriendo lo contrario al sobreexpresarla (Turner et al., 2002). El SA y el JA parecen, por tanto, tener un efecto negativo mutuo, hecho que se ha demostrado de diversas formas. Las plantas NahG de *A. thaliana*, que no pueden acumular SA, así como las mutantes en el gen *NPR1*, incapaces de responder a SA, muestran mayores niveles de JA y de los productos de los genes de su ruta de señalización (Spoel et al., 2003).

La interacción puede estudiarse desde el punto de vista de ambas rutas:

1. $JA > SA \rightarrow$ Es la interacción mejor comprendida. El nexo de unión en este caso es *MYC2*, TF que regula ambas rutas de señalización. Tiene un efecto activador en la ruta del JA, pero también de inductor de la expresión de los TFs las “proteínas con dominio NAC 19, 55 y 72” (ANAC019, ANAC055 y ANAC072 respectivamente). Estos factores se unirán a los promotores de genes de SA, como *ICS1*, causando represión transcripcional y de *BSMT1*; lo cual, lleva a una disminución de los niveles de SA (Zheng et al., 2012).
2. $SA > JA \rightarrow$ Los mecanismos del SA para disminuir los niveles de JA son menos conocidos, pero la proteína responsable parece ser *NPR1*; existen indicios de que esta función ocurre en el citoplasma (Spoel et al., 2003).

Los patógenos aprovechan esta interacción negativa para sus necesidades específicas. Los biótrosos inducen la ruta del JA y los necrótrofos la del SA (Kazan and Lyons, 2014). Cabe citar como ejemplos:

1. La bacteria hemibiótrofa *P. syringae*. Es el modelo más conocido de la utilización de la ruta del JA. Por un lado, degrada el complejo represor JAZ mediante dos efectores: HopZ1a que acetila JAZ (Jiang et al., 2013) y HopX1 con actividad proteasa, que degrada directamente las proteínas del complejo

(Gimenez-Ibanez et al., 2014). Por otro lado, segrega coronatina, un homólogo estructural del JA-Ile (Brooks et al., 2005).

2. El hongo necrótrofo *B. cinerea*. Secreta un “exopolisacárido” (EPS) no proteico, denominado β -(1,3)(1,6)-D-glucano. Este EPS activa las defensas mediadas por SA, inhibiendo los genes de la ruta del JA, incluyendo los “inhibidores de proteasa de serina I y II” (PI I y PI II, respectivamente), necesarios para la resistencia de la planta frente al necrótrofo. En plantas con NPR1 silenciado, la aplicación de EPS no tiene efecto, por lo que esta proteína parece mediar en el proceso (El Oirdi et al., 2011).

ABA y las tres hormonas defensivas (ET, SA y JA)

El ABA puede empeorar o mejorar las respuestas a patógenos, esto implica una relación compleja con la defensa y, por lo tanto, con sus tres hormonas principales. La mayor sensibilidad que su incremento produce frente al necrótrofo *B. cinerea*, podría deberse a una acción positiva sobre los efectos del SA, como la inducción de genes PR, la acumulación de ROS (Asselbergh et al., 2007) o el aumento de la permeabilidad de la cutícula (L'Haridon et al., 2011). Por otra parte, la mejor respuesta que su presencia otorga a otros hongos podría deberse a que aumenta los niveles de NO (Sivakumaran et al., 2016).

En otro orden de cosas, el ABA comparte el TF MYC2 con el JA (Ton et al., 2009) por lo que un aumento de ABA, puede favorecer a la rama del MYC en detrimento de la del ERF, en la ruta de señalización de JA. Como consecuencia, hacer esto haría que la planta montara una defensa preparada para herbívoros en lugar de un patógeno necrótrofo. Por otro lado, el ET tiene un efecto negativo sobre las proteínas fosfatasas “insensible a ABA 1 y 2” (ABI1 y ABI2 respectivamente), que son reguladores positivos de la ruta del ABA (Asselbergh et al., 2008), esto parece indicar que, ambas hormonas, tienen efectos antagónicos entre sí y con la regulación de las rutas del JA.

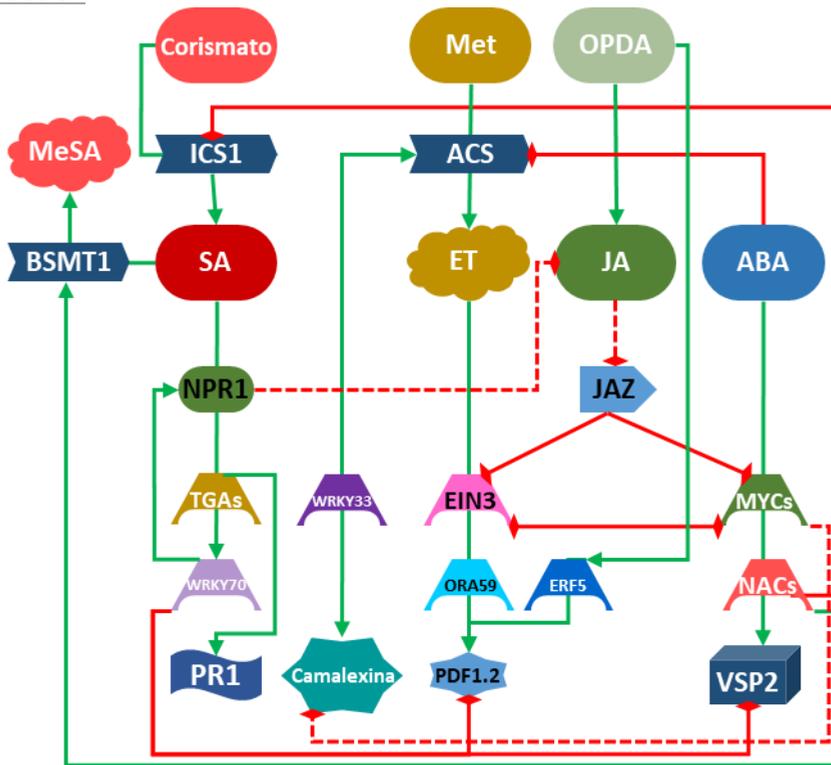


Figura 18 Interacción de cuatro hormonas

La ruta del JA tiene dos ramificaciones mutuamente excluyentes, la de los ERF (representada por ORA59 en la figura), promovida por el ET y la de los MYC, promovida por el ABA. En el caso de esta última, se producen TFs de la familia NAC que tienen un efecto antagónico sobre la ruta del SA y la síntesis de la camalexina. El SA a su vez, tiene, a través de la proteína NPR1, efectos negativos sobre la ruta del JA y, a través del TF WRKY70 la capacidad de inhibir la síntesis de sus productos. A parte del efecto negativo que tiene sobre la síntesis de la camalexina el ABA, la producción de esta fitoalexina es en gran medida independiente de las hormonas, pues es el TF WRKY33, el que la regula. Este TF tiene también efectos positivos sobre la síntesis del ET.

1.5.6. Papel de otras moléculas

Existen muchas otras hormonas y moléculas fuera de las clasificaciones generales, aunque su presencia es menor, por ejemplo:

BRs

A veces considerados como la 6ª gran clase de hormonas, los BRs son reguladores del crecimiento de naturaleza polihidroxiesteroidea; favorecen la elongación, el

floreCIMIENTO, la germinación y la división celular. Ayudan a proteger a algunas plantas durante los estreses abióticos, como frío y sequía (Clouse and Sasse, 1998). También tienen un papel defensivo frente a patógenos (Song et al., 2017). Sus efectos son complejos y, como en otros casos, varían en función del patógeno, seguramente debido a su interacción con otras hormonas (Nafisi et al., 2015). Los BR son sintetizados a partir del campesterol y se cree que esto ocurre en todos los tejidos de la planta (Fujioka and Yokota, 2003). Sus efectos positivos en la elongación y la división celular son realizadas en cooperación con las AUXs (Nemhauser et al., 2004).

Pequeños péptidos

Pueden funcionar como hormonas, estando involucrados en la señalización entre células, con papeles en el crecimiento y la defensa. Un ejemplo importante es la sistemina, descubierta originalmente en *S. lycopersicum*, aunque, a posteriori, se han encontrado péptidos de acción similar en *A. thaliana* (conocidos como “péptidos elicitores de la planta *A. thaliana*” (PEP1)). Están implicados en la defensa, especialmente contra herbívoros, pudiendo activar defensinas y promoviendo la síntesis de proteínas antinutricionales, señalizadoras y con actividad proteasa (Ryan, 2000). Estas actividades afectan especialmente a las larvas que se alimentan del tejido afectado, dificultando su crecimiento y desarrollo (Orozco-Cardenas et al., 1993). Tras la detección del daño, sus precursores, que se encuentran en citoplasma y pared celular, son procesados a péptidos maduros e incrementan la producción de JA, lo cual promueve el establecimiento de la SAR (Zhu et al., 2014).

Además de contra herbívoros también pueden afectar a otras respuestas frente a la luz UV u otros estreses bióticos como los oomicetos, pudiendo quizá, ayudar a diferenciar entre distintos patógenos (Huffaker et al., 2006).

Introducción

Metabolitos secundarios

Son compuestos no involucrados directamente en el crecimiento o la reproducción; se diferencian de los primarios en que su ausencia no provoca la muerte inmediata, aunque pueden dificultar algunos procesos. Suelen estar involucrados en la defensa y varían mucho entre especies de plantas (Pichersky and Gang, 2000). Los organismos fitopatógenos pueden adaptarse a ellos e, incluso, usarlos en su beneficio (Croteau et al., 2000).

1.5.6.1. Camalexina

En *A. thaliana*, destaca como metabolito secundario la camalexina (3-tiazol-2-il-indol), un alcaloide indólico presente también en otras crucíferas, considerada como una fitoalexina por aumentar considerablemente su concentración tras la infección, siendo esta más grave en su ausencia (Glazebrook et al., 1997). Posee actividad antimicrobiana, especialmente documentada contra hongos necrótrofos como *A. brassicicola* y *B. cinerea* (Ferrari et al., 2003), limitando su crecimiento. Se induce también contra biótropos como el oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* (Glazebrook et al., 1997), o el ascomiceto *Erysiphe orontii* (Reuber et al., 1998) y también contra hemibiótropos, como la bacteria *P. syringae*, aunque su eficacia en estos casos es limitada (Glazebrook and Ausubel, 1994). También puede inducirse su síntesis mediante estreses abióticos, como el tratamiento con nitrato de plata (Nafisi et al., 2007).

Aunque su ruta de síntesis no ha sido completamente descrita, se sabe que proviene del triptófano y que sus precursores son oxidados por enzimas del tipo citocromo P450 (Schuhegger et al., 2006), siendo necesario el GSH (Parisy et al., 2007). El aminoácido se convierte en “indol-3-acetaldoxima” (IAOx) mediante las enzimas monooxigenasas “citocromo P450, familia 79, subfamilia B, polipéptido 2 o 3” (CYP79B2 o 3, respectivamente), que a su vez se convierte en “indol-3 – acetoneitrilo” (IAN) mediante las enzimas CYP71A13 o 12 (Ahuja et al., 2012). A

continuación, se conjuga un GSH mediante la enzima “S-transferasa F6 de glutatión” (GSTF6) para formar “indol-3 –acetonitrilo glutatión” (GS-IAN) y, posteriormente, pasa por una reacción poco conocida en la que intervienen las enzimas “gamma-glutamyl peptidasa 1 o 3” (GGP1 o 3 respectivamente), formándose “indol-3 –acetonitrilo cisteína” (Cys-IAN). Finalmente, la enzima CYP71B15, también conocida como “deficiente 3 de fitoalexina” (PAD3), actúa en dos pasos consecutivos convirtiéndolo en “dihidrocamalexato” (DHCA) y este en camalexina (figura 19 (Nafisi et al., 2007)).

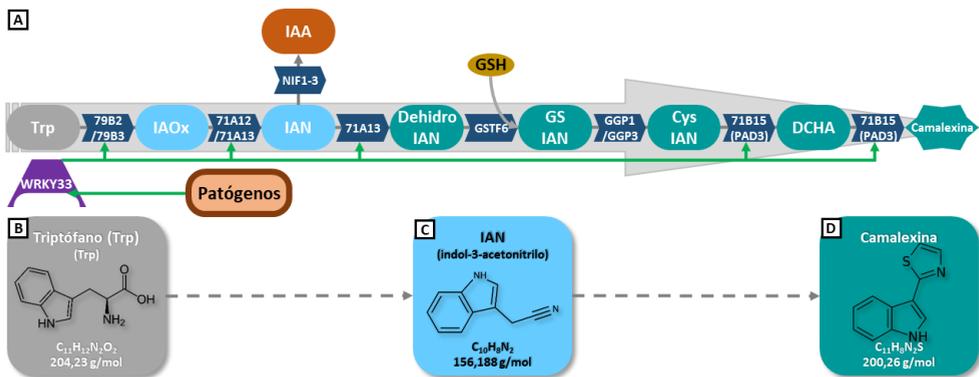


Figura 19 Síntesis de la camalexina

(D) La camalexina es sintetizada a partir del aminoácido (B) triptófano, mediante (A) un conjunto de reacciones enzimáticas. Entre los intermediarios, (C) IAN, puede ser convertido en la hormona de la clase AUX, IAA, por NIF1-3 una enzima alternativa a CYP71A13 que lo convertiría en dehidro IAN, continuando con el proceso de síntesis de la fitoalexina.

Su síntesis no parece estrictamente dependiente de alguna de las tres hormonas defensivas ET, SA y JA (figura 18), ya que una serie de mutantes independientes en la síntesis de cada una de ellas, reduce sus niveles pero no drásticamente (van Wees et al., 2003), variando con el patógeno. Parece ser que WRKY33 es el que regula positivamente la expresión de varias de las enzimas de su ruta de síntesis (Sham et al., 2017, Liu et al., 2015). Este TF está implicado en la ruta del JA y la homeostasis redox en la resistencia de *A. thaliana* a *B. cinerea* (Birkenbihl et al., 2012) y su cascada de activación WRKY33/ORF59/PDF1.2 está involucrada en la resistencia a este hongo, así como a *A. brassicicola*, pudiendo requerir la acetilación de histonas mediada por “proteína 2 del factor de elongación” (ELP2 (Wang et al., 2015)). Por

Introducción

lo tanto, el impacto de las hormonas en la transcripción de *WRKY33* sería el que modificaría los niveles de la fitoalexina (sección 1.6.4.3.).

La camalexina está relacionada con las AUXs, pues su precursor IAOx lo es también de la síntesis de estas hormonas (figura 19 (Zhao et al., 2002)). Las enzimas CYP71A13 y CYP71B15 están fuertemente correguladas, de manera que cuando aumenta la transcripción de sus genes, la de CYP79B2 también lo hace, aunque la inducción de esta última no necesariamente afecta a las otras dos. Esto se explica por su posición más basal en la ruta, que puede ramificarse hacia otros productos. Entre ellos se encuentra el IAA, que es producto de las enzimas “nitrilasas 1 a 3” (NIT1 a 3), las cuales usan de sustrato el IAN, molécula que induce la transcripción de estas enzimas (Grsic et al., 1998). Como sustrato el IAN parece ser bastante ineficaz, por lo tanto NIT1-3 y CYP71A13 deben competir por él, lo cual explica la enorme inducción que la última experimenta en condiciones de estrés (Nafisi et al., 2007).

1.6. Patógeno: *B. cinerea*

El nombre de su género deriva del griego “βότρυς, *botrus*” que significa “grupo de uvas”, debido a la forma que adquieren sus conidióforos, mientras que el sufijo latino “*itis*” hace referencia a la enfermedad que causa; por otro lado, el epíteto “*cinerea*” proviene también del latín y significa “con aspecto de ceniza”, lo que se corresponde con el color que pueden tener sus esporas conidiales (conidiosporas). Minoritariamente, se le puede denominar *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, (1945) o *Botryotinia cinerea*, denominaciones que hacen referencia a su forma sexual, la cual raramente se muestra.

El microorganismo patógeno utilizado en este estudio es *Botrytis cinerea* Pers., (1794). Se trata de un hongo de morfología filamentosa y estrategia de vida patógena necrotrófica, capaz de infectar a una amplia variedad de plantas y causando una enfermedad en

ocasiones denominada “podredumbre gris”, extremadamente difícil de controlar (Williamson et al., 2007). En términos filogenéticos, pertenece al filo de los ascomicetos, concretamente a la familia Sclerotiniaceae, dentro de la cual se engloba en los Leotiomycetes, clase en la que abundan los patógenos de plantas.

Tradicionalmente, debido a que suelen presentar un gran dimorfismo, la fase sexual (teleomórfica) y la asexual (anomorfa) se han nombrado por separado. Actualmente se tiende a nombrar a los hongos como un completo (denominado fase holomorfa), siendo el nombre usado el de su fase sexual que es la que presenta los cuerpos fructíferos que son estructuras más reconocibles, como las setas (frente al clásico aspecto de moho de las estructuras asexuales). Pero en casos como este, en la que la fase sexual es tan rara, se acepta el nombre de la fase asexual como denominación general.

1.6.1. Capacidad infectiva

Aunque su nombre no hace referencia real a ello, ataca principalmente a las uvas, siendo su hospedador más importante *Vitis vinifera* (vid) y, aun cuando no dañe a demasiados frutos, su mera presencia dificulta la fermentación, dado que segrega compuestos antifúngicos que matan a las levaduras. El nombre “podredumbre gris” (o “podredumbre de Botrytis”), hace referencia a la enfermedad que genera en *V. vinifera* en las condiciones de elevada humedad que son necesarias para su infección. Si esta desciende, el hongo extraerá agua de la uva (concentrando los azúcares) y la enfermedad se detendrá, produciéndose la denominada “podredumbre noble”, fruto de la cual surgen los apreciados vinos dulces. Pero *B. cinerea* no afecta solo a la vid, de hecho, es un patógeno especialmente diverso en cuanto a su número y tipo de hospedadores, con más de 500 (Elad et al., 2007) y, en horticultura, generalmente, la enfermedad producida se llama moho gris.

La gran cantidad de plantas a las que afecta provoca enormes pérdidas económicas a nivel local y mundial (Dean et al., 2012). Perjudica especialmente a especies de dicotiledóneas, aunque también ataca a algunas monocotiledóneas en zonas templadas y subtropicales (Williamson et al., 2007). Las condiciones de invernadero son idóneas para su propagación, así como una buena ventilación puede ser fatal para la supervivencia del hongo (Morgan, 1985).

Introducción

Origina pérdidas económicas fundamentalmente por su forma de infectar: aunque es capaz de atravesar cutículas intactas o entrar vía estomas (Fourie and Holz, 1994), suele infectar en estadios temprano, permaneciendo en estado latente hasta que algún punto de entrada sea más accesible, por ejemplo, a través de heridas producidas por herbívoros o agentes abióticos o, especialmente, por la maduración de los frutos. Esto último sucede debido a que, durante esta fase, las células degradan su propia pared celular, debilitando la barrera que *B. cinerea* debe atravesar, lo cual induce la formación del apresorio al detectar el hongo el ET y los monómeros de cutina asociados con este proceso (Lee and Dean, 1993). En caso de darse ambas circunstancias, atacará con especial agresividad, hecho que puede verse exacerbado en condiciones de poca ventilación como las que pueden ocasionarse en el almacenamiento.

Aunque prefiere órganos senescentes, que pueden actuar como reservorio, *B. cinerea* es capaz de infectar cualquier parte de la planta en cualquier fase de su desarrollo, incluidas las semillas. Esta capacidad hace que impacte en todo tipo de industrias; algunos ejemplos importantes de especies a las que afecta son: brócoli, frambuesa, fresa, judía, kiwi, lechuga, manzano, patata, petunia, pistacho o tomate. Bajo condiciones favorables puede infectar plantas incompatibles como *A. thaliana* (que normalmente presenta una buena resistencia). El hongo puede, inclusive, afectar a animales incluyendo humanos inmunodeprimidos en una forma rara de alveolitis alérgica extrínseca, llamada pulmón del viñador (Jurgensen and Madsen, 2009). Por otro lado, *B. cinerea* puede ser objetivo de patógenos, como los hongos *Gliocladium roseum* (Sutton et al., 1997) y *Trichoderma harzianum*, al igual que por varios micovirus (Wu et al., 2010).

1.6.2. Genética

B. cinerea es considerado un modelo para el estudio de patógenos necrótrofos, lo que ha permitido la secuenciación de su genoma cinco veces en tres cepas (B05.10,

BcDW1 y T4). La última secuenciación realizada en 2015, es completa, utilizándose la cepa B05.10 (Van Kan et al., 2017), siendo modificada en 2017. Posee un genoma haploide con 42.630.066 bp (bp), repartidas en dieciocho cromosomas. Se han descrito 11.703 genes, que codifican 13.725 proteínas predichas y un G+C del 42,0 %. Por otra parte, su genoma mitocondrial tiene 82.212 bp. Dentro del género *Botrytis*, pertenece a un complejo críptico de especies, es decir, un conjunto cuyos miembros son indistinguibles morfológicamente, aunque no pueden aparearse y se pueden diferenciar por métodos moleculares. El complejo está compuesto por el grupo I, o *B. pseudocinerea*, y el grupo II, o *B. cinerea sensu stricto* (Fournier et al., 2005), al que pertenece.

1.6.3. Ciclo vital

En su forma miceliar, el hongo está compuesto exclusivamente por hifas que pueden dar lugar a la fase sexual y asexual, dependiendo de las condiciones. Entre estas condiciones destaca la luz, pues este hongo con once fotorreceptores potenciales (Schumacher, 2017), es altamente sensible a sus cambios, al menos en cepas como B05.10 (figura 21 A), ya que hay otras cuyo ciclo no responde a la luz y quizá por ello son menos virulentas y no se reproducen sexualmente (Schumacher et al., 2013).

Respecto a la fase asexual que, como se ha dicho, es la que de largo predomina en el hongo, se desarrolla predominantemente en verano y se ve favorecida por condiciones relacionadas con esta estación, como una abundante luz solar. Especialmente favorecedores son los espectros electromagnéticos, correspondientes a la luz ultra violeta cercana o A (UVA) y la luz infrarroja (Tan, 1976); por el contrario, la luz roja y la azul son inhibitorias. En esta fase, *B. cinerea* producirá numerosos conidióforos, con forma de racimos de uva, que a su vez generarán enormes cantidades de conidiosporas (llamadas también conidias). Estas conidiosporas se dispersan muy fácilmente con el viento o la lluvia, e infectan a

Introducción

otras plantas o zonas de la misma. Una vez llegan a la planta, la luz verde que ésta refleja durante el día, tiende a reprimir la germinación de las conidias hasta que llega la noche cuando las condiciones, por ejemplo, de humedad, son más propicias. Al germinar la conidiospora forma un tubo germinativo que, a su vez, genera un apresorio, estructura de la que se vale para penetrar la cutícula de la planta, sobrepasando así sus defensas constitutivas físicas. Con la cutícula penetrada, se generan nuevas hifas que se extienden por el interior de las células, o entre ellas, provocando necrosis o incitando su muerte programada. En consecuencia, el micelio se genera nuevamente y drena los nutrientes del tejido vegetal, creando nuevos conidióforos que producen nuevas conidiosporas, reiniciando el ciclo asexual.

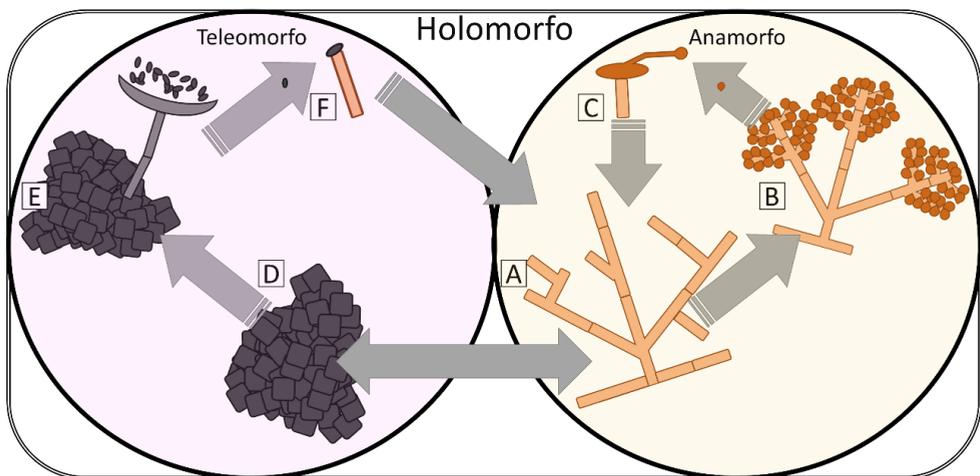


Figura 20 Ciclo vital de *B. cinerea*

(A) El micelio de *B. cinerea* forma parte de su estado anamorfo, este micelio es capaz de producir (B) conidiofóros que a su vez producirán (C) conidiosporas que al germinar volverán a producir micelio, cerrando el ciclo asexual. (D) Alternativamente, el micelio puede formar, de manera reversible, (D) esclerocia, entrando en su estado teleomorfo y pudiendo formar (E) ascogonios o anteridios, que, de encontrar un individuo del grupo de apareamiento contrario, formarán (F) ascosporas, que cuando germinen producirán micelio, saliendo de la fase sexual.

La enfermedad suele acabar de tres formas distintas. En primer lugar, cuando el hongo sea vencido por la planta o, en segundo lugar, cuando el micelio agote los recursos de la misma (matándola en ocasiones). En este segundo caso las hifas

mantienen su forma y sobreviven fácilmente alimentándose de residuos vegetales; continúan generando conidióforos para invadir a otro hospedador.

La tercera forma se da cuando las condiciones ambientales adversas impiden su crecimiento como, por ejemplo, las bajas temperaturas. En este caso las hifas entran, si es posible, en la fase sexual formando la esclerocia y, al contrario que en la fase asexual, este estadio se ve favorecido por la oscuridad, habitual en invierno (Williamson et al., 2007), aunque también se ve inhibida por la luz azul. El hongo suele salir de esta latencia en primavera o, en general, en cuanto las condiciones mejoren.

Si bien, comúnmente, la esclerocia forma hifas nuevamente regresando a la forma micelial para reiniciar un ciclo asexual, en raras ocasiones, si se encuentran con otro individuo del tipo reproductor contrario, puede generar estructuras llamadas ascogonios o anteridios (dependiendo del grupo de apareamiento), que se unen formando un puente llamado tricógina, en la que se da la fusión de células. Desde el ascogonio crecen células con dos núcleos (dicarion), que se dividen para producir el cuerpo fructífero (ascocarpo de tipo apotecio), donde se produce la fusión de núcleos (cariogamia), formando células diploides. Los dos juegos de cromosomas se recombinan (Beever and Weeds, 2007) y rápidamente producen ascosporas mediante meiosis, volviendo al estado haploide normal de la especie (Rowe and Kliebenstein, 2007) en un proceso llamado parasexualidad. A continuación, se forman esporas ascogónicas (ascosporas) que, al germinar, vuelven a producir hifas (figura 20).

En los hongos la diferenciación entre sexos masculino y femenino no se aplica normalmente, en su lugar se encuentran los denominados “grupos de apareamiento” (*Mating Types*), que pueden ser muchos más de dos y determinan la compatibilidad a la hora de reproducirse (Casselton and Kües, 2007).

Introducción

B. cinerea posee solo dos grupos de apareamiento y es normalmente heterotálico, aunque en raras ocasiones se ha observado homotalismo en la especie (De Miccolis Angelini et al., 2016). Esto hace que deba encontrarse con otro individuo del grupo de reproducción contrario para poder reproducirse sexualmente y generar ascosporas. Esto quizá explique el hecho de que, prácticamente siempre, se reproduzca asexualmente mediante conidiosporas, justo al contrario que *Sclerotinia sclerotiorum* (que es homotálico), un hongo también necrótrofo de su misma familia.

Al aparearse, los hongos utilizan hormonas para identificar el grupo de apareamiento de un posible compañero; en ascomicetos como *B. cinerea*, estos grupos se determina por los genes MAT1 y suelen tener dos, además a menudo son anisogamos, es

decir, que las estructuras sexuales de los grupos de apareamiento difieren (lo contrario se llama isogamia). Si el hongo posee de forma permanente un único grupo de apareamiento en sus células y solo puede reproducirse con otro, se denominará heterotálico (un término análogo a dioico o hermafrodita; en plantas y animales respectivamente), de lo contrario será homotálico.

El homotalismo puede deberse a la posesión de más de un grupo de apareamiento en la célula (varias versiones de genes MAT1), la posibilidad de cambiarlo, ser capaz de reproducirse con alguien de su mismo grupo (proceso denominado “apareamiento del mismo sexo”) o, en raros casos, en un fenómeno denominado pseudo-homotalismo, mediante la formación de esporas con dos núcleos de diferente tipo de apareamiento.

1.6.4. Infección

B. cinerea produce, en su infección, estructuras y moléculas que atacan a las células vegetales; sin embargo, las lesiones producidas son, en gran parte, responsabilidad de la planta y a su HR. Este hongo es conocido por favorecer esta respuesta y aprovecharla, ya que al ser un necrótrofo la muerte de las células le beneficia.

1.6.4.1. Mecanismos de penetración

El primer reto al que debe enfrentarse *B. cinerea* es la adhesión a la planta. Para esto, cuando las conidiosporas se hidratan segregan por la punta un mucílago adhesivo glucoproteínico (Ohtake et al., 1999) que las pega a la planta. A continuación, debe penetrar la cutícula (excepto en caso de herida), lo que consigue el mencionado apresorio, una estructura que deriva

El apresorio de *B. cinerea* no está tan diferenciado, ni presenta tanta melanina como el del hongo hemibiótrofo *Magnaporthe oryzae* en el que está mejor descrita la estructura. Por ejemplo, no muestra tal cantidad de genes expresados diferencialmente durante su formación y además no genera un septo que lo aísla del tubo germinativo (Gourgues et al., 2003). La “proteína 1 similar a tetraspanina” (PLS1) de *M. oryzae* es necesario para la penetración mediada por apresorio (Clergeot et al., 2001), el gen también está presente en *B. cinerea* y mutantes en él desarrollan apresorios incapaces de penetrar tejidos. Estas cepas solo pueden infectar en zonas heridas en las que no es necesario perforar la cutícula (Gourgues et al., 2004). De esto se deduce que quizá el apresorio de *B. cinerea* no tenga tal poder para ejercer presión de turgencia como el de *M. oryzae*, pero si es funcional.

del tubo germinativo que produce la conidiospora al germinar. Este tubo, que continúa produciendo el mucílago adhesivo (Xiao et al., 1994), debe detectar las señales de la superficie como la dureza, la hidrofobicidad y los compuestos químicos característicos (como las ceras); es entonces cuando deja de crecer, se engancha, se hincha y produce una hifa diferenciada con una estructura aplanada, el apresorio (Coertze et al., 2001). Los componentes de la conidiospora se transportan al apresorio, que madura y se une firmemente a la superficie vegetal, acumulando una densa capa de melanina altamente entrecruzada a lo largo de toda su pared celular, salvo en un poro en contacto con la planta. Comienza a acumular en su interior metabolitos como glicerol, que incrementan mucho el potencial osmótico del citoplasma. Esto, a su vez, genera una gran presión de turgencia que, gracias al recubrimiento melánico de la pared celular, se concentra en el poro. Entonces una hifa diminuta, con forma de estaca, crece por el poro y se extiende a través de la cutícula hacia la epidermis (de Jong et al., 1997). Mientras esta hifa avanza segrega una SOD, sin la cual la patogenicidad disminuye (Rolke et al., 2004), por lo que su función podría ser la de eliminar el superóxido que la planta produciría para frenar su penetración (van Kan, 2006). Recientemente, se ha demostrado que

Introducción

constituye un factor de virulencia que podría manipular el balance oxidativo en su propio beneficio (López-Cruz et al., 2017). El hongo también segrega varias enzimas líticas, como cutinasas, pectinasas y lipasas para permeabilizar y degradar los componentes de la cutícula (Shah et al., 2009, Williamson et al., 2007, Amselem et al., 2011). Las hifas penetran la pared celular anticlinal (la perpendicular a la cutícula), hasta llegar a la lamela media donde el hongo crece y comienza a segregar enzimas, con el fin de degradar la pared celular (Kars et al., 2005).

Finalmente, el patógeno se encuentra con la última barrera física que es la pared celular, que degrada con una colección de enzimas denominadas “enzimas degradativas de la pared celular” (CWDE), cuya producción y eficacia varía con la temperatura, el pH y la especie del hospedador (Manteau et al., 2003). Entre las CWDE, se encuentran: pectinasas, celulasas, hemicelulasas, metilesterasas y un gran número de endo y exo poligalacturonasas (ten Have et al., 2001, Rha et al., 2001, Kars et al., 2005). Degradar estas barreras le proporciona, además de acceso al delicado protoplasto, gran cantidad de sustratos como carbohidratos y proteínas, que puede usar para su propio metabolismo. Todas estas enzimas del hongo y sus productos actúan como patrones moleculares que la planta detectará tempranamente, ante lo que activará sus defensas, mediante la activación de la PTI (sección 1.4.3.):

- DAMPs → Los oligogalacturónidos, compuestos liberados de la pared celular vegetal al ser degradada (Ferrari et al., 2013), por lo que son indicativos de daño. De su detección se encarga la “kinasa 1 del receptor asociado a pared” (WAK1), que promueve la acumulación de ROS y NO. Otro compuesto considerado un DAMP es la sistemina de *S. lycopersicum* (PEP1 tiene funciones similares en *A. thaliana* (sección 1.5.6.)).
- MAMPs → La quitina de la pared celular, debido a su amplia distribución en los opistocontos (sección 1.1.) no es necesariamente un marcador patogénico; sin embargo, la planta detectará su presencia uniéndose ésta a los receptores

“kinasa 1 del receptor elicitor de quitina/kinasa 1 de la región similar al receptor” (CERK1/LysM RLK1) y a la “proteína 2 con dominio de anclaje glucofosfatidilinositol” (LYM2 (Miya et al., 2007)).

- PAMPs → Las CWDE, como las poligalacturonasas segregadas, serán detectadas por las células vegetales como claros marcadores patogénicos. De su recepción se encarga la proteína “responsiva 1 a poligalacturonasas de Botrytis” (RBPG1) y como respuesta la planta producirá “proteínas inhibidoras de poligalacturonasas” (PGIPs (Kalunke et al., 2015)).
 - Aunque no son usadas por el hongo para penetrar las barreras, las “proteínas similares a Nep” (NPL) son fitotóxicos también detectados; la planta responde acumulando ROS, calosa y ET (Gonzalez-Bosch, 2017, Cuesta Arenas et al., 2010).

1.6.4.2. Mecanismos de toxicidad

Otros compuestos cuya finalidad es diferente a la penetración en el hospedador son varias fitotoxinas que, a menudo, causan muerte celular vegetal, permitiendo a *B. cinerea* alimentarse. Las mismas NPL la provocan en dicotiledóneas, pero no en monocotiledóneas y se caracteriza por la acumulación de ROS en los cloroplastos (Schouten et al., 2008). El botridial es un conocido sesquiterpeno, aislado por primera vez en 1974 (Lindner, 1975), siendo su metabolito de mayor toxicidad (Colmenares et al., 2002), produciendo clorosis, colapso celular y, finalmente, necrosis (Deighton et al., 2001). El ácido botcínico tiene un rol en la virulencia redundante con el botridial, ya que los mutantes individuales no ven muy alterada su función, pero los que afectan a ambos genes tienen su capacidad necrótica disminuida (Dalmais et al., 2011). Finalmente, cuenta con proteasas y oxidasas, tipo lacasa (van Kan, 2006) y algunas cepas producen unas toxinas llamadas botcinólidos (Ramirez-Fernandez et al., 2011).

Introducción

Una de las primeras respuestas de la planta, tras detectar el hongo, es la producción de un estallido oxidativo en el apoplasto, cuya función es ofensiva hacia el patógeno y señalizadora para la planta. *B. cinerea* está bien equipado para lidiar con las ROS, especialmente con el H₂O₂, puesto que puede expresar peroxidasas de guaiacol, de ácido ascórbico y de glutatión; además, dispone de lacasas, catalasas y SODs. De hecho, se postula que el aporte de ROS por parte de *B. cinerea* en esta etapa podría estar destinado a promover las señales que desencadenan la HR y, como consecuencia, que la muerte celular programada fuera más probable (Schouten et al., 2002). Sin embargo, independientemente de la HR, un acúmulo excesivo de ROS provoca peroxidación lipídica, agotamiento de antioxidantes y desequilibrio redox masivo (Muckenschnabel et al., 2002), que produce la muerte celular, facilitando la propagación del patógeno (Rossi et al., 2017).

Paralelamente a las ROS también hay producción de NO por parte de *B. cinerea*, lo que facilita la inducción de la muerte celular programada y la expansión del hongo (Conrath et al., 2004). Desde la germinación el patógeno produce NO, que se difunde en el medio extracelular y puede promover la síntesis de más NO por parte de la planta, lo que podría modificar el nivel de defensa de la misma (Turrión-Gómez and Benito, 2011).

Además de enzimas, toxinas y ROS, el “ácido oxálico” (OA) es otro posible actor en la patogenicidad del hongo. Este compuesto es el ácido dicarboxílico más sencillo y, a pesar de que se ha probado que es necesario para su patogenicidad y la de *S. sclerotiorum*, su rol en *B. cinerea* es aún discutido (AbuQamar et al., 2017, Han et al., 2007). En primer lugar, al producir un pH ácido mejora la actividad de las enzimas degradativas fúngicas. Concretamente, las pectinasas se ven doblemente beneficiadas ya que puede quelar el Ca²⁺ de las pectinas, facilitando aún más su degradación (Prins et al., 2000). El Ca²⁺ también se ve afectado por el OA en su papel como mensajero en la respuesta defensiva (Beneloujaephajri et al., 2013). La acidificación, además, inhibe las enzimas protectoras de la planta y desregula el cierre estomático, proporcionando una vía de entrada que no requiere la

degradación de la cutícula (Manteau et al., 2003, ten Have et al., 2010, Hahn, 2014). Por otro lado, promueve la producción de ROS que activa la muerte celular, favoreciendo su invasión (Williams et al., 2011).

Otros ácidos, como el cítrico o el succínico, se han observado en la infección por este hongo en girasol, lo que sugiere una diferencia en la regulación del ciclo de los “ácidos tricarbóxicos” (TCA) en *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* (Billon-Grand et al., 2012, Mbengue et al., 2016).

1.6.4.3. Respuesta de la planta

Tras la detección de los citados elicitores, la planta debe transducir estas señales desde la membrana al núcleo. En ocasiones esto se produce de forma directa, como en algunos mecanismos dependientes de Ca^{2+} , ROS o NO, pero es común que se produzca a través de una cascada de MAPKs.

Por ejemplo, MPK6 es necesaria para la elicitación de las defensas mediadas por oligogalacturónidos, y junto con MPK3 es responsable de la síntesis de camalexina, así como del ET. La actividad de MPK6 se ve regulada negativamente, y de forma independiente a elicitores, por la “fosfatasa 2 de MAPK” (MKP2), la cual es necesaria para una correcta respuesta al hongo por ser un regulador de estrés frente a ROS, e inhibitoria de la muerte celular. Por su lado, MPK3 puede ser inactivada por MKP2 en otras condiciones, pero los elicitores de *B. cinerea* debilitan esta unión, lo cual puede explicar diferentes acciones sobre ambas quinasas.

Un caso más concreto de la activación transcripcional mediada por MAPKs es el de los genes *CYP71B15*, *CYP79B2* y *CYPCYP71A13*, responsables de la síntesis de camalexina (figura 19). Para que este gen se transcriba WRKY33 debe unirse a la caja W de su promotor. WRKY33 permanece secuestrado en un complejo con las proteínas “sustrato 1 de MAPK” (MKS1) y MPK4. Al fosforilarse MPK4 fosforila a su vez a MKS1, que se libera de ella y permanece unida a WRKY33, y ambas moléculas se unen al promotor (Sham et al., 2017, Liu et al., 2015).

Introducción

Las hormonas SA, JA, ET y ABA participan en la coordinación de la defensa de la planta en respuesta a *B. cinerea*, teniendo un papel claramente positivo el JA y el ET y un papel, a priori, negativo y complicado del SA y el ABA. Aunque ya se ha explicado el impacto de estas hormonas en la defensa (sección 1.5.5.4.), cabe destacar el efecto que tienen concretamente frente este patógeno:

- Papel claramente positivo → El JA es necesario para la resistencia frente al hongo, ya que los mutantes que reducen su síntesis (Abuqamar et al., 2008), su percepción (Thomma et al., 1999) o su acción (An and Mou, 2013), son más susceptibles, mientras que los que aumentan dicha síntesis, son más resistentes (AbuQamar et al., 2017). Además, mutantes en genes regulados por esta hormona, como *PDF1.2* y *B-CHI*, son también más sensibles a *B. cinerea* (Zander et al., 2010). Por su parte, el nivel del ET aumenta en *A. thaliana* y *S. lycopersicum*, tras la detección de *B. cinerea* vía PTI (Shakeel et al., 2013). Mutantes en los genes que codifican receptores del ET muestran mayor susceptibilidad frente a *B. cinerea* (Vidhyasekaran, 2014), mientras que su sobreexpresión mejora la respuesta. Esto indica que el ET también es necesario para una buena respuesta (AbuQamar et al., 2017) y, probablemente, sea el responsable de que la ruta del JA se decante por su rama ERF, en vez de por su rama MYC.
- Papel a priori negativo → La función del SA en la defensa contra *B. cinerea* es compleja (Zheng et al., 2006). Si bien, según los estándares clásicos es una hormona cuya acción debería ser negativa frente a un necrótrofo, su presencia es esencial para la detección del hongo por el mecanismo PTI mediante la vía flg22-PAMP flg22 (Laluk et al., 2011). Además, la síntesis de la proteína PR1, un marcador de la ruta del SA, aumenta muchísimo durante su infección (Angulo et al., 2015). Por otro lado, mutantes que disminuyen el nivel de SA no muestran más susceptibilidad al hongo, mientras que aquellos que lo aumentan si son más sensibles a él (AbuQamar et al., 2017). En todo caso, el hongo parece aprovechar sus propiedades negativas sobre la defensa, pues

secreta un EPS que activa los mecanismos mediados por SA (El Oirdi et al., 2011). Por su lado el ABA tiene un papel relacionado, fundamentalmente, con su impacto en las otras hormonas y, además, puede ser sintetizado por el hongo (Gong et al., 2014). Tratamientos con ABA empeoran la respuesta al hongo en *A. thaliana* (AbuQamar et al., 2006) y mutantes incapaces de sintetizarla (Audenaert et al., 2002). Pero afecta negativamente al SA (Yasuda et al., 2008), lo que, debido al ya complicado papel que tiene esta hormona en dicha infección, conlleva que el ABA tenga una función especialmente compleja.

1.6.5. Síntomas

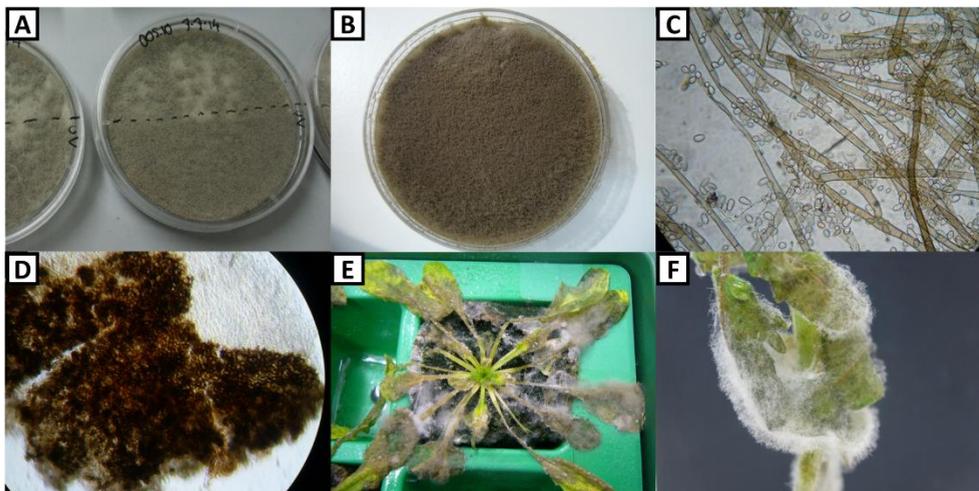


Figura 21 Imágenes de *B. cinerea*

(A) Placas de siete días con su mitad inferior irradiada con luz UVA y la superior protegida, (B) placa también de siete días, irradiada completamente con luz UVA y, plenamente crecida y esporulada. (C y D) Micelio con conidiosporas y esclerocia vistos al microscopio a 40 X, esta última proveniente de placa de varias semanas guardada a 4 °C. (E y F) *A. thaliana* y *S. lycopersicum* tras tres días de infección utilizando zumo como medio.

Su capacidad infectiva varía mucho de un hospedador a otro, e incluso la zona de la planta donde sea inoculado puede afectar al progreso de la enfermedad. Para un desarrollo óptimo, la temperatura debe estar en un rango de 18,3 a 23,9 °C, la humedad relativa debe acercarse al 100 % y el entorno debe ser ácido (Ciliberti et

Introducción

al., 2015). Pequeñas oscilaciones de las condiciones de infección hacen que los síntomas y su progresión puedan variar muchísimo.

Normalmente, a las pocas horas del inicio de la infección se produce un oscurecimiento en la zona inoculada del órgano y aparecen unas pequeñas manchas en la parte posterior de la hoja. Seguidamente se desprende un olor característico para, a continuación, formar lesiones marrones (HR). A medida que avanzan las lesiones se rodean de zonas cloróticas (LAR) y los órganos afectados tienden a desprenderse de la planta, como un mecanismo de defensa basado en la abscisión. Cuando la enfermedad progresa más se puede observar (incluso en órganos anteriormente abscisionados) una estructura aterciopelada de color, que oscila entre el gris claro y el marrón, que se corresponde con el desarrollo de conidióforos (figura 21 E y F). Bajo condiciones adversas formará esclerocios, cuya morfología es la de gránulos densos y oscuros por ser ricos en melanina (figura 21 D). Gracias a estas estructuras el hongo puede sobrevivir años y volver a infectar en cuanto cambien las circunstancias. Los esclerocios se denominan así en referencia a la familia a la que pertenece el hongo, de hecho, uno de sus sinónimos para esta fase es *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel (1945). *S. sclerotiorum* también posee estas estructuras y causa una enfermedad llamada podredumbre blanca; quizá estas estructuras contribuyan a que ambos necrótrofos puedan atacar a varios hospedadores (Amselem et al., 2011).

1.7. Hospedadores

Las plantas utilizadas en esta tesis como hospedadores de *B. cinerea* son *A. thaliana* y *S. lycopersicum*. La primera, si bien no presenta demasiada compatibilidad con el hongo y, por tanto, no se encuentra entre sus principales hospedadores, se ha utilizado para la puesta a punto del protocolo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) por su particular fácil manejo y la mayor disponibilidad de datos bibliográficos sobre ella; además, optimizando las condiciones de inoculación, es

posible facilitar la infección. La planta de *S. lycopersicum* si presenta una gran compatibilidad con el hongo y, por tanto, es muy susceptible a la infección. Por otro lado, aunque es mucho más compleja y difícil de manejar que *A. thaliana*, tiene un gran interés por la importancia económica de su cultivo y por el impacto económico que producen los daños ocasionados por *B. cinerea*.

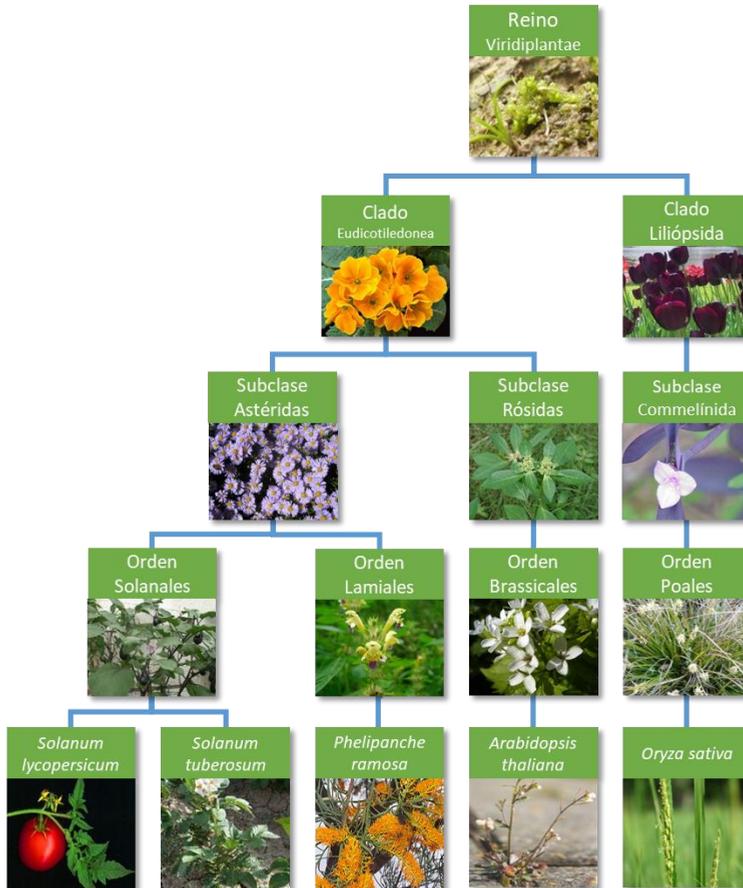


Figura 22 Árbol filogenético de varias plantas modelo

Aunque *A. thaliana* es la planta modelo por antonomasia, existen muchas otras, elegidas normalmente por su interés comercial, como *O. sativa* o plantas del género *Solanum*. Las diferencias entre estas especies, separadas por la evolución, por entre 140 y 150 millones de años, en el caso de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Chaw et al., 2004) hacen que el estudio de sus características sea difícil, al encontrarse la bibliografía dividida entre especies.

Ambas especies se usan en investigación, aunque al ser *A. thaliana* el organismo modelo de referencia en plantas, la diferencia de datos disponibles entre ambas es enorme. Además, entre ellas hay grandes contrastes genéticos y morfológicos

Introducción

(tabla 1, figura 23, 70 y 76), no en vano su divergencia evolutiva (rósidas y astéridas (figura 22)) se data hace 82,8 a 127,2 millones de años (Clarke et al., 2011). El genoma de *S. lycopersicum* es, de media, unas siete veces mayor que el de *A. thaliana* (figura 70 y 76) y, debido a la forma y tamaño de la planta, su manejo es mucho más difícil en su cultivo y en la experimentación.

1.7.1. *A. thaliana*

El nombre de su género deriva del de su denominación original "*Arabis thaliana* L., 1753", en referencia a Arabia, por la capacidad que tienen algunas plantas de este género para crecer en suelos arenosos o rocosos. El epíteto específico es en honor al autor que la describió por primera vez en 1577, Johannes Thal.

A. thaliana L. (Heynh., 1842) es una pequeña planta de origen euroasiático que suele crecer en cunetas, y es considerada como un hierbajo. Pese a

ser comestible, no es de importancia en agricultura. De hecho, no posee un nombre común y es conocida, sustancialmente, por ser el principal organismo modelo del estudio de plantas en el laboratorio.

Filogenéticamente hablando pertenece al clado de las eudicotiledóneas, dentro del cual se encuentra en el de las rósidas, en el que se localiza en la familia de las brassicáceas, también conocidas como crucíferas por su característica flor. Dentro de esta familia, existen ejemplos con relevancia económica como *Brassica oleracea*, *Brassica rapa* y *Sinapis alba* (col, nabo y mostaza respectivamente). *A. thaliana* procede originariamente del norte de Eurasia, pero, tanto en su zona sur, como a lo largo de América y Australia, la planta se ha naturalizado y adaptado, generando una gran variabilidad genética.

1.7.1.1. Características generales

Es una planta de porte herbáceo que alcanza de 10 a 30 cm de altura, según las circunstancias y contando con sus inflorescencias (figura 23). Posee una estrategia reproductiva de tipo estrictamente monocárpico, dado que muere después de

producir flores, lo cual hace en gran abundancia, generando una enorme cantidad de semillas. Puede completar su ciclo vital en tan solo seis semanas en condiciones óptimas, pero, bajo ciertas circunstancias, puede alargar su vida hasta dos años.

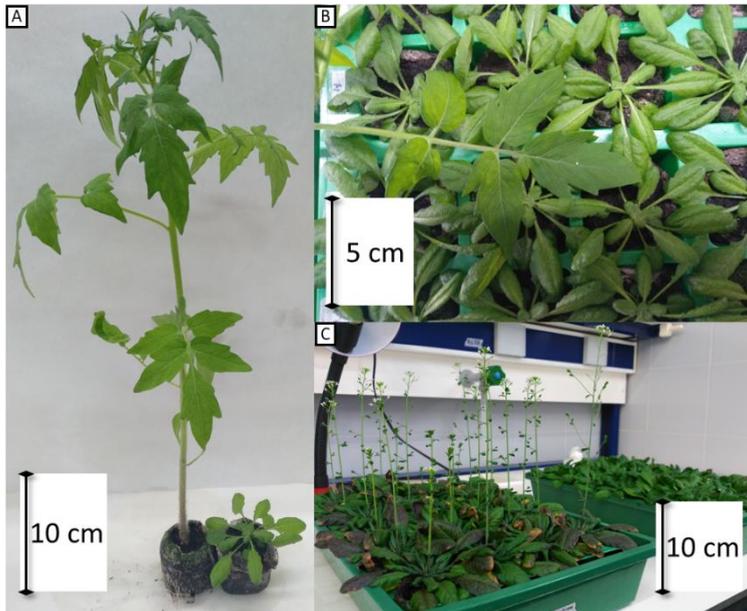


Figura 23 Comparación de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*

(A) Vista general de una planta de ambas especies con cuatro semanas, (B) vista cercana de hojas y folíolos y (C) imagen en primer plano de un propagador con veinticuatro plantas de *A. thaliana* de ocho semanas de edad iniciando su floración.

Tanto en variedades silvestres, como domesticadas, es una planta monoica autogámica, cuyas flores cuentan con partes masculinas y femeninas que pueden fecundarse con su propio polen. De hecho, se autofecundan antes de abrirse, lo que las convierte en cleistogámicas. Puede existir fecundación cruzada si la flor se abre antes, pero ocurre solo en un 0,3 % de los casos (Abbott and Gomes, 1989). Las hojas son simples, con bordes enteros o separadamente dentados, de 0,5 a 1 cm de ancho y de 1,5 a 5 cm de largo y no poseen peciolo. Juntas se disponen en forma de una roseta basal, que apenas se despega del suelo. Son de color verde, que puede volverse violeta a medida que las hojas maduran, especialmente, en condiciones de mucha luz. El sistema radicular es sencillo, con una raíz principal que crece recta hacia abajo y se ramifica. Pueden formar pequeñas ramas, sobre todo

Introducción

al llegar a la madurez, debido a que al final de cada una, y del tallo, sólo se puede formar un racimo principal, compuesto por varios secundarios que se elonga hacia arriba multiplicando la altura de la planta (formando la inflorescencia).

Las flores son blancas y muy pequeñas (0,5 cm de diámetro), constando de cuatro pétalos en forma de cruz (de donde viene el nombre común de su familia). De cada flor surge un fruto de tipo silicua lineal, que mide de 5 a 30 mm de largo y 1 mm de ancho. Estos frutos, al madurar y secarse, liberan con facilidad sus frutos de aspecto redondo y color marrón, de 0,3 a 0,5 mm de ancho. Cada fruto contiene de veinte a treinta semillas, por lo que cada planta puede producir miles de éstas.

1.7.1.2. Uso en investigación

Se utiliza en el campo científico debido a su pequeño tamaño, corto ciclo vital, fácil reproducción y su capacidad de generar enormes cantidades de semillas. Este uso se remonta al inicio del siglo XX, popularizándose especialmente en la década de 1980 frente a otras especies como *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida* o *Zea mays*. Además, se usa como organismo modelo por ser diploide y porque, pese a ser una eucariota superior, tiene un genoma muy pequeño (uno de los menores en plantas). Éste ha sido secuenciado diez veces de forma completa, con un total de 88 secuenciaciones basadas en CHIP de diferentes modificaciones de histonas, o de RNA. Es la primera planta cuyo genoma ha sido secuenciado, teniendo lugar la primera secuenciación en 2001, que continúa actualizándose, mientras que las últimas datan de 2016. Las características varían de una a otra, pero la versión más actualizada consta, en su forma haploide, de 93.654.500 bp repartidas en cinco cromosomas, con 16.842 genes que codifican 20.111 proteínas predichas y un G+C del 36,04 %. Por su parte, el genoma mitocondrial cuenta con 370.000 bp, posee 131 genes, de los cuales 117 codifican proteínas y un G+C del 44,8 %. Finalmente, el genoma cloroplástico cuenta con 15.000 bp, posee 129 genes, de los cuales 85 codifican proteínas.

Su transformación genética se hace de forma rutinaria con *A. tumefaciens* y existen más de 300.000 líneas transgénicas, lo que permite tener mutantes de casi todos sus genes. El mayor centro distribuidor es el “Nottingham Arabidopsis Stock Center-NASC”, seguido del “Arabidopsis Biological Resource Center-ABRC”. Las líneas más comunes son “Landsberg erecta” (Ler) y “Columbia” (Col), aunque también es habitual el uso de “Wassilewskija” (Ws).

1.7.2. *S. lycopersicum*

Solanum lycopersicum L., 1753, conocida popularmente como tomatera, o simplemente tomate en referencia a su fruto, es una planta de origen centro y suramericano. Filogenéticamente hablando, pertenece al clado de las eudicotiledóneas, dentro del cual se encuentra en el de las astéridas, en el que se localiza en la familia de las solanáceas. Esta familia de plantas se caracteriza por su gran importancia económica, especialmente en alimentación, pues similarmente a *S. lycopersicum* con los tomates,

El nombre del género podría referirse a los sitios soleados donde crece la planta. Por otro lado, su epíteto específico deriva del griego “λύκος, *lyco*” que significa “lobo” y “περσικός, *persicum*” que significa “persa” y, hace referencia a la “manzana persa”, forma de llamar a los melocotones antiguamente en la Europa central. Cuando los tomates llegaron a esta zona se les vio parecido con los melocotones y surgieron mitos de brujas que los usaban para crear hombres lobo, llamándolos, como consecuencia, “manzana persa del lobo”. Cuando se le puso el nombre binomial se tuvo en cuenta esta leyenda.

También fue llamada *Lycopersicon esculentum* Mill., 1768, nombre que se consideró correcto y que cambiaba la planta de género, debido a que la morfología de sus hojas y la ausencia de varios alcaloides hacía que pareciera una planta de fuera del género *Solanum*. Pero posteriormente se restauró el nombre inicial al demostrarse genéticamente que sí pertenecía al género *Solanum* (Peralta and Spooner, 2001). Desde 1974 *Lycopersicon lycopersicum* (L.) H. Karst, también fue un nombre válido, más adecuado de hecho, ya que, según las normas de la nomenclatura al cambiar de nombre, debe mantenerse el epíteto específico original, sin embargo, por el amplio uso de *L. esculentum* este último se consideró el correcto desde 1983.

producen apreciados frutos y tubérculos como la patata, la berenjena, el pimiento o las bayas de Goji (*S. tuberosum*, *S. melongena*, *Capsicum* y *Lycium barbarum*, respectivamente). También son usadas para ornamentación, por ejemplo, las especies del género *Petunia*.

Su porte es arbustivo, pues sus tallos crecen erectos hasta alcanzar cierta altura (1 m aprox.), pero al aumentar la planta de peso (sobre todo al desarrollar frutos), el tallo, debido a su debilidad, tiende a doblarse volviendo a ponerse en contacto con el suelo, donde volverá a crecer erecto, lo que la convierte en una planta rastrera semierecta. Aunque se cultiva como anual, es una planta perenne con estrategia reproductiva policárpica, por lo que una vez que florezca y de frutos, el individuo seguirá creciendo durante años fructificando cuando le sea posible. Son plantas monoicas y las variedades domésticas, gracias a la presión selectiva de ser criadas en ambientes sin sus polinizadores naturales, poseen flores que han perdido la autoincompatibilidad y se han vuelto autogámicas, al igual que las de *A. thaliana*. Sin embargo, no son realmente autopolinizadoras debido a que el polen está encerrado en estructuras que requieren movimiento para liberarlo. En la naturaleza la vibración de las alas de los polinizadores hace esta tarea, pero puede ocurrir también por el viento, o puede hacerse artificialmente. Sin embargo, estas flores no han perdido su capacidad alogámica, pues en presencia de polinizadores adecuados aún pueden ser polinizadas por polen de otros individuos.

El tallo principal mide de 2 a 4 cm de diámetro y de él pueden surgir tallos secundarios. Los tallos son de tipo fotosintético, por lo que su epidermis no acumula mucha lignina y por ello no se vuelve leñoso (lo que explica su debilidad). Además, al igual que sus hojas está cubierto de numerosas glándulas y tricomas con forma de pelos cortos y finos. Las raíces secundarias crecen con rapidez y vigorosidad a partir de una principal más débil. Pero los tallos también desarrollan con mucha facilidad raíces adventicias (aéreas), lo que les permite obtener alimento directamente del suelo una vez se doblan por su peso y, además, gracias a esto si la planta es seccionada ambas partes sobrevivirán.

Las hojas crecen de forma alterna y espaciada en el tallo, miden de 10 a 25 cm (figura 24) y son de naturaleza imparipinnada (o imparicompuestas); esto significa

que del peciolo central surgen a ambos lados peciolos secundarios llamados peciólulos, de los cuales nacen unas pequeñas hojas llamadas foliolos.

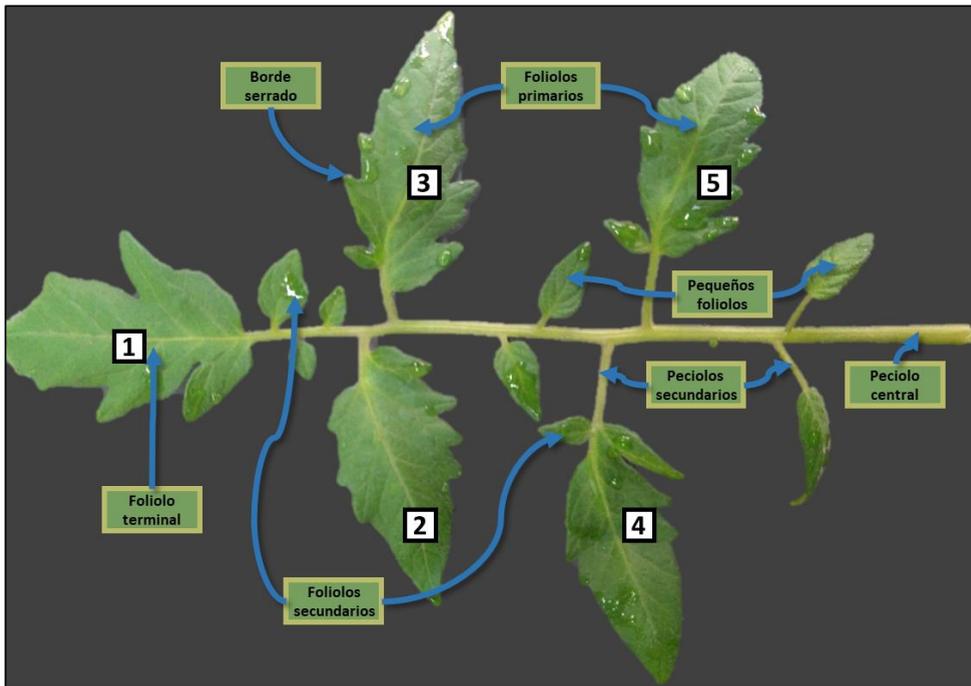


Figura 24 Esquema de la estructura de la hoja de *S. lycopersicum*

La hoja de *S. lycopersicum* de la figura corresponde a la cuarta de una planta de cuatro semanas, se observa como tiene bien desarrollados los cinco foliolos primarios (numerados) y que, incluso, alguno de ellos desarrolla foliolos secundarios. En plantas más desarrolladas, los pequeños foliolos salientes del peciolo central crecerían hasta formar más foliolos primarios.

Estos foliolos son finos y flexibles, miden hasta 8 cm y su margen tiene forma serrada. Al final del peciolo central nace un foliolo denominado terminal (figura 24 1), por lo que el número de foliolos suele ser impar (de ahí el nombre). El foliolo terminal es el más grande, los laterales cercanos a él se denominan foliolos primarios y le siguen en tamaño, incluso puede haber secundarios o terciarios, dependiendo del nivel de desarrollo de la planta. El tamaño de los foliolos descende a medida que se alejan del foliolo terminal, pero, conforme nacen hojas mayores, estas tienden a desarrollar pequeños foliolos repartidos por el peciolo principal y los peciólulos (figura 24). En plantas desarrolladas, las hojas se complican

Introducción

más pudiendo ser imparibipinnadas, si de los peciólulos, nacen otros peciolos más pequeños que dan lugar a foliolos secundarios llamados foliólulos.

La flor mide de 1 a 2 cm y es de color amarillo, con cinco o más pétalos y sépalos y un ovario que puede tener dos o más divisiones. De tres a doce flores forman unos grupos en unas inflorescencias en racimos que surgen de las axilas de algunas hojas, cada dos o tres, si la planta está adecuadamente cuidada. Su característico fruto es una baya, puesto que su ovario fecundado es carnoso. Como consecuencia del tipo de flor, puede ser bi o plurilocular, lo que significa que, internamente, puede estar dividido en dos o más secciones donde estarán las semillas. El fruto puede llegar a pesar hasta 600 g y medir de 1,3 a 10,2 cm, siendo enteramente comestible. En el interior del fruto, cubiertas de mucílago, se encuentran las semillas que son de color amarillo grisáceo, tienen forma ovalada, están cubiertas de vellosidades y miden de 3 a 5 mm de ancho y unos 2,5 mm de largo.

1.7.2.2. Uso en investigación

Aunque no al nivel de *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, también se usa habitualmente en investigación debido a su importancia en la agricultura. De hecho, su genoma, que es diploide, ha sido secuenciado cuatro veces y hay 134 lecturas, enfocándose sobre todo en distintas cepas. La primera secuenciación fue en 2009 y existen actualizaciones hasta 2015. La secuenciación más completa pertenece a la cepa “Heinz 1706” y consta, en su forma haploide, de 823.786.000 bp repartidas en doce cromosomas, con 30.336 genes que codifican 36.010 proteínas predichas y un G+C del 35,71 %. Por su parte, el genoma cloroplástico cuenta con 16.000 bp, posee 142 genes, de los cuales 87 codifican proteínas y un G+C del 37,9 %. El genoma mitocondrial aún no ha sido secuenciado.

Tabla 1 Resumen de las características generales de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*

	Actual	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
Nombre	Anterior(es)	<i>Arabis thaliana</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Lycopersicon lycopersicum</i>
	Común	-	Tomate o tomatera
	Familia	Brasicáceas (o crucíferas)	Solanáceas
	Planta	Herbáceo	Arbustivo (rastrero semierecto)
Vida	Porte	Herbáceo	Arbustivo (rastrero semierecto)
	Altura	≈ 10 a 30 cm	> 1 m
	Longevidad	≈ 0,5 a 2 años	Perenne
Genoma	Estrategia	Monocárpica	Policárpica
	Tamaño	93.654.500 bp	823.786.000 bp
	Genes	16.842	30.336
	Cromosomas	5	12
Flor	Tipo	Diploide	Diploide
	Pétalos	4 color de blanco	5 o más de color amarillo
	Género	Monoico	Monoico
	Inflorescencia	Racimosa con ≈ 15 a 30 flores	Racimosa con ≈ 3 a 12 flores
	Reproducción	Cleistogámica	Autogámica
	Tamaño (∅)	0,5 cm	1 a 2 cm
Hojas	Borde	Entero o algo dentado	Simples, serradas o lobuladas hasta dividirse
	Tamaño (largo x ancho)	≈ 1,5 a 5 cm x 0,5 a 1 cm	≈ 5 a 10 cm x 10 a 25 cm
	Tipo	Simple	Imparicompuesta
	CreCIMIENTO	Roseta basal	Alterno y espaciado
Fruto	Tipo	Silicua	Baya
	Tamaño (largo x ancho)	≈ 5 a 30 mm x 1 mm	≈ 1 a 5 cm x 1 a 10 cm
	Semillas (nº)	≈ 25	≈ 30

1.8. Epigenética

La epigenética es el estudio de los cambios heredables en la expresión génica, que no son debidos a cambios en la secuencia de DNA (Bird, 2007).

El término proviene del griego “ἐπι, epi” que significa “sobre, fuera o alrededor” y “γόνος, gonos” que significa “descendencia o procrear” y es el término del que deriva la palabra “genética”. Consecuentemente, podría traducirse como “por encima de la genética”.

Estos cambios se deben a diversos factores que proporcionan la posibilidad de que el genoma y el entorno puedan interactuar de forma dinámica, en oposición a los cambios genéticos que son prácticamente irreversibles. Si bien, son de naturaleza reversibles, la duración de los cambios epigenéticos es muy variable y, aunque suelen heredarse de célula a célula, eliminándose en la meiosis previa a la reproducción sexual, en ocasiones pueden ser transmitidos de una generación a otra (Bond and Finnegan, 2007).

Introducción

Diversos son los mecanismos moleculares mediante los cuales actúa la epigenética. Estos tienen la habilidad de regular casi todas las funciones génicas, incluyendo replicación, reparación del DNA, transcripción de genes, transposición de genes y diferenciación celular (Springer, 2013).

Las modificaciones epigenéticas son dependientes de tejido, especie, órgano y etapa del desarrollo (Vanyushin and Ashapkin, 2011) y pueden verse afectadas por cambios en los niveles hormonales que ocurren durante el estrés biótico y abiótico, permitiendo así la adaptación de la planta (Mirouze and Paszkowski, 2011). Para poder utilizar, con eficacia, herramientas como la manipulación genética es necesario, por tanto, entender cómo funcionan estos mecanismos y descifrar el efecto que tiene cada uno de ellos sobre las citadas funciones génicas (Springer, 2013). Por todo esto, la epigenética se ha convertido en uno de los campos más activos en la investigación de la genómica funcional (Sahu et al., 2013). En general, los mecanismos epigenéticos se pueden dividir en tres grupos de modificaciones, dependiendo en que molécula actúen: el DNA, sin llegar a modificar los nucleótidos, las proteínas, principalmente histonas y, el RNA (figura 25 (Springer, 2013)).

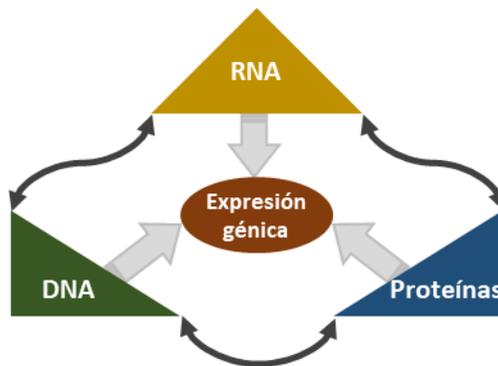


Figura 25 Interacción entre las tres moléculas de la epigenética

La cromatina está estrechamente vinculada con la epigenética, ya que engloba las tres moléculas asociadas con ella, pues se define como el complejo formado entre el DNA, las proteínas y el RNA en las células eucariotas. Los tres tipos de moléculas y sus mecanismos modificadores muestran relación entre sí; existe una influencia

bidireccional entre los proteicos y los del DNA, mientras que entre los basados en RNA parecen predominar aquellos que influyen en los otros dos de forma unidireccional (figura 25). Se hipotetiza que su influencia conjunta sobre las citadas funciones de la cromatina puede constituir un código epigenético (Turner, 2007) que, a diferencia del código genético, sería diferente entre células y tejidos (Chahwan et al., 2011). Obviamente, debido a la gran cantidad de factores que lo componen, descifrarlo será mucho más difícil de lo que lo fue con el código genético, pero permitirá comprender mejor la causa de muchos procesos biológicos.

Tiene enorme importancia en epigenética la estructura del gen (figura 26), pues muchas de las modificaciones son altamente dependientes de la zona donde se encuentran.

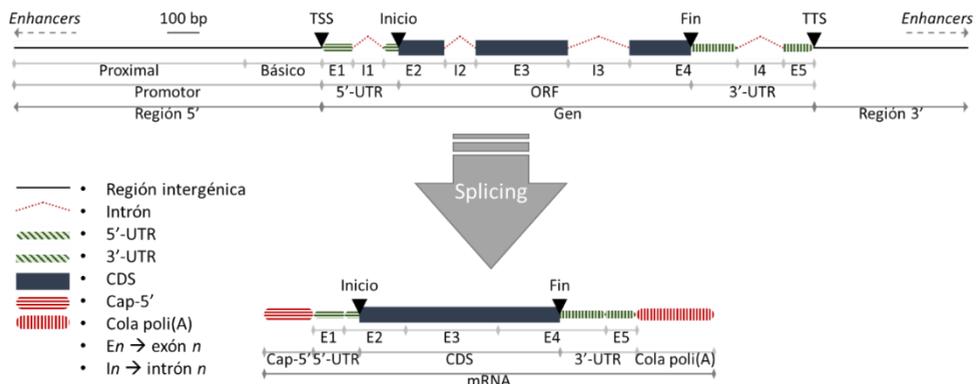


Figura 26 Estructura del gen, zonas aledañas y mRNA

Especialmente relevante es el “sitio de inicio de la transcripción” (TSS), el punto a partir del cual la RNAPII, u otras RNAPs, comienzan a transcribir generando el mRNA. Alrededor del TSS se aglomeran diversas proteínas y modificaciones de cromatina en general, siendo en su lado 5’ donde se encuentran los elementos del promotor, lugar de unión de TFs y RNAPs. Dentro del gen eucarionte destaca su división entre exones e intrones, siendo los primeros los que finalmente salen del núcleo, mientras que los intrones se quedan en el interior cuando el mRNA madura tras el ajuste o *splicing* (procesamiento del mRNA), proceso en el que también

Introducción

parece tener relevancia la epigenética (Fontana et al., 2017). Sin embargo, es escasa la información acerca del impacto producido por las regiones no traducibles (UTRs), que se encuentran en los extremos 5' y 3' (5'-UTR y 3'UTR, respectivamente) de los genes que, aunque no sean codificantes, pueden ser de un considerable tamaño, incluso más que un exón (en 5' o 3'). Entre estas regiones se encuentra la "pauta de lectura abierta" (ORF) que, obviando los intrones, es la "secuencia de DNA codificante" (CDS), que es la que realmente contiene la información traducible que dará lugar a la proteína. El final del gen, se puede definir como el último nucleótido de la 3'-UTR y se denomina "sitio de terminación de la transcripción" (TTS); su importancia no es tan grande como la de la TSS, pero existen modificaciones epigenéticas que tienden a acumularse en el gen cerca de esta región (Pervouchine et al., 2015). En el lado 3' del TTS no parece haber componentes de relevancia, al contrario del 5' del TSS, donde está el promotor. Sin embargo, en ambos casos, puede haber otros elementos como los *enhancers* a diversas distancias ("potenciadores"; secuencias cortas del DNA a las que se unen TFs para afectar la transcripción de un gen, sin tener que estar cerca del mismo). Finalmente, una vez el mRNA ha madurado y sus intrones han sido procesados, generalmente se producirán posteriores modificaciones, como la poliadenilación de su extremo 3' (formando la cola poli A) y la formación de una caperuza en el 5'.

1.8.1. DNA

El DNA está compuesto de cuatro nucleótidos: adenina, timina, guanina y citosina (A, T, G y C, respectivamente); en organismos superiores, al quinto carbono de la citosina se le puede añadir un grupo metilo (-CH₃), o hidroximetilo (-CH₂-OH), cuyo efecto está menos estudiado. La citosina metilada, se denomina "5-metilcitosina" y la metilación está catalizada por "metiltransferasa de DNA" (DNMT). En animales se produce especialmente en secuencias CpG, mientras que en plantas puede ocurrir también en GpHpG y GpHpH (H quiere decir A, T o G). La 5-metilcitosina

puede ser espontáneamente desaminada y, como consecuencia, convertida en timina, provocando que los CpG suelen mutarse en el genoma; si esto no se repara antes de la replicación del DNA (ya que hasta entonces habrá un desapareamiento T-T) el cambio puede fijarse, dando lugar a que el número de estas zonas escasee en el genoma. Por lo tanto, este mecanismo epigenético tiene el potencial de llevar a cabo cambios genéticos, a través de mutaciones. Esto es utilizado por las plantas metilando especialmente las zonas CpHpG de transposones (secuencia de DNA capaz de moverse autónomamente por el genoma de la célula (Yelagandula et al., 2014)).

Algunas áreas del genoma muestran un alto grado de metilación, lo cual suele corresponderse con menor activación transcripcional; de hecho, la metilación tiene efectos negativos sobre la transcripción al darse en el promotor, concretamente en las islas CpG. Se ha visto que la metilación de la citosina desempeña un papel en la respuesta al estrés (Saze et al., 2012), por ejemplo, un descenso en la metilación del DNA se ha asociado en plantas con cambios en los niveles de infección por bacterias patógenas (Pavet et al., 2006).

La enzima DNMT1 tiene una alta afinidad por la 5-metilcitosina y, si se une a ella, quizá podría metilar la citosina de la nueva copia, por lo que se la denomina “metiltransferasa de mantenimiento” y podría estar involucrada en la herencia de esta modificación.

1.8.2. Histonas

Las histonas son miembros de dos superfamilias de proteínas, altamente conservadas entre los eucariotas. Algunas de ellas no tienen intrones y sus mRNAs carecen de cola poli (A) y entre las arqueas, incluso, se encuentran proteínas similares a las mismas (Mattioli et al., 2017). Son las proteínas principales de la cromatina que, por su naturaleza altamente básica, tienen carga positiva a pH fisiológico, provocando que se unan con avidez al DNA debido a su carga negativa.

Introducción

Carentes de triptófano (van Holde, 1989), siendo especialmente ricas en lisina y arginina, gracias a lo cual obtienen su naturaleza básica.

Una de las dos superfamilias está compuesta por las cinco familias principales, llamadas, en general, “histonas del núcleo o médula” o específicamente “histona 2A, 2B, 3 y 4” (H1, H2A, H2B, H3 y H4, respectivamente), que se asocian entre sí junto con la “histona 1” (H1) para formar unas unidades llamadas nucleosomas (figura 27). En primer lugar, una H3 se asocia a una H4 formando un dímero y, posteriormente, un tetrámero, al unirse con otro dímero igual; de forma paralela, una H2A se asocia a una H2B y forma otro dímero. Dos dímeros se unen al tetrámero de H3 y H4, formando un octámero. En esta estructura las histonas presentarán su zona con carga positiva hacia el exterior, lo que les permite unirse con los grupos fosfato cargados negativamente de la hebra del DNA, que da, aproximadamente, dos (1,7) vueltas alrededor del nucleosoma a lo largo de 147 bp. Entre dos octámeros hay entre 20 y 60 bp de DNA, por lo que se considera que desde el inicio de uno hasta el siguiente hay unas 200 bp de DNA. Un nucleosoma es el conjunto del octámero, su DNA asociado y el que existe hasta el siguiente; varios nucleosomas forman la segunda estructura de condensación del DNA, llamada “fibra de 10 nm” o “collar de perlas”, por su aspecto al microscopio electrónico.

La H1 es miembro de la otra superfamilia llamada “ligador”, ya que su función es la de unirse al DNA en la zona del nucleosoma en la que la hebra llega y lo abandona, de modo que mantiene fija la hebra. H1 permite que los nucleosomas formen la tercera estructura de condensación, llamada “fibra de 30 nm” por su grosor. Para llegar hasta el nivel de condensación del cromosoma, hace falta la interacción con más proteínas formando grandes lazos que se anclan en la matriz nuclear. Cuando el DNA se replica no se separa completamente de las histonas y, es posible, que las modificadas pudieran servir de molde para las nuevas, en la cadena recién sintetizada, permitiendo una herencia de sus efectos tras la división celular (Ogryzko, 2008).

Existe una zona libre de nucleosomas alrededor del TSS (Segal et al., 2006, Liu et al., 2011), que permite que se añadan distintos TFs y la RNAP (figura 28). Además, los nucleosomas que se encuentran cercanos a esta zona muestran una mayor capacidad de movilidad que los del cuerpo del gen (Weiner et al., 2010). Por otro lado, los intrones muestran una menor densidad de nucleosomas (posiblemente debido a su menor contenido en GC), lo cual permite la unión de TFs (Schwartz et al., 2009); incluso los exones constitutivos muestran mayor cantidad que aquellos que pueden ser alternativamente eliminados durante el ajuste (Tilgner et al., 2009).

1.8.2.1. Modificaciones de histonas

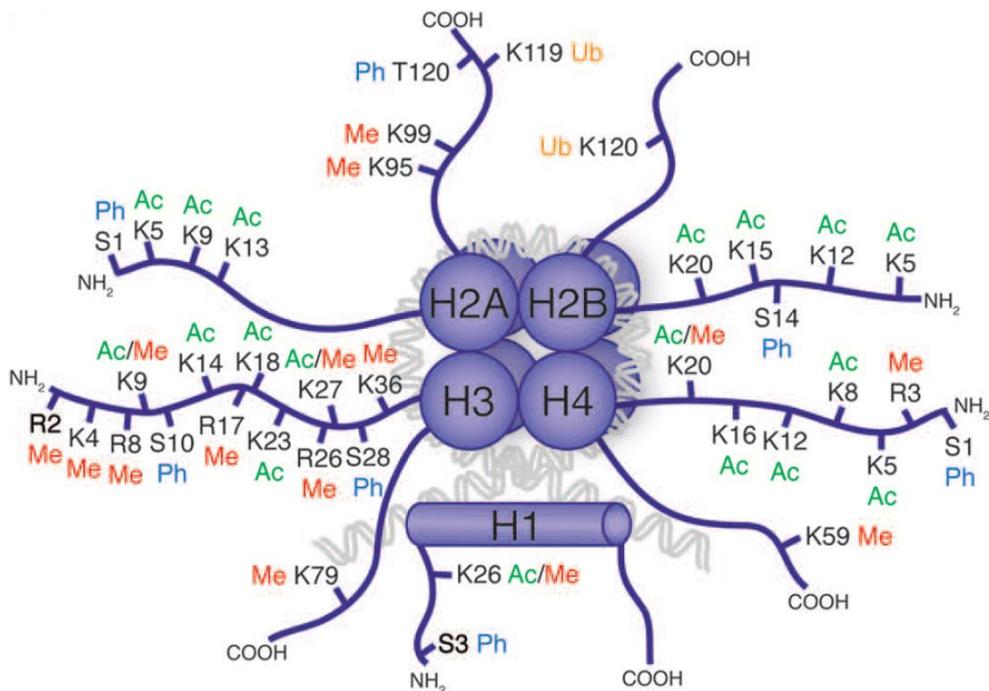


Figura 27 Modificaciones de histonas en el nucleosoma

En la figura se muestra un nucleosoma representado esquemáticamente con las cinco clases de histonas y sus modificaciones más comunes en las colas de ambos extremos amino (NH₂) y carboxilo (COOH) terminal (Tollervey and Lunyak, 2012).

Introducción

Todas las histonas, incluida H1, alejan sus regiones amino y carboxilo terminal de su centro de interacción con el DNA (figura 27). Estas regiones se denominan colas y algunos de sus aminoácidos pueden sufrir modificaciones, especialmente los aminoácidos lisina y arginina (K y R, respectivamente), aunque también se producen en serina, treonina y tirosina (S, T e Y, respectivamente).

Las modificaciones más importantes son simples adiciones de grupos funcionales, como acetilo (-COCH₃; abreviado como ac) o fosfato (PO₄³⁻; abreviado como ph). También pueden añadirse uno, dos o hasta tres grupos metilo a un mismo aminoácido (me1, me2 y me3, respectivamente) o, en menor grado, producirse la unión de moléculas más complejas como la proteína ubiquitina (ub) y su proteína relacionada, la “pequeña modificadora similar a la ubiquitina” (SUMO o su). Finalmente, también pueden agregarse moléculas como la “ribosa difosfato de adenosina” (ADP-ribosa) o, en el caso de la arginina, puede producirse la citrulinación, proceso por el cual se convierte en el aminoácido no proteico citrulina.

Nomenclatura

Con el fin de dar una denominación sencilla a las modificaciones de histonas, se usan las abreviaturas expuestas con anterioridad y se utiliza una nomenclatura que respeta las siguientes reglas:

1. Nombre de la histona (ej. H3)
2. Nombre del aminoácido (ej. K)
3. Posición del aminoácido en la histona desde su extremo amino terminal (ej. 4)
4. Nombre de la modificación (ej. me)
5. Número de veces que se da la modificación (en el caso de modificaciones que puedan darse más de una vez (ej. 3)

En el caso ejemplificado de que la modificación fuera una triple (3) metilación (me) de la lisina (K) cuatro (4) de la histona 3 (H3), se denominaría H3K4me3.

Interacción con la actividad transcripcional

Generalmente, se relacionan ciertas modificaciones con estados activos o inactivos (represores) de transcripción génica, o con la formación de eucromatina o heterocromatina, respectivamente. En un estado activo de eucromatina, el espacio entre nucleosomas será mayor, el DNA no estará tan fuertemente unido a éstos y, por lo tanto, a la hebra se le podrán unir proteínas que permitirán la expresión del gen codificado en la región, como TFs o la RNAPII. Normalmente, los genes se encuentran en la eucromatina, mientras que la heterocromatina es más rica en transposones. Sin embargo, esto es una simplificación, pues también existen estados intermedios en los que estos factores pueden unirse y la RNAPII puede permanecer pausada a la espera de una señal que active la polimerización, que ocurrirá más rápidamente que si hubiera que remodelar desde el estado de heterocromatina. Además, una modificación en una histona de un nucleosoma, entre el conjunto de las que se encuentran empaquetando un gen concreto, no debería ser capaz de determinar algo tan drástico como si un gen se transcribe o no. Por ello, formando parte del citado código epigenético, se hipotetiza sobre la existencia de un código histónico (Jenuwein and Allis, 2001). Dicho código sería enormemente complejo, debido a que sería fruto de la interacción de todas las modificaciones posibles en una región concreta (cis) o, incluso, en regiones lejanas (trans). Por ejemplo, en un mismo nucleosoma varias histonas pueden sufrir modificaciones simultáneas en distintos aminoácidos de sus colas. Este código estaría controlado por tres tipos de moléculas: escritores, lectores y borradores, de los cuales se obtiene nueva información continuamente (Wang et al., 2010a).

Escribir, leer y borrar

Las modificaciones más relevantes se hallan en las histonas de la superfamilia del núcleo, sobre todo en las colas carboxilo terminales de H3 y, en menor grado, H4. Estas modificaciones son producidas por varias enzimas, como las “transferasas de metilo en histonas” (HMT), las “transferasas de acetilo en histonas” (HAT), la

Introducción

“desiminasa de peptidil arginina” (PAD) o las ligasas de ubiquitina. Estas serían las denominadas enzimas “escritoras” del código.

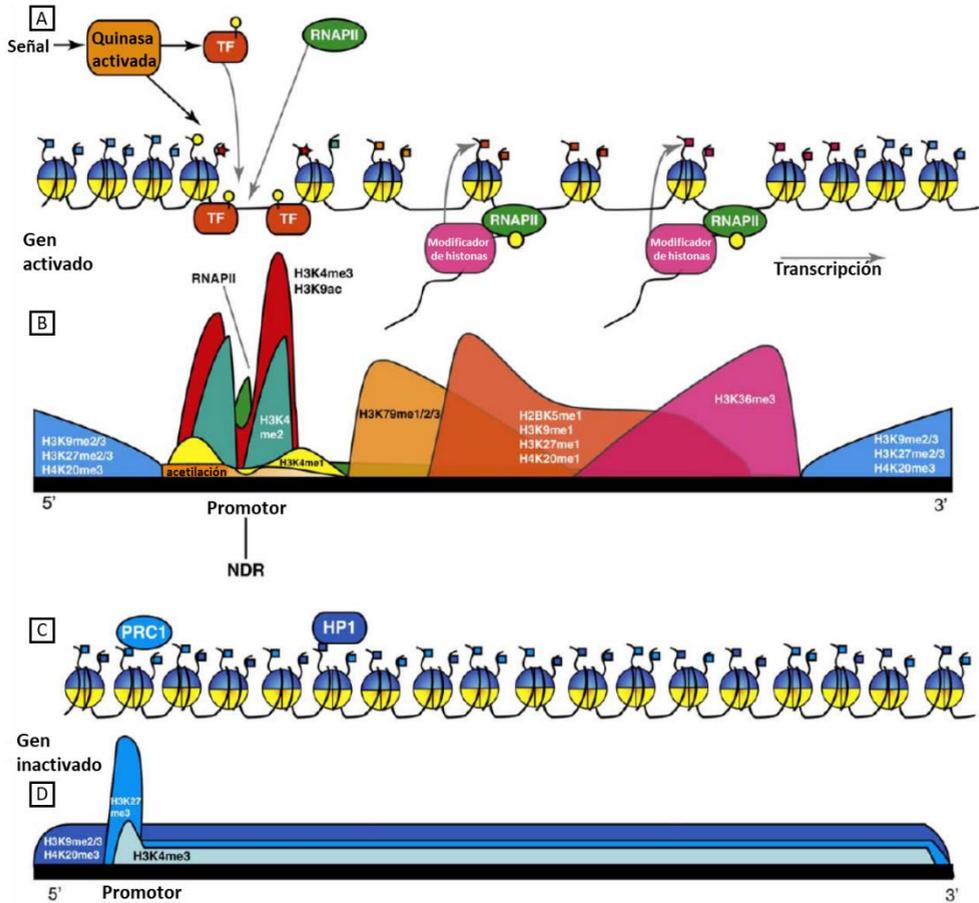


Figura 28 Distribución de las modificaciones de histonas

Traducida de Barth and Imhof (2010). (A) Una señal externa puede producir que las quinasas fosforilen (pequeños círculos amarillos) a las histonas de los nucleosomas (círculos amarillos y azules) y a TFs. Esto, a su vez, facilita el acoplamiento de la RNAPII y posteriormente la transcripción. La RNAPII, se fosforilará también durante el proceso e interactuará en su extremo C terminal con enzimas modificadoras de histonas. Los nucleosomas, en general, muestran una distribución diferente a la de los genes reprimidos (D), dejando una “zona libre de nucleosomas” (NDR) en el TSS y estando más espaciados a lo largo del gen. Además, los genes reprimidos tendrán proteínas heterocromatínicas (azul: “proteína heterocromatínica 1” (HP1) y “complejo represor polycomb 1” (PRC1)). A su vez, las modificaciones de histonas que poseen estos nucleosomas, también difieren (B y D), habiendo en genes activos una colección de modificaciones, como H3K4me3 y H3K9ac, en el promotor y el inicio del gen o H3K79me en su cuerpo, mientras que en los genes reprimidos la variedad es menor, siendo predominante H3K27me3 en la zona del promotor o H3K9me a lo largo de todo el gen.

Una vez realizadas las modificaciones en los aminoácidos éstas, en ocasiones, tienen efectos por si solas a nivel biofísico, lo cual se denomina efecto “cis”. Este se

da, especialmente, en aquellas modificaciones que alteran en exceso la masa o modifican la carga del aminoácido. Los ejemplos más claros son las que eliminan la carga positiva de los aminoácidos, provocando que el DNA (cargado negativamente) pierda afinidad por la histona, quedando así más accesible la hebra, lo que hace que la transcripción sea más sencilla. Entre estos casos se encuentran las acetilaciones de lisinas y argininas, así como la citrulinación de la arginina. Sin embargo, tanto las acetilaciones como el resto de modificaciones pueden tener efectos “trans”, que varían mucho dependiendo del aminoácido en que se encuentren, destacando especialmente las metilaciones. Un grupo metilo no modifica la carga del aminoácido y añade muy poco peso a éste, por lo que sus efectos puramente físicos son mínimos. Si bien su efecto podría ser simplemente el de impedir la presencia de una marca permisiva, como la acetilación, el funcionamiento parece ser más complejo, pues pueden tener también efectos positivos sobre la transcripción y su presencia tiene diferentes repercusiones, dependiendo del número de grupos metilo que haya en un mismo aminoácido. En estos casos entran en juego las moléculas denominadas “lectoras”, que reconocen y se asocian a las modificaciones, reclutando proteínas adicionales para causar sus efectos. Por ejemplo, las hay con dominios “Tudor”, “cromo” u “homeodominio de plantas” (PHD), que reconocen los grupos metilo y distinguen su número. Además, las metilaciones varían de un aminoácido a otro. En la lisina pueden darse hasta tres y en la arginina solo dos; sin embargo, pueden producirse de forma simétrica o asimétrica (debido a que hay dos grupos amino que pueden metilarse simultáneamente, metilarse solo uno o, dimetilarse solo uno (Litt et al., 2009)), lo que podría cambiar su función. Gracias a esto las metilaciones suelen dominar sobre las otras modificaciones, siendo buenos marcadores.

Las más comunes de estas modificaciones son reversibles (ejemplos de irreversibles serían la citrulinación), de modo que en el momento en que dejan de ser necesarias se eliminan con enzimas de efecto contrario a las escritoras, llamadas enzimas

Introducción

“borradoras”. Entre ellas se encuentran las “desmetilasas de histonas” (HDM), las “desacetilasas de histonas” (HDA) y las enzimas desubiquitinantes.

Modificaciones activadoras

Como se ha mencionado anteriormente, la acetilación es una de las marcas más inequívocas de activación transcripcional, como es el caso de H2K20ac, H3K9ac, H3K14ac o H3K27ac, (Eberharther and Becker, 2002). Sin embargo, la lista de marcas activadoras cuenta con otras modificaciones, como varias metilaciones: H2BK5me1, H3K4me1, H3K4me3, H3K9me1, H3K27me1, H3K79me1, H3K79me2, H3K36me3 o H4K20me1 (Cell Signaling Technology, 2007).

Entre las metilaciones destaca H3K4me3, modificación que suele ir acompañada por la H3K9ac (figura 28). Es un excelente marcador de promotores activos, por lo que se correlaciona muy bien con la transcripción. A ella se unen proteínas que procesan mRNA y se le asocia la capacidad de remodelar la cromatina, aunque su papel no es del todo conocido (Woo et al., 2017).

Se conocen dos familias de proteínas responsables de trimetilar la H3K4. En primer lugar, las “Su(var)3-9, Enhancer de zeste y Trithorax” (SET), que interactúan con el “complejo de proteínas asociadas a Set1/Set1” (COMPASS). La función de las SET se distribuye globalmente por el genoma. En segundo lugar, la familia “trithorax” (TRX), que interactúa con “similar a COMPASS” (COMPASS-like). Las funciones de las TRX, son más específicas de genes y no son responsables de los cambios globales en los nucleosomas. En los genes la función de H3K4me3 es dual, dependiendo de si se localiza aguas arriba o abajo del TSS:

- En los promotores forma un complejo con TBP y la RNAPII, afectando a la formación y estabilidad del complejo de preiniciación de la transcripción.
- En la región transcrita se produce un aumento de los nucleosomas con dicha modificación hasta 300 bp del TSS (figura 28). Este aumento requiere de la presencia de la forma activa de la RNAPII en dicha zona del gen; esta

forma se produce tras la fosforilación de la serina 5, que se da en muchas de las numerosas repeticiones de la secuencia de aminoácidos “YSPTSPS” en el dominio carboxilo terminal de la proteína. Se forma así la “RNAPII Ser5P” (RNAPIIS5P). ATX1 se une directamente a RNAPIIS5P para realizar la modificación.

Los dos COMPASS comparten tres subunidades conservadas en el dominio eucariota: WDR5, ASH2L y RbBp5, esenciales para la actividad metiltransferasa de SET o TRX. Además, mutaciones en ambos COMPASS disminuyen los niveles de mRNA y de H3K4me3. Por otro lado, se espera que ambas familias tengan distintas funciones debido a las diferencias estructurales y funcionales de SET y TRX, así como por la composición proteica y la interacción con sus respectivas subunidades en COMPASS y COMPASS-like.

Otra modificación, frecuentemente asociada con activación transcripcional, es H3K36me3, producto de otra trimetilación, en este caso mediada por SET2. El complejo “dependencia reducida de potasio 3” (RPD3), cuya función es eliminar los grupos acetilo de las histonas y generar un estado de cromatina compactada, al reconocer H3K36me3 no realiza su cometido, previniendo la interrupción de la transcripción. Por otro lado, esta modificación también se ha visto asociada con la corrección de desapareamientos de bases en el DNA (Venkatesh and Workman, 2015).

Modificaciones represoras

Como se ha visto antes, puede haber casos de marcas metiladas o acetiladas que producen activación transcripcional. Sin embargo, no se observa lo mismo con las que tienen efecto contrario, entre las que destacan: H2BK5me3, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2 y H3K27me3.

Introducción

Una de las más estudiadas es H3K27me3, que se encuentra como marca represora en la eucromatina (figura 28). Los “complejos represores polycomb” (PRC), son los responsables de realizar esta metilación, concretamente PRC2. Los PRCs funcionan como represores transcripcionales, cambiando la cromatina a un estado más compacto (Pikaard and Mittelsten Scheid, 2014). En este caso concreto, al ser trimetilada la H3K27 por PRC2 interaccionaría con otro PRC, en este caso PRC1, que al interaccionar con ella produciría la ubiquitinación de H2A, que promueve la compactación cromatínica. Por consiguiente, PRC2 acabaría por reclutar indirectamente a PRC1.

1.8.2.2. Sustitución de histonas

Las variantes de histonas, son proteínas que sustituyen a las histonas canónicas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) en los nucleosomas, proporcionándoles características funcionales y estructurales concretas (Deal and Henikoff, 2011). Estas variantes, además, poseen varias diferencias básicas con las canónicas:

- Se producen durante cualquier fase del ciclo celular y no solo en la replicación.
- No están tan conservadas en el dominio eucariota y sus genes no tienen tantas copias.
- Poseen intrones en sus genes y cola poli A en su mRNA.

Los organismos complejos suelen tener muchas de estas variantes. Destacan las que derivan de H2A y H3, mientras que en H2B no son tan habituales y en H4 se han detectado en pocas especies. Los aminoácidos cambiados producen interacciones distintas dentro y fuera del nucleosoma, modificando su estabilidad; por tanto, tal como ocurre con las modificaciones de histonas, sus variantes pueden encontrarse presentes en eucromatina o heterocromatina.

Las variantes de la H2A y la H3 evolucionaron de forma independiente en plantas y animales, no obstante, parece haber convergencia evolutiva entre sus funciones (Kawashima et al., 2015).

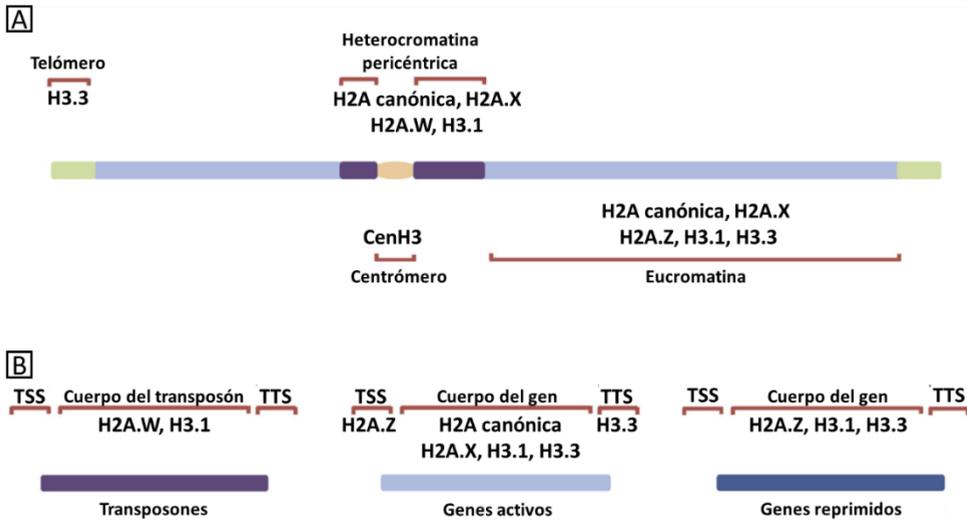


Figura 29 Distribución de las variantes de histonas

Traducida de Jiang and Berger (2017). (A) A nivel cromosómico, las variantes de histonas se distribuyen diferencialmente por zonas, los telómeros acumulan H3.3, en el centrómero se haya CenH3 y en las regiones pericéntricas está la H2A canónica, H2A.x, H2A.W y H3.1. En cuanto a la euromatina, situada entre las citadas zonas, la distribución es similar a la heterocromatina pericéntrica, pero con H2A.Z en vez de H2A.W y, también, se haya H3.3. (B) A nivel genético la distribución varía entre estados de transcripción, transposones y zonas del gen. H3.1, es común en el cuerpo de genes de alta y baja expresión y en transposones, mientras que en TSS y TTS solo en genes activos se encuentran diferentes a las canónicas (H2A.Z y H3.3, respectivamente).

Variantes de H2A

H2A.W es una variante exclusiva de plantas, que escasea en los cuerpos de los genes y la euromatina, pero es muy común en la heterocromatina, junto a la modificación H3K9me2 y los transposones (figura 29 (Bernatavichute et al., 2008)). Posee homología con la MacroH2A de vertebrados, responsable de inactivar uno de los cromosomas X en hembras (Gamble et al., 2010).

La H2A.Z es una de las variantes más conservadas. Se asocia con genes en la euromatina y está muy enriquecida en la región carente de nucleosomas alrededor del TSS. Se localiza fundamentalmente en el primer nucleosoma tras la TSS, que es una gran barrera para la elongación porque bloquea, o pausa, la RNAPII prácticamente en todos los genes. (figura 29) La H2A.Z al incorporarse al nucleosoma facilita el desplazamiento del dímero que forma con H2B, provocando

Introducción

que se debilite la barrera y, por tanto, promoviendo la elongación transcripcional (Weber et al., 2014). Por el contrario, su deposición en nucleosomas de los cuerpos de los genes se correlaciona negativamente con la transcripción, al contrario de lo que ocurre, por ejemplo, con H2A.X (que también es común en heterocromatina pericéntrica (Heo et al., 2008)).

Variantes de H3

H3.3 es una variante muy parecida a la canónica, que puede depositarse en cualquier momento del ciclo celular y se localiza principalmente en telómeros y eucromatina. Su presencia en la eucromatina se relaciona con la activación transcripcional, sobre todo cuando está en los TTS. Asimismo, su deposición se correlaciona con marcas activadoras, tales como H3K4me1 y H2Bub. Cuando la RNAPII avanza por el gen, mientras sintetiza el transcrito, se va fosforilando en su serina 2 y pierde la fosforilación en la 5, propia de la zona TSS (sección 1.8.2.1.), formando así la RNAPII Ser2P (RNAPIIS2P). Paralelamente, esa polimerasa fosforilada parece producir la deposición de H3.3 en el TTS, lo cual explicaría el hecho de que ambas proteínas suelen encontrarse juntas en esta zona.

La variante H3.1, se deposita en la fase de replicación y se localiza en las regiones que flanquean los centrómeros de cada cromosoma (figura 29). Es una variante que se encuentra en zonas con abundancia de H3K9me2 y H3K27me3. Dado el papel de H3K27me3 en la eucromatina, H3.1 tendría funciones represivas en eucromatina y en heterocromatina. Tanto H2A.W, como H3.1 y la metilación del DNA, parecen tener un papel en la represión de los transposones (Jiang and Berger, 2017).

CenH3 es muy distinta a las otras histonas y está presente en los centrómeros. Finalmente, en *A. thaliana* hay una variante llamada H3.10, también denominada “histona 3 específica del gameto masculino” (MGH3), que se da en el polen y se retira rápidamente del cigoto tras la fertilización (Ravi et al., 2011).

1.8.3. RNA

La epigenética mediada por RNA es la menos conocida, sin embargo, parece ser mayoritariamente la responsable de regular las modificaciones en las otras dos moléculas y la que dispone de un mecanismo de herencia más claro.

Generalmente el RNA puede alterar la transcripción mediante el “silenciamiento génico transcripcional o postranscripcional” (TGS o PTGS, respectivamente (Gutzat and Mittelsten Scheid, 2012)). Los pequeños RNAs, específicamente los micro RNAs (miRNA) y los pequeños RNAs de interferencia (siRNA), están involucrados en el silenciamiento transcripcional y postranscripcional. Las similitudes en estos mecanismos parecen indicar un origen común en eucariotas (Chapman and Carrington, 2007, Shabalina and Koonin, 2008). Sin embargo, en las plantas los mecanismos se han especializado mucho más que en el resto del dominio (Vazquez et al., 2010), desarrollando cuatro mecanismos principales (Pikaard and Mittelsten Scheid, 2014):

1. Se sintetizan miRNAs que son complementarios a mRNAs concretos, lo cual impide su traducción y promueve su degradación.
2. Hay miRNAs que pueden producir la síntesis de siRNAs, que reprimen la expresión de objetivos varios, sin ser complementarios a ellos.
3. Existen siRNAs capaces de interferir con RNAs víricos, o de otros organismos, impidiendo su expresión.
4. Un siRNA puede mediar la metilación del DNA en un proceso llamado “metilación del DNA dirigida por RNA” (RdDM) y, como consecuencia, la represión de genes concretos, así como de virus o transposones.

Interacción entre planta y patógeno

El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta tesis doctoral, ha estado centrado en este tema desde hace muchos años, abordándolo especialmente desde el punto de vista de la planta. Se han utilizado varias aproximaciones experimentales, haciendo uso de diversas herramientas como el estudio fenotípico para comparar los niveles de susceptibilidad de las plantas (Flors et al., 2007); la RTqPCR y la transcriptómica, para determinar los cambios producidos a nivel transcripcional en las plantas infectadas (Finiti et al., 2014); diversas tinciones para determinar los niveles de acumulación de polisacáridos de defensa como la calosa, o de ROS (Flors et al., 2007, Vicedo et al., 2009); la espectrometría de masas para la cuantificación de los niveles de hormonas y metabolitos secundarios implicados en la defensa (Camañes et al., 2015). También se ha trabajado con diversos mutantes, tanto de plantas de *A. thaliana* y de *S. lycopersicum* para llevar a cabo estudios funcionales (Lopez-Cruz et al., 2014, Angulo et al., 2015, Vicedo et al., 2009), como de *B. cinerea* para establecer la posible manipulación de las defensas de la planta por parte del patógeno (Lopez-Cruz et al., 2017). Adicionalmente, se ha trabajado con diversos cultivos y patógenos, en los que se ha estudiado la defensa basal e inducida mediante tratamientos con compuestos naturales (Kravchuk et al., 2011, Scalschi et al., 2013, Lopez-Galiano et al., 2017, Aranega-Bou et al., 2014, Fernández-Crespo E., 2017).

Estudio epigenético

Se ha demostrado que la epigenética juega un papel clave en la regulación de la expresión de los genes implicados en la respuesta de las plantas frente a patógenos (Ding and Wang, 2015). Una precisa y veloz reprogramación transcripcional, a menudo, se ve relacionada con modificaciones de histonas y, en general, con la remodelación cromatínica en *A. thaliana* (Alvarez et al., 2010). Este campo se ha

desarrollado especialmente en los últimos años, por lo que abordar un estudio desde esta perspectiva, sobre todo en el caso de la defensa frente a patógenos necrótrofos, resulta de gran interés (tabla 2). El análisis de las modificaciones epigenéticas, puede aportar datos muy valiosos a la hora de entender los complicados equilibrios existentes entre las distintas rutas hormonales, así como de los mecanismos a través de los cuales los genes implicados en rutas aparentemente antagónicas se expresan a lo largo de la infección. Además del trabajo realizado en la presente tesis, el grupo de investigación ha desarrollado, en los últimos años, otras herramientas para detectar cambios epigenéticos a nivel de RNAs (Lopez-Galiano et al., 2018).

1.10. Objetivos

Partiendo de la línea principal del grupo de investigación, la relación entre planta y patógeno, y teniendo en cuenta los nuevos datos obtenidos a nivel epigenético en plantas, los objetivos propuestos en esta tesis fueron de dos tipos:

1) Metodológicos:

- Puesta a punto de un protocolo de extracción de cromatina de plantas de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea*.
- Puesta a punto de un protocolo de ChIP extraída de plantas de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea*.
- Adaptación del protocolo de extracción de cromatina a plantas de *S. lycopersicum* infectadas con *B. cinerea*.
- Adaptación del protocolo de ChIP extraída de plantas de *S. lycopersicum* infectadas con *B. cinerea*.

2) Experimentales:

- Análisis de marcas epigenéticas de histonas en genes de *A. thaliana* implicados en la respuesta temprana a *B. cinerea*.

Introducción

- Análisis de marcas epigenéticas de histonas en genes de *S. lycopersicum* implicados en la respuesta temprana a *B. cinerea*.
- Determinación de la presencia de RNAPII en los genes de *S. lycopersicum* implicados en la respuesta temprana a *B. cinerea*.

Por tanto, gran parte de la tesis se tiene que dedicar al desarrollo o modificación de los protocolos necesarios para realizar los estudios epigenéticos en ambas especies, usando *A. thaliana* como modelo, adaptando posteriormente los protocolos ya funcionales a *S. lycopersicum*. En ambos casos, tras la puesta a punto de los protocolos, se procedió a analizar las distintas marcas de interés en los genes seleccionados y a determinar la presencia de la RNAPII en los mismos.

Introducción

Tabla 2 Trabajos consultados relacionados con el estudio de estreses abióticos o bióticos en plantas mediante ChIP

Especie	Estrés	Tratamiento	Mutantes	Anticuerpos	Genes	Regiones génicas	Referencia
<i>A. thaliana</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>A. brassicicola</i> y <i>P. syringae</i>	PAMP	Sí	H3K4me1, H3K4me2, y H3K4me3, H2Bubn, H3K36me1, H3K36me2 y H3K36me3	<i>CCR2</i> y <i>CER3</i>	Promotor y cuerpo del gen	(Lee et al., 2016)
<i>A. thaliana</i>	<i>B. cinerea</i> y <i>A. brassicicola</i>	Ninguno	Sí	H3K9/14ac y GFP	<i>WRKY33</i> , <i>ORA59</i> y <i>PDF1.2</i>	Promotor, cuerpo del gen y 3' UTR	(Wang et al., 2015)
<i>A. thaliana</i>	<i>B. cinerea</i> y <i>P. syringae</i>	ABA	Sí	H3, H3ac y H4ac	<i>PDF1.2</i> , <i>PR1</i> , <i>RPM1</i> , <i>RIN4</i> , <i>CYP79B3</i> , <i>PAD3</i> , <i>SUR2</i> , <i>WRKY33</i> , <i>ACS2</i> , <i>ACS6</i> , <i>WRKY40</i> , <i>RD29a</i> , <i>KAT2</i> , <i>HYS</i> , <i>ABI3</i> y <i>ABI5</i>	Promotor, TSS y CDS	(Liao et al., 2016)
<i>A. thaliana</i>	<i>B. cinerea</i> y <i>A. brassicicola</i>	MeJA	Sí	H3, H3K36me1, H3K36me3 y H3K27me3	<i>PDF1.2a</i> , <i>VSP2</i> , <i>MKK3</i> y <i>MKK5</i>	Cuerpo del gen y UTRs	(Berr et al., 2010)
<i>A. thaliana</i> y ^a <i>N. benthamiana</i>	<i>B. cinerea</i> y <i>A. brassicicola</i>	ABA y MeJA	Sí	MED18, RNA Pol II y H3K36me3	<i>PTR3</i> , <i>ABI5</i> y <i>FLC</i>	Promotor, TSS, cuerpo del gen y 3' UTR	(Lai et al., 2014)
<i>A. thaliana</i>	^b <i>H. arabidopsidis</i> y <i>P. syringae</i>	BABA	Sí	H3K9ac	<i>PR1</i> , <i>WRKY6</i> , <i>WRKY29</i> , <i>WRKY53</i> y <i>WRKY70</i>	Promotor	(Luna et al., 2014)
<i>A. thaliana</i>	<i>H. arabidopsidis</i> , <i>P. syringae</i> y <i>A. brassicicola</i>	SA y herencia	No	H3K9ac y H3K27me3	<i>PR1</i> , <i>WRKY6</i> , <i>WRKY53</i> , <i>WRKY70</i> y <i>PDF1.2</i>	Promotor	(Luna et al., 2012)
<i>A. thaliana</i>	^c <i>P. s. maculicola</i>	BTH	Sí	H3K4me3, H3K4me2, H3K4me1, K3K9ac, H4K5ac, H4K8ac y H4K12ac	<i>WRKY29</i> , <i>WRKY6</i> , <i>WRKY53</i> , <i>CHS</i> , <i>PR1</i> y <i>UBQ5</i>	Promotor	(Jaskiewicz et al., 2011a)
<i>A. thaliana</i>	Sequía	MeJA y sequía repetida	Sí	H3K4me3, Ser5P Pol II, H3, proteína de unión a TATA, FLAG y HA	<i>RD29B</i> y <i>RD29A</i>	Promotor y cuerpo del gen	(Liu and Avramova, 2016)
<i>A. thaliana</i>	Sequía	Sequía repetida	Sí	Ser2P, H3K4me3, H3K27me3 y H3	<i>LTP3</i> , <i>LTP4</i> , <i>HIPP2.2</i> , <i>RAB18</i> , <i>RD29B</i> , <i>RD29A</i> y <i>AGAMOUS</i>	Promotor, cuerpo del gen y UTRs	(Liu et al., 2014)

Introducción

<i>A. thaliana</i>	Sequía	Sequía repetida	No	Ser2P, Ser5P, H3K4me3 y H3	<i>RD29A, COR15A, RD29B, RAB18</i> y <i>ACT7</i>	Promotor, TSS, cuerpo del gen y UTRs	(Ding et al., 2012)
<i>A. thaliana</i>	Frío	Ninguno	Sí	RNA Pol II, H3, H3ac y MED6	<i>KIN2, GOLS3, PEX4, LTI78, COR15a</i> y <i>AT1G20030</i>	Promotor, TSS, UTRs, cuerpo del gen y 3' IGR	(Hemsley et al., 2014)
<i>S. lycopersicum</i>	Sequía	Ninguno	No	H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me2	<i>Asr2</i>	Promotor y cuerpo del gen	(Gonzalez et al., 2013)
<i>O. sativa</i>	Ninguno	5-azacitidina y herencia	Sí	H3K4me3, H3K27me3, FLAG y SDG711	<i>Os03g02470, 08g33488</i> y <i>ACTINA</i>	Promotor y TSS	(Chen et al., 2015a)
<i>P. vulgaris</i>	<i>P. syringae</i>	INA, BABA y herencia	No	H3K4me3 y H3K36me3	<i>PR1, PR4, NPR1, WRKY6, WRKY29</i> y <i>WRKY53</i>	TSS	(Martinez-Aguilar et al., 2016)-

En la tabla se esquematizan los trabajos consultados que reunían uno o varios aspectos de interés para los objetivos de esta tesis. De especial interés fueron aquellos que estudiaban estreses bióticos en *A. thaliana* o *S. lycopersicum*, a la hora de consultar los protocolos, pero también eran de gran interés las zonas génicas analizadas en aquellos que estudiaban las mismas modificaciones epigenéticas y/o genes. Cabe destacar que, aunque por simplicidad se mencione que se somete a la planta a uno o varios estreses, se realicen tratamientos, se analicen distintas modificaciones y genes en varias zonas; no necesariamente se dan todas las combinaciones posibles en estos trabajos. De hecho, los genes más estudiados en esta tesis, y las modificaciones elegidas, apenas han sido estudiadas, sobre todo en plantas infectadas por *B cinerea* y, especialmente en plantas de *S. lycopersicum*. Especies introducidas: ^a *Nicotiana benthamiana* ^b *Hyaloperonospora arabidopsidis* y ^c *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*.

2. Materiales y métodos

Los experimentos llevados a cabo en esta tesis han requerido la puesta a punto de nuevos protocolos, así como la adaptación de otros previamente utilizados, por lo que tiene un gran componente metodológico. Ha sido necesario modificar las condiciones de cultivo de las plantas y de los hongos para lograr un patosistema más homogéneo, en el que se intensificaran las respuestas frente al patógeno. Por otra parte, la obtención de un protocolo adecuado para el análisis de las modificaciones de histonas en plantas de *A. thaliana* infectadas por un necrótrofo, ha requerido introducir muchas modificaciones en los protocolos descritos previamente para este cultivo. El posterior análisis de dichas marcas epigenéticas en el patosistema *S. lycopersicum*-*B. cinerea*, ha implicado un posterior ajuste de los protocolos a este complejo sistema para el que la información disponible en el campo de la epigenética es escasa.

En la descripción de los métodos utilizados cada protocolo se ha descrito indicando la secuencia detallada del proceso de actuación, así como su duración aproximada (que será indicada al principio de cada uno). Se ha considerado un protocolo como independiente del inmediatamente posterior (o posteriores), si puede realizarse tras un periodo indeterminado de tiempo tras la finalización del primero (por ejemplo: extraer DNA sería un protocolo independiente del de su amplificación por qPCR, o de su visualización por electroforesis, pero infectar unas plantas y muestrearlas formarían parte del mismo protocolo). En el caso de un proceso que puede realizarse para otros fines, de forma independiente al protocolo en el que se encuentra, se ha considerado "subprotocolo" (por ejemplo: extraer conidiosporas sería un subprotocolo de la infección y muestreo, pero también, de la elaboración de glicerizados). En el caso de la generación de hongos y plantas, si bien técnicamente el protocolo va desde que se siembran hasta que se muestrean, por necesitar hongos y plantas de una edad concreta, se consideran protocolos separados a los de infección por ser, tanto las especies vegetales como la fúngica, generadas continuamente.

Además de los protocolos necesarios para la obtención de los datos, se describen los procedimientos necesarios para su procesamiento.

2.1. Mantenimiento y crecimiento del patógeno y de los hospedadores

El modelo de infección utilizado en este grupo de investigación, emplea como patógeno al hongo necrótrofo *B. cinerea* y como planta la brasicácea *A. thaliana*, sobre todo para la puesta punto y validación de los protocolos, y la solanácea *S. lycopersicum*, por constituir un modelo de plantas complejas con mayor interés comercial.

Con el fin de estudiar convenientemente las alteraciones que este patógeno produce en las plantas, se tuvo que tener muy en cuenta su naturaleza virulenta y necrótrofa, sobre todo a la hora de calcular las conidiosporas a inocular, así como el tiempo transcurrido antes de recoger las muestras. Además, es un hongo muy sensible a la desecación, hecho que también fue muy importante a la hora de cómo tratar las plantas una vez inoculadas con las conidiosporas. En cuanto a las plantas, también fue necesario conocer sus características, pues, por su mayor compatibilidad (sección 1.7.), *S. lycopersicum* presenta síntomas de la enfermedad de una forma mucho más temprana y aguda que *A. thaliana*.

En ambos casos, se ajustaron las condiciones ambientales para facilitar la infección, sobre todo en lo referente a humedad, luz y temperatura (sección 1.3.).

2.1.1. Generación de hongos

Duración: siete días

B. cinerea puede crecer y esporular con facilidad fuera de la planta, normalmente a partir de restos de tejido vegetal muerto en un tipo de desarrollo denominado saprofito. Pero se adapta fácilmente a otros medios, lo cual facilita en placa de Petri (figura 21 A y B, tabla 3). Teniendo esto en cuenta, para que pudiera

desarrollar la enfermedad en las plantas, se eligió el contagio mediante conidiosporas.

La cepa utilizada es B05.10 (derivada de la cepa SAS56) cedida por el Dr. Paul Tudzynski (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Alemania).

Previo:

- Se recolectaron hojas de *S. lycopersicum*, sin incluir peciolas ni tallos de la planta, y se guardaron a -20 °C. Una vez congeladas, se trocearon, apretando la bolsa para volver a guardarlas a -20 °C.
- Se preparó medio PDA siguiendo este proceso:

Pesos para preparar 500 mL de PDA (*Agar de Patata Dextrosada (Farm. Eur.)*, ref. 01-483-500, Scharlab, S.L.).

Tabla 3 Composición del medio PDA modificado

Medio PDA	
Componente	Concentración
PDA	3,9 % (p/v)
Hojas de <i>S. lycopersicum</i>	10,00 % (p/v)
Sacarosa	58,43 mM

El medio se homogenizó con una batidora doméstica (*Multiquick Professional Hand Blender*, ref. MR5550CA, Braun) y, una vez agitado (*Agitador magnético analógico Micro MST sin calefacción*, ref. 201251060, VELP) y enrasado al volumen deseado, se autoclavó 20 min a 120 °C. En una campana de flujo laminar (*HELIOS C 48, ST-002754000, Angelantoni Life Science*), se repartió el medio en ≈ 60 placas de Placa de Petri de 6 cm (*Placas de Petri en Poliestireno cristal. 60 mm X 15 mm*, ref. 108-2110062T, Levantinalab). Una vez solidificado el medio, se guardó a 4 °C.

Siembra en placa

En una campana de flujo laminar:

- a) A partir de micelio crecido: se extrajeron fragmentos de PDA conteniendo el hongo, con unas pinzas metálicas flameadas, restregándose después sobre

Materiales y métodos

varias placas de Petri con medio PDA, hasta que el micelio de los fragmentos estuviera repartido. A continuación, se cerraron y sellaron con parafilm.

- b) A partir de glicerinado: se descongeló un tubo con 200 μ L de conidiosporas en glicerol 25 % (v/v), que se sembraron en dos placas Petri (100 μ L en cada una). Se diseminaron las esporas por el medio utilizando bolitas o asa de siembra.

Crecimiento y esporulación

Siguiendo el protocolo descrito por Imada et al. (2014) para facilitar la esporulación, las placas se llevaron a una sala oscura a 16 °C y se colocaron a 40 cm debajo de una lámpara de luz ultra violeta A de 120 cm (*Flexo Print, ref. TL 60W/10-R SLV/25, Philips*), cuya longitud de onda es de 350 a 400 nm. La lámpara se conectó a un temporizador (*Programador diario 24 h, ref. 500001, Bricolux*) programado para encenderla en ciclos continuos de 15 min cada 3 h. Cada vez que se encendía la lámpara se encendía también un ventilador conectado con ella, con el fin de evitar el sobrecalentamiento de las placas. Normalmente, tras un periodo de 7 días las placas estuvieron totalmente crecidas y esporuladas (figura 21 B y C).

2.1.2. Generación de plantas

Las dos especies de plantas utilizadas en este estudio se generaron de distinta manera, teniendo en cuenta sus diferentes necesidades y tamaño (sección 1.7.). De todas formas, el tiempo necesario para tener ambas preparadas para proceder a su infección fue similar.

2.1.2.1. *A. thaliana*

Duración: seis semanas para las plantas a infectar o de dos a tres meses para generar semillas. Se describe el protocolo para el cultivo de una tanda de veinticuatro plantas.

1. Germinación

Se recogieron unas cincuenta semillas con una cucharilla (*Microespátula cuchara, ref. SPNS-150-005, labbox*), colocándolas en un tubo de 1,5 o 2 mL, que se llenó de agua destilada y se guardó 48 h a 4 °C en oscuridad, para así facilitar el proceso a través de una interrupción de la dormancia sincrónica.

2. Siembra

Se humedeció un disco de turba compactada o *Jiffy (Peat Pellets and Coco Pellets, ref. 32170142, Jiffy®)* hasta que se hinchó completamente. Seguidamente, se resuspendieron las semillas agitando el tubo manualmente o con un vórtex y, con la ayuda de una pipeta de 1000 µL, se repartieron sobre la superficie del *Jiffy*. Éste fue colocado en un propagador, con la cubierta puesta y los respiraderos cerrados, durante cinco días (diez días o más en casos excepcionales).

3. Condiciones de crecimiento

Tabla 4 Condiciones de crecimiento de *A. thaliana*

Condiciones de crecimiento											
Horas	10:00	10:10	10:20	10:30	11:35	14:30	17:30	17:45	17:50	17:55	18:00
Tª	21 °C	21,5 °C	22 °C	22,5 °C	23 °C	23 °C	22 °C	21 °C	21 °C	21 °C	21 °C
H.R.	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %
Luz	2	3	4	5	5	5	4	3	2	1	0

Las plantas de *A. thaliana (Col-0, ref. N70000; NASC)* se desarrollaron y fueron incubadas, tras la infección, en cámaras de crecimiento (*Chamber Environmental, MLR-351H, Sanyo*).

Estas cámaras cuentan con cinco estantes, en cada uno de los cuales caben dos propagadores (*37,5x24x19 cm propagator, 4260398560289, HORTOSOL*) con capacidad para veinticuatro plantas (figura 30 y 31). Poseen control horario de temperatura, humedad y luz (tres paneles; uno delantero y otro a cada lado), que se programó con unas condiciones concretas (tabla 4).

1. Trasplante

Se humedecieron veinticuatro *Jiffys* y, una vez se hubieron hinchado, se colocaron sobre una bandeja alveolar de veinticuatro huecos, situada en un propagador. Se practicaron unos pequeños agujeros en el centro de cada uno.

Con la ayuda de unas pinzas curvas de punta fina, se seleccionaron plántulas de tamaño manejable y homogéneo. Introduciendo las pinzas bajo cada plántula, se extrajeron una por una, cuidadosamente, intentando conservar algo de sustrato para no dañar las raíces. De haber plántulas con raíces enredadas, se separaron con cuidado colocándolas en una placa de Petri con agua destilada. Cada plántula se insertó en uno de los *Jiffys* preparados, procurando que sus cotiledones no estuvieran en contacto directo con el sustrato para evitar el crecimiento de hongos. Finalmente, se colocó la cubierta con los respiraderos abiertos y se puso el propagador en la parte inferior de la cámara de crecimiento.

Las plántulas restantes se mantuvieron, por si acaso eran necesarias en caso de morir alguna de las trasplantadas.

2. Crecimiento y redistribución en cámara

La intensidad de la luz recibida en cada zona de la cámara fue medida con un luxómetro (*Light meter, ref. 0560 0545, Testo*), observándose que la intensidad era mayor en los estantes inferiores (especialmente cuando la cámara estaba llena) y, dentro de cada bandeja, en las esquinas delanteras (figura 30). Por lo tanto, el propagador fue desplazándose semanalmente por la cámara de crecimiento a medida que fueron creciendo las plantas (y entrando nuevas tandas), con la intención de que las veinticuatro tuvieran un tamaño similar en la sexta semana (figura 30 y 31).

Comenzando en el estante inferior, el propagador se desplazó a un lado a la semana siguiente, quitándole la cubierta (las plantas de una semana ya pueden soportar bien la humedad de la cámara). Con dos semanas, las plantas se trasladaron al

segundo estante y se reordenaron dentro del propagador según el tamaño. En la tercera semana, la bandeja se mantuvo en su posición para respetar el cambio de posición interno de las plantas. En la cuarta semana, las plantas se subieron al tercer estante y se separaron en dos propagadores, pudiendo dejar un espacio vacío entre cada una, dado que por su tamaño empezaron a entrelazarse entre ellas (de separarse más tarde, se corría el riesgo de romper las hojas); además, volvían a redistribuirse en función de su tamaño dentro de los propagadores. Finalmente, en la quinta semana las plantas se subieron al cuarto estante, estando listas para ser infectadas con unos 10 cm de diámetro de roseta (figura 30).



Figura 30 Disposición de propagadores en la cámara durante el crecimiento

(A) Tabla donde se muestran las condiciones lumínicas en cada estante de la cámara de crecimiento, así como la edad y el número de plantas de *A. thaliana* en cada propagador. (B) Figura ilustrativa del crecimiento de las plantas a medida que van moviéndose por la cámara.

3. Reposición y redistribución en propagador

Al llegar a la semana tres, las plantas debieron reordenarse dentro del propagador, con el propósito de que las que estuvieran creciendo menos pudieran recibir más luz. Las plantas se recolocaron poniendo las más pequeñas en las zonas más iluminadas para compensar su crecimiento (figura 31).



Figura 31 Recolocación de plantas para minimizar la variabilidad

A la izquierda las plantas tal cual crecen de forma aleatoria, en el centro una representación de la luz recibida en un propagador colocado en el lado izquierdo de la cámara y, a la derecha, las plantas recolocadas para que las menos desarrolladas reciban más luz e igualen su crecimiento con el resto.

4. Riego y abonado:

Las plantas recién trasplantadas no se regaron al tener los *Jiffys* ya saturados de agua, aparte de estar cubiertas. Las de mayor edad se regaron por inundación en los propagadores, añadiendo a cada uno 300 mL de agua destilada suplementada con 1,625 mL/L de un fertilizante comercial (*Fertilizante líquido plantas verdes 500 ml, KB*). Además, las plantas mayores de tres o cuatro semanas se regaron otra vez, cada semana, con el mismo volumen de agua destilada, sin fertilizante.

5. Uso en experimentos o en la generación de semillas

Las plantas estuvieron listas para la experimentación cinco semanas tras el trasplante. En caso de querer generar semillas (recomendable una o dos veces al año, para que la ratio de germinación no disminuyera y las nuevas plántulas no perdieran vigor):

Se dejaron crecer un mínimo de seis plantas, criadas con las condiciones descritas, más allá de su quinta semana. A las siete semanas alcanzaron su tamaño máximo (unos 15 cm de diámetro de roseta) y empezaron a desarrollar flores (figura 23 B y C), mientras que las hojas mayores empezaban a mostrar coloración oscura y morada. En la décima semana los racimos alcanzaron la altura máxima (unos 45 cm), las hojas mayores ya mostraban la mayor parte de su superficie de color

morado y los extremos comenzaban a secarse (aunque se siguieran regando). Para la decimoséptima semana, las plantas ya estaban completamente secas y se procedió a extraer las semillas.

Para ello, en primer lugar, se colocó la bandeja del propagador lateralmente sobre un papel de filtro, se cortaron basalmente los racimos y se plegó el papel de filtro sobre ellas, aplastándolo. Con movimientos laterales las semillas se liberaron de los frutos con una malla de $\approx 850 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Se realizaron dos o tres filtraciones más para limpiar las semillas de restos de frutos y, por último, se introdujeron en uno o dos tubos de 2 mL, guardándolos en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente.

2.1.2.2. *S. lycopersicum*

Duración: cinco semanas para los experimentos o de dos a tres meses para generar semillas.

Protocolo para el cultivo de una tanda de veinte plantas.

Condiciones de crecimiento

A diferencia de las plantas de *A. thaliana*, las plantas de *S. lycopersicum* se cultivaron en condiciones de invernadero, tal como se indica a continuación:

Tabla 5 Condiciones de crecimiento de *S. lycopersicum*

Condiciones de crecimiento		
Periodo	Día	Noche
Temperatura	18 a 23 °C	16 a 23 °C
Humedad relativa	50 a 70 %	
Luz	Solar + luz de apoyo ($\leq 100 \text{ W/m}^2/\text{día}$)	-

Siembra

Las semillas de *S. lycopersicum* (Ailsa Craig, cv T5), fueron suministradas por el invernadero de la Universidad de Valencia, sito en el Campus de Burjasot.

Materiales y métodos

Se humedecieron 20 *Jiffys* y, una vez hinchados, se colocaron sobre una bandeja alveolar de veinte huecos situada en una bandeja perforada. Se sembraron dos o tres semillas en cada *Jiffy* y se tapó la bandeja con una lámina opaca durante una semana. Las plantas se regaron por inundación una vez al día, abonando semanalmente con un fertilizante facilitado por el invernadero. Normalmente, de las tres semillas germinaron una o dos.

Uso en experimentos o en generación de semillas

Las plantas estuvieron listas para la experimentación cuatro semanas tras la siembra, cuando ya habían desarrollado visiblemente su tercera y cuarta hoja (figura 23 A).

En caso de querer generar nuevas semillas (lo cual hubo que hacer a menudo por su rápido consumo y por su capacidad de producción bastante menor que en el caso de *A. thaliana*), las plantas se trasplantaron a una maceta de unos 5 L, dejándolas crecer y fructificar en las mismas condiciones ambientales del invernadero. Al alcanzar los 2 m de altura los tomates se fueron cosechando a medida que maduraban, para finalmente extraer las semillas.

Sobre un papel de filtro los tomates se cortaron por la mitad y, con la ayuda de una espátula, o un cuchillo, se extrajo la pulpa con semillas, depositándola en un vaso de precipitados de 250 o 500 mL, dependiendo de la cantidad de pulpa extraída. A continuación, se añadió 1 mL de HCl al 2 % (v/v) por cada mL de pulpa, se introdujo un pez magnético y se colocó sobre un agitador magnético durante unos 10 min. Después, se coló el contenido del vaso y se limpió el exceso de HCl y pulpa degradada con agua del grifo y se repartieron las semillas sobre un papel de filtro, dejándolas secar durante 24 h.

Finalmente, se recogieron las semillas y se guardaron en un tubo de 30 o 50 mL, donde fueron conservadas a 4 °C.

2.2. Realización de los experimentos de infección

Duración: uno o dos días

2.2.1. Preparación del inóculo de *B. cinerea* e infección

Duración: 2 h

Previo:

- Sección 2.1.1.
- Se prepararon varias jeringas de 10 o 20 mL (*Jeringa desechable estéril, ref. SYRI-010-100, labbox*) sacando el émbolo, colocando un trozo de algodón dentro y volviendo a ponerlo, de forma que el algodón apretado no ocupara más de 1 mL. Se introdujeron en un bote de vidrio y se autoclavarón 20 min, a 120 °C.
- Se prepararon alícuotas de 15 mL de zumo de uva blanca (*Mosto blanco en botella PET 1,5 L; Casón Histórico*), guardándolas a -20 °C.

1. Extracción de esporas:

A placas totalmente crecidas y esporuladas (figura 21 B) se añadió tween 20 (*TWEEN® 20, ref. P9416, SIGMA-ALDRICH*) al 0,002 % (v/v), con la ayuda de una pipeta Pasteur (*Polyethylene graduated transfer Pasteur pipettes, ref. PIPP-E01-1K0, labbox*) hasta cubrir todo el micelio. A continuación, utilizando una espátula flameada, se rascó cuidadosamente el micelio hasta arrancarlo totalmente, sin soltar el medio.

Se transfirió el volumen del líquido conteniendo el micelio a uno o varios tubos de 15 mL, que se agitaron vigorosamente de forma manual o con vórtex, para que las conidiosporas se liberaran del micelio. Acto seguido, se filtraron con una jeringa

Materiales y métodos

con algodón a un tubo de 15 mL, que se centrifugó durante 10 min a 2320 RCFs, descartando el sobrenadante por decantación.

El sedimento de conidiosporas se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se centrifugó 1 min a 9500 RCFs, descartándose el sobrenadante cuidadosamente con pipeta. Finalmente, se resuspendieron las conidiosporas en 1 mL de agua destilada estéril.

En caso de querer hacer glicerizados de reserva, el sedimento se resuspendió en 15 mL de agua destilada estéril, se centrifugó 1 min a 9500 RCFs, y una vez descartado el sobrenadante por decantación, se resuspendió el sedimento en 15 mL de glicerol al 25 % (v/v), y se repartió en aproximadamente 75 alícuotas de 200 μ L, que se almacenaron a -80 °C.

2. Recuento

Se hicieron diluciones de las conidiosporas (1/100 y 1/50) en agua destilada estéril. El *stock* se dejó en agitación durante el recuento (*Agitador rotativo, ref. 444-0500 VWR*).

Utilizando una cámara de Neubauer doble (*Cámara cuentaglóbulos doble sin pinza, ref. 236-8100104, Levantinalab* (figura 32)), con el cubreobjetos colocado, se añadieron 10 μ L provenientes de cada dilución, en cada uno de los dos espacios.

Se contaron las conidiosporas contenidas en dieciséis cuadrados de 0,0625 mm² (6,25 nL). Concretamente, cuatro cuadrados formando una diagonal, en cada una de las zonas de 1 mm², que iban de la esquina externa al cuadrado interior. Para no contar de más, no se contabilizaron las conidiosporas situadas en los cuatro márgenes de los cuadrados (los mismos para todos los cuadrados).

Acabado el recuento, se sumaron las conidiosporas de los dieciséis cuadrados y se aplicó la fórmula:

$$\text{conidiosporas/mL} = \text{conidiosporas en 16 cuadrados} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

Los recuentos se aceptaron, exclusivamente, cuando su desviación estándar fue menor del 10 %. De lo contrario se repitieron, calculando finalmente el promedio

entre ambos. Normalmente se obtenían $\approx 5 \cdot 10^7$ conidiosporas por placa, pero podía llegar a oscilar de 10^6 a 10^8 , dependiendo del crecimiento de la placa y de la extracción. Una vez realizado el recuento se procedió a la infección.

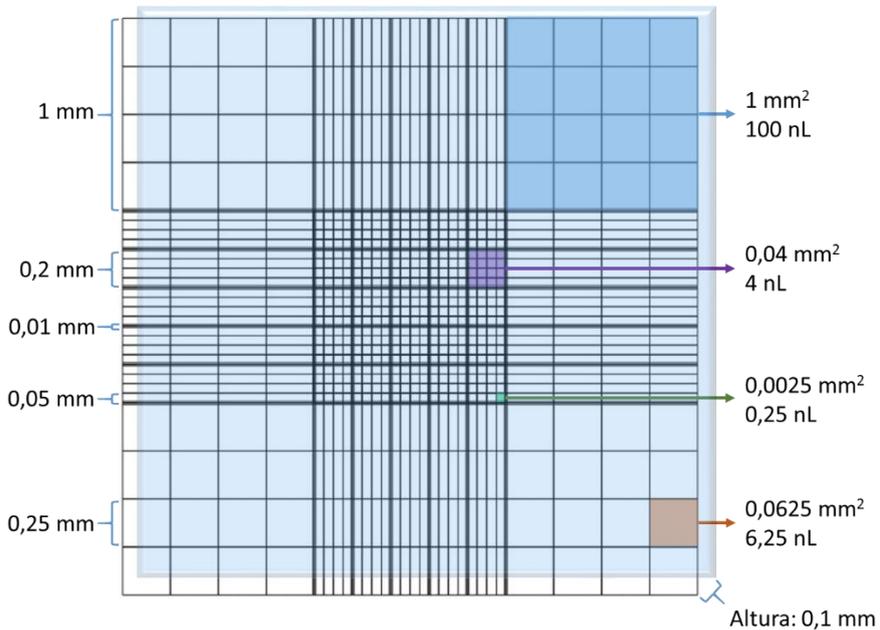


Figura 32 Características de una cámara de Neubauer

3. Infección

La inoculación del hongo se realizó mediante una suspensión de conidiosporas depositada en la hoja (Finiti et al., 2013), o mediante un protocolo de inoculación por spray puesto a punto en la presente tesis. Los experimentos habitualmente constaban de veinticuatro plantas de cinco semanas, utilizando doce como “condición control” (CTL) y doce como “condición infectada” (INF).

Utilizando pulverizadores, con una capacidad máxima de 55 mL, se introdujo el medio, consistente en zumo de uva diluido cuatro veces en agua destilada. Para la INF, al medio se le añadieron las conidiosporas extraídas el mismo día, a una concentración final de 10^5 conidiosporas/mL, que se homogenizaron vigorosamente.

Materiales y métodos

A continuación, se situó la bandeja del propagador de las plantas CTL en una campana de extracción y se procedió a pulverizarlas con el medio, a una distancia de unos 10 cm, disparando a cada planta hasta que estuvieran completamente cubiertas (aproximadamente diez disparos por planta). Finalmente, se colocó una tapa de propagador con las siguientes modificaciones:

- Respiraderos sellados → Para evitar la pérdida de humedad.
- Zona lateral y delantera cubierta → Con el fin de que las plantas más cercanas a los laterales de las cámaras no se secan más rápido.
- Recipientes de agua destilada internos → Para mantener la humedad sin tener que inundar las plantas (sometiéndolas a un posible estrés hídrico).

Por el mismo procedimiento, salvo que sin conidiosporas, se inocularon las plantas en la CTL, y ambos propagadores se colocaron en el estante superior de la cámara de crecimiento (donde las plantas reciben menos luz).

*2.2.1.1. Variaciones en la inoculación de plantas de *S. lycopersicum**

Se utilizaron menos plantas, dieciséis en total, ocho por condición. Los requisitos de las plantas de *S. lycopersicum* eran tener bien desarrolladas las hojas tercera y cuarta, contando a partir de los cotiledones (par de hojas iniciales que forma la planta al germinar), es decir, que contaran con al menos cinco folíolos y que las siguientes hojas ya estuvieran creciendo. Normalmente las hojas primera y segunda no presentaban apenas desarrollo, contando con solo tres folíolos, a menudo parcialmente fusionados (figura 23 A). Al contrario de lo que ocurre con *A. thaliana*, las plantas de *S. lycopersicum* presentan mucha variabilidad en su crecimiento, por lo que muchas solían ser descartadas si no cumplían los requisitos mínimos.

Los inóculos se prepararon de la forma ya descrita, aunque la concentración de conidiosporas era menor, de $5 \cdot 10^4$ conidiosporas/mL, dada la mayor susceptibilidad

de esta especie a *B. cinerea*, requiriéndose un mayor volumen de solución dada la mayor superficie foliar a inocular. Las plantas fueron infectadas de manera individual en la campana de extracción, girándolas para poder acceder a los folíolos de la tercera y cuarta hoja.

Al acabar la inoculación, las plantas se depositaron en una caja de plástico transparente (de unas dimensiones de 34,5 x 30,0 x 40,5 cm de alto, ancho y largo, respectivamente) con abundante agua en la base. Esto se hizo con sumo cuidado para que las hojas inoculadas no se tocaran entre sí, ni con las paredes de la caja, para evitar que se eliminaran las gotas con conidiosporas. Estas cajas se cerraron completamente para mantener la humedad y se incubaron en una cámara de cultivo de mayor tamaño, diseñada a tal efecto, pero con unas condiciones de humedad, temperatura e iluminación similares a las de las otras cámaras (tabla 4).

Materiales y métodos

2.2.2. Muestreo y entrecruzamiento

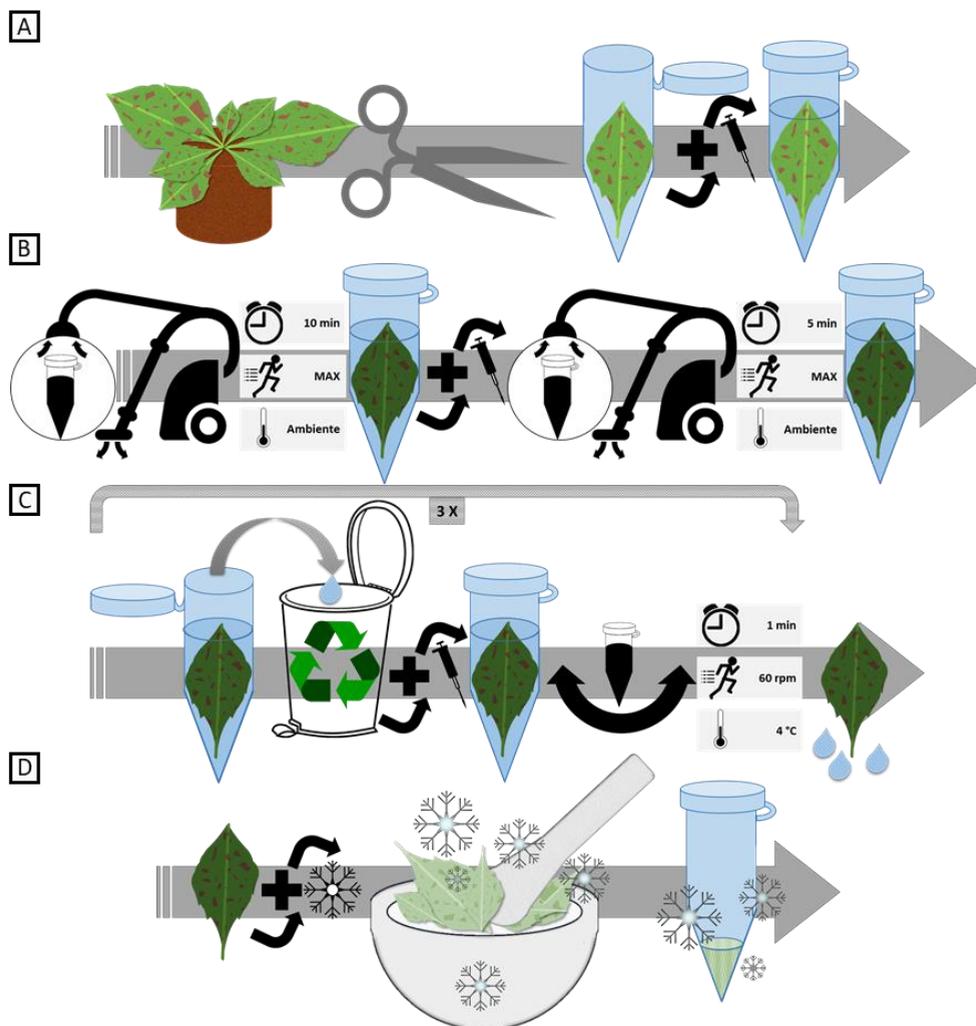


Figura 33 Muestreo y entrecruzamiento

(A) Muestreo de las plantas INF (en este ejemplo, véanse las hojas con manchas marrones que representan las necrosis producidas) e introducción de las hojas elegidas en tampón de entrecruzamiento, así como adición de formaldehído. (B) Entrecruzamiento por infiltración y posterior interrupción del mismo por idéntico método mediante la adición de glicina. (C) Limpieza y secado de las hojas y, finalmente, (D) congelación en “dinitrógeno” (N₂) líquido (cuya temperatura de ebullición se encuentra a -196 °C) y machaqueo de las mismas hasta obtener un tejido pulverizado.

Duración: 2 h

Previo:

- Preparar cuatro tubos de 50 mL con sus tapones. Coger cuatro tapones más y realizar cinco pequeñas perforaciones de 0,5 a 1 mm de grosor.

- Recortar cuatro fragmentos de estropajo, en forma de cubos, de unos 4 cm de lado (aproximadamente el diámetro de un tubo de 50 mL).
- Preparar 160 mL de tampón de entrecruzamiento el mismo día, o el día anterior, y conservar a 4 °C (tabla 6).

Tabla 6 Composición de tampones usados en el muestreo para el entrecruzamiento

Tampón de entrecruzamiento	
Compuesto	Concentración
EDTA-NaOH pH 8,0	1,0 mM
Sacarosa	400 mM
Tris-HCl pH 8,0	10,0 mM
BME	5,0 mM
PMSF	1,0 mM
Formaldehido	1,0 % (v/v)
Glicina	125,0 mM

1. Recolección de hojas (figura 33 A)

Antes de empezar:

Añadir el PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride* $\geq 98.5\%$ (GC), ref. P7626-250MG, SIGMA-ALDRICH) y el β -Mercaptoetanol (*2-Mercaptoethanol* $\geq 99.0\%$, ref. M6250-500ML, SIGMA-ALDRICH) al tampón, poniendo 37 mL del mismo en cada tubo de 50 mL (dos para la CTL y dos para la INF).

Las plantas se muestrearon 24 h tras la inoculación del hongo, cuando apenas mostraron signos de la enfermedad; se tomaron fotos para tener una primera valoración del estado de desarrollo de la misma.

Para alcanzar los 2 g de masa foliar, se seleccionaron de veinte a treinta hojas con el nivel de infección deseado, colocándolas sobre una báscula hasta llegar a los 3,5 o 4 g e introduciendo, a continuación, y cuidadosamente, las hojas en los tubos preparados anteriormente, dejándolas sumergidas en tampón. Luego se repitió el proceso con las plantas CTL, llegando a 3 o 3,5 g. Era imprescindible coger masa de más, en ambas condiciones, porque el medio utilizado añade peso extra a las hojas

Materiales y métodos

y se cogió aún mayor cantidad de tejido infectado, debido a que parte de éste se perdería en el proceso de entrecruzamiento y posterior secado.

Seguidamente, o durante el proceso de entrecruzamiento, se muestrearon de cuatro a ocho hojas similares a las anteriores de ambas condiciones y se congelaron en N₂ líquido (figura 58 C, G y H). Este tejido servirá para extraer RNA y observar el nivel de expresión de los genes de interés.

2. Entrecruzamiento (figura 33 B)

Se colocaron con unas pinzas de punta fina los fragmentos de estropajo en el interior de los tubos, dejándolos sujetos encima de las hojas y bajándolos hasta la marca de 20 o 25 mL, depositando una capa de tampón encima de los mismos. Las hojas debían quedar bajo del estropajo, pero no muy apretadas, lo que permitía incluir entre diez y veinte hojas de tamaño promedio (unos 4 cm).

En el interior de una campana de extracción se añadió a cada tubo 1 mL de formaldehído al 37 % (v/v), se taparon bien y se agitaron por inversión unas diez veces, asegurando una buena mezcla del formaldehído con el tampón. A continuación, se quitaron las tapas colocando en su lugar las perforadas, y se metió la gradilla con los tubos en el desecador (*Desecador 250 mmT/Tubuladura PP, ref. 554, Kartell Labware*). Este se conectó a una bomba de vacío (*Rotary Vacuum Pump, ref. E2M1.5; Edawrds*) que, se mantuvo durante 10 min. Se observaba como el tampón se expandía por la despresurización y comenzaba a hervir en unos 20 s, posiblemente perdiendo algo de volumen a pesar de las tapas.

Transcurrido el tiempo se represurizó el interior del desecador. La presión del interior puede disminuir por debajo de los 2,5 Pa (100000 veces menos presión que la atmosférica), por lo que debía dejarse entrar el aire lentamente (unos 20 s) usando una pinza Hoffman (*Pinza de Hoffman con Abertura máxima 15 mm, 033-1000063, Levantinalab*).

El tampón con formaldehído se infiltró entonces en el tejido, oscureciéndolo completamente y dejándolo con un aspecto translúcido. Además, las hojas dejaron de flotar, cayendo al fondo del tubo. Si no se producían estos cambios se evidenciaba que el tampón no había penetrado en los tejidos, debido probablemente a falta de potencia de la bomba o a que las hojas estaban en contacto con el aire (por pérdida de tampón o por haber subido entre el estropajo y el tubo). En este caso, convenía retirar las hojas no infiltradas.

3. Detención del entrecruzamiento (figura 33 B)

Se añadieron 1,85 mL de glicina 2500 mM y se repitió el proceso de infiltración (desde la mezcla por inversión, hasta la despresurización), con la diferencia de que el vacío se mantuvo 5 min y que, al represurizar, no se podía comprobar la infiltración al haberse dado con anterioridad los cambios de aspecto en las hojas.

4. Lavados y preparación de alícuotas (figura 33 C y D)

A continuación, ya fuera de la campana de extracción, se quitaron los tapones perforados y los trozos de estropajo y se sacaron las hojas, volcando rápidamente los tubos sobre un embudo forrado con una malla, o un colador. Se colocaron las hojas en unos recipientes ($\approx 13 \times 9$ cm) y se añadió agua destilada a 4 °C para eliminar el tampón de entrecruzamiento, separando bien las hojas para asegurar la limpieza y eliminando posteriormente el agua. Este lavado se repitió dos veces más, dejando las hojas en el agua fría del tercer lavado hasta el paso siguiente.

Posteriormente, se colocaron las hojas sobre un trozo de papel secamanos y, una vez bien separadas, se taparon para eliminar el exceso de agua y se fotografiaron. Después se congelaron rápidamente en N₂ líquido, antes de que las hojas empezaran a perder el agua interna (especialmente en el caso de las INF).

Tanto las muestras entrecruzadas, como las que se habían muestreado previamente para extraer RNA, se pulverizaron en N₂ líquido, usando morteros y

Materiales y métodos

pistilos preenfriados en congelador. Cuando el tejido quedó convertido en un fino polvo, se recogió rápidamente y se pesó para comprobar la cantidad real obtenida, separando alícuotas de aproximadamente 2 g. Para la extracción de RNA se separaron entre 0,10 y 0,15 g. Todas las muestras se guardaron a -80 °C hasta la extracción del RNA y de la cromatina. En este punto las muestras se pueden guardar congeladas, o proceder con el siguiente paso.

En el caso de analizar muestras de *S. lycopersicum* se necesitaron unos treinta foliolos (seis hojas) por condición, lo que hizo necesario preparar tres tubos de 50 mL y más volumen de tampón.

2.2.2.1. Variaciones en *S. lycopersicum*

Como se ha comentado, al contrario que *A. thaliana*, *S. lycopersicum* posee hojas divididas en foliolos cuyo número varía con la edad y tamaño de la planta. En nuestras condiciones, las hojas poseen normalmente cinco foliolos principales, de longitudes que pueden oscilar de 2,5 a 7,5 cm en la misma hoja. Su textura es más fina que las de las hojas de *A. thaliana*, y, como consecuencia, son necesarios más foliolos de *S. lycopersicum* que hojas de *A. thaliana* para obtener la misma masa. Así pues, mientras que de *A. thaliana* se recogieron normalmente en torno a veinte hojas, en el caso de *S. lycopersicum*, fueron unos treinta foliolos (seis hojas), lo que hizo necesario preparar tres tubos de 50 mL en vez de dos y, por tanto, un tercio más de tampón (≈ 235 mL).

2.3. Protocolo de extracción de cromatina

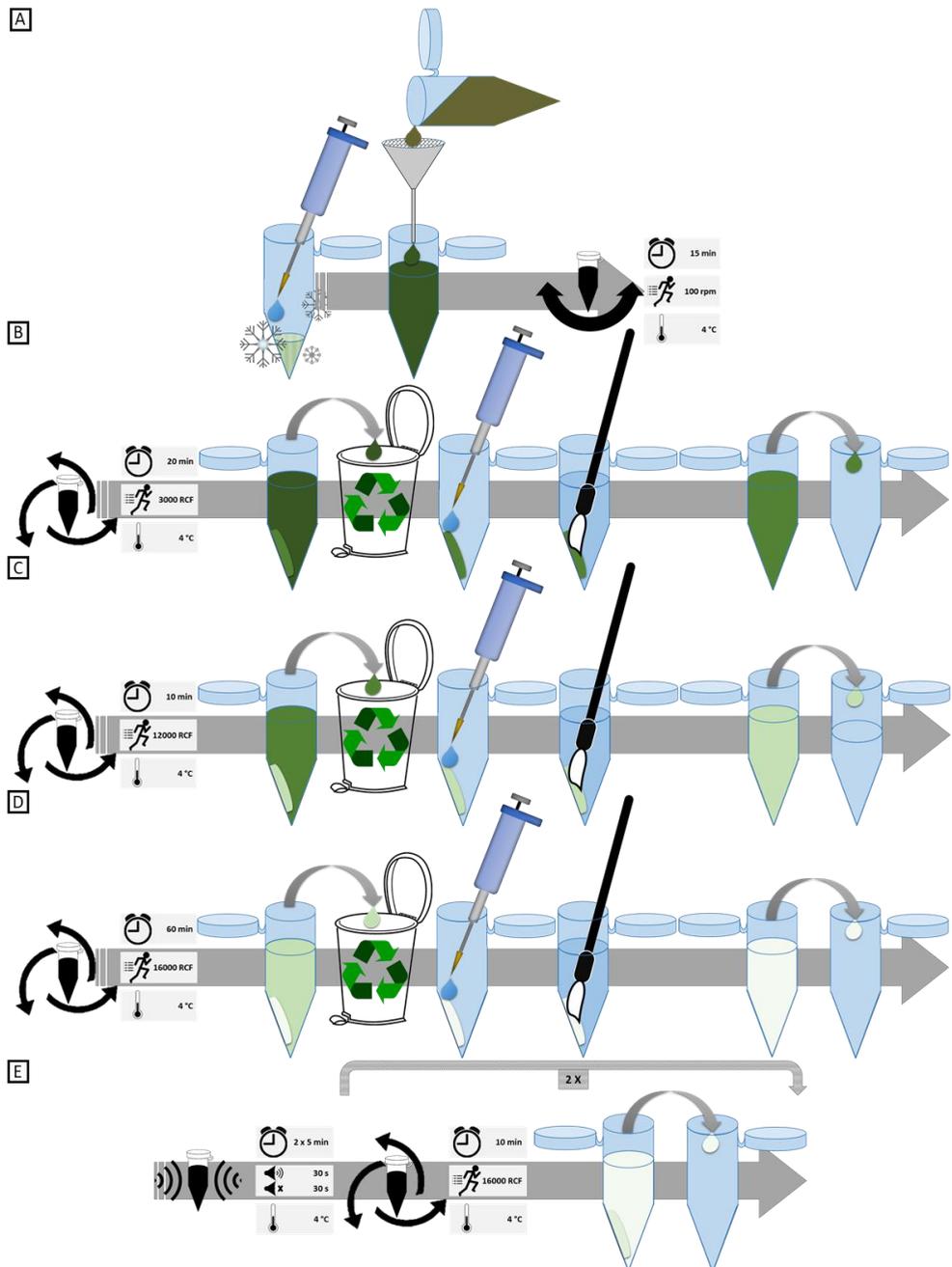


Figura 34 Esquema del protocolo de extracción de cromatina

(A) Resuspensión del tejido congelado en tampón de homogenización, para su posterior filtrado e incubación en hielo. (B, C y D) Centrifugaciones secuenciales del tejido, con varios tampones, hasta conseguir cromatina purificada. (E) Sonicación y eliminación de cromatina no fragmentada.

Materiales y métodos

Duración: dos días (6 h + 2 h). Volúmenes calculados para un ensayo con muestras de 2 g cada una de las dos condiciones (CTL e INF).

Previo:

- Se prepararon el mismo día, o el día anterior, manteniéndolos a 4 °C, los siguientes tampones (tabla 7): de tampón de homogenización (61 mL); tampón de limpieza tisular (2,10 mL); tampón de limpieza celular (3,15 mL) y tampón de lisis nuclear (0,95 mL). Pueden prepararse concentrados, exceptuando los componentes no autoclavables (detergentes y sacáridos).
- Se cortaron al menos cuatro trozos de miracloth (*Miracloth, ref. 475855, Merck Millipore*) de 8 x 8 cm, doblándolos en forma de filtro y autoclavándolos.

Tabla 7 Composición de tampones usados en el protocolo de extracción de cromatina

Tampones de extracción de cromatina				
Nombre	Homogenización	Limpieza celular	Limpieza celular	Lisis nuclear
Compuesto	Concentración			
EDTA-NaOH pH 8,0				10,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM	10,0 mM	2,0 mM	
Sacarosa	400,0 mM	250,0 mM	1700,0 mM	
SDS				1,0 % (p/v)
Tris-HCl pH 8,0	10,0 mM	10,0 mM	10,0 mM	50,0 mM
Tritón X-100		1,00 % (v/v)	0,15 % (v/v)	
BME	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM	
Pis	1 X	1 X	1 X	1 X
PMSF	5,0 mM	5,0 mM	5,0 mM	5,0 mM

Antes de empezar:

- Se mantuvieron en hielo los tampones (salvo el tampón de lisis nuclear que contiene “dodecilsulfato sódico” (SDS)), el BME, los “inhibidores de proteasas” (PIs) (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, ref. 11697498001, ROCHE*) y el PMSF.
- Se puso en el hielo un vaso de precipitados con los filtros de miracloth en su interior, añadiendo el agua destilada suficiente para que quedaran cubiertos.

- Se colocaron, en un vaso de precipitado con agua destilada y hielo: cuatro pinceles de punta fina (*Pincel Serie 1P N° 6, ref. SKU-1999, WONDER ART*) y dos pinceles de punta plana (*Pincel Serie 1R N° 4, ref. SKU-1998, WONDER ART*) de unos 5 y 2,5 mm de anchura de punta, respectivamente.
- Se colocaron en hielo 2 tubos de 50 mL rotulados.
- Se puso a preenfriar la centrífuga (*Universal Centrifuge, ref. Z 366 K, HERMLE LaborTechnik*) a 4 °C con el rotor para tubos de 50 mL.

1. Homogenización (figura 34 A)

Se añadieron BME, los PIs y el PMSF al tampón de homogenización, poniendo 30 mL del mismo al tejido de cada condición, justo después de sacarlo de -80 °C. Se agitó vigorosamente (pudiendo usarse vórtex) hasta que el tejido quedó bien mezclado con el tampón.

Se prepararon dos embudos, poniéndolos sobre los dos tubos de 50 mL, preenfriados y puestos en hielo, y dentro de cada uno se colocaron dos filtros de miracloth húmedos y preenfriados de forma contrapuesta. Rápidamente se vertió sobre el embudo la muestra y una vez hubo pasado todo el líquido, se recuperó lo máximo posible. Se colocaron los tubos con la muestra filtrada en posición horizontal, en hielo (intentando cubrirlos lo máximo posible) y se agitó a 100 rpm durante 15 min en un agitador (*AGITADOR ORBITAL Y VAIVEN, ref. AO-400, BUNSEN*).

2. Limpieza tisular (figura 34 B)

Se centrifugó la muestra 20 min a 3000 RCFs y 4 °C. Se preparó el tampón de limpieza tisular añadiendo BME, los inhibidores de proteasas y el PMSF, evitando que se formara espuma.

Tras la centrifugación se descartó por decantación el sobrenadante de cada condición y, rápidamente, se añadió 1 mL de tampón de limpieza tisular. Con la

Materiales y métodos

ayuda de los pinceles de punta fina, preenfriados y húmedos, se resuspendió cuidadosamente cada sedimento hasta que no se vieron fragmentos, manteniendo la muestra siempre fría. A continuación, se transfirió cada volumen de muestra a un tubo preenfriado de 2 mL, terminando de resuspender el sedimento pipeteando lentamente contra la pared del tubo, sin formar espuma.

3. Limpieza celular (figura 34 C)

Se centrifugaron las muestras 10 min a 12000 RCFs y 4 °C. Mientras tanto, se añadió al tampón de limpieza celular BME, los PIs y el PMSF. Se colocaron 1,2 mL del tampón en un tubo de 2 mL.

Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante cuidadosamente por aspiración, o con pipeta y, rápidamente, se añadieron 300 µL de tampón de limpieza celular a cada condición. Con la ayuda de los pinceles de punta fina del nº 6, preenfriados y húmedos, se resuspendió cada sedimento cuidadosamente hasta que no se vieron fragmentos, manteniendo fría la muestra. Se acabó de resuspender pipeteando lentamente contra la pared del tubo sin producir espuma. A continuación, se transfirió cuidadosamente cada volumen al tubo de 2 mL que contenía el tampón de limpieza celular, colocando la muestra encima del tampón sin mezclar ambas fases.

4. Lisis nuclear (figura 34 D)

Se centrifugaron las muestras 60 min a 16000 RCFs y 4 °C. Mientras tanto se preparó el tampón de lisis nuclear añadiendo los PIs y el PMSF sin formar espuma y se mantuvo en hielo.

Al finalizar la centrifugación se descartó el sobrenadante cuidadosamente por aspiración, o con pipeta y, rápidamente, se añadieron 450 µL de tampón de lisis nuclear a cada condición. Con la ayuda de los pinceles de punta plana, preenfriados y húmedos, se resuspendió cada sedimento cuidadosamente hasta que no se vieron fragmentos, manteniendo fría la muestra. Posteriormente, se dividió el volumen de

muestra de cada condición en dos tubos de 1,5 mL y se acabó de resuspender el sedimento pipeteando lentamente contra la pared del tubo, sin producir espuma. Contando con el volumen del sedimento, el volumen total en cada tubo fue de, aproximadamente, 600 μ L entre los dos tubos, quedando unos 300 μ L en cada tubo (que es la capacidad máxima admitida por el sonicador).

5. Sonicación (figura 34 E)

Se extrajeron 5 μ L de la muestra de cada condición que se guardaron a 4 °C para tener una alícuota de la muestra previa a la sonicación.

En el caso de querer validar el entrecruzamiento, el volumen de la alícuota fue de 10 μ L (sección 3.2.5.1.).

Se llenó el baño del sonicador (*Sonication System Standard, ref. UCD-200, Diagenode*) con una mezcla de hielo y agua destilada, hasta la línea de máximo volumen. Debía haber agua suficiente para que el hielo flotara sobre una capa de unos 5 centímetros de profundidad.

Se colocaron los cuatro tubos en el adaptador, de forma que quedara el contenido sumergido en el agua con hielo y se pusieron dos tubos más con 300 μ L para que no quedaran huecos en el adaptador (que dispone de seis huecos). Se configuró el sonicador con las siguientes condiciones:

Tabla 8 Parámetros de sonicación en la extracción de cromatina

Condiciones de sonicación	
Característica	Configuración
Potencia	Media
Tiempo de sonicación on	30 s
Tiempo de sonicación off	30 s
Tiempo total de ciclo	5 min
Número de ciclos	2

Acabado el primer ciclo, se colocaron los tubos en hielo mientras se repuso el hielo derretido y retiró el agua sobrante antes del segundo ciclo.

Materiales y métodos

6. Eliminación de cromatina no sonicada y división de la muestra

Se centrifugó la muestra 10 min a 16000 RCFs y 4 °C. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL, con cuidado de no perturbar el sedimento, juntando las muestras de la misma condición separadas en el paso 4, por lo que se continuó con dos tubos, uno de cada condición.

Se centrifugaron otra vez las muestras, 10 min a 16000 RCFs y 4 °C; transfiriéndose el sobrenadante a un tubo de 1,5mL, pipeteando cuidadosamente para no perturbar el sedimento.

Tras la primera centrifugación el sedimento fue muy abundante, mientras que tras la segunda fue muy pequeño. Se dividió la cromatina purificada de cada condición, aproximadamente 450 µL, en seis alícuotas de 65 µL en tubos de 1,5 mL, además de una extra con el volumen sobrante por condición. De esta última se extrajeron dos alícuotas de 5 y 13 µL, que constituyeron la muestra post sonicación y el denominado INPUT 0, respectivamente, que se guardaron a 4 °C. Las alícuotas de cromatina se congelaron con N₂ líquido y se guardaron a -80 °C.

7. Medición de la concentración y procesamiento del INPUT 0

En el caso de querer validar el entrecruzamiento, varios de los siguientes volúmenes y procedimientos cambian (sección 3.2.5.1.).

En cada condición se añadieron 245 y 237 µL de tampón TE + NaCl 200 mM a las alícuotas pre y post sonicación y al INPUT 0, respectivamente, mezclando por agitación y vórtex. Se midió la absorbancia a 260 nm de ambas alícuotas de cada condición, usando un espectrofotómetro (*Spectrophotometer, ref. ND-1000, NanoDrop®*). Finalmente, se incubaron los seis tubos de las alícuotas y el INPUT 0, durante 24 h a 65 °C, para desentrecruzar la cromatina.

Se extrajo el DNA de las muestras utilizando un kit comercial de columnas (*GeneJET PCR Purification Kit, ref. K0702, Thermo Fisher Scientific*) resuspendiendo en 20 y

200 µL las alícuotas y el INPUT 0, respectivamente. Se guardó el INPUT 0 a -20 °C y se determinó la concentración de DNA de las alícuotas usando el espectrofotómetro, almacenándolas después a 4 °C.

2.3.1. Visualización de fragmentos

Aparte de determinar la concentración por espectrofotometría, con el fin de verificar la validez de las muestras para inmunoprecipitar, fue imprescindible comprobar el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos tras la sonicación de la cromatina mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se utilizó el DNA purificado de las alícuotas pre y post sonicadas.

Tabla 9 Tampones y demás preparados para la electroforesis de agarosa

Componentes de la electroforesis			
Nombre	Gel de electroforesis	TBE 0,5 X	Tampón de carga 6 X
Compuesto	Concentración		
Ácido bórico	44,5 mM	44,5 mM	
EDTA-NaOH pH 8,0	1,0 mM	1,0 mM	
Tris-HCl pH 8,0	44,6 mM	44,6 mM	
Agarosa	1,00 % (p/v)		
Glicerol			30,00 % (v/v)
Azul de bromofenol			0,005 % (p/v)
Xileno cianol			0,005 % (p/v)
Bromuro de etidio	250 ng/mL	250 ng/mL	

Se llenó una cubeta de electroforesis (*Horizontal Gel Box 7 cm, ref. HGB-7, Axygen®-Corning®*) con 250 mL de tampón TBE 0,5 X (tabla 9). A continuación, se añadió el bromuro de etidio (*Ethidium bromide, ref. E7637-1G, SIGMA-ALDRICH*) al tampón y se preparó un gel de agarosa (*Agarose D1 LOW EEO, ref. 8010.01, Laboratorio Conda*) de 40 mL en una bandeja de 7 x 10 cm con un peine de 10 pocillos, calentando la agarosa en una placa calefactora (*Agitador magnético con calefacción, ref. C-MAG HS 7, IKA®*) y añadiendo una vez templada, el bromuro de etidio (tabla 9).

Materiales y métodos

Las muestras se cargaron en el gel mezclando previamente 15 μL de las mismas con 2 μL de tampón de carga 6X, además de un marcador incluyendo DNAs de entre 100 y 1000 bp (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ref. SM0242, Thermo Fisher Scientific*). Se llevó a cabo a 100 V durante 45 min (*MINI Power Supply, ref. nanoPAC-300, Cleaver Scientific Ltd*).

Para la captura de la imagen se utilizó un transiluminador (*Electronic Ballast transiluminador, ref. ECX-F15.M, Vilber Lourmat*) y se fotografió el gel con una capturador (*UVP PhotoDoc-It™ Imaging Systems, ref. 97-0274-10, Analytik Jena*).

Las alícuotas de cromatina sonicada debían presentar una estela o *smear* de entre 100 y 1000 bp, mientras que lo esperado para las presonicadas era una banda de gran tamaño (>10 kb). Habitualmente, además de la banda grande, se vio una ligera estela en las muestras presonicadas de la INF.

2.3.2. Validación del entrecruzamiento

Duración: dos días.

En algunos casos, sobre todo tras realizar cambios en las condiciones experimentales, se verificó que el proceso de entrecruzamiento fuera exitoso.

Para ello se tomaron alícuotas de 10 μL de las muestras presonicadas de cada condición. La mitad se destinó a determinar la concentración y la visualización de los fragmentos obtenidos, siguiendo el protocolo indicado.

Los otros 5 μL de cada alícuota se separaron en dos tubos poniendo 2,5 μL de alícuota y añadiendo 900 μL de agua. A uno de estos tubos de cada condición se le añadieron 36 μL de NaCl 5000 mM y al otro el mismo volumen de agua destilada. Las muestras conteniendo NaCl se incubaron durante 8 h a 65 °C, para desentrecruzar la cromatina. Las otras muestras se mantuvieron a 4 °C.

El DNA de los cuatro tubos (muestra entrecruzada y desentrecruzada de cada condición) se obtuvo mediante el método de la extracción fenólica (sección 2.5.2.), resuspendiéndose en un volumen final de 20 μ L. Se utilizó la extracción fenólica en este caso porque los fragmentos entrecruzados, al seguir unidos a la parte proteica de la cromatina, especialmente histonas, se quedan en la fase orgánica de la mezcla en vez de en la acuosa como el DNA libre.

Finalmente, se analizaron las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 2.3.1.). Las alícuotas no desentrecruzadas no debían presentar bandas o estelas de DNA, en todo caso, muy ligeras. Por otro lado, las desentrecruzadas debían exhibir una banda de DNA de gran tamaño (> 10 kb).

2.3.3. Variaciones en *S. lycopersicum*

A la hora de adaptar el protocolo a *S. lycopersicum* se efectuaron varios cambios:

1. Las velocidades en las centrifugaciones variaron de la siguiente forma:

Tabla 10 Velocidades de centrifugación de *S. lycopersicum* para extraer cromatina

Cambios en las velocidades de centrifugación		
Paso	Original	Modificada
Limpieza tisular	3000 RCFs	850 RCFs
Limpieza celular	12000 RCFs	13680 RCFs
Lisis nuclear y eliminación de cromatina no sonicada	16000 RCFs	24320 RCFs

2. La resuspensión en tampón de lisis nuclear, pasó de 450 μ L a 225 μ L.
3. La sonicación, pasó de dos ciclos de 5 min a media potencia con 30 s encendido y 30 s apagado; a un solo ciclo de iguales características.
4. Las alícuotas pasaron de ser de 65 μ L a ser de 32,5 μ L.

2.4. Protocolo de ChIP

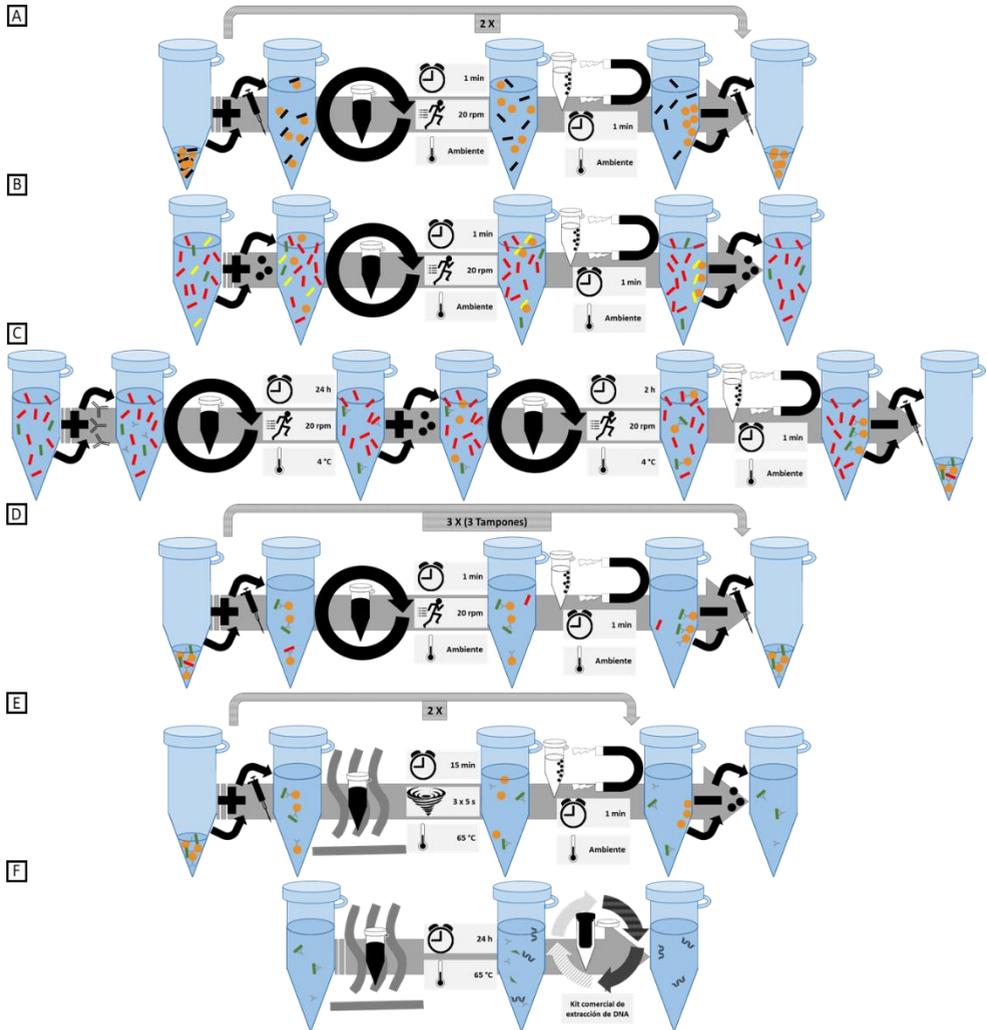


Figura 35 Esquema del protocolo de ChIP

(A) Prelavado de las *dynabeads* y (B) de la cromatina. (C) Incubación de la cromatina con los anticuerpos, posterior incubación de ambos con las *dynabeads* y eliminación de cromatina no deseada. (D) Lavados con tampones para eliminar cromatina inespecíficamente unida, (E) separación de las *dynabeads* de los anticuerpos y la cromatina y, finalmente, (F) separación del DNA de las proteínas y los anticuerpos y purificación del mismo.

Duración: tres días (4 h + 5 h + 1 h). Volúmenes calculados para inmunoprecipitar una muestra con dos condiciones (CTL e INF), utilizando cinco anticuerpos y un control negativo.

Previo:

Se prepararon en la misma semana los siguientes tampones, manteniéndolos a 4 °C (tabla 10): tampón de dilución de cromatina (38 mL), tampón de baja salinidad (30 mL), tampón de alta salinidad (30 mL), tampón de cloruro de litio (30 mL), tampón Tris-EDTA (15 mL) y tampón de elución (4 mL). Pueden hacerse premezclas concentradas, exceptuando los componentes no autoclavables (detergentes y sacáridos).

Tabla 11 Composición de tampones usados en el protocolo de ChIP

Tampones del protocolo de ChIP						
Nombre	Dilución de cromatina	Baja salinidad	Alta salinidad	Cloruro de litio	Tris-EDTA	Elución
Compuesto	Concentración					
Desoxicolato de Na				1 % (p/v)		
EDTA-NaOH pH 8,0	1,2 mM	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM	1 mM	
Igepal				1, % (v/v)		
LiCl				250 mM		
NaHCO ₃						100 mM
NaCl	167 mM	150 mM	500 mM			
SDS		0,1 % (p/v)	0,1 % (p/v)			1 % (p/v)
Tris-HCl pH 8,0	16,7 Mm	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	
Tritón X-100	1 % (v/v)	1 % (v/v)	1 % (v/v)			

1. Prelavado de *dynabeads* (*Dynabeads® Protein G for Immunoprecipitation, ref. 10003D, Thermo Fisher Scientific* (figura 35 A))

Se colocaron en hielo doce tubos de 1,5 mL a los que se les añadieron 100 µL de *dynabeads* (agitando suavemente la botella del *stock* para resuspenderlas).

Se añadieron 900 µL de tampón de dilución de cromatina a cada tubo, incubándolos durante 1 min en rotación, para posteriormente recogerlas magnéticamente (*DynaMag™-2 Magnet, ref. 12321D, Thermo Fisher Scientific*) durante 1 min.

Materiales y métodos

Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente por aspiración, o con pipeta, y se resuspendieron las *dynabeads* en 900 μL de tampón de dilución de cromatina. Se repitió el proceso de lavado, dando un *spin* a los tubos antes de introducirlos en el imán (para recoger las *dynabeads* que hayan podido quedar adheridas a la tapa), que se resuspendieron finalmente en 100 μL de tampón de dilución de cromatina y se guardaron a 4 °C.

2. Lavado de cromatina con *dynabeads* prelavadas (figura 35 B)

Las doce alícuotas de cromatina de 65 μL , se sacaron del congelador de -80 °C y se pusieron en hielo, y se diluyeron 10 veces añadiendo 585 μL de tampón de dilución de cromatina a cada una. Se les agregaron 50 μL de *dynabeads* prelavadas y se dejaron incubando en rotación durante 2 h a 4 °C.

3. Incubación de la cromatina con los anticuerpos (figura 35 C)

Previo:

Se rotularon doce nuevos tubos y se colocaron en hielo.

Se dio un *spin* a los tubos conteniendo la cromatina incubada con las *dynabeads*, que se recogieron magnéticamente, transfiriendo la cromatina a los nuevos tubos. Apartando un tubo de cada condición, como control negativo (no anticuerpo); se añadieron a los otros cinco 2,5 μL de los correspondientes anticuerpos: anti H3 (*Anti-Histone H3 antibody ChIP Grade, ref. ab1791, Abcam*), anti H3K27me3 (*Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) Antibody, ref. 07-449, Merck Millipore*), anti H3K36me3 (*Anti-Histone H3K36me3 antibody ChIP Grade, ref. ab9050, Abcam*), anti H3K4me3 (*Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys4) Antibody, ref. 07-473, Merck Millipore*) y anti H3K9ac (*Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9) Antibody, ref. 07-352, Merck Millipore*).

Se incubaron los doce tubos en rotación, durante 24 h a 4 °C.

4. Incubación de *dynabeads* prelavadas con complejos anticuerpo-cromatina (figura 35 C)

Se transfirió el volumen de los doce tubos a los tubos con *dynabeads* prelavadas del día anterior y se incubaron en rotación durante 2 h a 4 °C.

5. Lavado con tampones del complejo anticuerpo-cromatina-*dynabeads* (figura 35 D)

Previo:

Se encendió el termobloque (*Thermolyne analog high temperature modular dri bath block, ref. DB104210-33, Barnstead International*) para la incubación a 65 °C y se puso el tampón de elución a temperatura ambiente.

Se recogieron magnéticamente las *dynabeads*, transfiriendo 130 µL del volumen del sobrenadante de los tubos no anticuerpo a tubos de 1,5 mL, que se guardaron a 4 °C como INPUT C. Posteriormente, se eliminó

El INPUT puede ser denominado de formas distintas, dependiendo de cuando se extraiga (0, A, B o C). El INPUT 0 es aquel que se extrae justo tras hacer el último lavado de la cromatina tras sonicar. El INPUT A, muy similar al 0, corresponde al que se toma tras descongelar la muestra para iniciar la inmunoprecipitación. El INPUT B es el que se obtiene tras el prelavado de la cromatina y, finalmente, el INPUT C es el sobrenadante de la inmunoprecipitación control negativo (sección 3.2.7.).

cuidadosamente, por aspiración o con pipeta, el resto del sobrenadante de estos tubos.

Se eliminó el sobrenadante de los tubos que contenían anticuerpos y se resuspendieron las correspondientes *dynabeads* en 1 mL de tampón de baja salinidad. Se incubaron en rotación durante 1 min. Posteriormente se recogieron magnéticamente durante 1 min y se volvió a eliminar el sobrenadante.

Se repitió el proceso dos veces con tampón de alta salinidad y de cloruro de litio y una vez con tampón Tris-EDTA. Tras este último lavado, y antes de recoger las *dynabeads*, se dio un *spin* para recoger bien todo el volumen.

Materiales y métodos

6. Elución y desentrecruzamiento (figura 35 E y F)

Se resuspendieron las *dynabeads* en 120 μ L de tampón de elución y se agitaron con vórtex, incubándolas posteriormente durante 15 min a 65 °C, volviendo a agitar con vórtex cada 5 min.

Durante la incubación se prepararon doce tubos de 1,5 mL, a los que se les añadieron 10 μ L de NaCl 5000 mM. Una vez recogidas las *dynabeads* se transfirieron los sobrenadantes a dichos tubos. Se volvieron a resuspender las *dynabeads* con 120 μ L de tampón de elución y se procedió a repetir la incubación de 15 min a 65 °C.

Acabada la incubación, se dio un *spin* a los tubos y se recogieron las *dynabeads* durante 1 min, transfiriendo el sobrenadante a los anteriores tubos de 1,5 mL, juntando ambos sobrenadantes.

Se añadieron 110 μ L de tampón de elución de cromatina a los tubos con el INPUT C. Todos los tubos se agitaron con el vórtex, dejándolas en incubación 24 h, a 65 °C.

7. Extracción de DNA (figura 35 F)

Se extrajo el DNA de las muestras inmunoprecipitadas y de los INPUTs C utilizando el kit de columnas, en un volumen final de 100 μ L en el caso de las muestras y en 200 μ L el INPUT C. Se guardó el DNA purificado a -20 °C.

2.4.1. Variaciones para *S. lycopersicum*.

En el caso de *S. lycopersicum* las modificaciones se limitaron a utilizar alícuotas de 32,5 μ L de cromatina, que se diluyeron veinte veces con tampón de dilución de cromatina.

2.5. Purificación de ácidos nucleicos

Tras obtener las distintas muestras y alícuotas, se realizaron diferentes purificaciones de ácidos nucleicos para poder realizar las subsiguientes mediciones, electroforesis o qPCRs.

2.5.1. Extracción de DNA mediante kit de columnas

Duración: 30 min.

La mayoría de las purificaciones de DNA se hicieron mediante un kit comercial, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizaron algunas modificaciones opcionales del propio protocolo, que recomendaba la adición de un volumen de isopropanol (*2-Propanol*, ref. 278475, SIGMA-ALDRICH) igual al de la muestra (normalmente 250 μ L) antes de añadir el primer tampón del kit, con el fin de mejorar la extracción de muestras de 500 bp o inferiores, como era el caso de las sonicadas. También se calentó el tampón de elución del kit a 65 °C con el propósito de mejorar la elución de muestras con poca cantidad de DNA, como en el caso de las obtenidas tras el proceso de inmunoprecipitación. Tras la extracción, el DNA se guardó a 4°C o a -20 °C, o se utilizó directamente, dependiendo de la finalidad.

2.5.2. Extracción fenólica de DNA

Duración: dos días (1 h + 1 h).

Para otras muestras se utilizó el protocolo clásico de extracción fenólica, usando un reactivo comercial (*Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, (v/v))*, ref. 15593031, Thermo Fisher Scientific):

Se añadió un volumen de la mezcla igual al de la muestra, que se agitó vigorosamente con vórtex durante 30 s.

Materiales y métodos

Se centrifugó 5 min a 16000 RCFs, a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa (la superior y más clara) a un nuevo tubo, sin interferir en la interfase. A continuación, se añadió isopropanol, un volumen equivalente a un 85 % del volumen de la muestra, acetato de sodio (*Sodium acetate, ref. S2889-1KG, SIGMA-ALDRICH*) a una concentración final de 300 mM y glucógeno (*UltraPure™ Glycogen, ref. 10814010, Thermo Fisher Scientific*) a una concentración final de 0,05 µg/µL. Se agitó vigorosamente con vórtex durante 30 s y se dejó a -80 °C durante como mínimo 30 min (idealmente 8 h).

Se centrifugó la muestra 15 min a 16000 RCFs y 4 °C. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente, por aspiración o con pipeta, para no perturbar el sedimento blanquecino. Se añadió un volumen de etanol 100 % (v/v) equivalente al de la muestra.

Se centrifugó la muestra nuevamente 15 min a 16000 RCFs y 4 °C, descartándose el sobrenadante mediante aspiración o con pipeta, cuidando de no perturbar el sedimento blanquecino. Para eliminar todo rastro de líquido, se introdujeron los tubos en una centrifuga a vacío (*Concentrator Plus, ref. 5305 000.304, Eppendorf*) en programa de “solvente alcohólico”, durante 15 o 30 min. El sedimento se resuspendió en agua destilada.

A diferencia del kit de columnas, en esta purificación el RNA no se separa del DNA, por lo que cuando fue necesario se realizó una digestión con RNasa (*RNase A, DNase and protease-free (10 mg/mL), ref. EN0531, Thermo Fisher Scientific*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5.3. Extracción de RNA

Duración: 1,5 h.

La purificación del RNA se llevó a cabo mediante un kit comercial (*GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, ref. E3598, EURx*), siguiendo las especificaciones del

fabricante para muestras vegetales, realizando el paso extra opcional de digestión de DNA en columna con DNasa (*Deoxyribonuclease I (DNase I) RNase-free 1000 units, ref. E1345, EURx*). La elución final se hizo en 60 μL , tras lo cual, se procedió a determinar la concentración del RNA con un espectrofotómetro, obteniendo unos valores que oscilaban entre 100 y 800 $\text{ng}/\mu\text{L}$. El RNA se guardó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ o se utilizó directamente para realizar la retro transcripción.

2.6. Retrotranscripción

Duración: 1 h.

La retrotranscripción (RT) de RNA a cDNA se realizó con un kit comercial (*PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect*

El kit es capaz de transcribir 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y siempre se puso RNA a una concentración superior, por lo que teóricamente, tras diluir la muestra, la concentración del cDNA era de 2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Real Time), ref. RR037A, Takara). Se utilizaron 7 μL de RNA, con oligo dT como cebador de la retrotranscriptasa y un volumen final de 10 μL . Usando un termociclador (*Techne, ref. TC-412, Bibby Scientific*), se incubó la mezcla durante 15 min a $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5 s a $85\text{ }^\circ\text{C}$ y $4\text{ }^\circ\text{C}$, por tiempo indefinido. Acabada la retrotranscripción, se diluyó el cDNA veinte veces añadiendo agua destilada. No se hizo el paso de digestión de RNA porque la etapa posterior llevaba RNasa incluida (*SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus)*, ref. RR420W; Takara). Una vez diluido el cDNA, se guardó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, o se utilizó directamente para realizar la qPCR.

2.7. RTqPCR y ChIPqPCR

Duración: 2 h.

1. Componentes

Las qPCRs (RT y ChIP) se realizaron utilizando una *máster mix* comercial (sección 2.6.). Se usó un volumen final de 10 μL en placas de 96 pocillos (*96 Well*

Materiales y métodos

Polypropylene PCR Microplate Compatible with ROCHE Light Cycler 480, ref. #PCR-96-LC480-W, Axygen®), de los cuales 5 µL eran del máster mix (tampón, DNA polimerasa, SYBR Green y dNTPs), 0,2 µL de los oligos correspondientes (a una concentración final de 0,2 µM) y 4,8 µL del DNA (concentración final de 0,4 ng/µL de cDNA y del 0,4 al 4 % (v/v) en el caso de CHIPDNA). Los volúmenes fueron repartidos utilizando puntas con filtro de retención ultra baja de líquido, para una máxima recuperación (10µLMaximumRecovery®Gilson-StyleP2, ref. #TF-300-L-R-S, Axygen®).

2. Pasos de la reacción

La reacción se realizó en un termociclador LightCycler 480 (*high-performance, flexible throughput qPCR platform*; ref. *LightCycler® 480 System; ROCHE*) siguiendo este esquema en ambos tipos de qPCR:

Tabla 12 Características de la qPCR

Esquema de la qPCR							
	Temperatura	Ciclos	Ratio de rampa	Tiempo por		Tiempo total	
				Ciclo	Rampa	Ciclos	Rampas
Desnaturalización	95,0 °C	1	4,40 °C/s	30,00 s	15,9 s	30,0 s	15,9 s
	95,0 °C	45	4,40 °C/s	5,00 s	0,0 s	225,0 s	0,0 s
Hibridación y elongación	60,0 °C		2,20 °C/s	30,00 s	15,9 s	1350,0 s	715,9 s
Desnaturalización final	95,0 °C	1	4,40 °C/s	5,00 s	21,6 s	5,0 s	21,6 s
Curva de <i>melting</i>	60,0 °C		2,20 °C/s	60,00 s	15,9 s	60,0 s	15,9 s
	95,0 °C		0,11 °C/s		318,2 s		318,2 s
Enfriado	50,0 °C		2,20 °C/s		20,5 s		20,5 s

Nótese que, siguiendo las instrucciones del fabricante, la hibridación y la elongación se hicieron en un solo paso de 60 °C.

Los ciclos totales de desnaturalización, hibridación y elongación se ajustaron a 40, porque se comprobó que los amplicones correctos no se solían obtener después del ciclo 35 y, salvo en las muestras utilizadas como control negativo (como la muestra No Anticuerpo del CHIP), no era común que se dieran amplificaciones en ciclos posteriores al 33.

3. Obtención de datos

Se utilizó el software del termociclador (*LightCycler® 480 SW 1.5*) para obtener los siguientes datos:

- “Puntos de cruce” (Cps) → Al final de cada ciclo de amplificación, el aparato registraba la fluorescencia emitida por el *SYBR Green*, que multiplica la luz emitida por 1000 cuando se encuentra intercalado entre las dos hebras de una doble hélice de DNA. Por lo tanto, a mayor cantidad de producto de PCR, mayor fluorescencia. Finalizada la PCR, la opción *Abs Quant/2nd Derivative Max* determinó en qué ciclo el aumento de la fluorescencia empezó a estar por encima de la del fondo de la reacción. Los Cps se utilizaron, posteriormente, para determinar la cantidad relativa de la secuencia diana de los oligos presentes en la reacción y, por lo tanto, indirectamente, la cantidad relativa de la muestra de partida.
- “Temperaturas de *melting*” (Tms) → En el cuarto paso de la PCR se llevó la muestra durante 60 s a 60 °C, produciéndose la hibridación de las hebras complementarias; a continuación, se inició una etapa de incremento gradual de la temperatura, provocando que las hebras de la doble hélice fueran separándose progresivamente y, como consecuencia, la fluorescencia del *SYBR Green* fuera disminuyendo hasta llegar al mínimo a los 95 °C, cuando las hebras se hubieran separado completamente. El aparato registró, continuamente, la fluorescencia durante esta rampa de temperatura y, con la opción *Tm Calling*, determinó la temperatura a la que el 50 % del amplicón se encontraba hibridado, pudiendo detectar si había más de un amplicón (mostrando dos o más Tms, o una con un pico muy ancho). Las Tms se utilizaron para validar los Cps, pues cada amplicón tiene una concreta; en caso de no coincidir con la esperada, o de tener dos, el valor del Cp fue descartado.

2.8. Diseño de oligos

Al analizarse las modificaciones epigenéticas en regiones concretas de los genes, en los ensayos de ChIPqPCR el diseño de los oligos (cebadores o *primers*) cobró una crucial importancia, a diferencia del estudio de expresión (RTqPCR), en el cual la zona del gen donde estos se diseñaron, era menos relevante (exceptuando intrones o genes no codificantes).

Elaboración de la base de datos

En primer lugar, se conformó una base de datos de los genes de interés con los datos obtenidos en la bibliografía. Para los genes de plantas se utilizaron, en principio, las bases de datos especializadas de TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>) para *A. thaliana* y Sol Genomics Networks (<https://solgenomics.net>) para *S. lycopersicum*, y, a modo de comprobación, la base de datos general Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). En el caso de *B. cinerea*, se usó directamente esta última.

De cada gen de interés se recopiló la siguiente información:

La secuencia genómica con 1000 bp antes, el “DNA complementario” (cDNA) o mRNA, la “secuencia de DNA codificante” (CDS) y la secuencia de aminoácidos, equivalente a la proteína. En los casos donde había transcritos alternativos, se empleó el que la base de datos concreta consideraba representativo, guardando también los otros.

1. Limitaciones de las bases de datos

En muchas ocasiones, especialmente en el caso de *S. lycopersicum*, la anotación de los genes en las bases de datos era incompleta, o incorrecta. En algunos casos contaban con la CDS, el cDNA (pudiendo ser una, en realidad la otra por anotación incorrecta) o contaban con ambas, pero eran la misma secuencia (y por lo tanto al

menos una, era errónea) o, simplemente poseían secuencias incompletas. Ante esta incertidumbre, tuvo que comprobarse cada secuencia.

2. Comprobación u obtención de la secuencia genómica y el cDNA

En primer lugar, se utilizó la secuencia obtenida (o de tenerlas todas, la secuencia genómica) para hacer un alineamiento con las secuencias de mRNA disponibles en el Genbank. Se utilizó para ello la herramienta *online* BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), especificando la especie y la base de datos concreta para encontrar transcritos (*Reference RNA sequences (refseq_rna)*), acelerando así el proceso. Hecho esto, se buscaron aquellas secuencias con un alineamiento perfecto que empezaran antes y/o acabaran después que la introducida. Se obtuvieron dos tipos de resultados:

1. No encontrar ninguna con estas características → Implicaba que la secuencia genómica introducida estaba completa.
2. Encontrar una o más con estas características → Significaría que la secuencia genómica estaba incompleta.

De darse el segundo caso, el siguiente paso sería obtener la secuencia genómica, para lo cual se tendría que hacer un alineamiento con BLAST, pero utilizando la base de datos concreta para DNA genómico (*Reference genomic sequences (refseq_genomic)*). El resultado sería una secuencia cromosómica de mayor tamaño o igual, en caso de ser un gen sin intrones.

Por otro lado, en caso de no encontrar secuencias que alinearan perfectamente, existía la posibilidad de que la secuencia introducida tuviera algún fallo de secuenciación, sobre todo si la secuencia encontrada más parecida era más reciente. En este caso se elegiría la secuencia nueva. También es posible que, de estar el fallo de alineamiento al final de la secuencia, se debiera a que la anotación del cDNA incluía al menos un fragmento de la cola poli A, en cuyo caso también se elegiría la nueva secuencia.

1. Promotor: zona 5'

Aprovechando el alineamiento con la base de datos cromosómica, se extrajo también una secuencia que incluyó 1000 bp antes del inicio de transcripción deducido. Esta secuencia se introdujo en el *software online*, TSSP (*TSSP / Prediction of PLANT Promoters (Using RegSite Plant DB, Softberry Inc., <http://linux1.softberry.com>)*). Este programa predice la presencia de regiones como el promotor, los *enhancers* y la caja TATA. Idealmente, al introducir la secuencia genómica con 1000 bp antes, la predicción mostró un promotor a pocos cientos de bp del inicio de transcripción, así como una caja TATA a unas 50 bp antes.

2. Comprobación u obtención de la CDS y la secuencia aminoacídica

La secuencia de cDNA obtenida se introdujo en la herramienta online de traducción de nucleótidos a aminoácidos: *DNA to protein translation* o *translate tool* (<http://insilico.ehu.es/translate> y <http://web.expasy.org/translate>, respectivamente). Normalmente, se obtuvieron numerosas colecciones de secuencias de aminoácidos, correspondientes a otras tantas “pautas de lectura abierta” (ORFs). Se eligió aquella colección de ORFs que se encontrara en uno de los tres marcos de lectura positivos y, cuyo primer y último fragmento, empezara y acabara respectivamente con el codón de inicio y uno de los de terminación. La secuencia de esta colección de ORFs elegida se comparó con la CDS mayor obtenida de la base de datos y, de no tener aún la CDS, se utilizaría como tal. Respecto a la secuencia de la proteína, de tener una, se cotejaría con la obtenida en el programa, completándola de no coincidir completamente, u obteniéndola.

3. Regiones UTR, TSS y TSS

La CDS obtenida (por cualquier método) debería alinear perfectamente con el cDNA, salvo por una secuencia faltante al principio correspondiente a la 5'-UTR y otra al final, que sería la 3'-UTR.

No encontrar alguna de estas regiones, tras los pasos anteriores, podría significar algún error en el proceso, o que no hubiera un cDNA completo en las bases de datos consultadas, lo cual haría imposible encontrar el verdadero inicio y final del gen (TSS y TTS respectivamente).

La importancia de esto radica en que el TSS es un punto de gran relevancia alrededor del cual se concentran numerosas modificaciones de histonas y, en general, donde se acumulan muchas proteínas, como TFs o la RNAPII (sección 1.8.). En menor medida, el TTS, también reviste importancia para la localización de algunas modificaciones.

4. Alineamiento de las cuatro secuencias

Finalmente, tras obtener las cuatro secuencias de nucleótidos y la de aminoácidos, se hizo una última verificación, alineando las primeras con el software de alineamiento *offline*, MEGA 7 (MEGA, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*; <http://megasoftware.net/>). Las secuencias debieron aparecer en el siguiente orden: genómica con 1000 bp antes, genómica, cDNA y CDS.

Este alineamiento sería de gran ayuda a la hora del diseño de los oligos.

2.8.1. Características de los oligos

Tabla 13 Criterios numéricos para el diseño de oligos

Criterios numéricos			
		Mínimo	Máximo
Tamaño	Producto de PCR	75 bp	160 bp
	Oligos	15 b	30 b
Auto complementariedad	Total	-	4 b
	3'	-	0 b
	Entre oligos	-	4 b
	3'	-	0 b
Oligos a mostrar		-	50 oligos
Errores en dianas no deseadas	Total	6 errores	-
	Últimos 22 bp 3'	6 errores	-

Tabla 14 Criterios categóricos para el diseño de oligos

Criterios categóricos	
Modo de búsqueda	Sin guía
Base de datos	<i>Refseq representative genomes</i>
Organismo (según el caso)	<ul style="list-style-type: none">• <i>A. thaliana</i> (taxid:3702)• <i>S. lycopersicum</i> (taxid:4081)• <i>B. cinerea</i> B05.10 (taxid:332648)

Los oligos de las tres especies se diseñaron con la ayuda del software online primer-BAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). La mayor ventaja de este programa es que utiliza como algoritmo central Primer3 (*Primer3 v. 0.4.0*; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), que permite predecir amplicones inespecíficos en distintas zonas del genoma de la especie o especies seleccionadas, por lo tanto, utilizando esta opción, se minimizaron estos problemas en las qPCRs ulteriores.

Con la intención de facilitar el proceso, se cambiaron en primera instancia los criterios preestablecidos (tabla 13 y 14) y, con los resultados obtenidos con estas opciones y las predeterminadas, se priorizaron los oligos cercanos a las 22 bp, con una temperatura de hibridación de 60 °C, un tamaño del amplicón de 100 bp y nula complementariedad entre oligos.

Por cada gen se intentaron diseñar cuatro pares de oligos, excepto si ya había algún par diseñado previamente por el grupo de investigación, o estaba disponible en la bibliografía, para la zona adecuada. En el caso de *B. cinerea*, especie en la que no se hizo estudio epigenético, solo se diseñaron oligos para RTqPCR. Las zonas donde se intentó hacer el diseño, en primer lugar, fueron:

- Promotor cercano → Situado de forma fija entre 100 y 300 bp aguas arriba del inicio de transcripción
- TSS → Región de mayor importancia, definida como nucleótido 1. Los oligos se diseñaron flanqueando esta zona, por tanto, contenían parte o la totalidad de

la UTR 5', la caja TATA y, en ocasiones, la zona codificante del primer exón (de tenerla).

- Interna → Aunque dependía del tamaño del gen, generalmente estaba situada a varios cientos de bp del principio y el final del gen.
- 3' → Localizada flanqueando el final de la CDS (con parte del amplicón en la UTR 3'). Los oligos diseñados en esta zona se usaron también en las RTqPCRs, debido a que en las RTs se utilizó solamente oligo dT y, en consecuencia, era más probable que se hubieran amplificado las zonas 3' de los transcritos.

En caso de haber problemas en el diseño, se flexibilizaron algunos criterios, como se muestra a continuación según el orden indicado:

Tabla 15 Modificación de criterios numéricos para el diseño de oligos

Criterios numéricos flexibilizados y su orden				
		Mínimo	Máximo	Orden
Tamaño del producto de PCR		60 bp	300 bp	1º
Auto complementariedad	Total	-	8 b	3º
	3'	-	0 b	7º
	Entre oligos	-	8 b	2º
Temperatura de <i>melting</i> de los oligos	3'	-	0 b	6º
	Diferencia entre ellos	-	5 °C	4º
	Absoluta de cada uno	55 °C	65 °C	5º
Contenido en G+C		10 %	90 %	8º

Por último, se modificó el criterio categórico “Filtro de baja complejidad” dejándolo en modo “desactivado”.

De no obtenerse resultados cambiando estos parámetros, se desplazó la zona del diseño a una cercana, por ejemplo, la caja TATA en vez de la TSS o se alejaron los pares destinados al promotor hasta las 1000 bp.

2.8.2. Validación y cálculo de eficiencias

Una vez se obtuvieron los oligos, se probaron en una qPCR con el fin de obtener los datos de su especificidad, es decir, si realmente amplificaban la región para la que

Materiales y métodos

fueron diseñados, así como su eficiencia a la hora de amplificar dicha región, en cada ciclo de la qPCR. La eficiencia máxima de una pareja de oligos es 2, puesto que, al estar formado por dos hebras la cantidad de DNA puede como máximo duplicarse y, por lo tanto, el valor debía estar muy próximo al citado.

El cálculo puede resultar en un valor ligeramente por encima de 2, debido a pequeños errores de pipeteo o de lectura del termociclador.

Las qPCRs se realizaron con cada uno de ellos, en las condiciones anteriormente mencionadas. El DNA se utilizó a distintas concentraciones conocidas, siendo una mezcla del de la planta para la que estaban diseñados con el de *B. cinerea*. Esto se hizo con la intención de asegurar que no se producirían amplificaciones inespecíficas en los experimentos reales (donde hay presencia del DNA del hongo). En el caso de los oligos diseñados para el hongo, la reacción se hizo solamente con su DNA, debido a la poca proporción de este en las muestras vegetales. Aunque, posteriormente, se probaron con muestras que poseían DNA de planta y hongo.

Intentando obtener al menos tres diluciones por encima de una concentración de 0,02 ng/ μ L, el DNA fue diluido inicialmente 100 veces y, a partir de ahí, se hicieron otras diluciones seriadas con un factor de 7,5. Se obtuvieron así diluciones: 1/100; 1/750; 1/5625 y 1/42187,5.

Tras realizar las qPCRs, se extrajeron del software del termociclador los datos de T_m y C_p y se procesaron adicionalmente con el software Excel (*Microsoft Excel 2016*). El primer dato debía ser el mismo para cada concentración de DNA con el mismo oligo y se utilizó, posteriormente, como referencia para identificar si los amplicones eran correctos.

El segundo dato, los Cps, se enfrentaron a los logaritmos en base 10 de las concentraciones del DNA para realizar una recta patrón. Se halló a continuación la ecuación de la recta:

$$y = pendiente \cdot \text{Log}_{10}x + \text{punto de corte (eje Y)}$$

- Donde “Y” es el valor de los Cps y “x” es el valor de la concentración del DNA. De esta ecuación, se extrajo la pendiente para hallar finalmente la eficiencia:

$$Eficiencia = 10^{-1/pendiente}$$

- Además, gracias a la recta patrón, pudo extrapolarse en las siguientes qPCRs, cuál era la concentración del DNA a partir de la Cp obtenida, despejando x:

$$x = 10^{-\frac{\text{punto de corte (eje Y)} - y}{pendiente}}$$

Por último, para corroborar que los amplicones eran los esperados, se comprobó su tamaño realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (p/v) (sección 2.3.1.).

2.8.3. Oligos utilizados

A continuación, se muestran en tres tablas separadas los oligos que se utilizaron en las distintas especies.

Materiales y métodos
 Tabla 16 Oligos de *A. thaliana*

Características de los oligos de <i>A. thaliana</i>								
Nomenclatura		Amplificón			Secuencia de oligos		Letra	Tipo de PCR
Abreviatura	Código (AT)	Región	Inicio	Final	F	R		
CYP71A13	2G30770	Promotor	-298	-157	TGTTCTGGTTCATAGTTAATGGA	CCGATCCTATATGGTTAGTTTTGGA	D	ChIP
		TSS	-89	10	GGGTTCCAAAAGTGTCTGCTAA	TCATGTAAGAAAGTGTGTTGATTGGT		ChIP
		Exón 1	43	106	TCTCTTTGTGCTTAACGACCCT	CGGTTCTGTTGAGGAATCGC		Todas
		Exón 4	2023	2136	CAACCTGATCTAACTGAAGCCA	GCATAGCATAACAAGGTGAAAGAG		Todas
ELI3	4G37990	Promotor medio	-315	-159	AGTTTGATCGACTGCTCATGTTCC	CACCGACCGTTCCTTTCTTCC	Ñ	ChIP
		Promotor	-175	-29	AAAAGAACGGTCGGTGAGGAAC	ATAGGAGAGGATTGTGGAACCGA		ChIP
		TSS	-23	129	GCCTTCACTGCTCCTTATCATCTC	CGGCTAATCCGAACGCCTCT		ChIP
		Exón 1	83	170	TCGATTATGGGAAAGTTCTTCAG	AGTGAAACTGAAAGGCGAGAGA		Todas
		Exón 4	1344	1504	AGACCCAGGAAATGATAGATATGG	GGATTAGGCTTCAATGTGTTGG		Todas
		3-UTR	1540	1672	GTTATTTTCTGTTGGTTGTGTCGT	AACTCTGGCTTACCCCAAA		Todas
GST6	2G47730	Promotor	-189	-87	CGTGGCTGGTCTCATTCT	TGTGAAAATCTGTGGTCTTCTT	F	ChIP
		5'-UTR	90	194	GTTGGGTAAATCCGGCTCA	TCTGTGCACTCCTGCTTTT		Todas
		Exón 4 a 6	794	1879	AAGCCGCCTTCTGTGTTTTG	ATCTTCTCACCACCACCAC		RT
HSFA2	2G26150	Promotor	-257	-109	GCGGCCACATTAAGAAGAAG	CGTGGCACAAGACAAGACA	C	ChIP
		TSS	-22	62	CATTTCTCTCTCCACGCCT	TGGGTTTTGGGTAAAGTTGCGAC		ChIP
		5'-UTR	40	193	CGCAAACCTTACCCAAACCAG	CACCTTCAGTCTTCCATTTTCGTT		Todas
		Exón 1	184	277	CTGAAAGTGAAATGGAGGAAGA	CATTGGTCTAGGAGAGGAAGAGGA		Todas
		Exón 1 a 2	369	840	TAATGGTCGTAACAGCTTTGTTGGT	TCCATCTATCTGGATCAATCTTTC		ChIP<>RT
		Exón 3	1157	1243	ACTTTGTTGAGGTTGCGGTT	AGAAGTAAGCCTCCGTTTCTC		Todas
		3'-UTR	1563	1659	TTGCGGTCTAAGTTATGGTAATGCT	AACCACACTCAATGACTCTTCC		Todas

Material es y métodos

HSP17.4	3G46230	Promotor medio	-463	-326	TCATCAAACCTAAAAATCCCGT	GTTGGTGTGGTCCCTGTAAGAC	J	ChIP
		Promotor	-175	-40	GCGTTCCTACTACCCACCT	TTCAGGTTTCTTCTTTCCGTTTC		ChIP
		TSS	-62	36	AAACGGAAGAAGAACCTGAAA	CGTTGGCGTATTTATAGGGAGA		ChIP
		CDS	480	580	GGAAGTAAAGGCGAGTATGGAGAAT	TTAACCAGAGATATCAACGGACTTG		Todas
		3'-UTR	620	683	GATAGTGTGAAATAAATGGTGCGA	AACGAGATTGGTATTACAAGAAAA		Todas
PDF1.2	5G44420	Promotor medio	-579	-256	TTCAGTAATAGGTGTGCCAGG	GCGGCTGGTTAATCTGAATGG	Q	ChIP
		Promotor	-175	-73	TGGAGAAACCAGCCATCAACAAA	CAATAACGTGGTAACCCACACA		ChIP
		TSS	-59	11	AGAAGATTAACCCACTACCATTTC	TGTGTTGTGTAAGAAATAAGCCA		ChIP
		5'-UTR	41	121	TAATCATCATGGCTAAGTTTGCTTCC	TTACTACCGAAAGCAGCAAAG		Todas
		Exón 1 a intrón 1	57	127	GTTTGCTTCCATCATCACCCCTT	ACATTATTACTACCGAAAGCAG		ChIP
		Exón 1 a 2	101	231	TTGCTGCTTCGGTGAGTAATAATG	CTGTGCTTCCACCATTGCCG		ChIP<>RT
		Intrón 1 a exón 2	195	267	ATATATGCAGACGCACCGGC	CCCTGACCATGTCCCACTTG		ChIP
		Exón 2	318	509	GCCAAACATGGATCATGCAAC	TGTAACAACAACGGGAAAATAAACA		Todas
Exón 2	396	509	TCTTTGGTGCTAAATCGTGTGT	TGTAACAACAACGGGAAAATAAACA	Todas			
PMR4	4G03550	Promotor medio	-393	-311	ATGTCCTTCTTTGTTATGCTGACT	TGCTTTGTATCTTCCACCTTCT	K	ChIP
		5'-UTR	5	98	ACTGAAACGCGGAAAGGAGG	AGAAATCGAAACGGAAGCGAG		Todas
		Inicio de CDS	77	263	CTCGCTCCGTTTCGATTTCTC	CGGGAATGATATTGTACGGCT		Todas
		<i>Exón 1 a 2</i>	2022	2377	GGACGGCATTATAGATTGAAGC	ACCGTCACATCCCAGGAATTCT		RT
PR1	2G14610	Promotor medio	-819	-628	TCGGTCCCTAGAGTTTTTCAA	CCGCCACATCTATGACGTAAG	B	ChIP
		Promotor	-233	-129	GCAAAGCTACCGATACGAAACAATA	TTGCAATTGTCCAAATGAATAGAAG		ChIP
		TSS	-24	70	AGCGATGTTTACGAACCCCAA	ACGATTAATAATCGAGAATAGCCAG		ChIP
		CDS (inicio)	67	127	CGTCTTTGTAGCTCTTGAGGT	TGTGGGCTATCTTGAGCTTTC		Todas
		CDS (mitad)	134	267	CTAAGGGTTCACAACCAGGCA	GCCACCAGAGTGTATGAGT		Todas
		CDS (final)	343	444	GGCTAACTACAACCTACGCTGCCA	TCACCTTGGCACATCCGAGTC		Todas

Materiales y métodos

		3'-UTR	590	660	GGAGCATCATATGCAGGATGT	AGATTCTCGTAATCTCAGCTCTTAT		Todas
WRKY33	2G38470	TSS	-58	59	TTCACCAATCAGACGTGCAA	GGGGGCTTGGAGAAGAAGAA	E	ChIP
		<i>Exón 3 a 4</i>	1389	1582	GTGGGAGTGAACCTGAAGCA	TGCACTACGATTCTCGGCTC		ChIP<>RT
WRKY53	4G23810	Promotor	-203	-64	TTCACTACCACCACCCCACT	TTGACCAAATGACCAAACCATAAA	N	ChIP
		Caja TATA	-93	1	AATTATTATGGTTTGGTCATTTGGTC	GGTGATAAAAATGGATGAGTGTGG		ChIP
		Exón 1	464	602	CATCTCACCCGAGCGTACAA	TAGAACCTCCTCCATCGGCA		Todas
		3'-UTR	1529	1602	CCATCAGTTTTGCGGCCCTT	GCGAATACGCTTTGCGAGGAA		Todas
BGLU23	3G09260	Promotor medio	-311	-169	AAAAGAAATACAACGATCGACGG	ACATGGATATTGACGTTATAGTTG	G	ChIP
		Promotor	-187	-70	TAACGTCAATATCCATGTACGTAGT	ATAATATACCCAGCCAGGCCA		ChIP
		Caja TATA	-97	8	TTAATATGGCCTGGCTGGGT	TGGTTCTTTTACATATCGAAGACG		ChIP
		Exón 1	99	204	CATCGTCGCCTCCAGCAA	GCAGTAGCCGTGCCAAATAAAAA		Todas
		Exón 12 a 13	2829	2987	GCTGTTTGGTATGTCCTATTTCTT	CCATCTTGCCACTCGAAGTTATCC		ChIP
		3'-UTR	3177	3306	AGATTATGAGGCTTGGTTCTAAT	TGACTAGAAGAGGCACAAAGG		Todas
EXL7	1G35140	Promotor	-183	-78	CCGCGTTTTCATTTTGTCTTT	CAAGATTTGGTTGCCAGTTAGG	A	ChIP
		TSS	-53	28	TACCCCTTTTACCCCTCTCTTCTT	ACTTTGAGGTAGTAGTGATGCCTGT		ChIP
		5'-UTR	54	168	AGTCTCTTGTTTCTTGCTTCTAC	TTTGTCCGTTCTCGCATCCA		Todas
		<i>Exón</i>	940	1023	ACGTTAAGGGACTGAATGGGAG	TCAAAACAGAGTCGAGCAAGAA		Todas
VSP1	5G24780	<i>Exón 1 a 2</i>	628	1058	TTTTACGCCAAAGGACTTGC	ATCCCGATTCCAAGAGGTT	O	ChIP<>RT
		Exón 3	1256	1331	CGAAGTTGACGCAAGTGGTG	TCCCAACGATGTTGTACCCT		Todas
VSP2	5G24770	Promotor	-194	-117	CTCACATTTCTTATCGTCATGTCTC	GGTTCACAGTGAGCGAGAA	P	ChIP
		5'-UTR	209	337	TGGGACCAGTAGCATTTGTTG	GTGTGACGCAAAGGGTGGTAT		Todas
		Exón 1	422	492	TACGGTCTCGGCATCCGTTT	GGCTACGTTCCCAAAGATGGTTTTT		Todas
		Exón 2	1053	1131	GGCGTACTGTTGTGGTTAG	ATGATGTTTTGGTAAAGATGCAAGG		Todas
		Exón 3	1389	1459	GAGTCTCGTAAGAAAGGATAACAAC	ATCCTCAACCAAATCAGCCC		Todas

Material es y métodos

ACT2	3G18780	Promotor	-178	-69	CGGATCGAGCAGGTACACGTC	AGACAGCCTTTCCCTCGTGT	I	ChIP
		TSS	-37	96	CGAAATGATTCGTGTCTGTCGATTT	AGTGAGGAGGACAACGAGACAA		ChIP
		5'-UTR	98	229	CATCAGCCGTTTTGAATCTCCG	GAGCGGAAGAAGATGAGATTGAGG		Todas
		Exón 2	830	1020	TGGTTGGGATGAACCAGAAGG	TCGGTAAGAAGAACAGGGTGC		Todas
		Exón 3 a 3'-UTR	1664	2220	ACATTGTGCTCAGTGGTGAA	TCAGAGCTACAAAACAATGGGA		PCR
		Intrón 3 a exón 4	1878	1976	TGCAAATTGAAATCAAAGGCTGA	TGAACGATTCCTGGACCTGC		ChIP
		<i>Final de CDS</i>	2141	2222	GGTTTTACTTACGTCTGCGTT	ACTCAGAGCTACAAAACAATGGG		Todas
EIF4A1	3G13920	5'-UTR (mitad)	63	178	AACCGCTTTTCTCTCAGCCT	GCTTGAATCTCCAAACTCGG	H	Todas
		5'-UTR (final)	148	221	GGTTCAGATCCGAGTTGGGAG	GGAGCAAAGTTGGTAAGCGAG		Todas
		Final de CDS	2103	2640	CTGGTTCCTCCCGTGTCTC	AAGACAAACAACAAAGCCGAA		Todas
		3'-UTR	2378	2493	AGTCGGTCTGTTGCTGTGT	AATCGTGATAGACGACGGG		Todas
TUB	4G14960	Exón 2 a 3	1133	1234	TCCATCCTCTCGACAATGAA	ACCTGAGAGACGAGGCGGTT	L	ChIP<>RT
AG	4G18960	Promotor medio	-346	-245	CAAGTAATGGTAAGTAGAGTCTGCATC	GGTGGGTAGTTCTTGTGTGGT	M	ChIP
		Promotor	-199	-120	TTCTACAATTTCTCAATTTGGGGG	AATAACACCCACCATACATCCG		ChIP
		TSS	-65	28	TGTACTCATGCTTTGTGAACCT	ACTGGTGTTCCTTTTCAGTACATT		ChIP
		5'-UTR	4	111	AATGTACTGAAAAGAACACCAGTT	ATGTGGTGAAAGTTGATTTTGAGA		Todas
		3'-UTR	5435	5532	GGCCGGGAGTGAATAAAAACC	TCACTGATACAACATTCATGGGATA		Todas

Tabla 17 Oligos de *S. lycopersicum*

Características de los oligos de <i>S. lycopersicum</i>							
Nomenclatura		Amplicón			Secuencia de oligos		Tipo de PCR
Abreviatura	Código	Región	Inicio	Final	F	R	

Material es y métodos

DES	01g109140	Promotor	-281	-161	TGGCCTATGTATACGCAAGAAATCAA	TTCAGAGCAACCAAAACACAACA	ChIP
		Promotor a exón 1	-148	364	GAATTC AATGTTTTCTTAGCCGC	CCACCGTAGTATTCTTTACCAGGC	PCR
		TSS	-88	70	TAGAATACCTGTAAAATTACTTAACCT	AGATTTGATAGCTCTGAATAAGAAGAC	ChIP
		Exón 1	71	170	CCGATTCGTGAAATTCAGG	GAACCAAGCATCTTCACCTTGG	Todas
		Exón 2	1073	1174	CAGGTTTGTGGCGAAGC	TCGCTGATAATGTATTGCACC	RT
		Final CDS	1593	1675	GCGTTCAACACATTAATAAGCAAGTAA	AGAGAATATGCAACGTGAGCGG	Todas
DOX1	02g087070	Promotor	-330	-158	AGAGAATCGCGTTCATCATACAA	TGAGTCAAAAAGAAAGAGCTGAGA	ChIP
		TSS	-63	69	AAATAATTGTCAAAGCCATCCAACA	AAGGTAACGTCTCTCTCTCTA	ChIP
		Inicio CDS	118	189	AACAATGCTTTTTGTATGCTCAAG	GGAAATCTTTGTGGATGAATTTACGG	Todas
		Exón 2	487	629	AACGTCGGTAGAACCTACCG	GAAGAGGCATCATATTCCTGCC	Todas
		Final CDS	3633	3723	CCTTCTCTGTTGGGATTCTTCTCC	CACATGATTTTGAGGCTACTACTGAGG	Todas
LOXD	03g122340	Promotor	-304	-181	AGTAGCGCGTGTTCCTGTG	TATTTGCTGGGGTCCGATCTT	ChIP
		TSS	-83	77	TGTGAAGGAAATAAAAACGTGTGG	TGCTAATGAATTTGGTAGAGAGGGA	ChIP
		Exón 1	302	472	TTGGTCAAAGTTGTGCCTGAAAA	TCGATGTCGGTGCTGATG	Todas
		Exón 6	2688	2789	CACCTAAGCCATTGCCATTG	CCAGTTACCAAGTGGCACAAACA	Todas
		Exón 7	3130	3202	GGCTTGCTTTACTCCTGGTC	AAATCAAAGCGCCAGTTCTT	Todas
		3'-UTR	4268	4401	CGGACTGCTGTGTCTAGTTATG	ACGGAACTCAAGTATGTGGTAGA	Todas
PR2	04g064870	Promotor	-224	-153	CGGACAAGTTAGCCCTGTA AAA	TTCTCATATAATAAATTTGTGGGCGT	ChIP
		TSS	-36	44	TTGATCCTATAAAAACCTCATCTGAAGG	CCCTCCTACTATTGAACTTGCC	ChIP
		Exón 1 a intrón 1	85	218	AAACACAAAATGGAGAAATGGACCT	GGGAGTGATGTATTGCAAGAAG	ChIP
		Exón 2	607	734	ATGGGCTGAAGGATCAGTTG	GACACTTCTTGAACCTTGTGG	Todas
		Final CDS	1437	1569	GAGATGGCATTATTGGAGGATTCA	GGAAATTACACTTTTGCACCTATTTT	Todas
WRKY53	08g008280	Promotor	-217	-122	TCTGAGACTCGAAAAGATTTGAAGA	TTTGGTCATAATAACAAGAAAGTCCA	ChIP
		TSS	-51	96	TTTTTGTTCACATAAATTCCTTCTTTTT	ACTTCGAAAAACGAACACAAGC	ChIP

Materiales y métodos

		Exón 1	265	404	ACACACAAGCAACTTAGAGAACAC	GGATTGTA CTGTTGAGCCACCC	Todas
		Exón 3	1343	1481	ACTTGGACGAGAATGACCCAGC	AAGACGGTGAATAGCCGCTACC	Todas
		Exón 3.1	1358	1479	ACCCAGCAGCATGTCAATTCT	GACGGTGAATAGCCGCTACCT	Todas
		3'-UTR	1776	1864	TTTATTGAGGTCGATGATCCTTCCTT	AGTTTCTAAATACGTGGCTAATTTGTTG	Todas
WRKY75	05g015850	Promotor a CDS	-73	398	GAATAATATTGAACAAGGCAGCCG	CAGCTTTTTGTCCATATTTCTCC	ChIP
		TSS	-54	46	AGCCGCCACACTAGTCCAAC	TGAGAATGTAAAAGTGGAGACGTTTTG	ChIP
		Exon 1	100	250	TTCCATCAGCATCATCGTCG	TTCCATGCTTGCATTAGTCC	Todas
		3'-UTR	2514	2678	TCAATGCCTAAGGCTTATATCTTATCT	GATAATCCCAAATATGAATGACTACCT	Todas
EF1a	06g005060	Caja TATA	-172	-22	TCCTGAATTCATTGCAAGTGTGA	TTTCAAAAACCATGCAACCCA	ChIP
		Exón 2	831	961	GATTGGTGAATTGGAAGTGTGTC	AGCTTCGTGGTGCATCTC	Todas
		Exón 2.1	1204	1323	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC	Todas

Tabla 18 Oligos de *B. cinerea*

Características de los oligos de <i>B. cinerea</i>							
Nomenclatura		Amplicón			Secuencia de oligos		Tipo de PCR
Abreviatura	Código	Región	Inicio	Final	F	R	
ACT	XM_001553318.1	Exón 5	1059	1139	AGCGTGAATCGTCCGTGAT	GACTGGCGGTTTGGATTCTT	Todas
ATUB	XM_001555875.1	Exón 5	736	826	GCCGGGTTGCCGATAATT	AGAAGAGCACCGAAACAGATC	Todas

Se muestran, en las tres tablas y sombreados en verde, aquellos oligos pertenecientes a genes que se espera que estén transcripcionalmente activos; en rosado, reprimidos; en azul, constitutivamente activos y en morado, constitutivamente reprimidos. En negrita, quedan resaltadas las regiones que se usaron finalmente en ChIPqPCR y, en cursiva, las que lo fueron en RTqPCR. En el caso de *A. thaliana*, hay una columna extra indicando la letra asignada a cada gen en la figura de su genoma (sección 3.3.).

2.9. Normalización e interpretación de resultados

Cada combinación de muestra y oligo se hizo por triplicado y se calculó la media de las Cps obtenidas, siempre que cumplieran estos criterios:

- Su T_m asociada coincidiera con la obtenida en la validación del oligo, con una desviación inferior a 0,2 °C.
- La desviación típica de cada Cp dentro de su trío fuera inferior a 0,2 Cps.

$$\mu Cp = \frac{Cp1 + Cp2 + \dots + Cpn}{n}$$

Las siguientes normalizaciones se hicieron dependiendo del tipo de qPCR como se indica a continuación:

2.9.1. RTqPCR

La normalización de los resultados se realizó usando el método Pfaffl (Pfaffl, 2001), teniendo en cuenta la concentración de DNA utilizada (a menos que esta fuera siempre la misma en cada qPCR) y los cuatro tipos de combinaciones:

- Oligo problema + INF* = $E_{prob}^{-(\mu Cp_{INF} + Log E_{prob} [INF])}$
- Oligo constitutivo + INF* = $E_{const}^{-(\mu Cp_{INF} + Log E_{const} [INF])}$
- Oligo problema + CTL* = $E_{prob}^{-(\mu Cp_{CTL} + Log E_{prob} [CTL])}$
- Oligo constitutivo + CTL* = $E_{const}^{-(\mu Cp_{CTL} + Log E_{const} [CTL])}$

Donde:

E_{const} = Eficiencia de oligo de gen constitutivo

E_{prob} = Eficiencia de oligo de gen problema

μCp_{CTL} = Promedio de Cps de la CTL

μCp_{INF} = Promedio de Cps de la INF

[CTL] = Concentración de la CTL

[INF] = Concentración de la INF

A continuación, se normalizaron, paralelamente en las CTL e INF, las señales de las combinaciones de cada oligo problema con el constitutivo.

$$\text{Expresión en INF normalizada} = \frac{\text{Oligo problema} + \text{INF}}{\text{Oligo constitutivo} + \text{INF}}$$

$$\text{Expresión en CTL normalizada} = \frac{\text{Oligo problema} + \text{CTL}}{\text{Oligo constitutivo} + \text{CTL}}$$

Finalmente se normalizó la señal de la INF, con respecto a la CTL, obteniéndose la ratio.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Expresión en infectada normalizada}}{\text{Expresión en control normalizada}}$$

Desarrollando completamente sería como sigue:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{prob}^{-\left(\mu C_{pINF} + \text{Log}_{E_{prob}}[INF]\right)}}{E_{const}^{-\left(\mu C_{pINF} + \text{Log}_{E_{const}}[INF]\right)}} \div \frac{E_{prob}^{-\left(\mu C_{pCTL} + \text{Log}_{E_{prob}}[CTL]\right)}}{E_{const}^{-\left(\mu C_{pCTL} + \text{Log}_{E_{const}}[CTL]\right)}}$$

Se calculó, por tanto, la ratio de la expresión relativa de cada oligo problema en cada réplica, viéndose adicionalmente si, entre réplicas, el nivel de expresión de la INF era significativamente diferente de la CTL.

Para ello, se realizó una prueba T con dos colas, utilizando como matriz uno las expresiones normalizadas en las INFs de las réplicas y, como matriz dos, las CTLs.

Para hacer la prueba T con mayor rigurosidad, se realizó anidadamente una prueba F con el fin de averiguar si las varianzas de cada matriz eran iguales (homocedásticas) o diferentes (heterocedástica).

En ambas pruebas se utilizó el nivel de significación estándar de $\alpha = 5\%$

2.9.2. ChIPqPCR

Inicialmente la normalización se hizo de igual manera que en la RTqPCR, usando el método Pfaffl, de forma genérica:

$$\text{Oligo A} + \text{Muestra 1} = E_A^{-\left(\mu C_{p1} + \text{Log}_{E_A}[1]\right)}$$

Materiales y métodos

Pero a diferencia que, en el cálculo del nivel de expresión, en CHIP no suelen usarse oligos para genes constitutivos (al menos, no para normalizar) y, si bien se mantuvieron las condiciones (CTL e INF), dentro de cada una de estas hubo hasta siete tipos de inmunoprecipitaciones (IPs), llegando hasta las catorce combinaciones por oligo.

En primer lugar, hubo tres tipos de IPs utilizadas para la normalización dentro de las siguientes condiciones:

1. No Ac (Sin anticuerpo) → Muestra de DNA obtenida a partir de la inmunoprecipitación con *dynabeads*, pero sin usar anticuerpos. Matemáticamente se utilizó como el ruido de fondo, un factor común para todas las IPs. El valor obtenido de la qPCR se restó al del resto de IPs amplificadas con el mismo oligo. Normalmente no se llegó a obtener una amplificación válida (o no había amplificación o, las Tms no coincidían con las validadas), en cuyo caso se asumió un Cp de 40.
2. INPUT → Dependiendo del tipo (O, A, B o C), puede ser una muestra de cromatina extraída antes de hacer las inmunoprecipitaciones, durante o después. En cualquier caso, el valor solía ser muy similar en todas ellas. Su valor se utilizó como dividiendo del resto de inmunoprecipitaciones.
3. H3 → Dentro de los controles es la única que realmente puede considerarse como una muestra inmunoprecipitada que se utilizó como referencia de la cantidad de histona 3 presente en la región amplificada por el oligo; teóricamente su valor debía situarse entre el del INPUT y el del resto de IPs. De forma similar al INPUT, se utiliza para dividir los valores de las IPs con anticuerpos frente a modificaciones de H3, resultando en una proporción.

Por otro lado, se analizaron cuatro modificaciones de H3, que fueron las inmunoprecipitaciones “problema”. Independientemente de la IP, a todas se les restó el valor de No Ac (salvo a él mismo), para ser normalizadas a continuación con el INPUT. Sin embargo, el No Ac también se normalizó dividiéndolo entre el INPUT,

para comprobar si su nivel era mínimo. Tras restar el No Ac, los niveles de cada IP fueron divididos entre el valor del INPUT o de H3, obteniéndose el dato conocido como % de INPUT o H3, respectivamente, ambos válidos para interpretar los resultados.

Sin embargo, adicionalmente, los resultados de % de INPUT de las IPs de H3 modificada podían ser a su vez divididos entre el valor obtenido de H3 (habiéndole restado a este el del No AC, pero sin haberlo dividido entre el del INPUT, pues esto anularía esta última la normalización). Obteniéndose así una normalización triple que incluyera ambos referentes.

Por lo tanto, se eligió, dependiendo de los resultados, uno de estos tres tipos de normalizaciones a la hora de la interpretación:

1. % de INPUT = $\frac{Ac-No\ Ac}{INPUT-No\ Ac}$
2. % de H3 = $\frac{Ac-No\ Ac}{H3-No\ Ac}$
3. Normalización triple = $\frac{Ac-No\ Ac}{\frac{INPUT-No\ Ac}{H3-No\ Ac}}$

O, desarrollando:

$$1. \text{ \% de INPUT} = \frac{E_{Oligo}^{-\left(\mu Cp_{Ac+LogE_{oligo}}[Ac]\right)-\left(\mu Cp_{No\ Ac+LogE_{oligo}}[No\ Ac]\right)}}{E_{Oligo}^{-\left(\mu Cp_{INPUT+LogE_{oligo}}[INPUT]\right)-\left(\mu Cp_{No\ Ac+LogE_{oligo}}[No\ Ac]\right)}}$$

$$2. \text{ \% de H3} = \frac{E_{Oligo}^{-\left(\mu Cp_{Ac+LogE_{oligo}}[Ac]\right)-\left(\mu Cp_{No\ Ac+LogE_{oligo}}[No\ Ac]\right)}}{E_{Oligo}^{-\left(\mu Cp_{H3+LogE_{oligo}}[H3]\right)-\left(\mu Cp_{No\ Ac+LogE_{oligo}}[No\ Ac]\right)}}$$

3. Normalización triple =

$$\frac{E_{Oligo}^{-\left(\mu Cp_{Ac+LogE_{oligo}}[Ac]\right)-\left(\mu Cp_{No\ Ac+LogE_{oligo}}[No\ Ac]\right)}}{\frac{E_{Oligo}^{-\left(\mu Cp_{INPUT+LogE_{oligo}}[INPUT]\right)-\left(\mu Cp_{No\ Ac+LogE_{oligo}}[No\ Ac]\right)}}{E_{Oligo}^{-\left(\mu Cp_{H3+LogE_{oligo}}[H3]\right)-\left(\mu Cp_{No\ Ac+LogE_{oligo}}[No\ Ac]\right)}}}$$

Materiales y métodos

Donde:

E_{oligo} = Eficiencia de oligo que se esté analizando

Ac = Anticuerpo problema

Ocasionalmente, se podía realizar una normalización más, utilizando un gen de expresión constitutivamente activa, pudiéndose aplicar tanto directamente, como adicionalmente a la normalización respecto al INPUT, a H3 o a la normalización triple. Este cálculo, aunque descrito (Haring et al., 2007) raramente se ve en la bibliografía por la variabilidad de los genes constitutivos y por el hecho de que, para realizarla correctamente, sería necesario teóricamente normalizar cada oligo del gen problema, con el correspondiente oligo diseñado en la misma zona del gen constitutivo (lo cual es muy relativo por las diferencias entre genes). El cálculo, en caso de realizarse adicionalmente al INPUT, sería como sigue:

% de INPUT /gen constitutivo

$$\frac{E_{Oligo\ problema}^{-\left(\mu Cp_{Ac} + Log E_{oligo\ problema} [Ac]\right)} - \left(\mu Cp_{No\ Ac} + Log E_{oligo\ problema} [No\ Ac]\right)}{E_{Oligo\ problema}^{-\left(\mu Cp_{INPUT} + Log E_{oligo\ problema} [INPUT]\right)} - \left(\mu Cp_{No\ Ac} + Log E_{oligo\ problema} [No\ Ac]\right)} = \frac{E_{Oligo\ constitutivo}^{-\left(\mu Cp_{Ac} + Log E_{oligo\ constitutivo} [Ac]\right)} - \left(\mu Cp_{No\ Ac} + Log E_{oligo\ constitutivo} [No\ Ac]\right)}{E_{Oligo\ constitutivo}^{-\left(\mu Cp_{INPUT} + Log E_{oligo\ constitutivo} [INPUT]\right)} - \left(\mu Cp_{No\ Ac} + Log E_{oligo\ constitutivo} [No\ Ac]\right)}$$

2.10. Medición del nivel de infección

Al utilizar un método de inoculación mediante spray, se tuvo que recurrir a un procedimiento alternativo para determinar el grado de infección de la planta. En el grupo de investigación normalmente se realiza una medición de la superficie de los halos de necrosis, ya que se utiliza un método de infección mediante la aplicación de dos gotas de suspensión de conidiosporas por hoja o foliolo.

Se eligió un método cuantitativo, midiendo la cantidad relativa de genes constitutivos de *B. cinerea* en el cDNA de la INF correspondiente de cada réplica (Crespo-Salvador et al., 2017). Se diseñaron o eligieron oligos en estos genes y, tras probar su validez intrínseca (amplificación del tamaño previsto, eficiencia aceptable y anotación de su Tm), se utilizaron muestras de cinéticas de infección de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* con *B. cinerea* a 0, 24, 48 y 72 h para establecer la progresión del transcrito de estos genes a lo largo de la infección.

Para que no influyeran sesgos, como variaciones en la cantidad de muestra, se relativizó el nivel de transcrito del gen constitutivo del hongo con el de uno de la planta, tal como se describe en la bibliografía (Wang et al., 2015), expresándose el nivel de infección en tanto por 1 o en porcentaje.

$$\text{Nivel de infección} = \frac{E_{const H}^{-\left(\mu C p_{INF} + \text{Log} E_{const H} [INF]\right)}}{E_{const P}^{-\left(\mu C p_{INF} + \text{Log} E_{const P} [INF]\right)}}$$

Donde:

$E_{const H}$ = Eficiencia de oligo constitutivo del hongo

$E_{const P}$ = Eficiencia de oligo constitutivo de la planta

Con este método, realmente se estaba midiendo la expresión relativa de un gen constitutivo de la especie infectante, con respecto a otro de la INF, no la ratio de masas, tejidos o células. Por lo tanto, paralelamente, se utilizó también el INPUT (que básicamente es una extracción indirecta de DNA de la muestra) de las INFs, para ver qué cantidad relativa de células de una especie había con respecto a la otra. La forma de calcular el nivel fue la misma, sustituyendo solamente cDNA por DNA, y se comprobó que los resultados eran similares.

3. Resultados y discusión

Previamente al inicio de esta tesis existían pocos estudios sobre modificaciones de cromatina relacionadas con el efecto de patógenos necrótrofos, y en concreto del hongo *B. cinerea*, que eran indirectas, basadas en el efecto de mutaciones en ciertos genes en las principales rutas defensivas (figura 18). Por otro lado, estos estudios se realizaron en *A. thaliana*, no habiendo información previa en *S. lycopersicum*. Como consecuencia, uno de los principales objetivos fue la elaboración de los siguientes protocolos principales (aunque en cada uno de ellos hay subprotocolos o protocolos derivados, para comprobaciones y controles de calidad de la muestra):

- Infección y muestreo → Parte de plantas y hongos listos para la interacción e incluye los protocolos de extracción de esporas, inoculación en las plantas, muestreo tras la infección y entrecruzamiento.
- Extracción de cromatina → Utilizando una cantidad fija de tejido infectado y entrecruzado, contiene también el protocolo de sonicación, validación de la sonicación y medición de la concentración de la cromatina.
- ChIP → A partir de la cromatina purificada, fragmentada y, validada. En este protocolo también se realiza el desentrecruzamiento de la cromatina y, la purificación del DNA para su uso en qPCR.

Los patosistemas que se estudian en la presente tesis son especialmente complicados al tratarse *B. cinerea* de un necrótrofo que degrada rápidamente el tejido (especialmente en *S. lycopersicum*), por lo que el estudio de la epigenética del proceso de infección fue particularmente difícil y hubo que solventar diversos problemas en varias etapas de cada protocolo. Debido a esto, gran parte de los resultados ya han sido descritos previamente a modo de protocolos finales (sección 2.).

Cuando ya estaba avanzada la realización de la presente tesis, se publicó un trabajo en el que se analizaban modificaciones de histonas en plantas de *A. thaliana* inoculadas con *B. cinerea* pero con un objetivo muy distinto, centrado en el análisis de otras modificaciones en genes y zonas distintas a las que se han abordado en el presente trabajo (Lee et al., 2016).

3.1. Protocolos iniciales

Respecto a la infección y el muestreo, se utilizaron los protocolos ya utilizados previamente en el grupo de investigación (Lopez-Cruz et al., 2017). Por otra parte, en lo que a protocolos de extracción de cromatina y ChIP se refiere, se partió de una combinación de éstos usados en animales, concretamente *Mus musculus* (Tur et al., 2010) y en plantas de la especie del guisante (*Pisum sativum* (Gagete et al., 2011), este último basado a su vez en un protocolo para trigo (*Triticum aestivum* (Spiker et al., 1983). En estos protocolos, se realiza un tipo de entrecruzamiento, denominado entrecruzamiento en suspensión, diferente al normalmente utilizado en plantas (entrecruzamiento a vacío). Pero al estar soportados por la bibliografía, en cultivares distintos a *A. thaliana*, se pensó que esto podría ayudar a la adaptación en *S. lycopersicum*, además de conseguir realizar un muestreo más rápido y versátil, al no tener que realizar en el momento el entrecruzamiento. Los anticuerpos utilizados fueron anti-histonas, por estar bien estudiados en otros estreses y ser proteínas, que, al unirse fuertemente al DNA y ser muy numerosas, ofrecían más probabilidades de éxito.

Los tres protocolos principales usados originalmente, se explican brevemente a continuación:

Resultados y discusión

3.1.1. Infección y muestreo

Muestra de partida: doce plantas de CTL y otras doce de INF. No se utilizaron tampones.

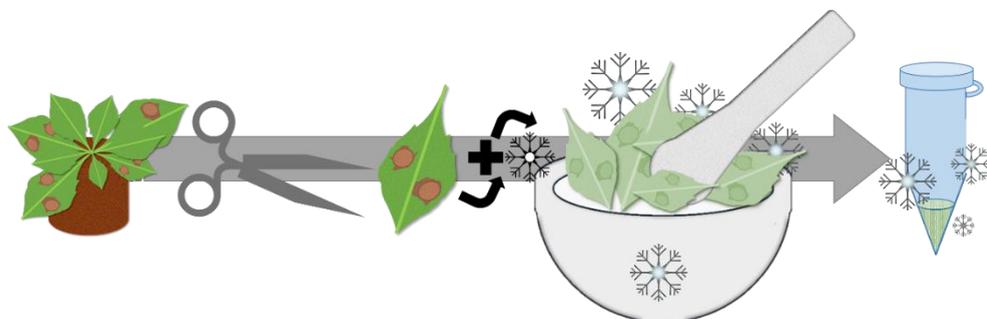


Figura 36 Esquema de muestreo original

En plantas inoculadas por gota (véanse las dos necrosis en cuatro hojas de la planta) se muestrean las hojas que, directamente, se congelan con N₂ líquido y se machacan.

En los protocolos de infección y muestreo originales, el hongo se creció en cámaras de cultivo y se inoculó depositando dos gotas de 5 µL de una suspensión de conidiosporas (10⁵ conidiosporas/mL) por hoja en cuatro hojas por planta de *A. thaliana*. Posteriormente se muestrearon hojas homogéneamente infectadas e, inmediatamente se procedió a su congelación con N₂ líquido y se pulverizaron con mortero, guardándolo a -80 °C (figura 36) o procediendo directamente con el siguiente protocolo (Lopez-Cruz et al., 2017).

3.1.2. Extracción de cromatina

Muestra de partida: 1 a 3 g de tejido de CTL e INF. Los tampones utilizados eran idénticos, salvo por carecer de PMSF.

Se resuspendió el tejido pulverizado en 7,5 mL de tampón de homogenización conteniendo BME e PIs y se homogenizó con un *potter* (*Overhead Stirrers RW 20*

digital, ref. 0003593001, IKA) hasta eliminar los fragmentos de tejido visibles, manteniendo la muestra en hielo.

A continuación, se atemperó durante 3 min a 25 °C en un baño con agitación (Unitronic Vaivén, ref. 6032011, JP SELECTA S.A) y, posteriormente, se añadió formaldehído al 1% (v/v) para proceder al entrecruzamiento durante 10 min, agitando manualmente cada 3 min (figura 37 A). Finalizado el tiempo de incubación, se añadió glicina a una concentración final de 125 mM para detener el entrecruzamiento, agitando bien y continuando con la incubación durante 5 min más (figura 37 B).

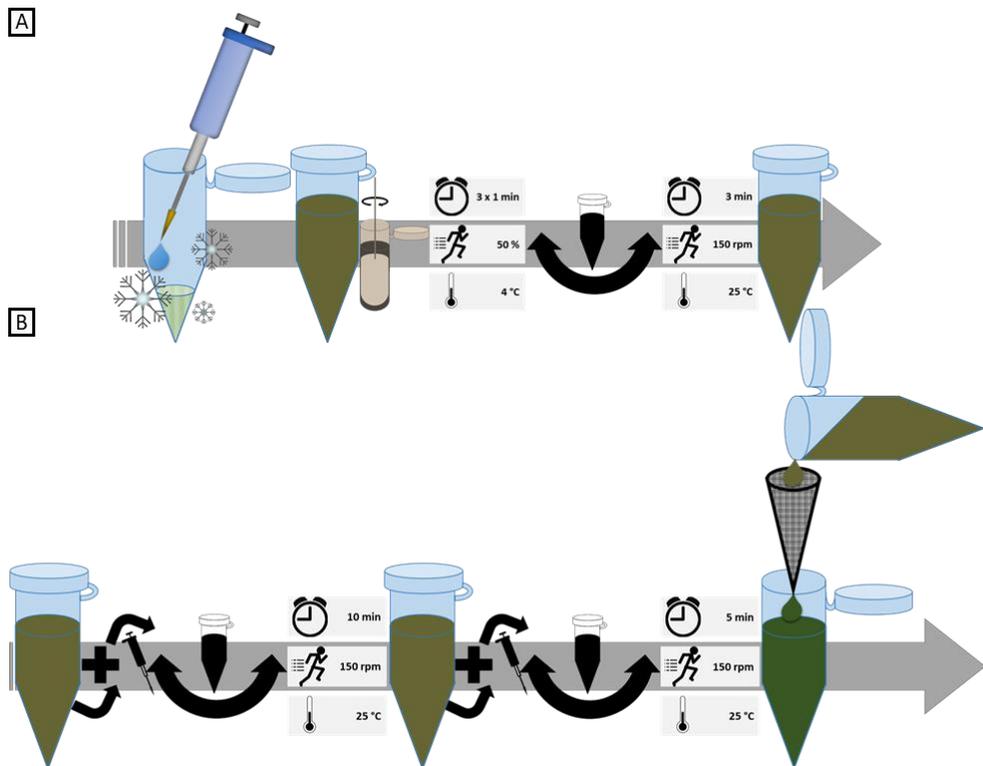


Figura 37 Esquema de la primera etapa original de la extracción de cromatina

(A) El tejido pulverizado se resuspende en tampón de homogenización, se homogeniza con *potter* y se incuba en hielo. (B) Posteriormente, se entrecruza en suspensión añadiendo formaldehído e incubando para detener el proceso añadiendo glicina. Finalmente, el tejido entrecruzado se filtra.

Posteriormente, se realizó un filtrado con una malla de 125 μm de poro (figura 37 B) y una centrifugación durante 20 min a 3000 RCFs, a 4 °C. El sobrenadante era

Resultados y discusión

descartado y el sedimento resuspendido en 3,75 mL de tampón de lisis celular (BME e Pls) y centrifugado durante 20 min a 3000 RCFs y a 4 °C.

Se volvió a descartar el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 5 mL tampón de homogenización, volviendo a utilizar el *potter* para deshacer cualquier resto de tejido visible, como en el inicio del protocolo. Seguidamente se incubó la muestra en hielo durante 10 min y luego se centrifugó durante 20 min a 2100 RCFs y a 4 °C, para descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1,5 mL de tampón de homogenización.

Entonces se realizaba otra centrifugación durante 20 min a 12000 RCFs y 4 °C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 3 mL de tampón de sedimentación. El volumen era, a continuación, transferido a otro tubo, sobre un volumen previamente depositado de 4,5 mL y se procedía a una centrifugación durante 1 h a 27000 RCFs y 4 °C. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 750 µL de tampón de lisis nuclear, obteniendo así la cromatina.

El volumen de la muestra se transfirió a un tubo especial de 15 mL al que se le colocaba una sonda que entraba en contacto con la cromatina para la sonicación. El sonicador se preparó con el baño de hielo como en el protocolo final y la sonicación se llevó a cabo en seis ciclos de 10 min, en los que el sonicador permanecía secuencialmente activo durante 30 s e inactivo otros 30 s, a la potencia máxima. Cada ciclo era necesario reajustar la sonda de cada tubo y reponer el hielo. Después de la sonicación, se realizó una centrifugación durante 10 min a 15000 RCFs y 4 °C, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo. El proceso se repitió hasta no observarse sedimento (de dos a cinco veces).

3.1.3. ChIP

Muestra de partida: 750 µL de cromatina de CTL e INF para llevar a cabo seis inmunoprecipitaciones.

Tabla 19 Composición de tampones de CHIP

Tampones del protocolo CHIP original						
Nombre	PBS/BSA	Baja salinidad	Alta salinidad	Cloruro de litio	Tris-EDTA	Elución
Compuesto	Concentración					
BSA	0,5 % (p/v)					
Desoxicolato de Na				0,5 % (v/v)		
EDTA-NaOH pH 8,0		1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM	
HEPES pH 8,0		50,0 mM	50,0 mM			
Igepal				0,5 % (v/v)		
KH ₂ PO ₄	2,0 mM					
KCl	2,7 mM					
LiCl				250		
Na ₂ HPO ₄	10,0 mM					
NaCl	137,0 mM	140,0 mM	500,0 mM			
NaHCO ₃						100,0 mM
SDS		0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)			1,0 % (v/v)
Tris-HCl pH 8,0				10,0 mM	10,0 mM	
Tritón X-100		1,0 % (v/v)	1,0 % (v/v)			

Se preparaban alícuotas de 50 μ L de *dynabeads* para cada inmunoprecipitación (300 μ L en total por condición), haciendo tres prelavados con 1 mL de BSA/PBS (5mg /mL), centrifugando durante 1 min a 1000 RCFs. Se recogieron magnéticamente las *dynabeads*, eliminando el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron en 50 μ L de tampón BSA/PBS, al que se añadieron 2 mg de tRNA y 2 μ g del anticuerpo correspondiente a cada alícuota (salvo la del control negativo “No Anticuerpo”), dejando los tubos incubando en rotación durante 24 h a 4 °C (figura 38 A).

Utilizando un tubo de 15 mL, la cromatina se diluyó diez veces con 7,5 mL tampón de PBS/BSA al que se añadieron 15 μ L de PIs. La cromatina diluida se centrifugó 10 min a 1400 RCFs y 4 °C, transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo y repitiendo el proceso hasta que no se observara sedimento (una o dos veces).

- Se prepararon otros 100 μ L de *dynabeads* por cada condición, realizando los mismos prelavados descritos, pero esta vez la resuspensión era solo en tampón BSA/PBS.

Resultados y discusión

Las *dynabeads* recién prelavadas se añadían a la cromatina diluida y se incubaban en rotación durante 1,5 h a 4 °C. A continuación, se dividió la cromatina en tubos de 1,5 mL y se recogieron las *dynabeads* magnéticamente, transfiriendo los sobrenadantes a un único tubo de 15 mL por condición.

Las *dynabeads* unidas a los anticuerpos se lavaron cuatro veces con 1 mL de tampón BSA/PBS, centrifugando 1 min a 1000 RCFs, siendo después recogidas magnéticamente y eliminando el sobrenadante.

A continuación, estas *dynabeads* (en alícuotas de 50 μ L) se combinaron con 1 mL de la cromatina prelavada en tubos de 1,5 mL, incubando en rotación durante 1,5 h a 4 °C. Finalizada la incubación, mediante un *spin* se recuperaron las *dynabeads* y se recogieron magnéticamente eliminando los sobrenadantes (figura 38 B), salvo en los tubos sin anticuerpo, cuya cromatina sería utilizada como INPUT.

- El INPUT se incubó con 10 mg de RNasa durante 24 h, a 65 °C.

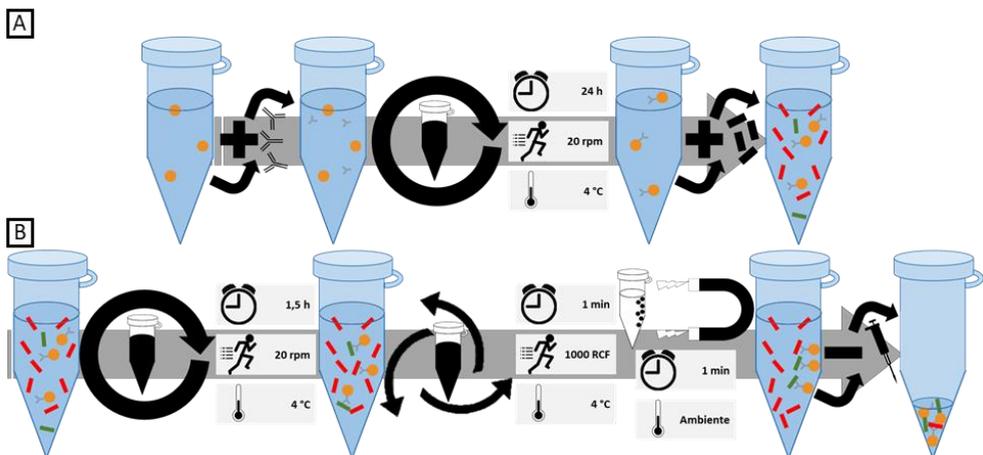


Figura 38 Esquema de la fase diferencial del protocolo original de ChIP

(A) Las *dynabeads* se incuban con los anticuerpos y, posteriormente, ambos se agregan a la cromatina. (B) Se incubó la muestra para que los anticuerpos se unan a la cromatina y, a continuación, se descarta la cromatina no unida.

Usando tampón de baja salinidad (que empleaba “ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacetansulfónico” (HEPES) en lugar de tris como regulador de pH), se

resuspendieron las *dynabeads* y se realizaron dos lavados incubando en rotación durante 1 min, recogiénolas después magnéticamente, eliminando el sobrenadante. A continuación, se realizaron dos lavados con tampón de alta salinidad y con tampón de cloruro de litio. Por último, se realizó un único lavado con tampón TE resuspendiendo finalmente las *dynabeads* en 50 μL de tampón de elución.

Los tubos se agitaron con vórtex y se incubaron 10 min a 65 °C, tras lo cual se centrifugaron 1 min a 1000 RCFs. Las *dynabeads* se recogieron magnéticamente, transfiriendo 40 μL del sobrenadante a tubos nuevos. Se resuspendieron las *dynabeads* nuevamente en otros 50 μL de tampón de elución y se repitió el proceso, juntando al final los sobrenadantes, a los que se añadieron 20 μL de tampón de elución para alcanzar un volumen de 100 μL . Los tubos conteniendo los sobrenadantes se incubaron 8 h a 65 °C.

Después de la incubación, se añadieron 40 μg de Proteasa K a los tubos inmunoprecipitados y otros 200 μg a los de los INPUTs incubando 1 h a 37 °C. Finalmente, se realizó una extracción fenólica del DNA (sección 2.5.2.), estando ya preparado para el análisis por qPCR.

3.2. Modificaciones en los protocolos

En varios pasos de los protocolos se hacen validaciones para verificar que la muestra es adecuada para el siguiente paso. En el primer experimento se utilizaron plantas CTL para observar si se podría extraer cromatina, inmunoprecipitarla con un anticuerpo de interés, purificar su DNA y amplificarlo con éxito.

Debido a esto, la primera validación del protocolo vino mediante una electroforesis de la cromatina extraída y sonicada y, una medición mediante espectrofotometría de su concentración (posteriormente las primeras validaciones estarían enfocadas a la infección). Además, para la puesta a punto del protocolo, se probaron nueve combinaciones de tiempos de entrecruzamiento y sonicación: 5, 10 y 20 min de

Resultados y discusión

entrecruzamiento, con tres, seis y nueve ciclos de sonicación (todos a alta potencia y con el sonicador secuencialmente activo durante 30 s e inactivo durante otros 30 s).

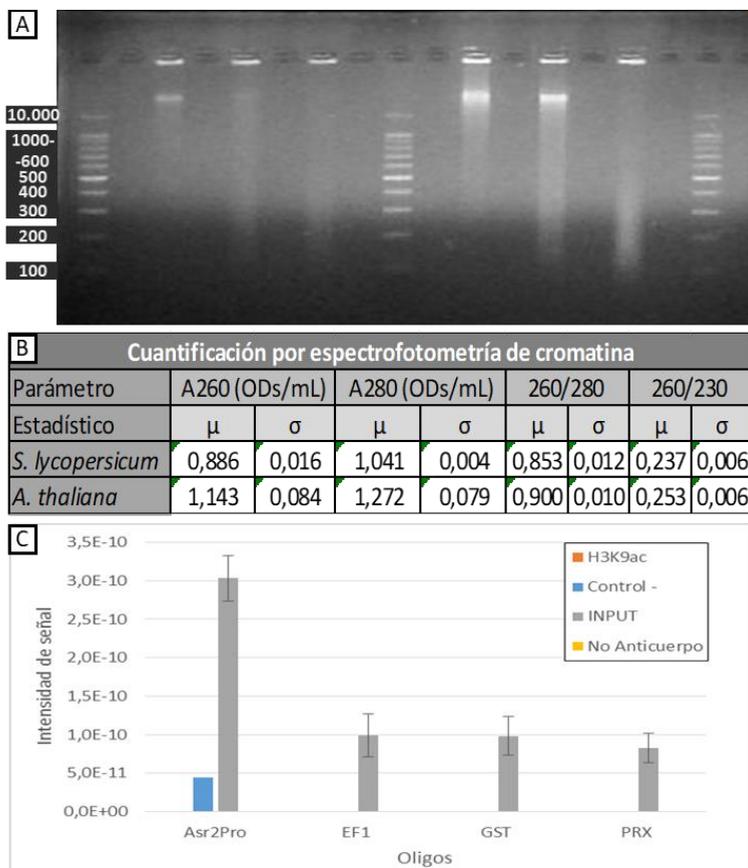


Figura 39 Resultados de los experimentos iniciales

(A) Electroforesis de *S. lycopersicum* y *A. thaliana* (en ese orden) a alta potencia, entrecruzamiento durante 10 min y sonicación en 3, 6 y 9 ciclos, de izquierda a derecha (en las condiciones indicadas previamente en el apartado). (B) Tabla de cuantificación de la cantidad de cromatina mediante ODs, con su pureza expresada en las ratios 260/280 y 260/230. (C) Gráfica del resultado de la ChIPqPCR con muestras de *S. lycopersicum* examinando distintos genes en una sola zona, se inmunoprecipitó utilizando el anticuerpo anti H3K9ac. En el eje de las "Y" se muestra el nivel de intensidad y en el de las "X" los genes y muestras examinadas. Las barras de error indican la "desviación estándar con respecto a la media" (s.e.m.) de tres réplicas técnicas (n = 3).

Los valores extremos de entrecruzamiento mostraron ser los menos convenientes y se descartaron:

- 5 min → La cromatina no se entrecruzaba lo suficiente, haciéndola más susceptible a la sonicación, dando cortas estelas con fragmentos de bajo tamaño (100 a 200 bp).

- 20 min → Se obtenía poca recuperación de cromatina final y la recuperada tenía una apariencia intacta en la electroforesis (intensa banda superior).

Las condiciones óptimas se establecieron dentro de los 10 min de entrecruzamiento (figura 39 A), variando en ocasiones el número de ciclos de tres a seis. Por otro lado, la concentración de la cromatina obtenida en estas condiciones, se aproximaba al óptimo estimado para realizar una inmunoprecipitación (1 OD a 260 nm por anticuerpo (figura 39 B)).

Tras realizar la inmunoprecipitación con el anticuerpo H3K9ac y realizar las primeras qPCRs, no se observaron diferencias entre las muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo y las utilizadas como control sin anticuerpo (figura 39 C). Las muestras de INPUT si daban señal, por lo que se descartaron posibles problemas con la qPCR o con la concentración de las muestras. Se obtuvieron en ocasiones señales con los controles negativos internos de la qPCR, no así con los de la inmunoprecipitación, de lo que se entreveía que al menos no había unión inespecífica de la cromatina a las *dynabeads*.

Después de obtener estos resultados y considerar los pasos que, en apariencia, habían sido exitosos (extracción, entrecruzamiento y al menos, parte de la inmunoprecipitación), se contrastaron los pasos utilizados con otros protocolos similares descritos en la bibliografía (tabla 20), es decir, de extracción de cromatina y CHIP en plantas, especialmente en muestras sometidas a estreses bióticos (tabla 2). Inicialmente se planteó que el problema pudiera estar en la extracción del DNA a partir de la cromatina, pues quizá el método utilizado no era eficaz, pudiendo perderse gran cantidad de muestra.

Resultados y discusión

Tabla 20 Comparación de protocolos de extracción de cromatina y ChIP

General														
Autor	Óscar Crespo	Flores-Vergara, Miguel A.	Yamaguchi, Nobutoshi	Jaskiewicz, Michael	Abdelaty Saleh	Hemsley, Piers A.	Abcam	Kaufmann, Kerstin	Wei, Li	Rcardi, Martiniano M.	Haring, Max	Zymo	Posé, David	Epigen-tek
Fecha	2017	2015	2014	2011	2008	2014	2007	2010	2014	2010	2007		2016	2011
Tipo de publicación	Artículo	Protocolo	Protocolo	Protocolo	Artículo	Artículo	Protocolo	Artículo	Artículo	Protocolo	Protocolo	Kit	Artículo	Kit
Especie	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Z. mays</i>	Plantas	Plantas	Plantas
Dynabeads magnéticas	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No	No	Sí	No	No (placa)
Tejido de partida (g)	2	0,5-2	0,3-06	1-2	4	2-3	1,5	0,8	5	3-4	1-5	1-2	1-2	0,8-1
Entrecruzamiento														
Prelavado	No	Sí	Sí	No	No	No	Sí	No	No	Si (X2)	No	Si (X2)	No	Si (X2)
Tampón (PMSF/BME/PIs)	✓/X/X	X/X/X	X/X/X	X/✓/X	✓/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	✓/✓/✓	X/✓/X	✓/✓/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X
Entrecruzamiento: Ciclos/Tiempo (min)	1/5	3/10	5/15	1/10	1/10	1/20	1/10	2/14,5	5/5	1/10	1/10	1/10	5/12	110
Detención: Ciclos/Tiempo (min)	1/5	1/5	1/3	1/5	1/5	1/5	1/5	1/2	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5

Resultados y discusión

Formaldehido (%) / glicina (mM)	1/125	1/125	1/125	3/125	1/100	1/200	1/125	1/125	1/84	1/135	3/167	1/125	0,75-1/125	1/125	
Medio de limpieza final	Agua	Agua	Tampón	Agua	Agua	Tampón	Agua	Tampón	Agua	Agua	Agua	Agua	Tampón	Agua	
Machacado prealmacenamiento	Varía	No	No	No	No	No	No	No	No	-	Sí	Sí	No	No	
Extracción de cromatina															
Resuspensión	Sacarosa/detergente	✓/X	✓/X	✓/✓	✓/X	✓/✓	X/X	✓/X	X/X	✓/X	X/X	✓/X	¿?	X/X	¿?
	PMSF/BME/Pls	✓/✓/✓	✓/✓/✓	X/✓/✓	X/✓/✓	X/X/X	X/X/X	✓/✓/✓	✓/✓/✓	✓/✓/✓	X/X/X	✓/✓/✓	X/X/X	X/✓/✓	X/X/X
	Densidad (g/mL)	0,10	0,08	0,24	0,07	0,16	0,12	0,05	0,04	0,14	1,14	0,17	3,96	0,13	0,05
Filtración	Miracloth	Miracloth	Miracloth	Miracloth	Cheese cloth	Miracloth	,	Malla	Miracloth	Nylon	Miracloth	Miracloth	Miracloth	Miracloth	
Incubación a 4 °C	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No	
Centrifugación 1	Tiempo (min)/velocidad (RCFs)	20/2880	20/3000		20/2880		15/3000	20/1550	20/1000	10/1800	20/1880	20/2880		10/1000	20/1900
	Densidad (g/mL)	3,00	0,17		2,00		1,50	1,50	0,16	2,50	0,40	5,00		1,00	1,00
Centrifugación 2	Sacarosa/detergente	✓/✓	✓/✓		✓/✓		✓/✓	✓/✓	X/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓		X/✓	¿?
	PMSF/BME/Pls	✓/✓/✓	✓/✓/✓		X/✓/✓		X/✓/✓	✓/✓/✓	X/✓/✓	✓/✓/✓	X/✓/✓	✓/✓/✓		X/✓/✓	X/X/X
	Tiempo (min)/velocidad (RCFs)	10/12000	10/12000		10/12000		15/20000	10/16000	20/1000	10/16000	20/2100	10/1200		5/2000	10/13680
	Densidad (g/mL)	10,00	1,11		6,67		3,00	5,00	0,16	2,50	1,00	16,67		1,00	3,33
Centrifugación extra	No	No	No	No	No	No	No	No	Sí	Sí	No	No	No	No	

Resultados y discusión

Centrifugación 4		Tiempo (min)/velocidad (RCFs)	60/16000	60/16000	5/1000	60/16000	20/11000	15/3000	10/16000	10/1000	60/16000	10/12000	60/16000	1/3000	5/2000	4/18620		
		Colchón (X)	4,5	1		5			1		1	5	5				2	
		EDTA/SDS	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	¿?	✓/✓	¿?
		BME/PIs	✓/✓	✓/✓	X/X	X/✓	✓/✓	✓/✓	X/✓	✓/✓	✓/✓	X/X	✓/✓	X/✓	✓/✓		X/X	
		Densidad (g/mL)	6,67	1,11	0,67	6,67	2,00	6,00	5,00	0,80	14,29	8,00	15,63	3,96	1,00	2,00		
Sonicación																		
Sonicador		Diagenode Bioruptor ultrasonic bath	Diagenode M-50050	Fisher Dismembrator	Diagenode Bioruptor ultrasonic bath	Fisher Dismembrator	Diagenode Bioruptor ultrasonic bath				Branson S-250D				Branson S-450A	Branson 450		
Tiempo activa/inactiva (s)		30/30	30/30	10/50	30/30	15/60	15/30	10/45	15/45	10/60	10/0	15/30	30/30	6/0	15/60			
Intensidad		Alta	Media		Alta	6	Alta	Alta	Máxima	10%	15%	3 µm	40%	O3 Cont	20%			
Número de ciclos		2	2	5	1	5	20	2	3	12	5		4	8	5			
Rango de tamaños (bp)		100-1500	200-1000	200-1000	400	200-1000	400	200-2000	200-1200	200-2000	200-1000	500-1000	100-600	200-1000	200-1000			
Centrifugación tiempo/velocidad (min/RCFs)		10/16000	10/16000	5/18000	5/16000	10/13800	30/16000	10/16000	10/MAX	10/16000	5/21000	5/16000	5/1200	5/MAX	10/13680			
Inmunoprecipitación																		
Dilución	Cromatina	10,0	10,0	12,0	10,2	10,0	0,0	10,3	1,0	10,0	10,0	6,5	10,0	2,0	2,0			
	Dynabeads	13,00	60,00	1,50	10,00	26,67	25,00		12,50	6,60	12,50	15,00	33,33	50,00	-			

Resultados y discusión

INPUT	Tipo	0	0-A	B	B	0-A	B	B	0-A	0-A	B	B	A	0-A	A
	Volumen	13 µL	40 µL	18 µL	40 µL	50 µL	100 µL	60 µL	120 µL	50 µL	500 µL	55 µL	10 µL	250 µL	10 µL
	Proporción	10,00%	1,67%	2,00%	1,31%	2,50%		1,47%	12,00%	15,15%	10,53%	2,81%	2,00%	12,50%	2,00%
Dynabeads para prelavado / IP (µL)		50/50	80/40	50/50	40/30	50/75	20/20		5/80	50/50	40	40/20	0/15	0/40	
Anticuerpo (µg)		0,5-5	1-4	1-10	1-10	5	2	10-40	1-2	1-10	2	1	1-5	1-2	2-3
Método general		Indirecto	Indirecto	Indirecto	Mixto	Indirecto	Directo	Indirecto	Indirecto	Indirecto	Indirecto	Mixto	Indirecto	Indirecto	Directo
Incubación 1	Tiempo (h)	3	1	2	1	1	3	1	1,5	1	1	1	8	8	1,5
	Tipo	Prelavado	C+A	C+A	A+Plato										
Incubación 2	Tiempo (h)	8	8	8	8	8	3	8	1	8	8	8	1	2	1,5
	Tipo	C+A	C+A	C+A	C+D+A	C+A	D+A	D+(C-A)	C+A	C+A	C+A	C+A	C+D+A	D+(C-A)	D+(C-A)
Incubación 3	Tiempo (h)	2	2	4	-	2	8	-	0,83	2	¿?	-	-	-	-
	Tipo	D+(C-A)	D+(C-A)	D+(C-A)	-	D+(C-A)	C+(B-A)	-	D+(C-A)	D+(C-A)	D+(C-A)	-	-	-	-
Lavados	Tiempo (min)/ciclos	3/8	5/8	5/8	10/4	5/5	¿?/6	1/5	¿?/5	1/6	10/5	1/5	4/3	10/4	2/7

Resultados y discusión

Tipo		Salinos	Salinos	Salinos	Salinos	Salinos	Salinos	Salinos	Incubación	Salinos	Salinos	Salinos	Salinos	Incubación	Especial
Elución	Tiempo (min)/ciclos	15/2	15/2	30/2	480/1	15/2	15/2	15/2	1-4/3	15/2	15/2	15/2	5/1	0,5/3	90/1
	Temperatura (°C)	65	65	65	65	25	100	65	37	65	65	65	75	4	65
	Tipo	SDS	SDS	SDS	SDS	SDS	Chelex 20%	SDS	Ácida	SDS	SDS	SDS	SDS	Ácida	¿?
Desentrecruzamiento															
Tiempo (h)/temperatura (°C)		8/65	8/65	8/65			0,5/60	8/65		8/65		8/65	2/65	8/65	2/65
NaCl/RNasa/ProtK		✓/X/X	✓/✓/✓	✓/X/X	✓/X/X	✓/X/✓	X/✓/✓	✓/X/✓	X/X/✓	✓/✓/✓	✓/✓/✓	✓/X/X	✓/X/✓	✓/✓/✓	¿?/X/✓
Purificación		Kit	Kit	Kit	Kit	F/C/AI	F/C/AI	Kit	Kit	F/C/AI	F/C/AI	Kit	Kit	Kit	Kit

La tabla muestra un desglose resumido de los trece protocolos descritos que han sido más útiles, además del descrito en esta tesis (sombreado en azul, usando la versión de *A. thaliana*). Está verticalmente dividida en 6 apartados: General, Entrecruzamiento, Extracción de cromatina, Sonicación, Inmunoprecipitación y Desentrecruzamiento. En cada uno de ellos se muestran las características más relevantes a la hora de adaptar los protocolos. En el apartado Extracción de cromatina, puede observarse como varios protocolos tienen distintos números de centrifugaciones, incluso una sola. En el apartado de Inmunoprecipitación se aclara el tipo de INPUT extraído (0, A, B o C; ver sección “Detalles sobre los protocolos”), además del método de inmunoprecipitación y en que paso se hace cada incubación (D = dynabeads, A = anticuerpo y C = cromatina). Hay tres protocolos comerciales (Abcam, Zymo y EpiGentek) que se usaron en la comparación, aunque actualmente existen nuevos y más actualizados para ChIP (*Chromatrap ChIP-Seq Kit Pro G*, ref. 500190, *Chromatrap*; *EpiQuik Plant ChIP Kit*, ref. P-2014-48, *EpiGentek*; *EZ-ChIP™*, ref. 17-371, *Merck Millipore*; *Pierce™ Magnetic ChIP Kit*, ref. 26157, *Thermo Fisher Scientific*; *Zymo-Spin ChIP Kit*, ref. D5210, *ZYMO RESEARCH*) o incluso para la extracción de cromatina (*ChromaFlash Plant Chromatin Extraction Kit*, ref. P-2022-050, *EpiGentek*; *EpiSonic 2000 Sonication System*, ref. EQC-2000).

Finalmente, tras una serie de modificaciones, se establecería un protocolo de extracción de cromatina y de ChIP más basado en los trabajos realizados en plantas (Jaskiewicz et al., 2011b, Saleh et al., 2008, Kaufmann et al., 2010).

3.2.1. Primeras modificaciones: purificación y medición del DNA

En las publicaciones más recientes se empleaban kits de extracción de DNA utilizando columnas en vez de la extracción fenólica (tabla 20), siendo habitual que no se realizasen digestiones enzimáticas de la cromatina (destinadas a eliminar las proteínas y el RNA con proteasa K y RNasa, respectivamente). Por otro lado, se observó que la concentración de la muestra y, en general los valores con los que se trabajaba en las inmunoprecipitaciones, se expresaban en μg de cromatina/ μL en lugar de en ODs. Se decidió probar una extracción de DNA con columnas (figura 40).

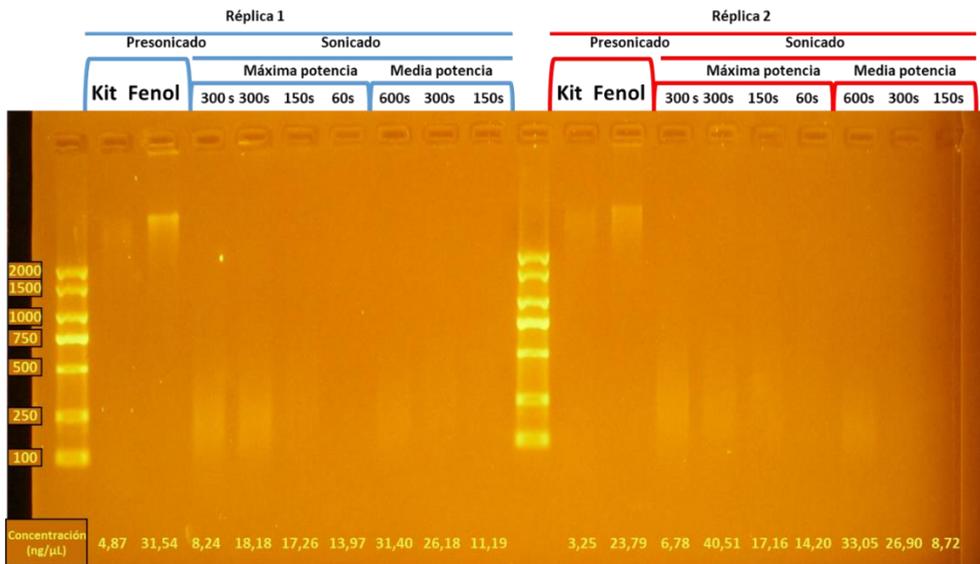


Figura 40 Electroforesis con varias condiciones de sonicación y de extracción de DNA en *A. thaliana*

Bajo las líneas azules, la réplica 1 del experimento y, de izquierda a derecha, el DNA antes de ser sonicado extraído con kit de columnas y con fenol. A continuación, sonicaciones a distintas potencias y tiempos, la primera (300 s) hecha con kit y el resto con fenol. Bajo las líneas rojas, el mismo patrón, pero con la réplica 2. Abajo, se muestran las concentraciones de las muestras cargadas.

Resultados y discusión

Tras extraer el DNA, se cuantificó en el NanoDrop y se comprobó que la cantidad obtenida era significativamente menor a la estimada tras la extracción con fenol, aunque la apariencia de las muestras en las electroforesis era muy similar (figura 40). Esto indicaba que en la extracción con fenol se sobreestimaba la cantidad de DNA. Sin embargo, no mejoró la ratio A_{260}/A_{280} que era muy inferior a 2, por lo que podía haber otras fuentes de contaminación ajenas al método de extracción de DNA.

En ambos métodos de extracción también se obtenía una gran absorbancia a 230 nm, lo cual se podía corresponder con la presencia de compuestos orgánicos abundantes en vegetales como fenolatos, alcoholes y carbohidratos. Esto podría indicar que la purificación de la cromatina era poco eficiente en ciertos pasos, lo cual podría ser una de las causas de los resultados negativos obtenidos en la qPCR. Paralelamente, se hicieron extracciones con y sin digestiones enzimáticas, viéndose que estas no eran necesarias en la purificación con columnas, mientras que, en la extracción fenólica, de no realizarse, se obtenía una aparente mayor cantidad, lo que justificaría (al menos para poder medir más correctamente) la realización de dichas reacciones de utilizar este tipo de extracción.

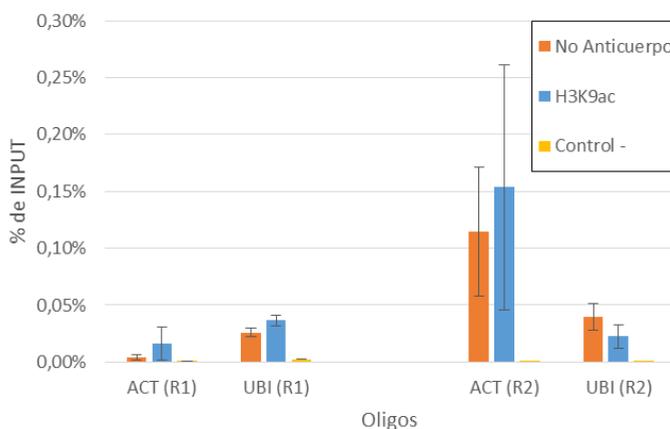


Figura 41 Ejemplo de los primeros resultados obtenidos tras la ChIPqPCR

A la izquierda, réplica 1 y, a la derecha, réplica 2 del experimento realizado en *A. thaliana*. Se usaron genes constitutivos, estudiando una sola zona en cada uno y se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti H3K9ac. En el eje de las "Y", se muestra el porcentaje de recuperación con respecto al INPUT y, en el de las "X", los genes y muestras examinadas. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3).

Tras realizar este cambio en el método de extracción de DNA, y en vista de lo descrito en la bibliografía, se decidió validar los fragmentos obtenidos tras la sonicación utilizando DNA en lugar de cromatina (figura 42). Al realizar una comprobación, analizando mediante cromatina y DNA la misma muestra, se comprobó que el análisis electroforético de la cromatina llevaba a sobreestimar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

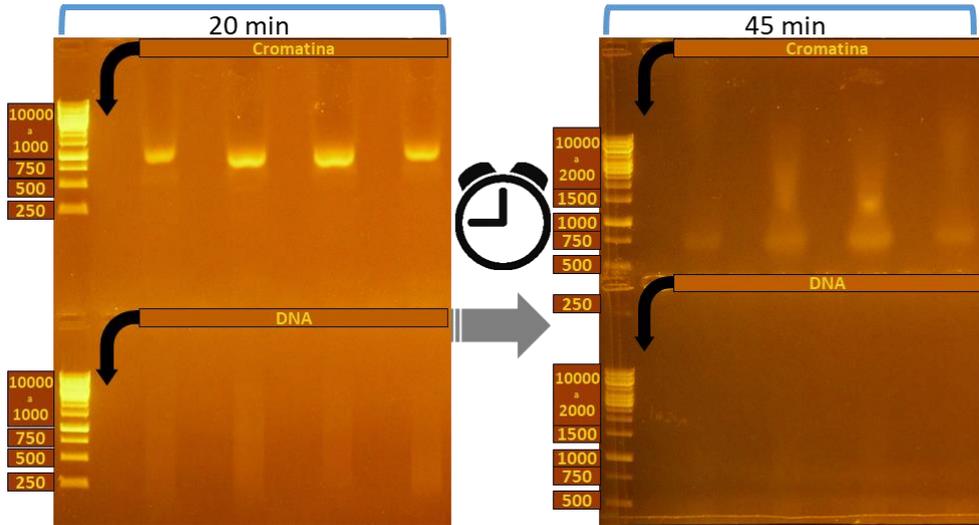


Figura 42 Comparación entre cromatina y DNA de la misma muestra en una electroforesis

A la izquierda, arriba, cuatro alícuotas de cromatina tras correr durante 20 min, en la parte de bajo DNA extraído de las mismas alícuotas. La cromatina se centra con intensidad en las 100 bp, mientras que el DNA forma una estela que va desde menos de 250 bp hasta casi 10000 bp. A la derecha, la misma electroforesis tras transcurrir 25 min más, el DNA se difumina hasta ser casi indistinguible, mientras que la cromatina parece desdoblarse migrando hacia el ánodo y hacia el cátodo.

3.2.2. Segundas modificaciones: homogenización, filtrado, ChIP y anticuerpos

Una vez mejorada la extracción y cuantificación del DNA, se optó por realizar modificaciones en varias etapas de los protocolos de extracción de cromatina y ChIP y así, cubrir ambos frentes: la obtención de una cromatina más limpia y la mejora de su inmunoprecipitación.

Resultados y discusión

3.2.2.1. Homogenización y filtrado

Estas dos etapas son clave en todo el proceso de extracción de la cromatina, ya que determinan su solubilidad y pureza. Tras revisar los protocolos elegidos (tabla 20), se estableció en 2 g la cantidad de muestra a extraer y se eliminaron los pasos de homogenización con potter y el filtrado con malla de 125 μm , que se sustituyeron por una filtración con Miracloth de 22 a 25 μm de anchura de poro, inmediatamente después de resuspender la muestra en el primer tampón. Esta filtración resultó mucho más lenta y la cantidad de residuo que quedaba en el filtro fue también mucho mayor, lo que permitió obtener una muestra mucho más limpia, que se pudo resuspender en menor cantidad de tampón, pasando de 7,5 mL a tan solo 1 mL. Es decir, en el primer caso la densidad teórica era de 0,2 g/mL y en el segundo de 2 g/mL y aun así fue mucho más fácil de resuspender usando tampones similares.

3.2.2.2. Método de ChIP y anticuerpos

La proteína G es utilizada en la naturaleza por bacterias del grupo C y G del género de los estreptococos como método defensivo por su capacidad para unir anticuerpos libres y así evitar que estos las alcancen (Sjobering et al., 1991). Esto las hace útiles en los protocolos de aislamiento de anticuerpos (y sus moléculas diana), donde también es utilizada la proteína A de *Staphylococcus aureus*, que tiene funciones similares (Goodyear and Silverman, 2003).

Esta parte del procedimiento suele presentar menos variantes entre los protocolos descritos, seguramente porque la cromatina ya ha sido purificada. De hecho, actualmente ya existen kits comerciales para realizarlo

que recomiendan ciertos protocolos de extracción (tabla 20). La mayoría de protocolos usan como medio, para la separación de la cromatina unida a los anticuerpos, unas perlas microscópicas cubiertas normalmente con proteína G. Las perlas se unen, por tanto, de manera indirecta con la proteína de interés y, posteriormente, se aíslan del resto de la muestra mediante centrifugación (perlas

de agarosa) o, como en el protocolo utilizado, mediante magnetismo (perlas magnéticas o *dynabeads*).

En este protocolo se utilizaron *dynabeads* de Invitrogen, por lo que se estudiaron varias de sus propiedades para corroborar que no hubiera problemas relacionados con ellas:

Bloqueo

Según varios manuales, este paso es innecesario con este producto y, en su lugar, se recomienda utilizar durante todo el proceso tampones con detergentes no iónicos como Tween 20 o Triton X-100, que evitan las posibles uniones inespecíficas a la superficie de las *dynabeads*.

Recogida

Para precipitar todas las *dynabeads* de un tubo de 1,5 o 2 mL basta con utilizar uno de sus imanes de neodimio durante unos segundos, sin necesidad de centrifugaciones previas.

Método de CHIP

En este apartado, las instrucciones presentan dos posibles aproximaciones, sugiriendo cambiarlas en caso de tener problemas:

- Método directo → Se incuba en primer lugar el anticuerpo con las *dynabeads* y, a continuación, el complejo formado se incuba con la muestra de cromatina (figura 38).
- Método indirecto → Se incuba en primer lugar el anticuerpo con la muestra de cromatina y, a continuación, el complejo formado se incuba con las *dynabeads* (figura 35).
 - Método mixto → Los tres componentes se incuban simultáneamente. Si bien esta opción no aparece en esta bibliografía, sí se da en algunos protocolos consultados (tabla 20).

Anticuerpo

Tabla 21 Características de las *dynabeads* y los anticuerpos

Capacidad de unión				
Reactivo	Anticuerpo		Antígeno (indirecto en <i>dynabeads</i>)	
	Esquema	Real	Esquema	Real
Dynabeads	4 anticuerpos	17-20 ng AC/ μ g <i>beads</i>	8 antígenos	50-500 ng DNA/ μ g <i>beads</i>
Anticuerpo			2 antígenos	2,5-25 μ g DNA/ μ g AC

En el eje vertical se muestra el reactivo que se está describiendo, mientras que en el eje horizontal se observa la capacidad de unión de los mismos, con respecto al anticuerpo (izquierda) y al antígeno (derecha). En cada caso, se representa los valores relativos al esquema ilustrado en la siguiente figura (figura 43) y el rango de valores reales, facilitados por la bibliografía y/o el distribuidor.

Las *dynabeads* tienen una capacidad de unión de 2,5 a 25 ng de anticuerpo por μ g de *dynabeads* (tabla 21). Esto quiere decir que, teniendo en cuenta que la concentración de las *dynabeads* es de 15 μ g/ μ L y que en un experimento estándar se utilizan 50 μ L, hay 750 μ g de *dynabeads* disponibles para unir anticuerpo, es decir, que puede unirse en un rango máximo que va desde 12,5 μ g hasta 15 μ g.

Teniendo en consideración toda esta información, se eliminó el paso de bloqueo y se modificaron los tampones, añadiéndoles Triton X-100 en aquellas incubaciones en las que la muestra era susceptible de establecer uniones inespecíficas. Además, se eliminaron las centrifugaciones previas a la recogida magnética, utilizando breves *spines* para recoger bien el volumen disperso por los tubos. Por otro lado, se cambió de método, utilizando en adelante el directo, es decir, incubando en primer lugar la cromatina con el anticuerpo.

Finalmente, con respecto a los anticuerpos, hubo que estudiar paralelamente las características de estos, tanto desde el punto de vista bibliográfico en trabajos similares, como sus características según el producto y la casa comercial a la que perteneciera.

Los protocolos suelen recomendar el uso de 1 a 10 μ g de anticuerpo por cada inmunoprecipitación (tabla 20) y 25 μ g de cromatina. Por lo tanto, según estas referencias la capacidad de unión de los anticuerpos a la cromatina sería de 2,5 a 25 μ g de cromatina por cada μ g de anticuerpo. Por consiguiente, en cada

inmunoprecipitación se podrían unir como máximo 25 μg de cromatina hasta saturar el anticuerpo y las *dynabeads* se estarían utilizando a menos de un 10 % de su capacidad (tabla 21).

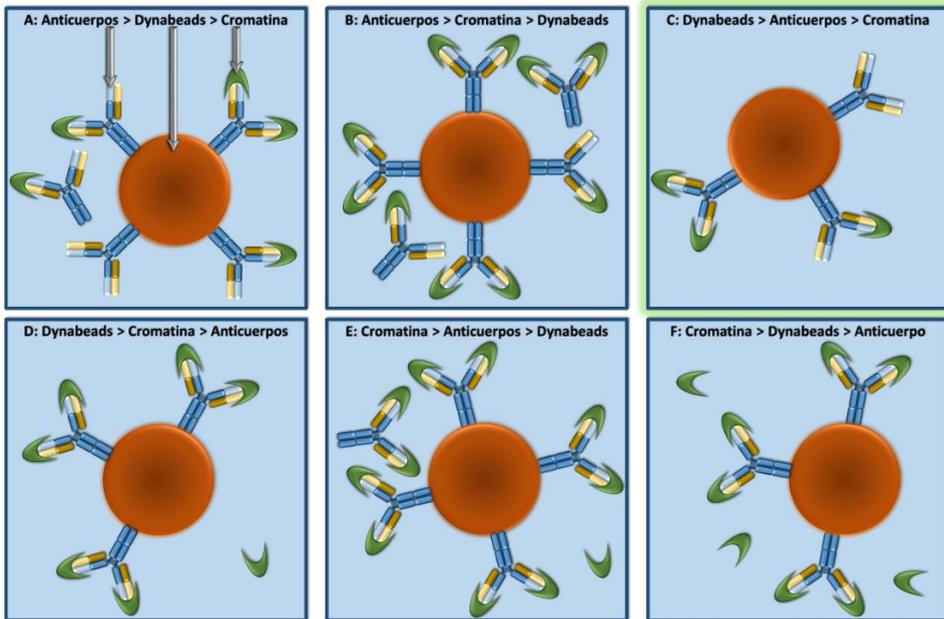


Figura 43 Posibles escenarios de combinación *dynabeads*-anticuerpo-cromatina

- (A) **Anticuerpo > *Dynabeads* > Cromatina:** Toda la cromatina quedará unida a los anticuerpos, habiendo poblaciones de estos con y sin cromatina. A continuación, ambas poblaciones se unirán estocásticamente a las *dynabeads* hasta saturarlas; por lo tanto, las diferencias entre ambas se verán sesgadas por el azar de esta unión. El nivel de señal será inferior al esperado, por la cromatina perdida en forma de complejos anticuerpo-cromatina libres y, consecuentemente, el % de INPUT será bajo.
- (B) **Anticuerpo > Cromatina > *Dynabeads*:** Sucederá lo mismo que en el anterior caso, en esta ocasión debido a la mayor cantidad de cromatina, el nivel de señal será superior o más elevado (no habrá tantos anticuerpos sin cromatina compitiendo por las *dynabeads* con los unidos) y se observará un % de INPUT todavía más bajo.
- (C) ***Dynabeads* > Anticuerpo > Cromatina:** (resaltada en verde) Toda la cromatina se unirá al exceso de anticuerpos que, a su vez, se unirán al exceso de *dynabeads*. La diferencia podrá verse sin interferencias del azar, en este paso, debido a no saturar ni anticuerpos ni *dynabeads*. Es la combinación idónea y el % de INPUT dependerá exclusivamente de la abundancia del antígeno.
- (D) ***Dynabeads* > Cromatina > Anticuerpo:** La cromatina se unirá a los anticuerpos hasta saturarlos y, a continuación, todos ellos se unirán al exceso de *dynabeads*. No se observarán diferencias entre condiciones, debido a la saturación de los anticuerpos, y quedará cromatina libre. La señal será algo menor de lo esperado y el % de INPUT, algo bajo.
- (E) **Cromatina > Anticuerpo > *Dynabeads*:** Al igual que en el caso anterior, la cromatina se unirá a los anticuerpos hasta saturarlos, pero debido al exceso relativo de estos, las *dynabeads* también quedarán saturadas por los anticuerpos. Quedarán complejos anticuerpo-cromatina libres, así como cromatina sola. Por lo tanto, si bien se obtendrá una intensa señal, no se verán en absoluto diferencias entre condiciones. El % de INPUT será muy bajo por la gran cantidad de cromatina que no se habrá podido capturar.
- (F) **Cromatina > *Dynabeads* > Anticuerpo:** Sucederá lo mismo que en el caso D, pero la cantidad de cromatina no capturada por anticuerpos será inferior por la mayor falta de estos. Consecuentemente, la señal y el % de INPUT serán menores.

Resultados y discusión

Por lo tanto, la cantidad de *dynabeads* no debería ser en ningún caso un factor limitante, sin embargo, se contemplaron las posibles combinaciones de cantidades de estas en combinación con los anticuerpos y la cromatina, así como sus resultados teóricos, para descartar que el problema residiera en este aspecto del protocolo (figura 43).

Tabla 22 Combinaciones de cantidades anticuerpo y cromatina y, sus diferencias

		Diagnóstico			
		Cromatina			
Anticuerpo	Dato	↑↑	↑	✓	↓
↑	Combinación	E	B	A1	A2
	Diferencia	Muy sesgada	Sesgada	Sesgada	Sesgada
	% de INPUT	Mínimo	Normal	Alto	Máximo
	Intensidad	Máxima	Muy alta	Baja	Mínima
✓	Combinación	F1	F2	C1	C2
	Diferencia	Indetectable	Indetectable	Detectable	Detectable
	% de INPUT	Muy Bajo	Bajo	Normal	Muy alto
	Intensidad	Alta	Alta	Normal	Muy baja
↓	Combinación	F3	F4	D	C3
	Diferencia	Indetectable	Indetectable	Sesgada	Detectable
	% de INPUT	Mínimo	Muy bajo	Alto	Muy alto
	Intensidad	Baja	Baja	Baja	Muy Baja

En el eje vertical de izquierda a derecha, se muestran la cantidad relativa de anticuerpo utilizado y, el dato que se describe en la tabla. Puede verse, en el eje horizontal, la cantidad relativa de cromatina utilizada. ↑↑ = mucho exceso, ↑ = exceso, ✓ = cantidad óptima y ↓ = cantidad subóptima (defecto). Las letras de la "A" a la "F", en el dato de la combinación, hacen referencia a los nombres dados anteriormente a dichas combinaciones (figura 43). El dato de la intensidad se refiere a la señal de qPCR que se obtendría (en el caso de la baja o mínima se tendrían problemas de replicabilidad o no detección). En todos los casos se utiliza el mismo código de color en gradiente, de rojo, subietivamente para el peor caso y verde intenso para el mejor.

Cabe destacar, sin embargo, en este ámbito, que el concepto de μg de cromatina, mencionado comúnmente en distintos trabajos, es confuso. Realmente en la bibliografía no se aclara si se refiere realmente al conjunto de masa de DNA y proteínas (descartando seguramente el RNA), a las proteínas aisladas, que es a lo que realmente se unen los anticuerpos, o al DNA potencialmente purificable que contiene. Esta última opción parece la más probable, pues en la mayoría de los protocolos, aunque se refieran a concentración o masa de cromatina, se deduce que la han cuantificado en base al DNA purificado (sección 3.2.1.). De ser así,

cuando se usa el término “cromatina” al hablarse de la cantidad de DNA, seguramente se haga por mera conveniencia. Pero ciertamente los anticuerpos usados no unen DNA sino histonas y, en los casos en los que se detalla su concentración y capacidad de unión, se refieren a la misma en esos términos.

Por otro lado, incluso dentro de la combinación ideal (figura 43 C), puede haber diferencias dependiendo de la ratio entre cromatina y anticuerpo (tabla 22).

A la luz de toda esta información se decidió, además de los cambios mencionados, utilizar el anticuerpo Anti-H3, por tener más posibilidades de unir cromatina, al ser su diana extremadamente abundante, siendo usado como un control positivo. También se probó el anticuerpo contra la RNAPII (*Pol II (N-20)*, ref. sc-899, Santa Cruz Biotechnology) utilizado en trabajos de inmunoprecipitación con *P. vulgaris* (Gagete et al., 2011). En ambos casos, se ajustó la concentración para intentar lograr la mejor combinación (figura 43 C, tabla 22 C1).

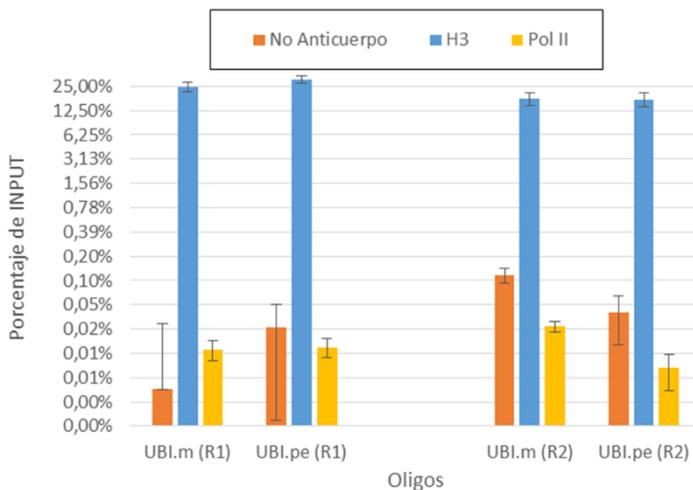


Figura 44 Resultados de la inmunoprecipitación de H3 y RNAPII

A la izquierda, réplica 1 y, a la derecha, réplica 2 del experimento realizado en *A. thaliana*. Se usó un gen constitutivo, estudiando dos zonas (cuerpo del gen y zona 3') y se inmunoprecipitó con anticuerpos anti H3 y RNAPII. En el eje de las “Y”, se muestra el porcentaje de recuperación con respecto al INPUT en escala logarítmica en base 2 y, en el de las “X”, los genes y muestras examinadas. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3).

Resultados y discusión

En este experimento se utilizaron muestras CTL únicamente y se probaron dos concentraciones de los anticuerpos contra H3 y RNAPII, previamente utilizados en muestras de plantas (Gagete et al., 2011). Se comprobó que Anti-H3 inmunoprecipitaba cromatina en ambas especies, mientras que Anti-RNAPII no funcionó, obteniéndose resultados similares para las muestras y el control negativo (figura 44). Tras analizar su región diana (extremo N terminal de la proteína), se determinó que la razón podía ser que no fuera el más adecuado para *A. thaliana* y *S. lycopersicum*.

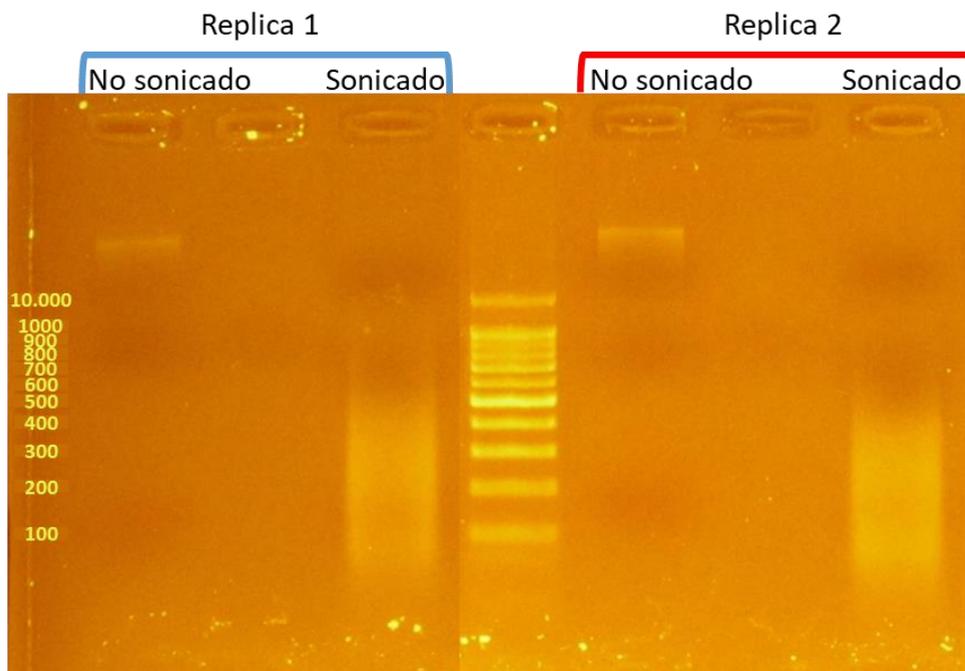


Figura 45 Sonicación tras las modificaciones en la homogenización y filtrado

Bajo las líneas azules, la réplica 1 del experimento y, de izquierda a derecha, el DNA antes de ser sonicado y después. Bajo las líneas rojas el mismo patrón, pero con la réplica 2.

Cabe destacar que, tras las modificaciones realizadas en el protocolo de extracción de cromatina, hubo que reajustar las condiciones de sonicación previamente establecidas, ya que daban lugar a fragmentos de tamaños por debajo de los 500 bp (figura 45) que son los idóneos para la detección de modificaciones de histonas. Se bajaron los ciclos de 6 a 2, manteniendo el resto de las otras condiciones iguales.

3.2.3. Terceras modificaciones: patosistema y distintos anticuerpos

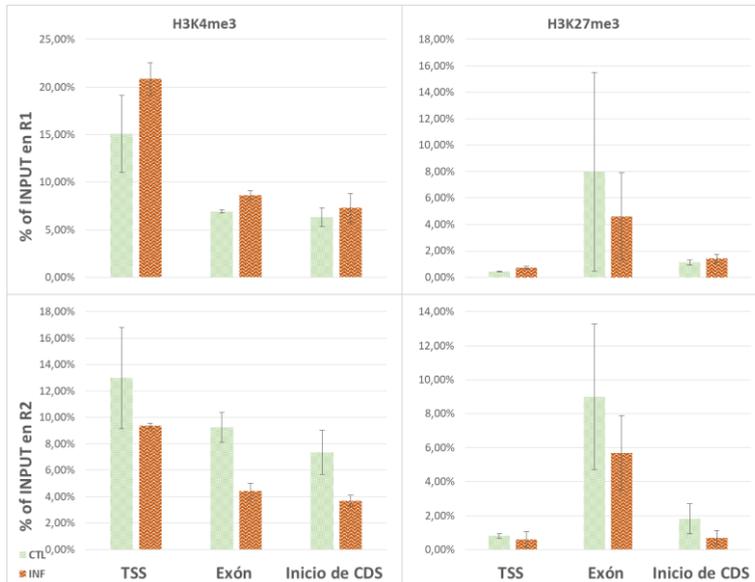


Figura 46 Enrichimiento de H3K4me3 y H3K27me3 en PR1

En el eje de las "Y", se muestra el porcentaje de recuperación con respecto al INPUT y en el de las "X", los genes y muestras examinadas. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3).

Una vez obtenida una inmunoprecipitación exitosa con anti-H3 y al observar diferencias entre las muestras inmunoprecipitadas y las que no llevaban anticuerpo, se realizaron pruebas con anticuerpos dirigidos contra modificaciones de interés como H3K4me3, relacionada con activación, (Li et al., 2007) y H3K27me3, con represión (Espinás et al., 2016).

Para ello se utilizaron muestras procedentes de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea* mediante inoculación por gota y se escogió el gen *PR1*, dado que se había analizado previamente en plantas de *A. thaliana* sometidas a otros estreses (tabla 2). En las condiciones de infección utilizadas *PR1* mostraba un alto nivel de inducción, estimado mediante RTqPCR (figura 69).

Los resultados obtenidos indicaron que, aunque era posible diferenciar las muestras con y sin anticuerpos, no se observaban diferencias claras entre CTL e INF

Resultados y discusión

en las réplicas técnicas, ni en las réplicas biológicas utilizadas, viéndose en los perfiles de enriquecimiento (figura 46).

Se planteó la posibilidad de que el nivel de infección de las plantas utilizadas no fuera suficiente para detectar diferencias a nivel de cromatina. En trabajos previos en los que se analizaba la cromatina en plantas sometidas a condiciones de estrés, se comprobó que se utilizaban condiciones muy extremas para poder visualizar las diferencias en las marcas de histonas (Jaskiewicz et al., 2011a). Esto llevó a modificar el protocolo de inoculación con *B. cinerea* para conseguir una infección más generalizada y homogénea en toda la hoja. Una de las dificultades que plantea la infección con un necrótrofo como *B. cinerea*, es la rápida producción de necrosis y su posible interferencia en los experimentos de ChIP.

En el siguiente apartado, se describen los cambios y adaptaciones llevados a cabo en el protocolo de inoculación del hongo y los resultados obtenidos.

3.2.3.1. Homogeneidad de las plantas

A. thaliana

En este caso, al cultivarse las plantas en cámaras en el laboratorio, se pudo reducir con bastante éxito la heterogeneidad de las plantas en el momento de su infección. Esta heterogeneidad deriva de diferencias de crecimiento azarosas y de la diferencia de luz recibida dependiendo de la posición que ocupen con respecto a los tubos fluorescentes. Este aspecto se controló gracias a cinco sistemas establecidos de manejo de las plantas (sección 2.1.2.):

1. Elección de plántulas (individuos de pocos días que aún no cuentan con hojas secundarias) que presentaban un aspecto óptimo y similar entre ellas.
2. Sistema dinámico de su distribución en el propagador y, a su vez, de éste en la cámara de crecimiento (figura 30).

3. Sustitución, sobre todo en las primeras semanas, de plantas con crecimiento retardado (figura 31).
4. Separación de plantas para el estudio de distintas condiciones antes de que fueran demasiado grandes, evitando así lesiones que pudieran activar defensas por daño (tipo PTI basada en DAMP (sección 1.4.3.)), induciendo genes de la ruta del JA y ABA, principalmente.
5. Elección de plantas y hojas óptimas para la infección en caso de que los anteriores mecanismos no hubiera resultados satisfactorios. Durante el muestreo solo se seleccionaron hojas de aspecto similar y con un nivel parecido de infección.

S. lycopersicum

En este caso, al ser las plantas cultivadas en invernadero, antes de ser aclimatadas en las cámaras para su posterior inoculación, se seleccionaron individuos con características similares para realizar cada experimento, descartando aquellos poco desarrollados o demasiado grandes (por limitaciones en los espacios de la cámara).

3.2.3.2. Esporulación de hongo

Para conseguir que *B. cinerea* (B05.10) creciera y esporulara en las placas de PDA de forma homogénea, en un tiempo concreto y en buena cantidad, se implementó un protocolo descrito en la bibliografía que aprovecha la sensibilidad a la luz de esta cepa en su ciclo vital, siendo inducida la esporulación por luz UVA (Schumacher, 2017). Para ello se cultivaron las placas en una incubadora que mantuvo la temperatura constante y en oscuridad, irradiándolas cíclicamente (sección 2.1.1.). Gracias a esto, se logró obtener placas del hongo con una esporulación abundante y homogénea en aproximadamente siete días (figura 21 A y B).

Resultados y discusión

3.2.3.3. Modo de infección: inoculación por espray



Figura 47 Comparación de infección por gota y por espray

(A) Método de inoculación típicamente usado para el estudio de la infección por *B. cinerea* e (B) inoculación mediante espray. De izquierda a derecha en ambos casos, inoculación y, resultados de la misma.

Tal como se describe en materiales y métodos, el procedimiento habitual para realizar la inoculación de las plantas consiste en aplicar 5 μL de una suspensión de conidiosporas en medio Gamborg (*GAMBORG B5 MEDIUM*, ref. G0209.0001, Duchefa Biochemie) suplementado con vitaminas (*Gamborg's Vitamin Solution 1000 x*, ref. G1019, SIGMA) al 50% (v/v) (Finiti et al., 2014). En *A. thaliana* se aplican dos gotas por hoja, en cuatro hojas por planta y en *S. lycopersicum* dos gotas por foliolo en cinco foliolos por hoja, en dos hojas por planta (figura 36 y 47 A). Estos inóculos generan lesiones necróticas claramente visibles a partir de las 48 h tras la inoculación, cuyas dimensiones pueden ser fácilmente medidas a las 72 h. Este procedimiento conlleva que se obtenga una cantidad limitada de lesiones y, por tanto, de tejido afectado, lo que puede dificultar la detección de cambios epigenéticos. Dado que las células de mayor interés son aquellas que circunscriben la lesión, es posible aumentar el número de éstas simplemente dejando pasar más tiempo para que la lesión crezca, pero esto conlleva un incremento considerable de

las zonas necróticas que pueden interferir con los siguientes pasos del procedimiento. Además, los cambios en la cromatina probablemente difieran entre células que están en la zona de inoculación, en la región circundante o en zonas alejadas de la misma (figura 7).

Por ello se puso a punto un protocolo de inoculación que fuera generalizado y homogéneo en las hojas, permitiendo obtener una gran cantidad de zonas infectadas, pero con lesiones reducidas. Además, se vio en la bibliografía que en estudios realizados previamente en plantas sometidas a otros tipos de estreses, para detectar las marcas epigenéticas también fueron sometidas a estreses más severos que para otros estudios (Jaskiewicz et al., 2011a). Por este motivo, en base a protocolos previamente descritos (Lai et al., 2014), se recurrió a la inoculación por spray, que permite cubrir las hojas con unas ciento cincuenta gotas, con lo que se consigue que la mayor parte del tejido esté en contacto con el hongo, induciendo una respuesta masiva que puede facilitar la detección de las marcas epigenéticas presentes en los genes estudiados a un tiempo corto tras la inoculación (24 h).



Figura 48 Infección por spray control y con medio Gamborg

(A) Plantas de *A. thaliana* inoculadas con conidiosporas diluidas en agua, mostrándose asintomáticas y (B) por Gamborg 50 % con síntomas leves.

Para intentar respetar lo más posible las condiciones originales de inoculación, se aplicó la suspensión de conidiosporas en medio Gamborg a la concentración habitual (50 % (v/v)) mediante spray, utilizando agua, como control. En estas condiciones la infección no resultó homogénea, produciendo además pocas

Resultados y discusión

necrosis, algunas de las cuales eran excesivamente grandes. Debido a esto, se probaron varias alternativas, que incluyeron agua (a modo de control negativo), medio Gamborg 100%, medio YPD (CALDO YPD, ref. 1547 Laboratorio Conda), medio LB (CALDO LB, ref. 1231, Laboratorio Conda) y zumo de uva.



Figura 49 Infección por spray con diversos medios

Plantas de *A. thaliana* inoculadas con (A) Gamborg 50 %, (B) medio YPD, (C) medio LB y (D) zumo de uva.

La inoculación con agua no mostró síntomas, mientras que con los medios Gamborg 100 %, YPD y LB, se vio una infección similar a la observada con Gamborg 50 % (v/v). Sin embargo, la infección realizada utilizando zumo de uva produjo efectos devastadores en la planta, en la que solo las hojas más jóvenes sobrevivieron. Comprobamos que, en un periodo más corto de incubación tras la infección, la inoculación en zumo producía pequeñas necrosis bien distribuidas en todas las hojas.

Por todo ello, se estableció el zumo de uva como medio de infección, diluyéndolo al 25 % (v/v) para ralentizar el progreso de la enfermedad, manteniendo los numerosos puntos de necrosis que proporcionaba. Posteriormente se probó este

método en plantas de *S. lycopersicum* obteniendo muy buenos resultados, probablemente por poseer esta planta hojas con tricomas que favorecen la estabilidad de las gotas del medio. Aunque como en el caso de la infección inoculación por gota, la infección avanzó mucho más deprisa en este cultivo, por lo que hubo que reducir la concentración de conidiosporas a la mitad.

3.2.3.4. Cuantificación del grado de infección

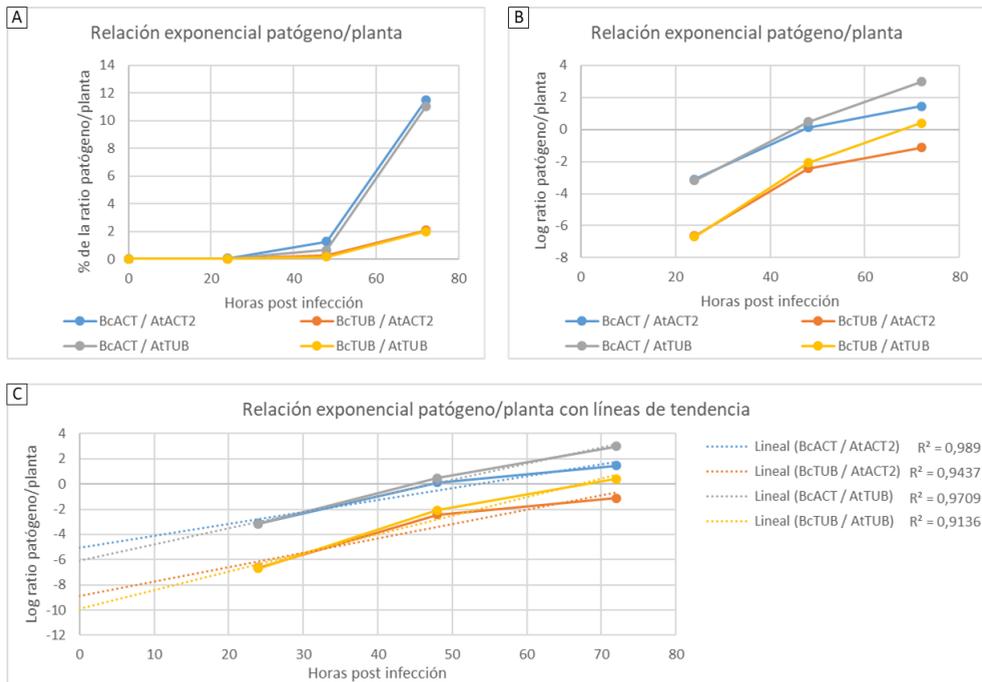


Figura 50 Rectas patrón *B. cinerea*/*A. thaliana*

(A) Cuatro combinaciones de oligos constitutivos de *A. thaliana* (*AtACT2* y *AtTUB*), con oligos constitutivos de *B. cinerea* (*BcACT* y *BcTUB*) mostrando, en el eje de las "X", el tiempo de infección y, en el de las "Y", su ratio en escala real, (B) logarítmica en base 2 y (C) logarítmica en base 2, mostrando además línea de tendencia y R^2 .

Con este procedimiento de infección por espray las plantas apenas presentaban síntomas a la hora del muestreo, que se realizaba a 24 hpi, más allá de un muy ligero oscurecimiento del color verde normal de la hoja, acompañado de cierto olor y unas pequeñas manchas en la parte trasera., por lo que no era posible medir el grado de

Resultados y discusión

infección mediante el diámetro de las necrosis. Por ello se optó por utilizar un método descrito en la bibliografía (Gachon and Saindrenan, 2004), consistente en determinar la masa del patógeno cuantificando genes constitutivos del hongo y de la planta. Para ello se construyó una recta patrón utilizando RNA extraído de experimentos de cinéticas de infección (0, 24, 48 y 72 h), para determinar la combinación de genes constitutivos del hongo y de la planta que más se ajustaba a la escala temporal.

En base a los resultados obtenidos, se eligieron el gen “actina” (*ACT*) y “alfa tubulina” (*ATUB*) en *B. cinerea* y los genes “tubulina” (*TUB*) y “factor de elongación 1 alfa” (*EF1 α*) en *A. thaliana* y *S. lycopersicum*, respectivamente. También se usaron estos genes con la medición del DNA, dando resultados similares en cuanto a diferencias de infección.

Una vez incorporados los cambios en el protocolo, se procedió a realizar una inmunoprecipitación con anti-H3K4me3 en tres réplicas biológicas de *A. thaliana*-*B. cinerea*.

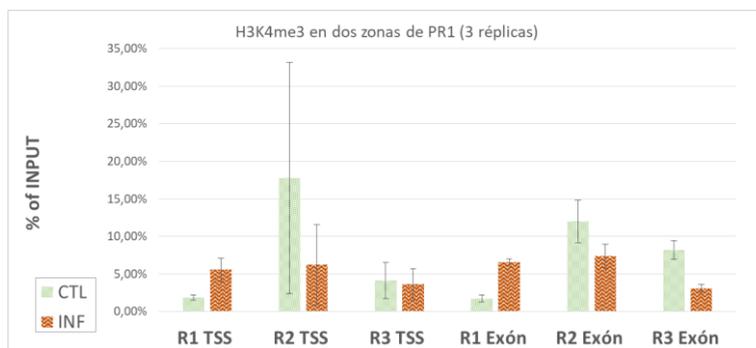


Figura 51 Inmunoprecipitación con H3K4me3

Se observan los resultados, de izquierda a derecha, *PDF1.2* y *PR1* en tres réplicas. En el eje de las “Y”, se muestra el porcentaje de recuperación de H3K364me3 con respecto al INPUT y, en el de las “X”, los genes y réplicas examinadas.

A pesar de que las modificaciones incorporadas en el protocolo incrementaron la homogeneidad de las muestras obtenidas, los resultados obtenidos tras la

inmunoprecipitación presentaron mucha variabilidad entre réplicas, por lo que se abordaron nuevas modificaciones en esa etapa del protocolo.

3.2.3.5. Anticuerpos a utilizar

Con las mismas muestras utilizadas en el apartado anterior se utilizó otro anticuerpo, en concreto contra la modificación H3K36me3, que se asocia con genes activados, aunque se le ha relacionado también con represión (Wagner and Carpenter, 2012).

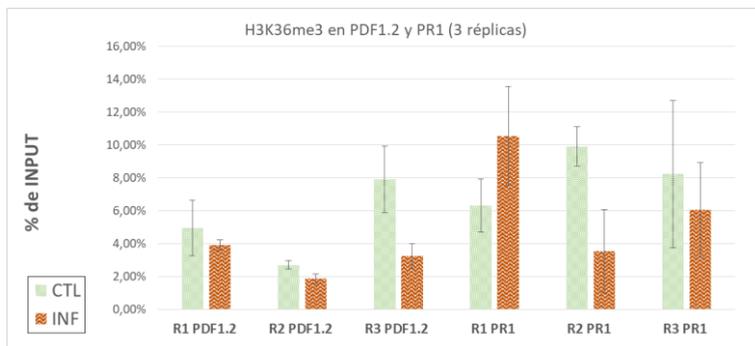


Figura 52 Inmunoprecipitación con H3K36me3

Réplicas 1, 2 y 3 de *A. thaliana* infectada con *B. cinerea*, mediante espray (10^5 conidiosporas/mL) a 48 hpi. Se muestran los resultados de PR1 en dos zonas. En el eje de las "Y", se muestra el porcentaje de recuperación de H3K4me3 con respecto al INPUT y, en el de las "X", las réplicas y zonas examinadas. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3).

Al igual que con Anti-H3K4me3, con Anti-H3K36me3 tampoco se obtuvieron resultados reproducibles en y entre réplicas, por lo que se modificaron otros aspectos del protocolo.

3.2.4. Cuarta modificación: elución ácida de la cromatina

El hecho de obtener reiteradamente resultados que mostraban una inmunoprecipitación claramente distinguible entre las *dynabeads* incubadas con y sin anticuerpo, y, habiendo usado ya distintos anticuerpos sin obtener resultados reproducibles entre las muestras utilizadas, se repasaron los protocolos en busca

Resultados y discusión

de una posible causa. Se detectó que en el paso final del protocolo de inmunoprecipitación, justo antes de realizar la extracción de DNA, se obtenían precipitados blanquecinos de difícil resuspensión, que podrían llevar a la pérdida de DNA.

En ese paso se usa un tampón que contiene SDS y NaHCO_3 y, posteriormente se añade NaCl; quizá alguno de estos compuestos pudiera interferir con la extracción en la columna, por lo que se probó la extracción fenólica y un kit de columnas alternativo (*High Pure PCR Template Preparation Kit, ref. 11796828001, ROCHE*). Además, se comprobó que algunos protocolos utilizaban una incubación en ácido para separar la cromatina de las *dynabeads*, tras la que se recoge la cromatina del sobrenadante y se neutraliza su pH.

Tabla 23 Tampones utilizados en la prueba de elución ácida

Tampones de elución ácida		
Nombre	Acidificación	Neutralización
Compuesto	Concentración	
Ácido cítrico pH 2,5	1000,0 mM	
Tris-HCl pH 8,0		500,0 mM
NaHCO_3	100,0 mM	
NaCl		400 mM
EDTA-NaOH pH 8,0		0,4 mM

Por todo ello, se hicieron una serie de experimentos combinando distintas condiciones para verificar si el SDS u otros compuestos podían estar interfiriendo con la extracción y si esta elución ácida podría solucionarlo, como se indica a continuación:

- Medio de desentrecruzamiento → Se utilizó tampón de elución, tampón de acidificación con o sin tampón de neutralización añadido. Como control negativo se usó H_2O , TE y TE con SDS 1 % (p/v) para determinar la posible interferencia del SDS
- Tipo de extracción de DNA → Se utilizó un Kit de columnas de Thermo (usado en el protocolo final), un kit de columnas de ROCHE (*High Pure PCR Template Preparation Kit, ref. 11796828001, ROCHE*) y la extracción fenólica (sección

3.2.5.1.). En el primer caso existía la opción de añadir isopropanol, que se probó y también se usó en ambos, más volumen del tampón por si hubiera problemas al diluir la muestra.

- Digestión enzimática → Con RNasa (*RNase A solution, ref. A7973, Promega*), con Proteasa K (*Proteinase K, recombinant, PCR Grade; ref. 3115828001; ROCHE*) y con digestiones secuenciales de ambas.
- Desentrecruzamiento → A 4 °C o 65 °C, en presencia o ausencia de NaCl 200 mM.
- Tipo de muestra de partida → Cromatina, cromatina diluida o DNA ya purificado, a modo de control positivo.

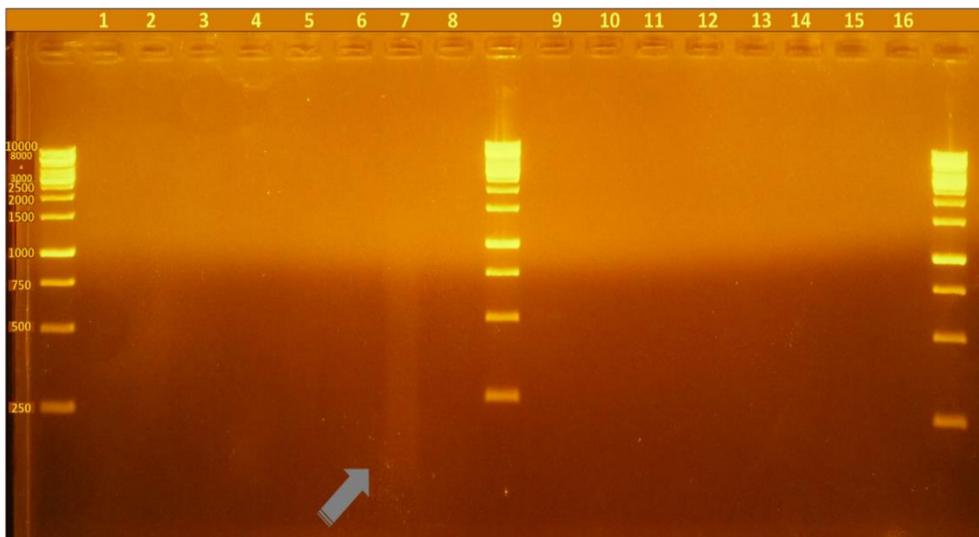


Figura 53 Electroforesis con 16 condiciones distintas de extracción de DNA

De izquierda a derecha las muestras extraídas con las condiciones de la tabla de abajo. Solo se observa una cantidad apreciable en la 7 (Kit de Thermo, con tampón Tris EDTA, sin digestiones enzimáticas, con la proporción normal de tampón de unión, sin observarse sedimento y con la mayor recuperación medida en NanoDrop, sí como una relación 260/280 compatible con DNA.

Resultados y discusión

Tabla 24 Detalles de las 16 condiciones distintas de extracción de DNA

Pocillo	Kit	Tampón	Digestión	Proporción Tampón	Sedimento	Turbidez	ng/ μ l	260/280
1	Thermo	Tris EDTA	ProtK y RNasa	1/5	No	No	2,66	1,05
2	ROCHE	Tris EDTA	ProtK y RNasa	1/5	No	No	2,51	-1,22
3	Thermo	Tris EDTA	ProtK y RNasa	1/1	No	No	3,53	1,68
4	ROCHE	Tris EDTA	ProtK y RNasa	1/1	No	No	2,62	2,19
5	Thermo	Tris EDTA	No	1/5	No	No	-6,80	1,70
6	ROCHE	Tris EDTA	No	1/5	No	No	0,87	1,85
7	Thermo	Tris EDTA	No	1/1	No	No	18,8	2,19
8	ROCHE	Tris EDTA	No	1/1	No	No	4,62	2,16
9	Thermo	SDS NaHCO ₃	ProtK y RNasa	1/5	No	No	1,49	-2,03
10	ROCHE	SDS NaHCO ₃	ProtK y RNasa	1/5	Sí	Sí	0,93	-0,03
11	Thermo	SDS NaHCO ₃	ProtK y RNasa	1/1	No	No	2,14	-4,33
12	ROCHE	SDS NaHCO ₃	ProtK y RNasa	1/1	Sí	Sí	2,45	13,39
13	Thermo	SDS NaHCO ₃	No	1/5	No	No	2,37	3,12
14	ROCHE	SDS NaHCO ₃	No	1/5	Sí	No	1,30	-0,41
15	Thermo	SDS NaHCO ₃	No	1/1	No	No	2,75	-0,56
16	ROCHE	SDS NaHCO ₃	No	1/1	Sí	No	2,45	4,85

Condiciones de extracción de las muestras de la electroforesis de arriba, incluyen el kit utilizado (marca Thermo o ROCHE), el tampón usado para diluir la cromatina (con y sin SDS), la presencia o ausencia de digestiones enzimáticas, la proporción de tampón de unión al DNA (usando, en la mitad de los casos, más cantidad para intentar diluir el SDS), la presencia de sedimento justo tras la adición de este tampón, si la apariencia era turbia y los datos de concentración y pureza obtenidos, por NanoDrop, tras el proceso.

Tras las mediciones del DNA obtenido y el análisis electroforético del mismo, se extrajeron las siguientes conclusiones:

- Medio de desentrecruzamiento \rightarrow En los medios sin SDS se redujo considerablemente el precipitado, mejorando la recuperación de DNA. El tampón de acidificación debía ir acompañado del de neutralización para poder obtener DNA.
- Tipo de extracción de DNA \rightarrow Aunque la extracción fenólica dio lugar a muestras de concentración similar al observarlas mediante electroforesis, daba lugar a lecturas muy superiores por espectrofotometría, por lo que se decidió utilizar kits de extracción. Los kits utilizados mostraron la misma eficacia, pero la adición de isopropanol en el de Thermo permitió extraer mayor cantidad de DNA. En ambos, diluir la muestra redujo la obtención de DNA.

- Digestión enzimática → Los tratamientos provocaron la pérdida de DNA en la extracción de cromatina.
- Desentrecruzamiento → La incubación a 65 °C incrementaba la recuperación y se requería NaCl.
- Tipo de muestra de partida → La concentración o sonicación de la cromatina resultaba irrelevante para la eficacia de la extracción. El DNA puro utilizado como control podía ser extraído igualmente por tampones con y sin SDS, por todos los medios de purificación y con y sin digestiones enzimáticas.

Ante todo esto, se decidió hacer una prueba incorporando la elución ácida, usando el kit de columnas de Thermo y sin digestiones enzimáticas. Las condiciones fueron las siguientes:

Se realizaron inmunoprecipitaciones usando dos cantidades distintas de cromatina, 2 y 20 µg, de dos réplicas de muestras. En la etapa de la elución, se resuspendieron los complejos *dynabead*-anticuerpo-cromatina con 50 µL de tampón de acidificación y se dejó incubando en rotación 10 min, tras lo cual el sobrenadante fue transferido a un tubo conteniendo 100 µL de tampón de neutralización. Se repitió el procedimiento con las *dynabeads* para aumentar la recuperación y el volumen total se agitó en vórtex y se incubó 24 h a 65 °C para realizar el desentrecruzamiento.

Como resultado, se vio, que las modificaciones incorporadas en el protocolo incrementaron la variabilidad entre las muestras además de volverse a de obtener señal positiva en el control sin anticuerpo (figura 54). Esto llevó a mantener la elución con SDS, habitual en los protocolos consultados y se buscó otra posible causa de la variabilidad observada.

Resultados y discusión

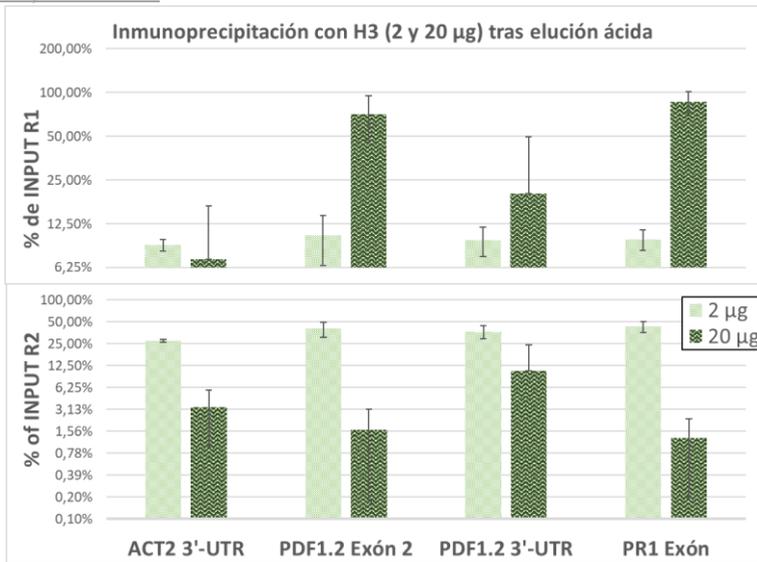


Figura 54 Resultados ChIPqPCR de elución ácida

Muestras control inmunoprecitadas con H3, en dos cantidades (2 y 20 µg) y en dos réplicas biológicas. Se estudiaron tres genes (*ACT2*, *PDF1.2* y *PR1*) examinando dos zonas, en el caso de *PDF1.2*. En el eje de las "Y", se muestra el porcentaje de recuperación con respecto al INPUT en escala logarítmica en base 2 y, en el de las "X", los genes y zonas examinadas. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3).

3.2.5. Quintas modificaciones: entrecruzamiento a vacío y muestreo en paralelo

Tras haber considerado y descartado que el paso final de elución de cromatina y extracción de DNA era la causa de la variabilidad observada, se reconsideró modificar el protocolo de entrecruzamiento, buscando una alternativa.

El entrecruzamiento a vacío se utiliza también en los estudios epigenéticos en plantas. Un aspecto importante a tener en cuenta es que el tejido utilizado en este caso son hojas u otros órganos vegetales enteros o fragmentados si son demasiado grandes, procedentes directamente de las plantas analizadas, por lo que tiene que realizarse justo tras completarse el periodo de infección de la planta. Se utiliza un desecador conectado a una bomba de vacío, tal como se indica a continuación (sección 2.3.):

Hojas de plantas CTL e INF de *A. thaliana* recién colectadas se introdujeron en tubos y se sumergieron en tampón de entrecruzamiento. Se puso un estropajo que evitaba que entraran en contacto con el aire y se añadió el formaldehído. Se agitaron los tubos y se cerraron con tapones perforados, introduciéndolos en un desecador conectado a una bomba de vacío durante 10 min (figura 55).

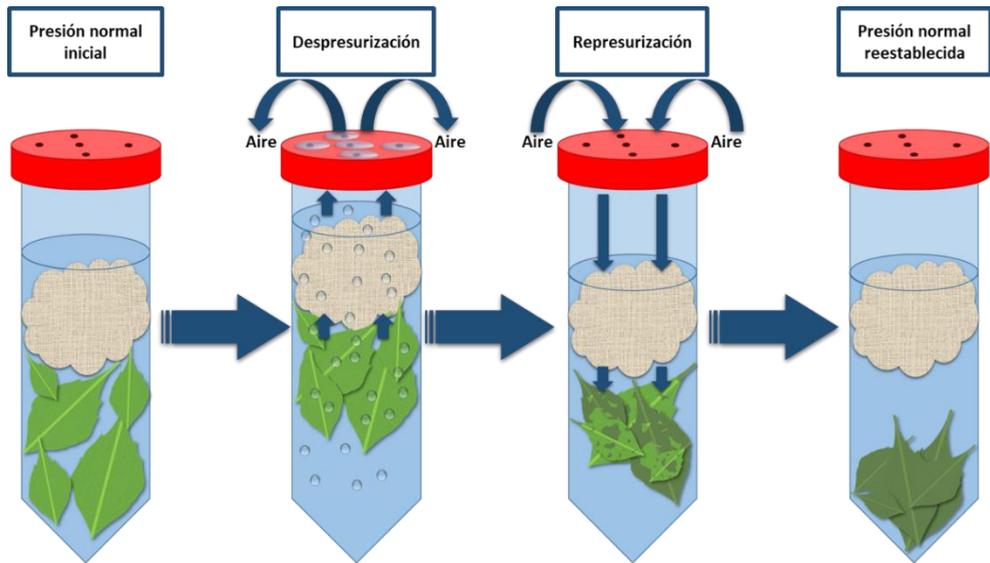


Figura 55 Esquema de entrecruzamiento a vacío

De izquierda a derecha: El tubo con las hojas de *A. thaliana* en su interior, sumergidas en tampón de entrecruzamiento con formaldehído a presión normal, bajo un trozo de estropajo que impide su contacto con el aire. A continuación, durante la despresurización en la que el tampón aumenta su volumen e hierve mientras las hojas suben, saliéndose parte de este por los agujeros de la tapa. Después, en el proceso de represurización en el que el tampón es presionado por el aire, disminuye su volumen y se infiltra en las hojas cambiando su color. Finalmente, con la presión ya reestablecida, las hojas caen al fondo al haberse infiltrado el tampón completamente.

Aunque las condiciones concretas no están bien descritas en la bibliografía, se utilizó la duración habitual de 10 min y se comprobó que era clave que el medio de entrecruzamiento se expandiera e hirviera, de forma que al represurizar el medio penetrara en las hojas. Esto último se puede comprobar ya que las hojas se oscurecen lentamente a medida que se infiltra el tejido.

Al igual que en el entrecruzamiento en suspensión utilizado en el protocolo original, el paso siguiente es la detención del proceso de entrecruzamiento añadiendo

Resultados y discusión

glicina. En este caso, al añadir la glicina se repite el proceso. Como las hojas ya han sido infiltradas con tampón en este caso no se puede comprobar visualmente que el proceso se había desarrollado correctamente. Como ocurre con el entrecruzamiento, se utilizó el tiempo usado habitualmente en la bibliografía, 5 min.

3.2.5.1. Comprobación del entrecruzamiento

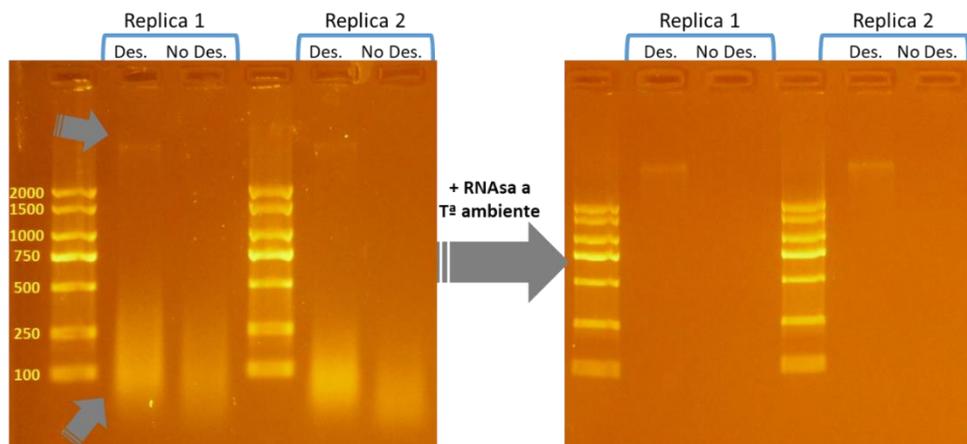


Figura 56 Validación del entrecruzamiento

A la izquierda de la figura se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa en la que se analizaron dos réplicas de alícuotas de cromatina desentrecruzadas (Des.) y dos réplicas no desentrecruzadas (No Des.). La banda de DNA de gran tamaño de las alícuotas desentrecruzadas, así como la intensa señal en torno a 100 bp que aparece en todas las muestras, se indican con flechas. A la derecha se muestra el resultado de la electroforesis de las muestras analizadas tras un tratamiento con RNasa.

Se usó el método del fenol en vez de usar una purificación por columnas, por su fundamento, ya que provoca que las proteínas sean desnaturalizadas, orientando sus residuos polares hacia la cara interna y los apolares hacia afuera, con lo que, si el DNA no está covalentemente unido a ellas, será liberado e irá a la fase acuosa. Por tanto, de haberse realizado correctamente el entrecruzamiento, en la muestra no desentrecruzada no debería obtenerse DNA, debido a que éste estará covalentemente enlazado con las proteínas desnaturalizadas.

Para comprobar que el nuevo procedimiento de entrecruzamiento a vacío había funcionado, se tomaron alícuotas de cromatina al final del protocolo de extracción que se dividieron, desentrecruzando unas y manteniendo las otras entrecruzadas,

para posteriormente extraer su DNA por el método del fenol. El análisis mediante

electroforesis en gel de agarosa confirmó en todos los casos que el entrecruzamiento había sido exitoso, ya que las alícuotas desentrecruzadas presentaban una banda de DNA de gran tamaño (figura 56).

Cabe destacar que en todas las muestras analizadas se observaba una señal intensa en torno a 100 bp. Tras un tratamiento con RNasa esta señal desapareció en todas las muestras, mientras que las bandas de mayor tamaño de las muestras desentrecruzadas permanecieron.

Optimización de las condiciones

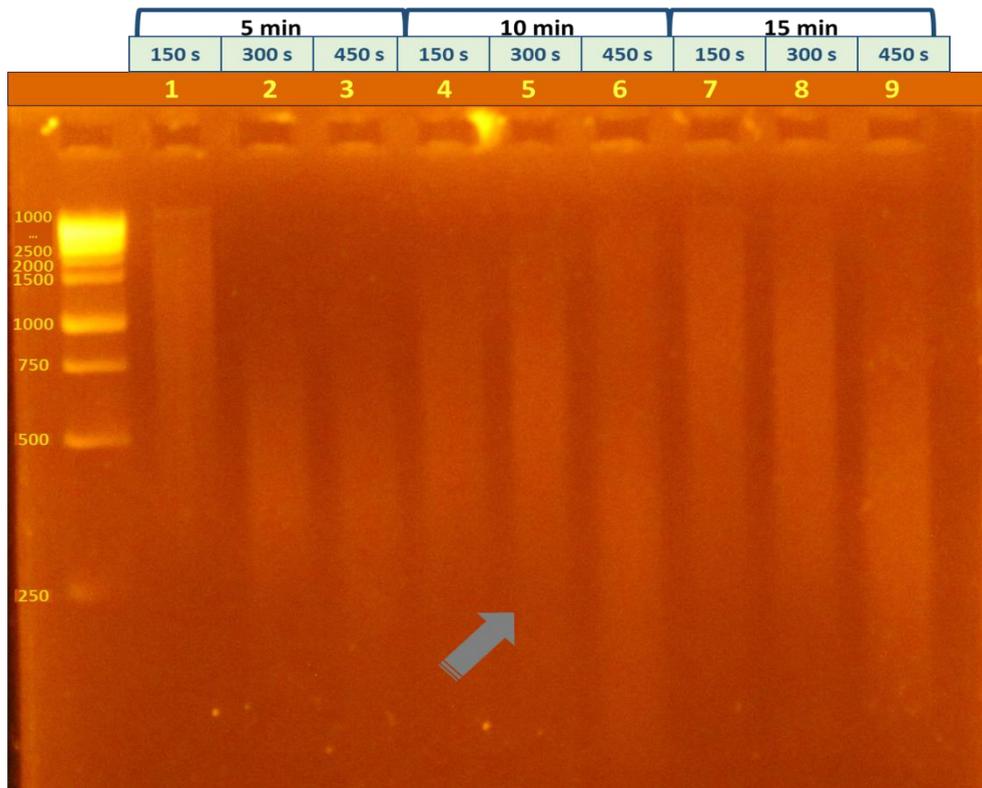


Figura 57 Ajuste de las condiciones de sonicación tras el entrecruzamiento a vacío

En la figura se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa en la que se analizaron muestras de cromatina sometidas a distintas condiciones de entrecruzamiento a vacío y posterior sonicación. De izquierda a derecha: muestras extraídas de *A. thaliana* entrecruzadas durante 5, 10 y 15 min, posteriormente sonicadas a media potencia durante 150, 300 y 450 s, respectivamente. Con una flecha se resalta la condición 5, que supone 10 min de entrecruzamiento y 300 s de sonicación.

Resultados y discusión

La cromatina extraída, utilizando este método de entrecruzamiento, resultó más susceptible al proceso de sonicación, por lo que hubo que reajustarlo para conseguir estelas de fragmentos centradas en 500 bp. Para ello se analizaron distintas combinaciones de entrecruzamiento a vacío (5, 10 y 15 min) y sonicación a media potencia (150, 300 y 450 s totales).

En vista de los resultados obtenidos (figura 57), se establecieron 10 min de entrecruzamiento y dos ciclos de 5 min de sonicación (30 s ON y 30 s OFF, 300 s totales) a media potencia para los análisis posteriores.

Además de alterar el resultado de la sonicación, de las muestras entrecruzadas no se puede extraer RNA de calidad, por lo que hubo que modificar nuevamente el protocolo de infección y muestreo, haciendo dos muestreos paralelos, uno para CHIP y otro para RT (figura 58).

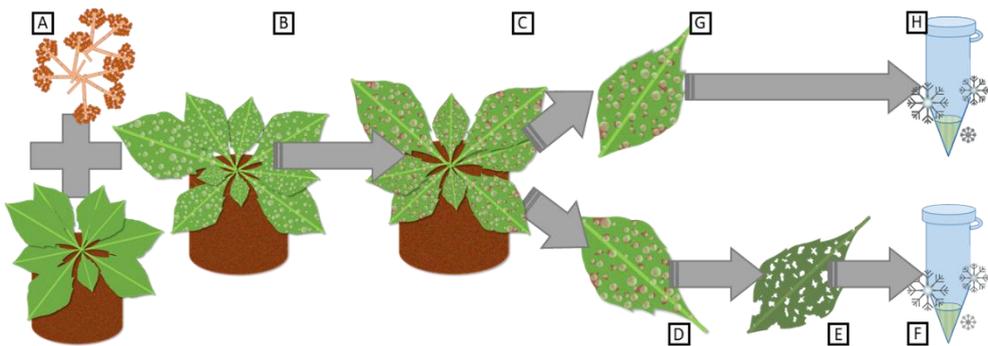


Figura 58 Muestreo en paralelo para CHIP y RT

(A) Plantas de *A. thaliana* y micelio de *B. cinerea*, son cultivados hasta alcanzar las condiciones idóneas para su interacción. (B) Las plantas son rociadas con medio conteniendo conidiosporas. (C) A las 24 hpi se pueden observar las primeras necrosis repartidas por las hojas de toda la planta, que son muestreadas para ser entrecruzadas. (D) y posteriormente (E) lavadas, secadas y (F) congeladas y pulverizadas. Este tejido será utilizado para la extracción de cromatina, posterior CHIP y qPCR. (G) Paralelamente, se muestrean hojas para la extracción del RNA y posterior RT y qPCR, (H) congelándolas y pulverizándolas, al igual que en el caso anterior.

3.2.5.2. *Fundamento del entrecruzamiento a vacío*

La introducción del entrecruzamiento a vacío supuso una modificación esencial en el protocolo, por lo que a continuación se discute la naturaleza de dicho procedimiento:

El entrecruzamiento, o reticulación, es un proceso por el cual dos polímeros se enlazan en varios puntos formando, normalmente, enlaces covalentes. Este proceso se da de forma natural en las plantas, concretamente es muy común en la pared celular, donde las distintas moléculas ya mencionadas (sección 1.3.) se entrecruzan, formando redes que favorecen la fortaleza de la estructura. En el núcleo las proteínas se unen al DNA mediante distintos tipos de enlaces electrostáticos, hidrofóbicos o de hidrogeno, que son relativamente débiles con el fin de permitir una interacción dinámica entre ambos componentes.

En los protocolos de extracción de cromatina la finalidad es estudiar qué proteínas interactúan y con qué zonas del DNA. Por ello, para que ambas

Existe una variante de la ChIP que no realiza entrecruzamiento, que se denomina ChIP nativa (NChIP) en contraposición a la ChIP entrecruzada (XChIP). Es más usada para tejidos en los que los protocolos de extracción no son largos y en los que las proteínas buscadas están fuertemente unidas.

moléculas no se separen durante los distintos pasos de purificación y fragmentación, suele ser necesario fortalecer esta unión mediante la adición de enlaces covalentes.

Para producir estos enlaces se utiliza formaldehído (CH_2O), un compuesto dipolar muy reactivo, cuyo carbono actúa como centro nucleófilo. Los grupos amino e imino de aminoácidos como la lisina o la arginina, y de los ácidos nucleicos como la citosina, reaccionan formando una base de Schiff ($-\text{N}=\text{CH}_2$). Posteriormente esta base podrá reaccionar con otro grupo amino o imino (de un aminoácido o ácido nucleico), enlazando ambas moléculas. La reacción más estudiada es la que se

Resultados y discusión

produce entre los grupos amino de la lisina y de la citosina, como se indica a continuación:

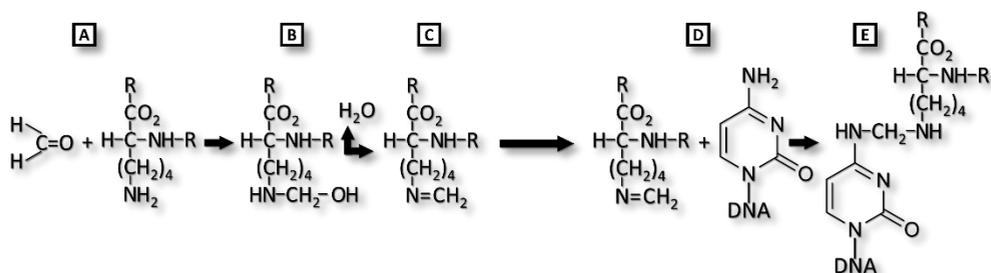


Figura 59 Entrecruzamiento de lisina con citosina

(A) El formaldehído ataca al grupo amino de la lisina y forma un grupo hidroximetilo ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). (B y C) Se libera H_2O y el grupo hidroximetilo se transforma en un grupo metileno ($=\text{CH}_2$), generando la base de Schiff. (D) Al entrar en contacto con el grupo amino de la citosina, el grupo metileno rompe uno de sus enlaces con el amino de la lisina (deshaciendo la base de Schiff) y se enlaza con el de la citosina, (E) generando un puente metilo ($-\text{CH}_2-$) entre ambas moléculas.

Puede obtenerse el mismo resultado “al revés”, es decir, si el formaldehído ataca, en primer lugar, al amino de la citosina y la base Schiff se forma en ella, atacando luego esta al amino de la lisina.

Este tipo de enlace covalente une la proteína y el DNA en varios puntos de una forma más estable, capaz de resistir los pasos siguientes del protocolo, siendo reversible mediante una incubación a $65\text{ }^\circ\text{C}$ con NaCl 200 mM y SDS 1% (p/v), con frecuentes agitaciones en vórtex (sección 2.4.). En esta incubación los componentes de la mezcla y la energía cinética generan un medio altamente reactivo y desnaturalizante en el que se rompen, en primer lugar, los enlaces previos que tenían las proteínas con el DNA y, finalmente, los enlaces covalentes creados en el entrecruzamiento. De esta forma las proteínas liberan el DNA, dejándolo listo para ser purificado.

Cabe destacar que el entrecruzamiento debe ser parcial, por lo que la concentración de formaldehído utilizada es del 1% al 3% (v/v) y el tiempo de entrecruzamiento entre 5 y 20 min. Por ello, en cada caso hay que optimizar las condiciones analizando mediante electroforesis en gel de agarosa la cromatina sometida a este proceso, antes y después de la posterior fragmentación (sección 3.2.6.2.). Hay que tratar de evitar un excesivo entrecruzamiento que genere

agregados de gran tamaño, imposibles de fragmentar en los pasos posteriores, y que formarían un sedimento con facilidad. Para impedir que la reacción del formaldehído continúe tras el tiempo estipulado, esta se detiene mediante la adición del aminoácido glicina (FIGURA 60), que difunde fácilmente y une el formaldehído restante a su grupo amino formando una base Schiff.

Como alternativa a la glicina se puede utilizar "tris(hidroximetil)aminometano" (tris), que puede unir simultáneamente dos moléculas de formaldehído formando una molécula bicíclica llamada 1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-5-metanol y dos moléculas de agua. Esto secuestra completamente al formaldehído, impidiendo que se formen más enlaces. Sin embargo, la glicina es más usada probablemente porque la eficacia del tris es tal que puede llegar incluso a revertir el entrecruzamiento. Además, los efectos de tener unido un pequeño aminoácido a las proteínas y el DNA no parece ser de importancia. En general en el tampón de entrecruzamiento se usa una baja concentración de tris (10,0 mM), mientras que la concentración final del formaldehído es del 1,0 % (p/v).

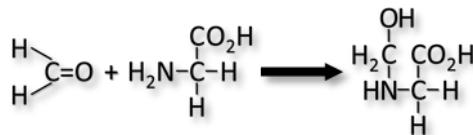


Figura 60 Reacción de la glicina con el formaldehído

A la hora de poner a punto el entrecruzamiento a vacío no se encontró una descripción detallada de su funcionamiento en la bibliografía. Visualmente el tampón que contiene formaldehído entra en el tejido una vez finalizada la represurización (figura 61), por lo que es probable que el proceso ocurra en el tiempo que pasa desde que el tampón se infiltra con formaldehído, justo después de finalizar la represurización, hasta que se infiltra con la glicina añadida. De ser esto así el tiempo real de entrecruzamiento incluiría los 5 min en los que se genera el vacío, más el tiempo que se tarda en añadir y homogenizar la glicina, que varía según la cantidad de muestras, pero pueden llegar a ser 5 min.

Por otro lado, la composición del tampón de entrecruzamiento varía entre los protocolos utilizados previamente en plantas. En muchos casos utilizan uno similar al del protocolo puesto a punto en esta tesis, pero conteniendo sacarosa. Aunque es incierta la función de este sacárido se ha especulado que mejora el proceso de

Resultados y discusión

entrecruzamiento (Saleh et al., 2008). En algunos casos, sin embargo, se utiliza agua destilada (tabla 20).

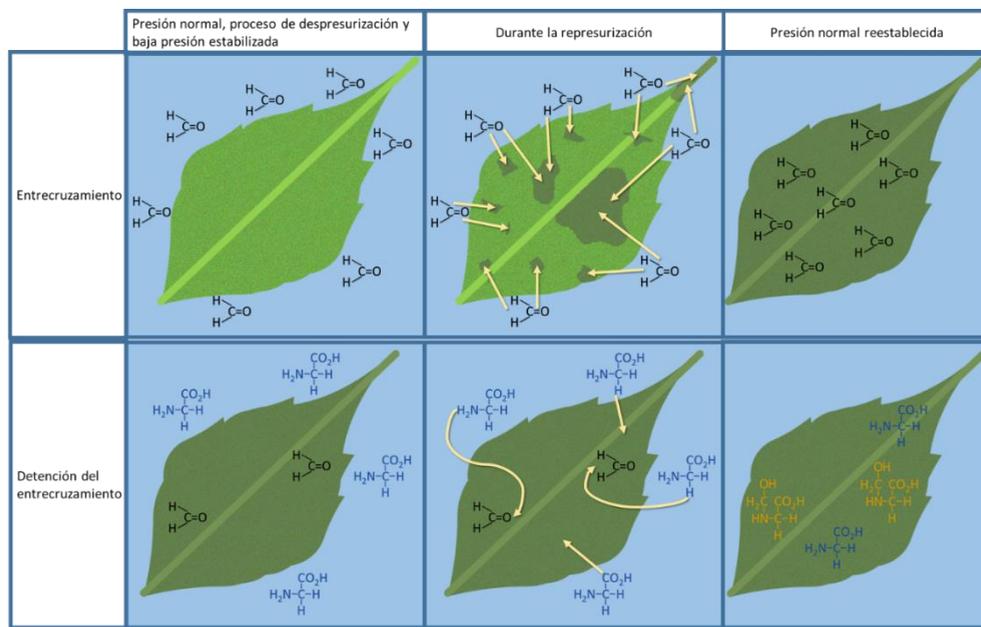


Figura 61 Funcionamiento teórico del entrecruzamiento a vacío y su detención

De izquierda a derecha y de arriba a abajo: la hoja se encuentra sumergida en tampón de entrecruzamiento durante su muestreo y, posteriormente, se le añade formaldehído (CH_2O) que penetra en el transcurso de la represurización junto al tampón en el que está diluido, lo que oscurece la hoja en el proceso (al llenarse de fluido). Una vez dentro produce el entrecruzamiento. Posteriormente, se añade glicina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) que penetra en el tejido al represurizarse. La glicina se une con el formaldehído formando un grupo metileno ($=\text{CH}_2$) y generando la base de Schiff (indicada en naranja), previniendo que el formaldehído reaccione con más grupos amino.

El hecho de que no funcionara el entrecruzamiento en suspensión, que se había utilizado previamente en plantas de guisante (Gagete Mateos, 2009), seguramente se debió a reacciones cruzadas con moléculas de la pared celular, o compuestos propios de la célula vegetal. Por ello se concluyó que, aunque este procedimiento es válido para tejidos animales, no siempre puede funcionar en plantas.

3.2.6. Modificaciones generales introducidas en la puesta a punto de los distintos protocolos

3.2.6.1. Componentes de los tampones

En las distintas modificaciones introducidas en los protocolos, descritas previamente, hubo que cambiar la composición de varios tampones. Para comprender mejor el objetivo de dichos cambios, a continuación, se discute la función de los componentes de dichos tampones.

Compuestos orgánicos generales

Ciertos componentes tienen una función ampliamente conocida: el tris actúa como un regulador de pH (en ocasiones se utilizan otros compuestos como el HEPES). Para proporcionar un pH básico, se utiliza NaHCO_3 en el paso final del protocolo CHIP. El EDTA se usa como un quelante de metales que podrían actuar como cofactores enzimáticos de posibles proteasas o nucleasas. Por último, la sacarosa, parece utilizarse en el proceso de entrecruzamiento para mejorarlo (Saleh et al., 2008), pero en el resto de los pasos probablemente tenga la función de generar gradientes para las distintas centrifugaciones, especialmente en la de una hora de duración, en la que la muestra resuspendida se coloca sobre cierto volumen de tampón con alto contenido en este sacárido (figura 62).

Detergentes

Los no iónicos, como el Triton X-100 o el Igepal, ayudan a lisar membranas no nucleares (menos ricas en proteínas) en la extracción de cromatina y a crear condiciones rigurosas para evitar uniones inespecíficas en la inmunoprecipitación. Por otro lado, los detergentes iónicos como el desoxicolato de Na y, especialmente el SDS, con sus propiedades desnaturizantes, se usan en los pasos finales del protocolo de extracción de cromatina para lisar membranas más ricas en proteínas,

Resultados y discusión

como la del núcleo, y también, en los del protocolo de ChIP para romper los enlaces entre *dynabeads*, anticuerpos y cromatina. A baja concentración (0,1 % (p/v)), estos detergentes también son usados en los lavados de la ChIP para crear condiciones rigurosas que ayuden a los no iónicos y a las sales (figura 62).

Por otro lado, el SDS es uno de los factores limitantes entre el protocolo de extracción y el de ChIP, pues al estar a una concentración del 1 % (p/v) al final del primero (figura 62) y ser capaz de impedir que los anticuerpos se unan a sus dianas, la cromatina debe ser diluida antes de empezar a inmunoprecipitarla en un factor de 10, lo que a su vez es limitante para el uso de las *dynabeads*, pues pierden eficacia al ser diluidas. Esto hace que la cromatina deba tener un mínimo de concentración al obtenerla para poder realizar una inmunoprecipitación exitosa.

Sales

El $MgCl_2$ parece tener un papel en la estabilización de los núcleos en el protocolo de extracción de cromatina (Neri et al., 1997). El NaCl parece tener funciones similares a las de los detergentes iónicos y no iónicos en el protocolo ChIP, con un papel fundamental en el desentrecruzamiento. El LiCl se usa normalmente para precipitar el RNA, pero en el protocolo de ChIP se emplea en un paso en el que es muy difícil que esta molécula siga presente; algunos protocolos indican que este compuesto se utiliza para introducir una variedad de sales que mejore la limpieza, o porque funciona mejor con SDS que el NaCl (Merck, 2018). Sin embargo, justamente en este paso muchos protocolos no usan este detergente. El SDS, de hecho, se usa combinado con NaCl en varios tampones, incluido el usado para desentrecruzar.

Compuestos que se añaden justo antes del experimento

La alta reactividad de ciertas sustancias hace que, en muchos casos, deban añadirse poco antes de usar los tampones. Los PIs realizan la función que su nombre indica, que también es llevada a cabo, aunque en menor grado, por el PMSF pues su rango

de inhibición se limita a algunas proteasas de serina, siendo un compuesto que se degrada rápidamente tras su adición al tampón. El BME, por su parte, reduce los enlaces disulfuro entre los grupos tiol de los residuos de cisteína, por lo que tiene la capacidad de desnaturalizar proteínas que potencialmente podrían degradar la cromatina. Si bien esto podría ser perjudicial para la integridad de los octámeros nucleosomales, sus enlaces entre proteínas están reforzados gracias al entrecruzamiento.

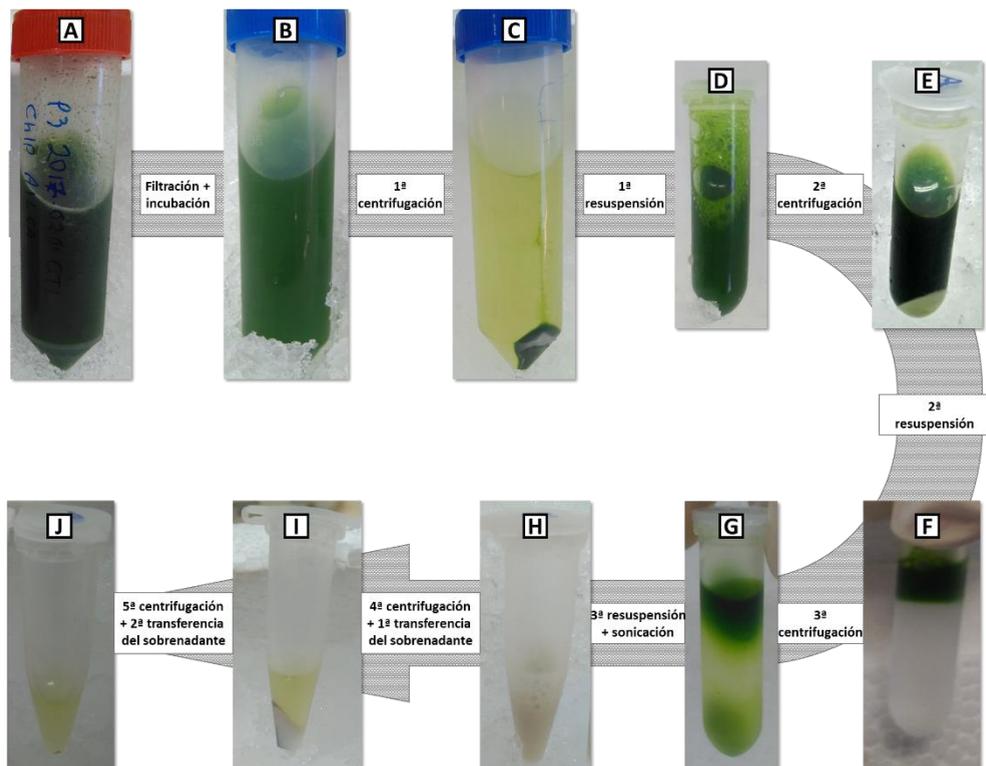


Figura 62 Imágenes del protocolo de extracción de cromatina

La figura ilustra el aspecto de las muestras en las distintas fases del protocolo de extracción de cromatina (A) Resuspensión de las hojas entrecruzadas y pulverizadas (B) Tras filtrar e incubar (C) Resultado de la primera centrifugación en el que se observa un sobrenadante claro y un sedimento con varias fracciones (teóricamente los núcleos abundan más en la blanca). (D y E) El tejido resuspendido sometido a la segunda centrifugación da lugar a un sedimento claro. (F) El sedimento resuspendido se coloca sobre un tampón con alto contenido en sacarosa. (G) Tras la tercera centrifugación (de 1 h de duración) se separan tres fases. (H) El sedimento se resuspende en tampón con SDS y se sonica. (I) Centrifugación en la que se recupera el sobrenadante. (J) Se repite el proceso, centrifugando y transfiriendo el sobrenadante descartando el minúsculo sedimento. Se obtiene así la cromatina purificada, fragmentada y lista para la inmunoprecipitación.

Resultados y discusión

3.2.6.2. Sonicación

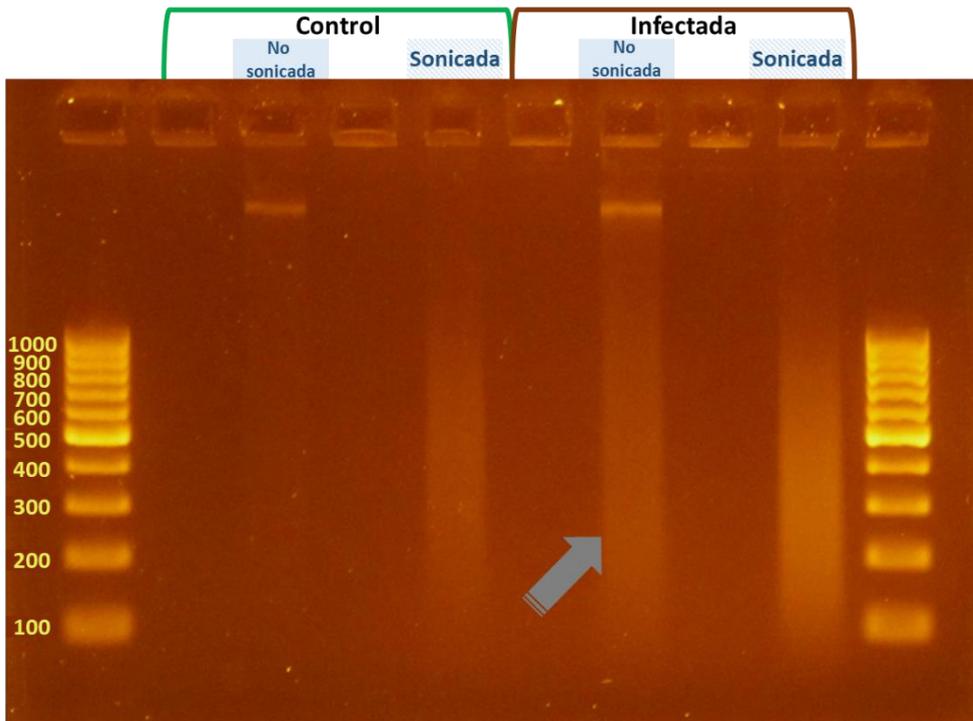


Figura 63 Comprobación de la fragmentación de la cromatina tras la sonicación

En la figura se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa en la que se analizaron muestras de cromatina sometidas a distintas condiciones de sonicación. De izquierda a derecha: alícuotas de cromatina no sonicadas y sonicadas de la CTL e INF de *A. thaliana*. Se indica con una flecha la INF no sonicada que presentaba una estela de fragmentos de DNA además la banda de DNA genómico

Cada vez que se introdujo un cambio, en las etapas previas a la sonicación, fue necesario ajustar sus condiciones. Con la nueva forma de realizar la homogenización y el filtrado y, tras entrecruzar a vacío, el análisis realizado mediante electroforesis en gel de agarosa mostró que las condiciones de sonicación utilizadas previamente eran demasiado potentes, por lo que se ajustaron el número de ciclos y la potencia, mientras que el tipo de ciclo (con el sonicador activo 30 s e inactivo otros 30 s) se mantuvo. Generalmente, las causas de los cambios en los resultados de la sonicación suelen ser fruto de cambios en el volumen y densidad

de la muestra, el tipo de tubo necesario y la composición del tampón. El primer ajuste que se realizó se debió a que las modificaciones introducidas en el protocolo implicaron cambios en el volumen y densidad de las muestras, así como en el tipo de tubos utilizados, ya que la densidad se incrementó a más del doble, el volumen se redujo diez veces y se necesitaron tubos de 1,5 mL.

En el segundo reajuste, debido al entrecruzamiento realizado a vacío, la sonicación fue más efectiva, por lo que se redujo a “media” la intensidad.

En todos los casos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en la que se confirmó la presencia de una banda de gran tamaño de DNA genómico en las muestras no sonicadas, mientras que en las segundas se observaban estelas de DNA cuyo tamaño oscilaba entre 100 y algo más de 1000 bp. Cabe destacar que era común ver cierta cantidad de DNA formando una estela de fragmentos en la INF, además de la banda de DNA genómico, probablemente correspondiente a células en estado de HR con la muerte celular programada activada.

Al igual que se ha comentado previamente, con respecto a las modificaciones introducidas en el procedimiento de entrecruzamiento de cromatina, los cambios requeridos en la sonicación se deben al fundamento de dicho proceso:

La sonicación usa ondas sonoras de alta frecuencia para fragmentar las muestras. Hay dos tipos: una que se

Para fragmentar la muestra se puede usar también la digestión con la nucleasa microcócica (Bauer et al., 2002), pero este método es más comúnmente usado en el NChIP y se piensa que su efecto no es tan aleatorio.

lleva a cabo mediante una sonda que transfiere las ondas directamente a la muestra y otra que se realiza mediante baños que transfieren las ondas a los tubos a través del agua. En cualquier caso, la energía sónica transmitida es transformada en cinética que rompe enlaces en la cromatina, entre ellos los de tipo fosfodiéster que unen un nucleótido con el siguiente, fragmentando el DNA. También se transforma en energía térmica, por lo que en estos protocolos la muestra debe estar refrigerada.

Resultados y discusión

La fragmentación es necesaria para poder estudiar las proteínas que están unidas a determinadas regiones del DNA (como genes o zonas de los mismos). Una cadena intacta produciría la inmunoprecipitación de secuencias potencialmente distantes a dichas proteínas, dando falsos positivos. Dado que el DNA unido a las proteínas es, posteriormente, amplificado mediante qPCR en fragmentos que oscilan entre 60 y 200 bp, la sonicación no puede ser demasiado potente y/o larga, puesto que el DNA se fragmentaría hasta quedar intacto solo aquel que está unido a las proteínas. Normalmente estas proteínas son las histonas que forman el nucleosoma, por lo que si se generan fragmentos de ≈ 200 bp (las 147 bp del octámero, más el DNA que lo une al siguiente) deben moderarse las condiciones de sonicación, porque la cromatina se estará fragmentando lo máximo posible en nucleosomas. Por ello la optimización de esta etapa, junto con la del entrecruzamiento, es crucial.

En la bibliografía el tamaño de los fragmentos a estudiar oscila entre 100 y 1000 bp, centrado en valores de 400 o 500 bp, es decir, conteniendo dos o tres nucleosomas. Esto es debido a que, en el caso de inmunoprecipitación de histonas, muchas de las regiones del DNA que posteriormente serán amplificadas pueden ocupar más de un nucleosoma, o encontrarse entre dos nucleosomas, ya que el posicionamiento de los mismos varía con facilidad. Si se analiza la presencia de otro tipo de proteínas, como TFs o RNAPII, conviene asegurarse de que los fragmentos sean lo bastante grandes como para que puedan ser amplificados por qPCR, como se ha mencionado anteriormente.

3.2.7. Resumen de las modificaciones introducidas y protocolos finales

Tabla 25 Modificaciones en protocolos y sus consecuencias

Modificaciones en protocolos						
	Pureza de DNA	Fragmentos adecuados	Diferencias			Resultados replicables
			Expresión	Anticuerpo <> No Anticuerpo	CTL <> INF	
Protocolo de partida	X	✓	✓	X	X	X
Cambio de purificación	X	✓	✓	X	X	X
Cambio en extracción e ChIP	✓	X	✓	X	X	X
Cambio en sonicación	✓	✓	✓	X	X	X
Cambio en anticuerpos	✓	✓	✓	✓	X	X
Cambio en infección	✓	✓	✓✓	✓	X	X
Prueba de otros anticuerpos	✓	✓	✓✓	✓	X	X
Cambio en elución	✓	✓	✓✓	X	X	X
Cambio en entrecruzamiento	✓	X	X	✓	✓	X
Cambio en sonicación 2	✓	✓	X	✓	✓	X
Extracción paralela del RNA	✓	✓	✓✓	✓	✓	X
Cambio en infección 2	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓

Se incluyen las modificaciones realizadas a partir de los protocolos originales, y de los sucesivos protocolos intermedios, en *A. thaliana*. ✓ y sombreado verdoso: la modificación introducida logró el objetivo en ese aspecto del protocolo. ✓✓ y sombreado verdoso: mejoró ese aspecto. X y sombreado rosado: se obtuvo un resultado negativo.

De todos los cambios necesarios para obtener unos protocolos funcionales, los más complejos se dieron entre los protocolos de infección y muestreo y, el de extracción de cromatina, pues el entrecruzamiento tuvo que trasladarse del segundo al primero. Esto, a su vez, conllevó problemas en el análisis de los niveles de expresión, pues no podía extraerse RNA de calidad de tejido entrecruzado. Pero en general, entre los tres protocolos, se realizaron más de una decena de ajustes (tabla 25).

Los sucesivos cambios introducidos en los protocolos originales llevaron a elaborar tres protocolos principales (figura 64), que son los que finalmente se utilizaron en

Resultados y discusión

los ensayos subsiguientes para el análisis de las modificaciones epigenéticas (sección 2).

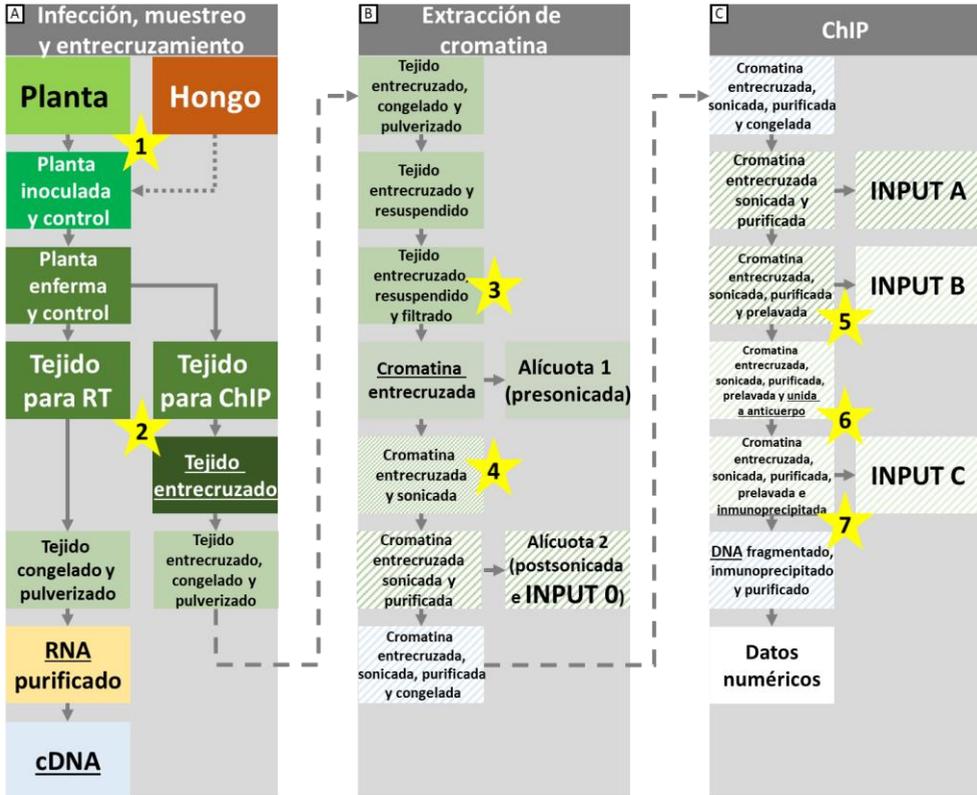


Figura 64 Esquema simplificado de los tres protocolos principales

(A) Protocolo de infección, muestreo y entrecruzamiento. Incluye también la extracción paralela de RNA y su procesamiento a cDNA. (B) Protocolo de extracción de cromatina. Se parte de las muestras entrecruzadas y pulverizadas obtenidas en el anterior. Se indican los pasos en los que se extraen alícuotas para comprobar la calidad y extraer el INPUT 0. (C) Protocolo de ChIP. Se parte de la cromatina purificada y sonificada obtenida en el anterior. Se indican los pasos en los que es posible extraer el INPUT A, B o C. Señalados con estrellas se indican los pasos más críticos a la hora de poner a punto los protocolos: (1) el patosistema, (2) el muestreo y entrecruzamiento, (3) la purificación y filtrado, (4) la sonicación, (5) el tipo de inmunoprecipitación, (6) la separación de las *dynabeads* y (7) la purificación del DNA.

3.3. Determinación de modificaciones epigenéticas plantas de en *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea*

3.3.1. Análisis de H3K4me3

Tras la puesta a punto del protocolo de extracción de cromatina y de ChIP, se llevó a cabo un experimento con plantas de *A. thaliana* de cinco semanas, inoculadas mediante espray con *B. cinerea* (10^5 conidiosporas/mL) en zumo (25 % (v/v)). Se realizaron tres réplicas en las que se utilizó el anticuerpo anti-H3K4me3, además del anti-H3 y un control negativo. Dado que la mayoría de los cambios de expresión génica, en *A. thaliana* se producen durante las primeras 48 h tras la infección con *B. cinerea*, antes de que se produzca el desarrollo de las lesiones asociadas (Windram et al., 2012), se estudiaron las marcas epigenéticas de las histonas a 24 and 33 h post-inoculación.

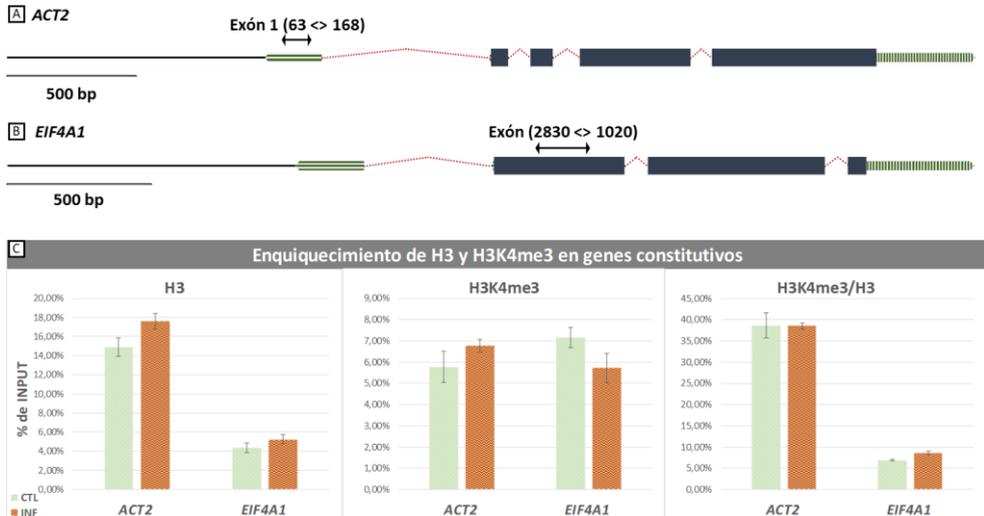


Figura 65 Enriquecimiento de H3 y H3K4me3 en genes constitutivos y esquemas de los mismos

Esquema del gen constitutivo (A) *ACT2* y (B) *EIF4A1* con el amplicón de la zona utilizada en la ChIPqPCR. (C) Se observan los resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3 con respecto al INPUT, H3K4me3 con respecto al INPUT y finalmente, H3K4me3 con respecto a H3 de los genes mencionados. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y, en el "X" los genes examinados en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 4). Se muestran los datos de un experimento representativo.

Resultados y discusión

En primer lugar, se analizaron los genes constitutivos “actina 2” (*ACT2*) y “factor eucariótico de iniciación de la traducción 4A-1” (*EIF4A1*), para validar los resultados obtenidos con los protocolos puestos a punto. Se analizó una región en el cuerpo de ambos genes, en plantas infectadas a 24 hpi, con respecto a las plantas no inoculadas (INF vs CTL).

En las condiciones utilizadas se obtuvieron resultados reproducibles en las distintas réplicas. Se observó que la marca H3K4me3 se detectó claramente en ambos genes constitutivos, pero no había diferencias significativas en el porcentaje de recuperación de H3 y H3K4me3, normalizado con respecto al INPUT, entre las INF y las CTL (figura 66). Este resultado se confirmó en ambos genes, tras normalizar los valores obtenidos para H3K4me3 con respecto a H3. Cabe resaltar que, en todos los casos el nivel de detección de H3, era considerablemente superior al de la modificación H3K4me3 e inferior al del INPUT, como era de esperar.

Una vez validado el protocolo con los genes constitutivos, se procedió a analizar la marca H3K4me3 en genes diferencialmente expresados, comenzando con el análisis de *PR1*, uno de los genes de respuesta más inducidos tempranamente en este patosistema (Finiti et al., 2013).

Existen diecisiete familias de proteínas PR, algunas de ellas con funciones directamente antimicrobianas y otras con actividad señalizadora. Los miembros de la familia PR1 están muy conservados en plantas, encontrándose homólogos suyos también en animales y hongos. Pese a que PR1 se ha estudiado extensamente, su función exacta permanece desconocida, aunque se ha sugerido que tienen una acción antimicótica y, también, un papel señalizador en la defensa mediada por SA, específicamente en la muerte celular mediada por HR (Pape et al., 2010). En *A. thaliana* hay veintidós genes tipo *PR1*, pero solo uno de ellos (AT2G14610), situado en el cromosoma dos, es activado en situaciones de estrés, mientras que el resto lo

están constitutivamente en raíz y polen. La proteína es pequeña (161 aa) y se secreta y acumula en el espacio apoplástico.

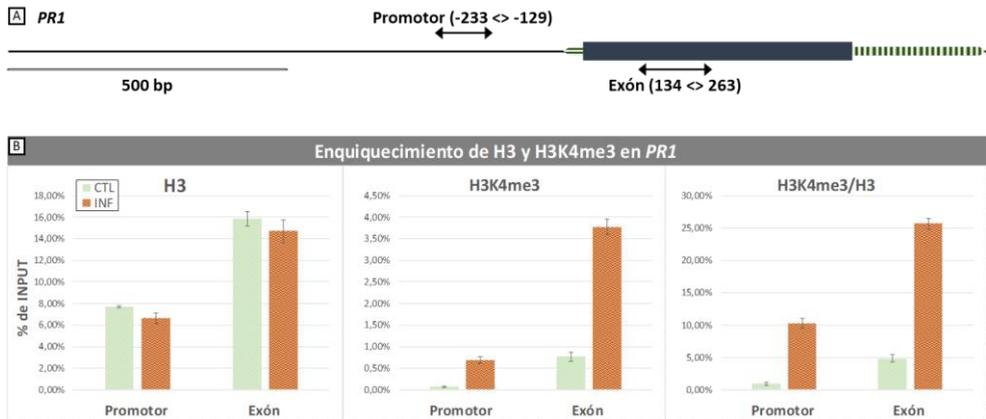


Figura 66 Enriquecimiento de H3 y H3K4me3 en *PR1* y esquemas del mismo

(A) Esquema del gen *PR1* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIPqPCR. (B) Resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3 con respecto al INPUT, H3K4me3 con respecto al INPUT y finalmente, H3K4me3 con respecto a H3. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las regiones del gen examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 4). Se muestran los datos de un experimento representativo.

PR1 se ha relacionado, previamente, con el *priming* de origen químico de las defensas de *A. thaliana* ((Jaskiewicz et al., 2011a). Además, plantas sobreexpresantes de *PR1*, han mostrado ser más resistentes a ciertos patógenos y más susceptibles a otros. Por otro lado, al silenciar el gen se ha observado una menor actividad glucanasa y, también, una menor deposición de calosa (Pecenkova et al., 2017). A nivel epigenético, el gen *PR1* ha sido estudiado en las zonas 5' cercanas, analizando las modificaciones H3K4me3, H3K9ac y H3K27me3 en plantas de *A. thaliana* infectadas con la bacteria hemibiótrofa *P. syringae* o tratadas con agentes de *priming* (Luna et al., 2012, Jaskiewicz et al., 2011a).

En esta tesis, además de analizar la zona del promotor, como estaba descrito en la bibliografía, se analizó también el cuerpo del gen. En ambos casos, se observó un mayor enriquecimiento de la modificación activadora H3K4me3 en las plantas INF a 24 hpi, que se correlacionaba con el incremento de transcrito (figura 66). En las condiciones utilizadas, las muestras incubadas con anticuerpo se diferenciaban

Resultados y discusión

claramente de las que se utilizaron como control sin anticuerpo y se obtuvieron resultados similares en todas las réplicas.

En base a la bibliografía disponible, se estableció como criterio una variación de 1,5 veces en la señal detectada entre condiciones (Berr et al., 2010, Luna et al., 2012, Jaskiewicz et al., 2011a).

3.3.2. Análisis de H3K4me3, H3K9ac, H3K27me3 y H3K36me3 en *PR1*

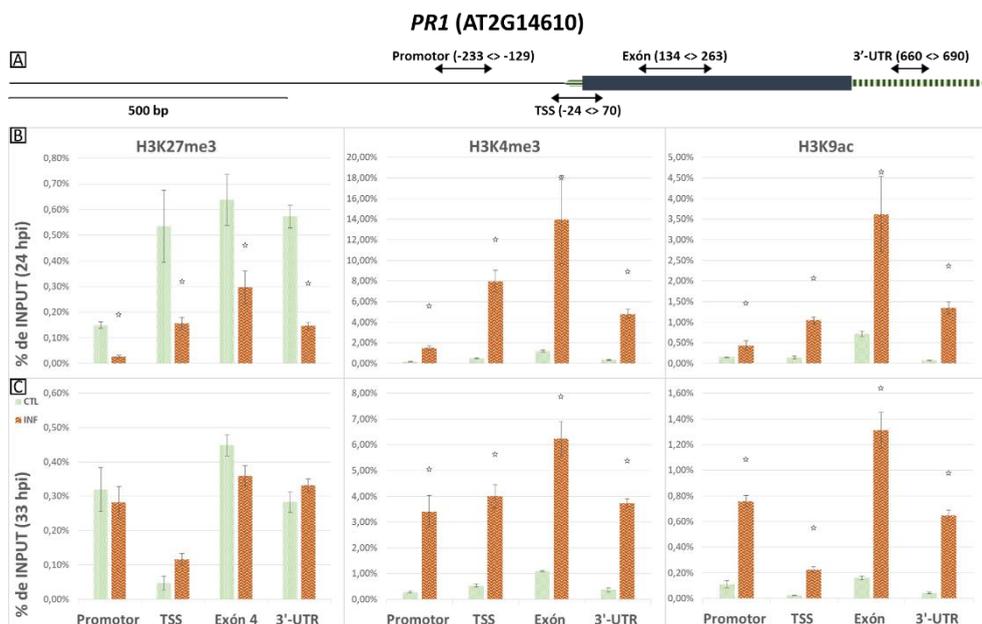


Figura 67 Resultados epigenéticos obtenidos con *PR1*

(A) Esquema del gen *PR1* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIPqPCR. (B y C) Se observan los resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3K27me3, H3K4me3 y H3K9ac con respecto al INPUT. En la parte superior (B) a 24 hpi y en la inferior (C) a 33 hpi. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y, en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas.

Con el objetivo de establecer una correlación entre la inducción temprana del gen de defensa *PR1* y las marcas epigenéticas en las histonas, se analizó la presencia de H3K4me3, H3K9ac y H3K36me3, relacionadas con activación, y H3K27me3, con represión, en distintas regiones del gen. Dichas marcas se analizaron a dos tiempos,

24 y 33 hpi, para establecer si estas varían durante la respuesta temprana a la infección. Como en el experimento anterior, se usaron los controles usuales: H3 como control positivo y para normalizar el número de nucleosomas, así como el control negativo sin anticuerpo.

En esta ocasión, a las dos zonas ya estudiadas de *PR1*, se le sumaron otras dos, abarcando así el promotor, el cuerpo del gen, el TSS y la 3'-UTR. Debido al pequeño tamaño de este gen (760 bp), especialmente de su zona codificante (485 bp), y a su estructura simple (sin intrones), con las zonas analizadas se cubrió prácticamente la totalidad del gen.

El transcrito de *PR1*, se incrementó considerablemente a 24 hpi y continuó haciéndolo a 33 hpi (figura 69). Las modificaciones activadoras H3K4me3 y H3K9ac se incrementaron en todas las zonas analizadas en las plantas INF, especialmente en la zona codificante del gen. Esto apenas varió a 33 hpi, salvo en el caso de H3K9ac en la zona TSS, donde la diferencia con las plantas CTL fue menor. Por otro lado, la modificación represora H3K27me3 mostró un empobrecimiento en la INF, que no se mantuvo a 33 hpi, aunque la acumulación de transcrito siguió incrementando. Es interesante destacar que se ha descrito la presencia de bajos niveles de la marca H3K27me3 en la cromatina de genes de defensa inducidos frente a patógenos necrótrofos, dado que la probabilidad de ser silenciados es escasa (Berr et al., 2010). Los resultados obtenidos indican un balance de diversas marcas de histonas que podría estar asociado con la inducción de este gen frente a *B. cinerea*. También demuestran que la marca H3K4me3 estaba presente a lo largo del gen, incluyendo el exón y la 3' UTR, hecho inusual para esta marca epigenética. En Ding et al. (2012), observaron el enriquecimiento de esta modificación en el cuerpo de genes inducidos por sequía. Asimismo, se había descrito que el promotor de *PR1* estaba enriquecido en la marca H3K9ac en la progenie de plantas de *A. thaliana* que habían sido sometidas a *priming*, mediante infección con la bacteria *P. syringae* pv tomato (Pst DC3000 (Luna et al., 2012). Esta marca también se correlacionó con el *priming* de la defensa temprana producida por los inductores BTH y BABA (Jaskiewicz et al.,

Resultados y discusión

2011a, Po-Wen et al., 2013). Sin embargo, el *priming* de la defensa a largo plazo debida al tratamiento con BABA no requiere la presencia de la marca H3K9ac (Luna et al., 2014).

H3 y H3K36me3

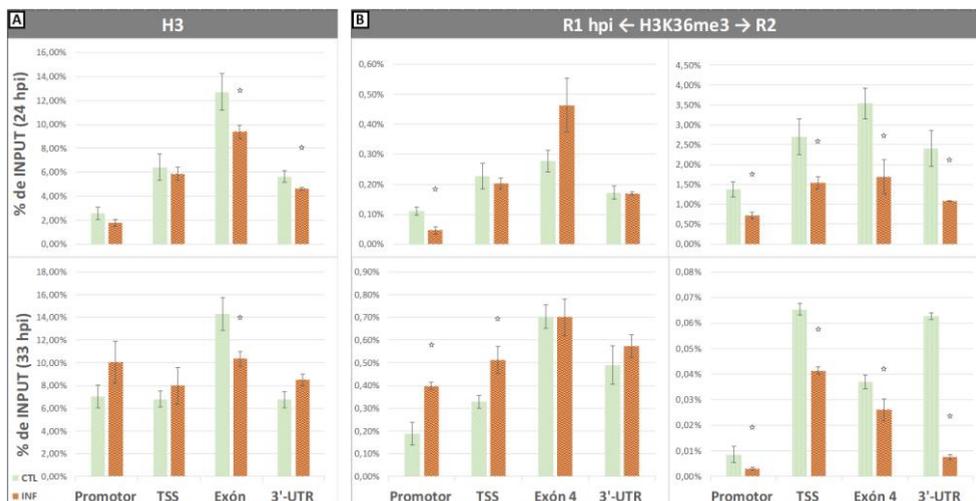


Figura 68 Resultados de H3 y H3K36me3 con PR1

Resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3 y H3K36me3 con respecto al INPUT. En la parte superior a 24 hpi y en la inferior a 33 hpi. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y, en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas.

Tal como se observó en el experimento descrito en el apartado anterior, los datos obtenidos tras la inmunoprecipitación de H3 mostraron bastante homogeneidad entre condiciones y, en todo caso, de haber diferencias no eran reproducibles (figura 68), por lo que, aunque se realizó una normalización inicial con respecto a H3, se decidió utilizar la normalización respecto al INPUT.

H3K36me3 es una modificación que ha sido relacionada positivamente con la defensa frente a hongos necrótrofos, concretamente por su papel en la ruta del JA/ET. Los estudios realizados previamente se centraron en plantas mutantes en

actividades enzimáticas relacionadas con las modificaciones de histonas, tratadas con MeJA e infectadas por el hongo necrótrofo *A. brassicicola* (Berr et al., 2010). En nuestras condiciones experimentales, el análisis del gen *PR1* con anti-H3K36me3 dio lugar a unos resultados altamente variables, que no eran reproducibles entre las réplicas y con una alta variabilidad dentro de las mismas (figura 68). Por esto no fue posible extraer conclusiones claras. Es posible que hubiera problemas relacionados con el anticuerpo, que habría que comprobar, o que sea necesario analizar otras zonas del gen. Los datos disponibles en la bibliografía, con respecto a esta modificación, indican que la localización preferente de esta marca epigenética es la zona 3' del gen (sección 1.8.2.1.), aunque hay muy poca información referente a la misma en plantas y, en particular, en respuesta a patógenos.

3.3.3. Análisis de H3K4me3, H3K9ac y H3K27me3 en otros genes

3.3.3.1. Caracterización de la expresión de los genes en el nuevo sistema de infección

Una vez caracterizadas las marcas epigenéticas en el gen *PR1*, el estudio se extendió a otros genes de respuesta temprana frente a *B. cinerea*. Previamente al estudio epigenético, se seleccionaron varios genes candidatos (tabla 26) repartidos por todo el pequeño genoma de la planta (figura 70). Se valoraron aquellos que se expresaran diferencialmente en la respuesta temprana a la infección por *B. cinerea* y frente al estrés oxidativo que la acompaña, así como los que fueran marcadores de las principales rutas de señalización o de las principales estrategias de defensa frente a este patógeno (Sham et al., 2014, Heller and Tudzynski, 2011, Kravchuk et al., 2011).

Tras elegir los genes fue necesario analizar o validar (en caso de genes ya estudiados), en primer lugar, su expresión en el sistema experimental puesto a

Resultados y discusión

punto en esta tesis doctoral, puesto que implica una infección masiva que quizá mostrara un perfil de expresión diferente al habitual. Para ello se llevó a cabo una RTqPCR, a partir de RNA extraído de los distintos tejidos antes de llevar a cabo el entrecruzamiento. Esto permitió confirmar que la mayoría de los genes seleccionados mostraban expresión diferencial en las nuevas condiciones de infección, a 24 hpi y 33 hpi (figura 69).

Resultados y discusión

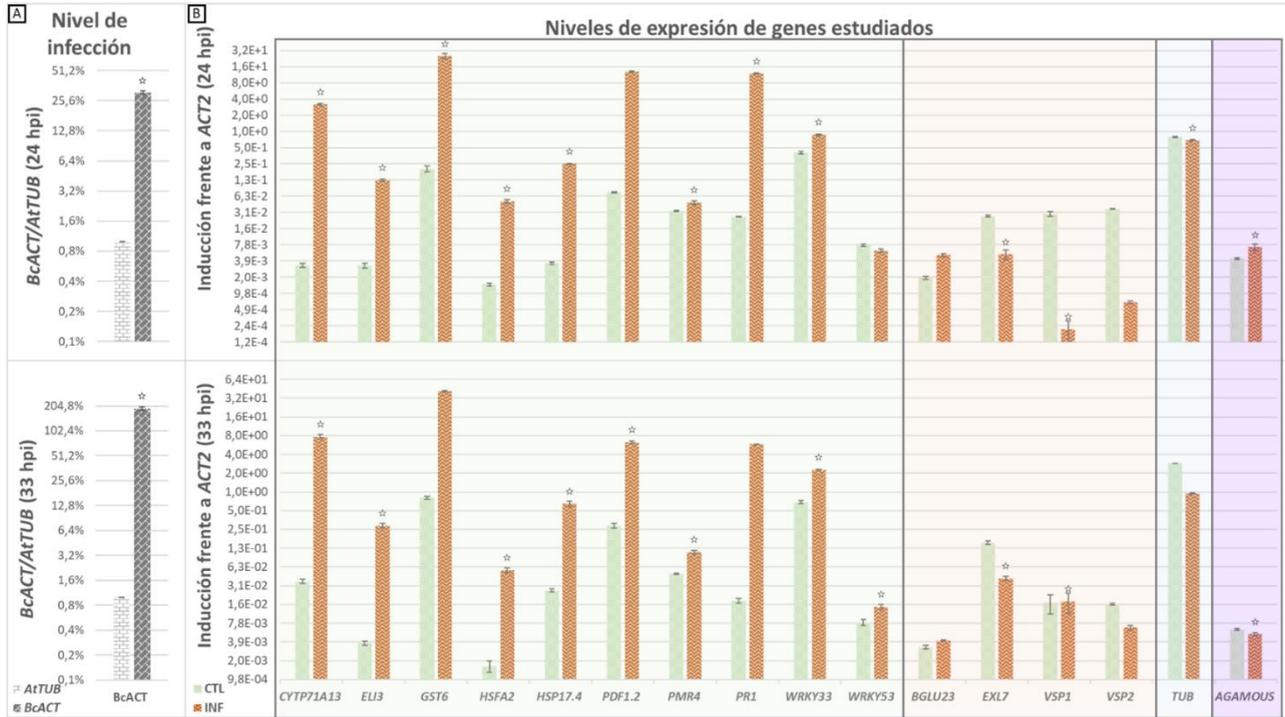


Figura 69 Caracterización del nivel de infección y de la expresión de genes de *A. thaliana* en el nuevo sistema de infección por spray

Resultados y discusión

(A) En el eje "Y" se muestra el nivel de infección representado gráficamente como la ratio de *BcACT/AtTUB* a 24 hpi y 33 hpi (arriba y abajo, respectivamente) en escala logarítmica en base 2, en el eje "X" cada gen (*AtTUB* está normalizado con respecto a él mismo, por lo que el nivel es 1). (B) Niveles de inducción de los genes de interés, medidos mediante RTqPCR en ambas condiciones y tiempos. En el eje "Y" se muestra el nivel de inducción respecto al gen constitutivo en escala logarítmica en base 2 y, en el "X" los genes examinados en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas. Sombreados en verde los genes inducidos en la INF del patosistema, en amarillo los reprimidos, en azul y morado los constitutivos (inducido y reprimido respectivamente, en ambas condiciones).

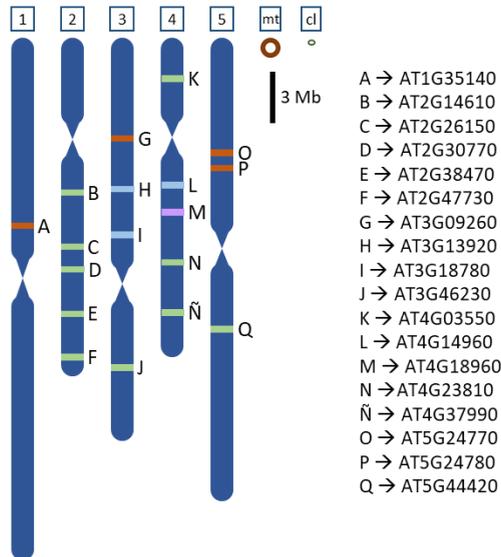


Figura 70 Genoma de *A. thaliana* con la localización de los genes estudiados

En la parte derecha se muestra una representación, a la escala indicada, de los cinco cromosomas de *A. thaliana*, además de su genoma mitocondrial y cloroplástico (mt y cl respectivamente) así como la localización aproximada de los genes estudiados, representada por una letra, y el código de color otorgado según su estado de activación (tabla 24). A la izquierda los códigos de los genes, cuyos nombres y características se incluyen en la mencionada tabla.

Resultados y discusión

Tabla 26 Genes estudiados en *A. thaliana*

Características generales de los genes estudiados en <i>A. thaliana</i>										
Nomenclatura			Características génicas				Producto			Letra
Código (AT)	Nombre	Abreviatura (alternativa)	Cromosoma	Tamaño	Exones	Expresión	Tamaño	Descripción	Función	
2G30770	Citocromo P450, familia 71, subfamilia A, polipéptido 13	<i>CYP71A13</i>	2	2218 bp	4	Inducida	503 aa	Oxidorreductasa: se une a proteínas, O ₂ , grupos hemo e iones de Fe	Biosíntesis de camalexina	D
4G37990	Gen activado por elicitor 3	<i>ELI3 (CAD-B2, CAD8 o ELI3-2)</i>	4	1764 bp	4	Inducida	359 aa	Oxidorreductasa: se une a alcoholes aromáticos	Biosíntesis de lignina	Ñ
2G47730	Transferasa-S 6 de glutatión	<i>GST6 (GST5 o GST8)</i>	2	3138 bp	6	Inducida	263 aa	Transferasa y peroxidasa: se une a glutatión	Equilibrio redox	F
2G26150	TF de choque térmico A2	<i>HSFA2</i>	2	1715 bp	2	Inducida	345 aa	TF: se une a la caja HSE (5'-AGAAnnTTCT-3')	Respuesta a estreses varios	C
3G46230	Proteína de choque térmico 17.4	<i>HSP17.4</i>	3	724 bp	1	Inducida	156 aa	Proteína de choque térmico tipo chaperona	Respuesta térmica	J
5G44420	Defensina de plantas 1.2A	<i>PDF1.2</i>	5	530 bp	2	Inducida	80 aa	Proteína PR tipo defensina	Citotoxicidad frente a patógenos	Q
4G03550	Resistente 4 al oídio	<i>PMR4 (CAL512, EED3 o GSL5)</i>	4	6349 bp	5	Inducida	1780 aa	Transferasa de grupos glicosil	Biosíntesis de calosa	K
2G14610	Relacionada con patogénesis 1	<i>PR1</i>	2	760 bp	1	Inducida	161 aa	Proteína PR secretada al apoplasto	Teorizada como antifúngica o señalizadora	B
2G38470	Factor con secuencia "WRKY" N-terminal N° 33	<i>WRKY33</i>	2	2406 bp	5	Inducida	519 aa	TF: se une a la caja W (5'-TTGAC[CT]-3')	Mediación entre rutas de SA y JA	E
4G23810	Factor con secuencia "WRKY" N-terminal N° 53	<i>WRKY53</i>	4	1613 bp	2	Inducida	324 aa	TF: se une a la caja W (5'-TTGAC[CT]-3')	Respuesta a estreses oxidativos	N

Resultados y discusión

3G09260	Beta glucosidasa 23	<i>BGLU23 (PSR3.1 o PYK10)</i>	3	3305 bp	13	Reprimida	524 aa	Enzima catabólica: homodimeriza, se une a proteínas, proteasas, glúcidos y Cu	Metabolismo de carbohidratos	G
1G35140	Similar 7 a <i>exorodium</i>	<i>EXL7 (PHI-1)</i>	1	1132 bp	1	Reprimida	309 aa	Desconocido: posiblemente interacciona con BR	Crecimiento	A
5G24780	Proteína de almacenamiento vegetativo 1	<i>VSP1</i>	5	1612 bp	3	Reprimida	271 aa	Fosfatasa: se une a cationes divalentes de Mg, Co, Zn y Mn	Almacenamiento de nutrientes	O
5G24770	Proteína de almacenamiento vegetativo 2	<i>VSP2</i>	5	1749 bp	3	Reprimida	265 aa	Fosfatasa: se une a cationes divalentes de Mg, Co, Zn y Mn	Almacenamiento de nutrientes	P
3G18780	Actina 2	<i>ACT2 (DER1 o FIZ2)</i>	3	2363 bp	4	Constitutiva	377 aa	Proteína estructural: se une a proteínas y ATP	Componente del citoesqueleto	I
3G13920	Factor eucariótico de iniciación de la traducción 4A-1	<i>EIF4A1 (RH4 o TIF4A1)</i>	3	2744 bp	4	Constitutiva	415 aa	Helicasa: se une a proteínas, RNA, ATP, cadmio	Regulación de la traducción	H
4G14960	Tubulina alfa 6	<i>TUB (TUA6)</i>	4	2196 bp	3	Constitutiva	450 aa	Proteína estructural: se une a proteínas y GTP	Componente de microtúbulos	L
4G18960	Proteína homeótica floral AGAMOUS	<i>AG</i>	4	5684 bp	9	Constitutiva	252 aa	TF: se une a la caja CArG	Regulación de la floración	M

Sombreados en verde los genes de expresión activa en la INF del patosistema, en rosado los reprimidos, en azul y orado los constitutivos (activos y reprimidos en ambas condiciones). La columna final indica la letra asignada a los genes en el esquema (figura 70).

3.3.3.2. Estudio epigenético de *CYP71A13*, *ELI3*, *BGLU23*, *EXL7* y *VSP2*

Tras valorar los resultados de la expresión y realizar algunas pruebas de ChIP previas (datos no mostrados) de estos genes, se seleccionaron, aparte de *PR1*, dos genes más inducidos y tres genes reprimidos:

Inducidos

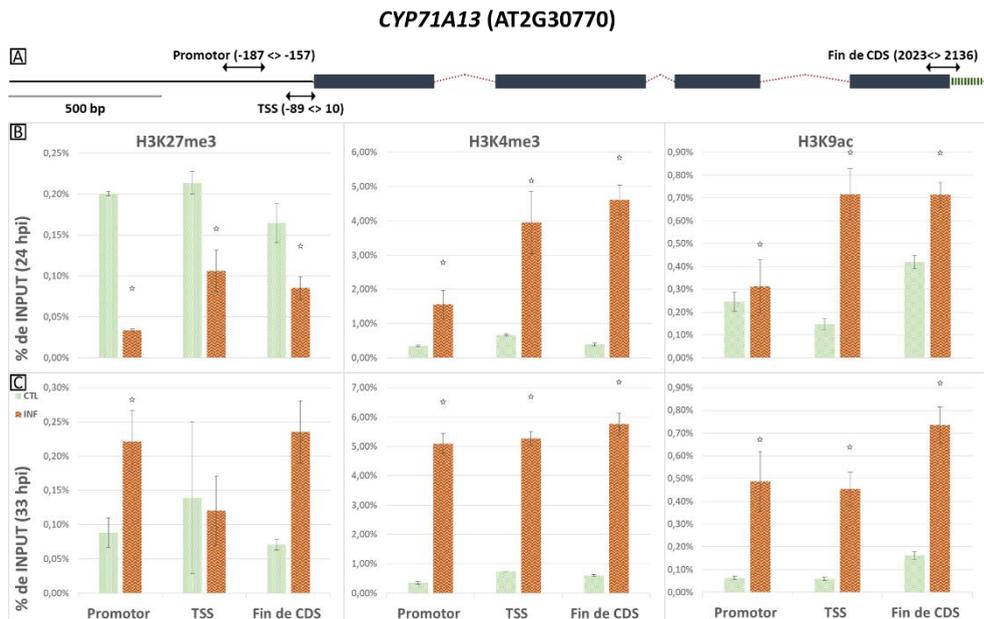


Figura 71 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen *CYP71A13*

(A) Esquema del gen *CYP71A13* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIPqPCR. (B y C) Resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3K27me3, H3K4me3 y H3K9ac con respecto al INPUT. En la parte superior (B) a 24 hpi y en la inferior (C) a 33 hpi. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas.

Destacó *CYP71A13* por su enorme inducción en respuesta a *B. cinerea* y al estrés oxidativo (Sham et al., 2014), además este gen codifica una citocromo P450 implicada en la ruta de biosíntesis de la fitoalexina camalexina, esencial contra hongos necrótrofos, incluido *B. cinerea* (Thomma et al., 1999). También, en dicha ruta, la enzima oxidorreductasa que codifica compite por el sustrato con la enzima

Resultados y discusión

NIF1, que da lugar a la auxina IAA, inductora del crecimiento en detrimento de la respuesta de defensa. El gen no depende directamente de las principales hormonas, aunque su inducción esta mediada por *WRKY33*, otro de los genes estudiados, que codifica un TF clave en la regulación de las respuestas de defensa (sección 1.5.6.1.), en las que están implicados el SA y el JA. *CYP71A13* es un gen del cromosoma dos, de un tamaño considerable (2218 bp) y una complejidad media (cuatro exones). Se examinaron tres regiones incluyendo el promotor, la zona flanqueando el TSS y el último exón, en el límite entre la CDS y la 3'-UTR. A 24 hpi, el gen mostró la mayor inducción del nuevo sistema (980,2 veces), que a 33hpi fue considerablemente menor, viéndose superada por la de *PR1*.

Tal como se observó en *PR1*, la inducción de este gen se correlacionó con un sólido enriquecimiento en las modificaciones activadoras H3K4me3 y H3K9ac, en las tres zonas estudiadas. Estas modificaciones no variaron mucho entre los dos tiempos de infección estudiados, salvo por un mayor enriquecimiento de H3K9ac en el promotor a las 33 hpi. Al contrario de lo esperado, por los datos disponibles en la bibliografía para esta marca (Li et al., 2007), el mayor incremento en las marcas activadoras se produjo en el interior del gen y no en la zona del promotor y la TSS. Con respecto a la modificación represora H3K27me3, se observó un perfil similar al obtenido en *PR1*, mostrando un claro empobrecimiento de la misma en las tres zonas estudiadas a las 24 hpi, coincidiendo con lo descrito previamente para esta marca en otros genes (Berr et al., 2010). Sin embargo, a las 33 hpi solo se observaron diferencias significativas en el promotor, en el que la marca estaba menos reducida que a las 24 hpi, coincidiendo con su menor inducción en este tiempo.

Los resultados obtenidos apoyan la presencia de las marcas H3K4me3 y H3K9ac en diferentes regiones de los genes inducidos en respuesta a *B. cinerea*, así como la posible relevancia del balance de distintas modificaciones en la regulación transcripcional en este patosistema.

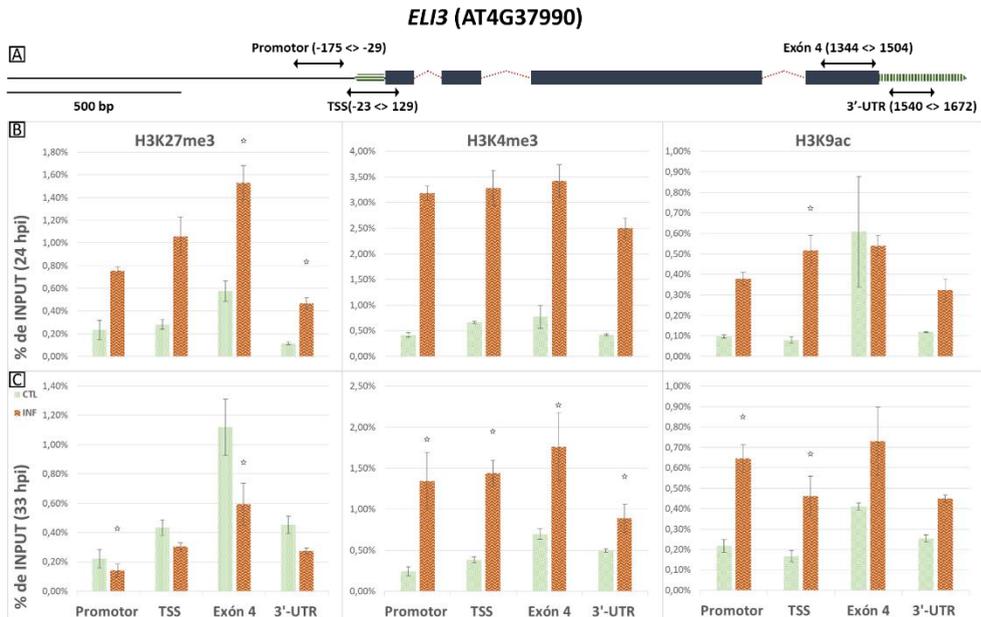


Figura 72 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen *ELI3*

(A) Esquema del gen *ELI3* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIPqPCR. (B y C) Se muestran los resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3K27me3, H3K4me3 y H3K9ac con respecto al INPUT. En la parte superior (B) a 24 hpi y en la inferior (C) a 33 hpi. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas.

Otro de los genes seleccionado para su análisis fue *ELI3*, que codifica una oxidoreductasa NADP⁺ de alcoholes aromáticos implicada en la síntesis de lignina para el reforzamiento de la pared celular, especialmente en respuesta a patógenos, que depende de la ruta del ET (Kiedrowski et al., 1992). Este gen se eligió porque, en la bibliografía, era el segundo gen más inducido en respuesta a la infección por *B. cinerea* y el más inducido en estrés oxidativo (Sham et al., 2014). *ELI3* se encuentra en el cromosoma cuatro y es algo menor que *CYP71A13*, tanto en tamaño total, como de zona codificante (60 % del total, frente a un 68 % de dicho gen), pero tiene una complejidad similar (también posee cuatro exones). En este caso se examinaron cuatro zonas, incluyendo el promotor y la TSS, así como dos zonas adicionales en el último exón, una en la región codificante y la otra en la 3'-UTR. Transcripcionalmente mostró un nivel de inducción similar a 24 y 33 hpi, que

Resultados y discusión

fue mucho menor que el de *CYP71A13* (unas diez veces menos a tiempo corto (figura 69)).

Las marcas epigenéticas observadas en este caso no fueron muy reproducibles. A 24 hpi solo se pudo establecer claramente el aumento en la INF de la marca H3K9ac en la zona TSS y de la modificación represora H3K27me3 en el exón cuatro y la 3'-UTR. Este último perfil, sin embargo, se invirtió a 33 hpi, decreciendo en la INF en el promotor y el exón cuatro. Con respecto a las modificaciones activadoras, H3K4me3 aumentó a 33 hpi en todas las zonas analizadas, mientras que H3K9ac incrementó en el TSS y el promotor.

Reprimidos

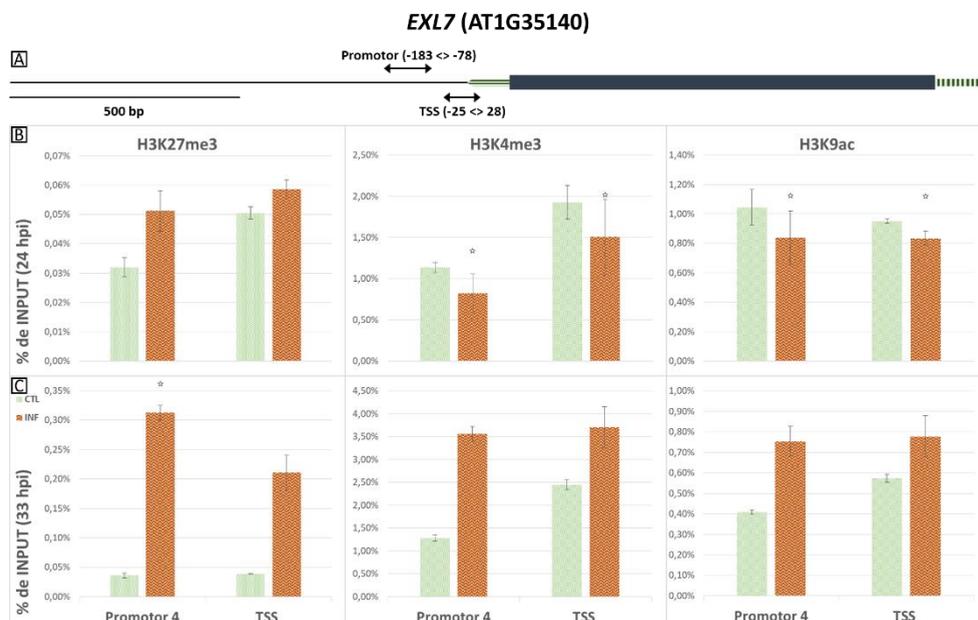


Figura 73 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen *EXL7*

(A) Esquema del gen *EXL7* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIPqPCR. (B y C). Se muestran los resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3K27me3, H3K4me3 y H3K9ac con respecto al INPUT. En la parte superior (B) a 24 hpi y en la inferior (C) a 33 hpi. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas.

Entre los genes de expresión reprimida se eligió “Similar 7 a exorodium” (*EXL7*), por ser el gen más reprimido en condiciones de estrés oxidativo y el vigesimonoveno en infección por *B. cinerea*. Al igual que *PR1* su función no es conocida, pero es una proteína excretada y se teoriza que puede tener un papel en el crecimiento dependiente de BRs y bajo estrés químico (escasez de carbono (Schroder et al., 2011)). *EXL7*, localizado en el cromosoma uno y de tamaño medio, es sencillo en su estructura conteniendo un solo exón. Mostró una clara represión en las nuevas condiciones experimentales, que resultó estable en ambos tiempos (figura 69). En el estudio epigenético se observó que, a 24 hpi, las marcas activadoras H3K4me3 y H3K9ac estaban empobrecidas, como cabría esperar, en las zonas analizadas (promotor y TSS), aunque estas resultaron muy variables entre réplicas a 33 hpi, lo que no permitió establecer la evolución temporal de su patrón de marcas (figura 73). Por su parte, la marca represora H3K27me3 no mostró cambios significativos a 24 hpi con respecto al CTL, pero sí incrementó a 33 hpi en la zona del promotor. Estos resultados indican que, en este caso, la represión temprana parece asociada a la reducción de marcas activadoras, mientras que el incremento de la marca represora se asocia con la represión a tiempo más largo, confirmando la importancia del balance de marcas en la regulación de estos genes de respuesta.

El gen “beta glucosidasa 23” (*BGLU23*), se seleccionó por ser el más reprimido en la infección por *B. cinerea* y estar regulado también frente al estrés oxidativo. Codifica una enzima que se localiza en el retículo endoplasmático y se ha descrito que participa en el control de la colonización radicular por parte del hongo mutualista endófito *Piriformospora indica*, reprimiendo la respuesta defensiva (Sherameti et al., 2008). *BGLU23* se localiza en el cromosoma tres, siendo el gen más grande de los estudiados a nivel epigenético, con 3305 bp, y una gran complejidad en su estructura al contar con trece exones. En este caso el estudio se limitó a la zona ubicada en la secuencia 5' del mismo, concretamente donde se localizaría el

Resultados y discusión

promotor cercano y la caja TATA, ya que, teóricamente, es allí donde se concentran las modificaciones represoras.

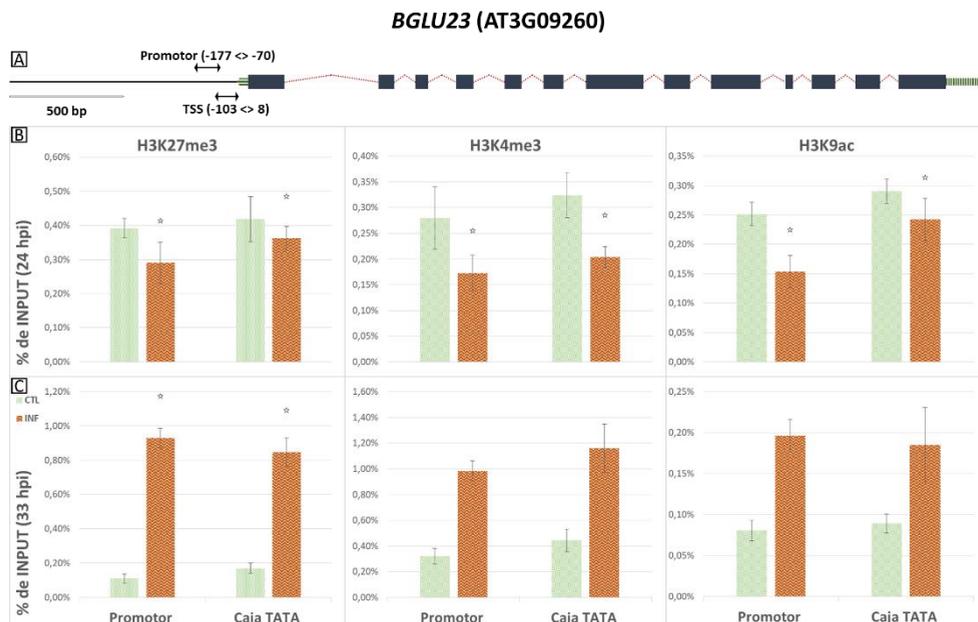


Figura 74 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen *BGLU23*

(A) Esquema del gen *BGLU23* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIPqPCR. (B y C) Se muestran los resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3K27me3, H3K4me3 y H3K9ac con respecto al INPUT. En la parte superior (B) a 24 hpi y en la inferior (C) a 33 hpi. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas.

En las nuevas condiciones de inoculación, *BGLU23* estaba levemente inducido a 24 hpi en las plantas INF, reduciéndose a 33 hpi al nivel de expresión de las plantas CTL (figura 69). Esto indicaba una tendencia a la represión más tardía que en el patosistema de referencia. Sin embargo, al determinar los cambios epigenéticos se comprobó que las marcas activadoras H3K4me3 y H3K9ac estaban reducidas en el promotor y en la zona de la caja TATA, con respecto a las plantas CTL, coexistiendo con la modificación represora H3K27me3. Esto denota una compleja regulación, basada en un balance de marcas activadoras y represoras. A las 33 hpi no se vieron cambios reproducibles en las modificaciones activadoras, mientras que la represora

aumentó significativamente en ambas zonas, hecho correlacionado con la bajada de la expresión del gen a ese tiempo.

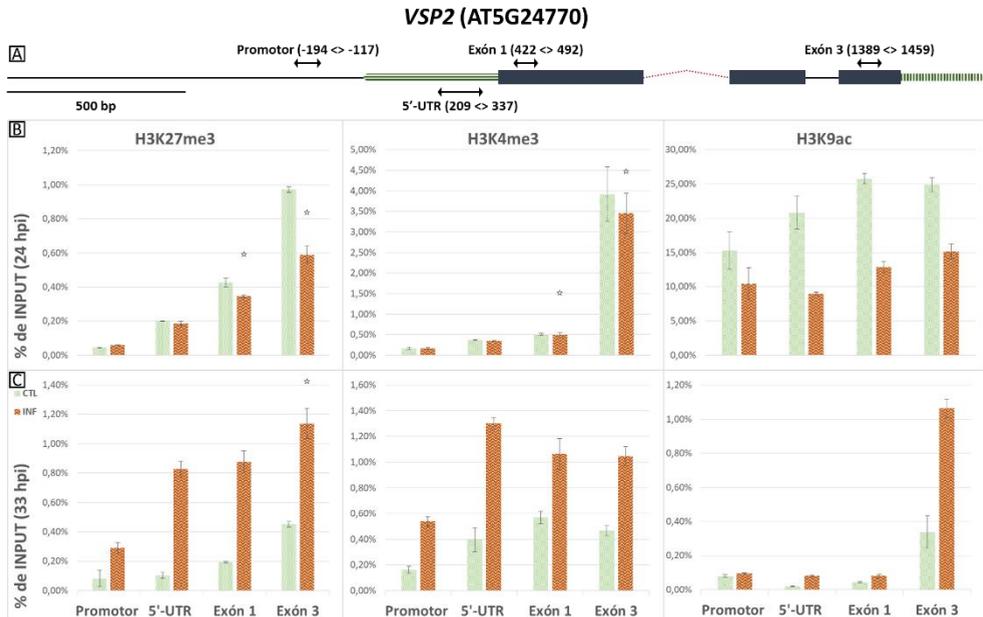


Figura 75 Análisis de las marcas epigenéticas en el gen *VSP2*

(A) Esquema del gen *VSP2* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIPqPCR. (B y C) Se muestran los resultados, de izquierda a derecha, de la normalización de H3K27me3, H3K4me3 y H3K9ac con respecto al INPUT. En la parte superior (B) a 24 hpi y en la inferior (C) a 33 hpi. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y, en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos dos réplicas biológicas.

Entre los genes reprimidos en respuesta a *B. cinerea*, en las condiciones experimentales utilizadas, también se analizaron las marcas epigenéticas en el gen que codifica la "proteína de almacenamiento vegetativo 2" (*VSP2*), principal marcador de la ruta de señalización del JA, concretamente, en su rama MYC (sección 1.5.5.3.). *VSP2* se localiza en el cromosoma cinco y presenta un tamaño moderadamente grande y una complejidad media (tres exones). En este caso se estudiaron cuatro zonas situadas en el promotor, la 5'-UTR, el exón uno y el exón tres.

Resultados y discusión

De todos los estudiados fue el gen que más claramente se reprimió a tiempo corto en las plantas infectadas por espray, lo que se suavizó a 33 hpi, probablemente debido a su posterior inducción debida a los daños ocasionados por las necrosis generadas por el hongo. Sin embargo, resultó difícil detectar las marcas estudiadas en las tres primeras zonas (promotor, 5'-UTR y exón uno). El único cambio significativo y reproducible que se detectó en las marcas activadoras fue en H3K4me3 en los exones uno y tres, donde se mostró empobrecida, cuadrando con el perfil de un gen reprimido. Respecto a la marca represora H3K27me3, a 24 hpi mostró un empobrecimiento en dichos exones, a pesar de la represión. A 33 hpi, sin embargo, se incrementó significativamente esta marca en el exón tres. Como probablemente ocurra con el resto de los genes, especialmente aquellos cuyos resultados preliminares mostraron un perfil de marcas poco reproducible y no se estudiaron en profundidad, este gen probablemente esté controlado, en mayor medida, por otras marcas o mecanismos epigenéticos.

3.4. Determinación de modificaciones epigenéticas en plantas de *S. lycopersicum* infectadas con *B. cinerea*

Una vez se corroboró la validez del protocolo puesto a punto en *A. thaliana*, se procedió a adaptarlo al patosistema *S. lycopersicum*-*B. cinerea*. Este es particularmente interesante, ya que *S. lycopersicum* constituye el modelo para plantas con genoma complejo, incluyendo un grupo de cultivos de gran importancia económica, y *B. cinerea* es un patógeno devastador y de muy difícil control.

Los estudios epigenéticos realizados en otras especies más complejas que *A. thaliana*, utilizando el ensayo de ChIP, son todavía escasos (Chen et al., 2015a, Li et al., 2014, Martínez-Aguilar et al., 2016). Por lo tanto, los estudios en *S. lycopersicum* se abordaron desde el principio paralelamente a los de *A. thaliana*, teniendo como base el único protocolo disponible para plantas de *S. lycopersicum*, con el que se

había hecho un estudio de marcas epigenéticas en un gen marcador de sequía, así como protocolos de otros cultivos comerciales (Li et al., 2014, Martínez-Aguilar et al., 2016, Chen et al., 2015b). Sin embargo, al encontrar tantos problemas en la puesta a punto, tuvo que posponerse hasta que se optimizó el protocolo para *A. thaliana*.

3.4.1. Análisis de la expresión de los genes en el nuevo sistema de infección

En este caso se utilizaron plantas de *S. lycopersicum* inoculadas por spray y muestreadas a 24 hpi, por lo que también fue esencial conocer el nivel transcripcional de los genes a estudiar en las nuevas condiciones de infección. Al igual que con *A. thaliana*, se seleccionaron varios genes (tabla 27) localizados en siete de los doce cromosomas del enorme genoma de esta planta (figura 76). Se utilizaron criterios similares, escogiendo aquellos cuya expresión en la respuesta temprana a la infección por *B. cinerea* y al estrés oxidativo estuviera inducida (Finiti et al., 2014, López-Cruz et al., 2017). Cabe destacar que, aunque estos genes están parcialmente caracterizados, gran parte de la información disponible para los mismos se basa en sus homólogos en *A. thaliana*.

Resultados y discusión

Tabla 27 Descripción de los genes estudiados en *S. lycopersicum*

Características generales de los genes estudiados en <i>S. lycopersicum</i>									
Nomenclatura			Características génicas				Producto		
Código (Solyc)	Nombre	Abreviatura (alternativa)	Cromosoma	Tamaño	Exones	Expresión	Tamaño	Descripción	Función
01g109140	Sintasa 9 de divinil éter	<i>DES (CYP74D1)</i>	1	1840 bp	2	Activa	478 aa	Descarboxilasa, monooxigenasa y oxidorreductasa: se une a grupos hemo e iones de Fe	Biosíntesis de ácido colnelico y colnelénico (antitoxina fúngica)
02g087070	Proteína de la superfamilia de las peroxidases	<i>DOX1 (α-DOX1, PADOX-1)</i>	2	3827 bp	10	Activa	639 aa	Peroxidasa: se une a grupos hemo	Respuesta a estrés oxidativo
03g122340	Lipoxigenasa	<i>LOXD</i>	3	4454 bp	8	Activa	908 aa	Dioxigenasa y oxidorreductasa: se une a cationes de Fe	Biosíntesis de oxilipinas
04g064870	Relacionada con patogénesis 2	<i>PR2</i>	4	1763 bp	4	Activa	240 aa	Glucanasa β-1,3	Degradación de glicanos de pared celular fúngica y vegetal
08g008280	Factor con secuencia "WRKY" N-terminal N° 53	<i>WRKY53</i>	8	1949 bp	3	Activa	360 aa	TF con dominio de dedo de zinc tipo C ₂ H ₂	Regulación de la transcripción en defensa a patógenos
05g015850	Factor con secuencia "WRKY" N-terminal N° 75	<i>WRKY75</i>	5	2702 bp	2	Activa	172 aa	TF con dominio de dedo de zinc tipo C ₂ H ₂	Regulación del dialogo entre las rutas del SA y JA
06g005060	Factor de elongación 1 alfa	<i>EF1a</i>	6	1781 bp	2	Constitutivamente activa	448 aa	Factor de elongación y GTPasa	Regulación de la síntesis de proteínas a nivel de traducción

Sombreados en verde los genes de inducción activa en el patosistema y en azul los constitutivamente activos.

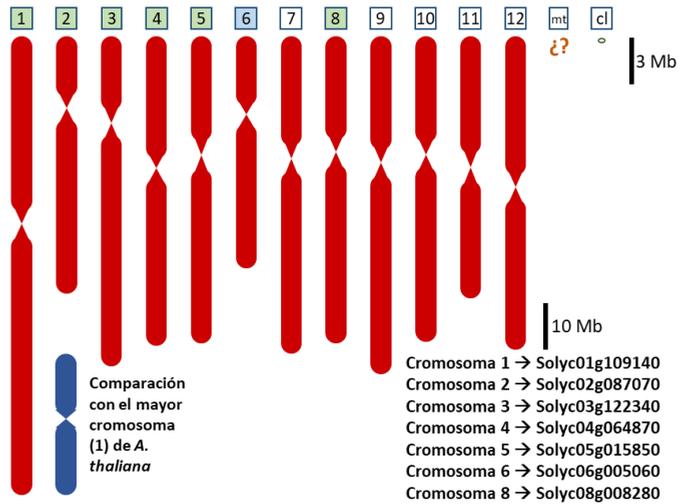


Figura 76 Genoma de *S. lycopersicum* con los genes estudiados indicados

Representación, a la escala indicada, de los doce cromosomas de *S. lycopersicum*, además de su genoma cloroplástico (cl, mt para el mitocondrial que, actualmente, no está secuenciado). Abajo a la derecha, en qué cromosoma se encuentra cada uno de los genes estudiados, con su código de *Sol Genomics* (tabla 27). Abajo, a la izquierda, el cromosoma mayor de los cinco de *A. thaliana*, en la misma escala, para la visualización de los tamaños.

Se utilizó como constitutivo el gen *EF1a*, codificante de un factor de elongación traduccional encargado de la unión de aminoácidos unidos a RNA de transferencia al sitio A del ribosoma, de forma dependiente de “Guanosín trifosfato” (GTP). Su elección se debió a que se había empleado previamente en diversos trabajos para la normalización de los resultados (Ricardi et al., 2010, Garcia-Abellan et al., 2014). Este trabajo usó *EF1a*, tanto para normalizar la expresión de los genes de la planta y el posterior análisis de marcas, como para relativizar; el gen constitutivo del hongo (*BcATUB*) y, así, poder determinar el nivel de infección en el sistema de infección por espray.

Todos los genes analizados mostraron una inducción significativa y reproducible entre réplicas a 24 hpi (figura 78). Los genes más expresados fueron *DES*, *DOX1* y *LOXD*, por este orden, perteneciendo todos ellos a la ruta de las oxilipinas, moléculas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados, que también se encuentran en animales (llamados eicosanoides) y hongos. Esa elevada expresión coincide con

Resultados y discusión

lo descrito previamente, ya que esta ruta es clave en la regulación de las defensas frente a *B. cinerea* en *S. lycopersicum* (Finiti et al., 2014). Los ácidos grasos pasan, al menos, por un paso de oxidación dependiente de enzimas como lipooxigenasas, peroxigenasas o dioxigenasas (Vellosillo et al., 2007), tras el cual pueden sufrir diversas modificaciones secundarias, pudiendo convertirse en una amplia variedad de moléculas como dioles, aldehidos, jasmonatos o divinil éteres, con diferentes funciones. Entre los papeles que desempeñan en las plantas se encuentran el crecimiento, la reproducción y la resistencia hacia patógenos y otros estreses (Vellosillo et al., 2007).

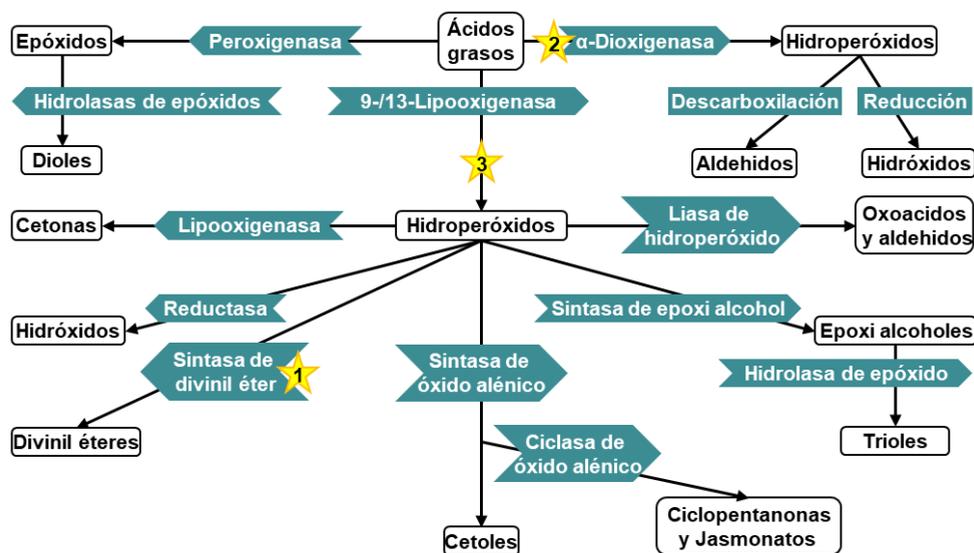


Figura 77 Rutas principales de oxidación de ácidos grasos en plantas

Partiendo de ácidos grasos en el centro de la parte superior se ramifican tres rutas de oxidación de los ácidos grasos. La ruta principal los convierte en hidroperóxidos por lipooxigenasas y, derivando de éstos, se producen la mayoría de la oxilipinas entre las que se encuentran las de la ruta del JA y los divinil éteres. Los ácidos grasos también pueden ser convertidos en hidroperóxidos mediante dioxigenasas, formando una rama secundaria. Figura traducida y adaptada de Vellosillo et al. (2007). En azul con forma de flecha se representan las enzimas, con forma cuadrada las reacciones espontáneas y en cuadros con marco oscuro los distintos sustratos y productos. Las enzimas codificadas por los genes analizados en este trabajo se indican con estrellas: 1: *DES*; 2: *DOX1* y 3: *LOXD*

El gen *DES* codifica la enzima “sintasa 9 de divinil éter” (*DES*), perteneciente a la familia 74 del citocromo P450 y que convierte hidroperóxidos en divinil éteres, como el ácido colneleico y colnelénico, que tienen actividad antifúngica (Itoh and Howe, 2001). Este gen mostró la mayor inducción de todos los estudiados a 24 hpi

en el patosistema utilizado, llegando a estar más de 1000 veces incrementada su expresión en la INF, frente a la CTL (figura 78).

El gen “ α -dioxigenasa 1” (*DOX1*) codifica una enzima que convierte ácidos grasos en hidroperóxidos, en una rama secundaria de las oxilipinas. De esta surgen, posteriormente, aldehídos e hidróxidos (por descarboxilación y reducción, respectivamente). Se ha demostrado su papel en la protección de las plantas de *A. thaliana* contra el daño oxidativo y la muerte celular (De Leon et al., 2002, Tirajoh et al., 2005). El gen *DOX1* mostró también una inducción muy alta, aunque aproximadamente la mitad que *DES* (figura 78), indicando que la ruta de las oxilipinas estaba altamente inducida en varias ramas.

Finalmente, el gen “lipooxigenasa D” (*LOXD*) codifica una enzima encargada de transformar los ácidos grasos en los hidroperóxidos centrales de la ruta que, posteriormente, podrán convertirse en divinil éteres (gracias a la acción de *DES*) o en hormonas de la ruta del JA, como el OPDA, el propio JA y el MeJA (Finiti et al., 2014, Vicedo et al., 2009). Este gen se indujo bastante menos que los otros dos, con respecto a la CTL, seguramente porque su función no es tan específica en defensa, lo que se corresponde con una expresión mayor en la CTL que en el caso de los genes *DES* y *DOX1* (figura 78).

Por otro lado, el gen “relacionado con patogénesis 2” (*PR2*) codifica una enzima glucanasa β -1,3 capaz de degradar la pared celular fúngica, así como componentes de la pared vegetal como la calosa, un polisacárido con funciones estructurales y defensivas. *PR2* es sensible al balance redox, por lo que constituye un marcador de estrés oxidativo y está regulado por SA frente a patógenos como *P. syringae*. El ABA también regula la expresión de este gen, de forma negativa o positiva, dependiendo del patógeno, por lo que promoverá o limitará la deposición de calosa (Oide et al., 2013). En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo *PR2* experimentó una inducción significativa, similar a la de *LOXD*, mostrando una considerable expresión en ausencia de infección.

Resultados y discusión

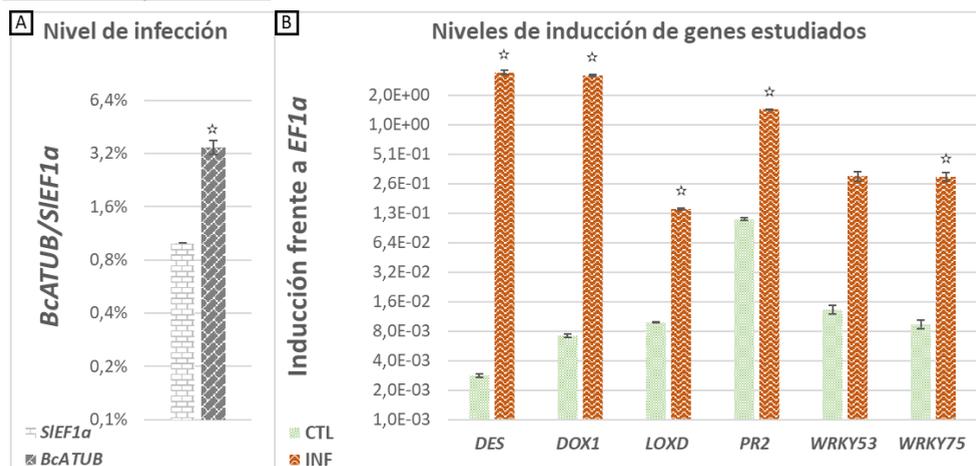


Figura 78 Nivel de infección y niveles de inducción de los genes estudiados en *S. lycopersicum*

(A) En el eje de las "Y" se muestra el Nivel de infección representado gráficamente como las ratios de *BcATUB/SIEF1a* en escala logarítmica en base 2, en el de las "X", cada gen (*SIEF1a* está normalizado con respecto a él mismo, por lo que el nivel es 1). (B) Niveles de inducción de los genes de interés medidos mediante RTqPCR, en ambas condiciones. En el eje "Y", se muestra el nivel de inducción respecto al gen constitutivo en escala logarítmica en base 2 y, en el "X", los genes examinados en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

Finalmente, también se examinaron genes que codifican TFs de la familia WRKY, como en el caso de *A. thaliana*, concretamente *WRKY53* y *WRKY75*. El primero está relacionado con el fenómeno del *priming* y la respuesta al estrés oxidativo, siendo considerado un marcador de la respuesta PTI (Yang et al., 2015, Finiti et al., 2014). Aunque *WRKY53* mostró inducción en las nuevas condiciones experimentales, no fue tan reproducible como en los otros genes estudiados (figura 78).

WRKY75 se ha descrito que está inducido frente a estreses abióticos, como sequía o calor, y bióticos como la respuesta a necrófitos, incluido *B. cinerea* (Kim et al., 2014). En el nuevo patosistema se indujo considerablemente, incluso más que *LOXD* (figura 78). En un estudio realizado paralelamente al de la presente tesis por el grupo de investigación, la inducción de *WRKY75* en plantas de *S. lycopersicum* infectadas con *B. cinerea* se correlacionó con un aumento de los niveles de JA y de JA-Ile, y con la expresión de un miRNA específico, indicando que constituye un regulador transcripcional de esta ruta (Lopez-Galiano et al., 2018).

3.4.2. Modificaciones realizadas en los distintos protocolos

Tabla 28 Resumen de las diferencias entre los protocolos de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*

Diferencias entre protocolos de <i>A. thaliana</i> y <i>S. lycopersicum</i>			
Paso		<i>A. thaliana</i>	<i>S. lycopersicum</i>
Edad de las plantas		5 semanas	4 semanas
Plantas totales (CTL + INF)		24 plantas	16 plantas
Concentración de conidiosporas		10 ⁵ conidiosporas/mL	5·10 ⁴ conidiosporas/mL
Hojas (foliolos) a muestrear		20 a 30 hojas	30 a 40 foliolos
Resuspensión en tampón de	Entrecruzamiento	160 mL	235 mL
	Lisis Nuclear	450,0 µL	225,0 µL
Tiempo total de sonicación		300 s	150 s
Volumen de alícuotas de cromatina		65,0 µL	32,5 µL
Velocidad de centrifugación en	Limpieza tisular	3000 RCFs	850 RCFs
	Limpieza celular	12000 RCFs	13680 RCFs
	Lisis nuclear	16000 RCFs	24320 RCFs

Extracción de cromatina

Al tratar de aplicar los protocolos utilizados en *A. thaliana*, fueron necesarios diversos cambios para obtener unos resultados reproducibles en plantas de *S. lycopersicum* (tabla 29).

Los cambios más significativos fueron los relacionados con los volúmenes utilizados en la extracción de la cromatina y en la sonicación, pues esta planta resultaba más susceptible a la fragmentación y se obtuvieron estelas con fragmentos de DNA demasiado pequeños para el ensayo de ChIP. Esto se solucionó utilizando un ciclo de 150 s (figura 79). Por otra parte, se analizaron las modificaciones activadoras que dieron mejor resultado en *A. thaliana* (H3K4me3 y H3K9ac), utilizando H3 como control. También se puso a punto el análisis de la presencia de la RNAPII en las distintas regiones de los genes estudiados, utilizando un anticuerpo contra la RNAPII (*Anti-RNA polymerase II CTD repeat YSPTSPS antibody [8WG16] - ChIP Grade, ref. ab817, Abcam*), validado para plantas (Shin et al., 2013).

Resultados y discusión

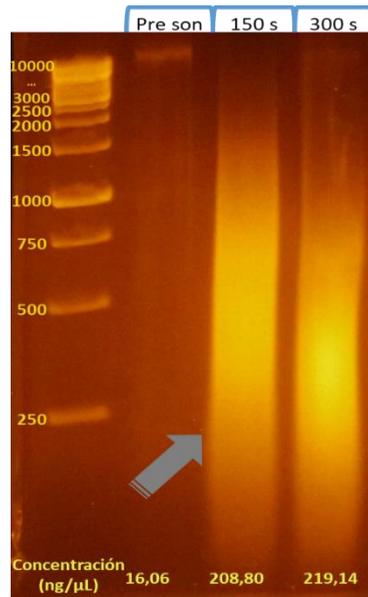


Figura 79 Análisis de la cromatina entrecruzada y sonicada en *S. lycopersicum*

Se muestra el resultado de una electroforesis en gel de agarosa en la que se analizó el DNA extraído de la cromatina obtenida de plantas de tomate. De izquierda a derecha: Patrones de peso molecular, cromatina no sonicada (DNA genómico), cromatina sonicada durante 150 s y cromatina sonicada durante 300 s. La flecha gris señala la condición que dio mejores resultados (150 s).

CHIP

Se realizó un ensayo de inmunoprecipitación con muestras de cromatina obtenidas de plantas CTL e INF con *B. cinerea*, utilizando anti-H3K4me3 y anti-H3. Los genes estudiados fueron *LOXD*, *PR2* y *WRKY53*. El análisis previo de una zona del cuerpo de dichos genes mostró el enriquecimiento de la marca H3K4me3, correlacionado con su inducción (figura 80). El nivel de recuperación y el incremento en la marca a 24 hpi, respecto al de las plantas CTL, fue similar al encontrado en genes inducidos en *A. thaliana*. Además, el análisis de H3 indicó que la CTL e INF mostraron un nivel similar de esta histona, como se había visto en el otro cultivo. Sin embargo, llamaba la atención que los niveles de recuperación de H3 eran inusualmente bajos comparados con los obtenidos en *A. thaliana* y que, en ocasiones, eran incluso inferiores a los de H3K4me3 (figura 80). Era evidente que la recuperación de H3 debía ser claramente superior a la de la marca H3K4me3, ya que la segunda

constituye una subpoblación de la primera. Este resultado llevó a revisar las condiciones utilizadas con respecto a las *dynabeads*, la cromatina y el anticuerpo (sección 3.2.2.2.) y se consideraron las posibles causas del resultado obtenido para H3.

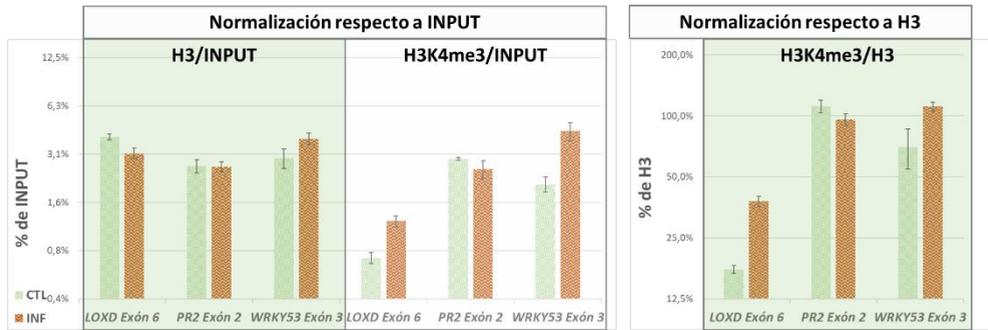


Figura 80 Análisis de la marca epigenética H3K4me en *S. lycopersicum*

A la izquierda se muestran las normalizaciones con respecto al INPUT en escala logarítmica en base 2 de H3 y H3K4me3. A la derecha la normalización con respecto a H3 de H3K4me3 en los mismos genes. En el eje "Y", se muestra el porcentaje de recuperación y, en el "X", los genes examinados en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). En esta inmunoprecipitación se usó una cantidad de cromatina elevada, de 16,5 µg.

Los datos obtenidos podrían deberse a que el anticuerpo anti-H3 estuviera saturado por la cromatina, lo cual explicaría que su porcentaje de recuperación respecto al INPUT fuera tan bajo que no se pudieran observar diferencias entre CTL e INF. La excesiva cantidad de cromatina se uniría al anticuerpo disponible hasta saturarlo, de forma que la mayor parte de esta se perdería en el sobrenadante durante el ensayo de CHIP. Por ello, al normalizar con el INPUT (muestra total, altamente concentrada en este caso), se obtendría una recuperación muy baja. La cantidad de anticuerpo que se usó inicialmente, fue la misma que la utilizada en el protocolo de *A. thaliana* y la concentración de cromatina de la réplica empleada, supuso que la ratio cromatina/anticuerpo fue de 22,1 µg/µg, cercanos a los 25 µg/µg recomendados (tabla 21). Por lo tanto, aunque en principio las condiciones del ensayo de CHIP estaban dentro del rango óptimo, se repitió la inmunoprecipitación reduciendo sensiblemente la cantidad de cromatina e incrementando la de anticuerpo anti-H3. De esta forma la ratio era de 4,4 µg/µg, bastante por debajo de lo recomendado, sin embargo, en estas condiciones se

Resultados y discusión

obtuvieron unos niveles de recuperación de H3 parecidos a los de *A. thaliana* y una ratio H3K4me3/H3 razonable (figura 81).

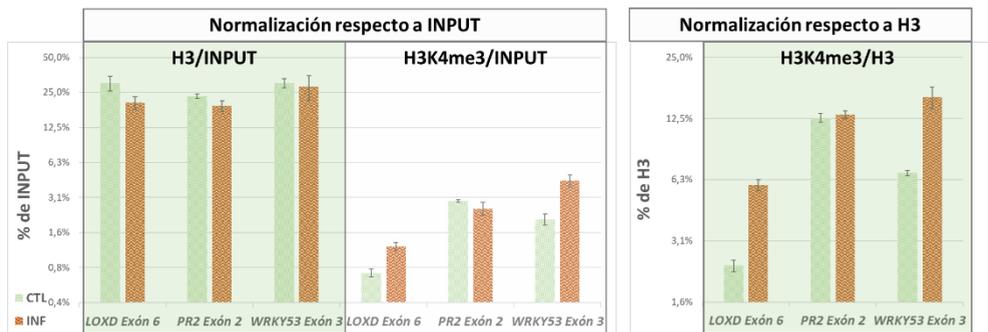


Figura 81 Resultados de la inmunoprecipitación con H3 y H3K4me en *S. lycopersicum* tras modificar el protocolo

A la izquierda se muestran las normalizaciones con respecto al INPUT en escala logarítmica en base 2 de H3 y H3K4me3. A la derecha la normalización con respecto a H3 de H3K4me3 en los mismos genes. En el eje "Y", se muestra el porcentaje de recuperación y, en el "X", los genes examinados en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). En esta inmunoprecipitación se usó una cantidad de cromatina elevada, de 6,6 µg.

Al analizar la presencia de H3 en los genes de *S. lycopersicum* estudiados, se observó que en algunas zonas de los más inducidos se recuperaba menos H3 con respecto al INPUT en las INF que en las CTL (figura 82), aunque no se podía descartar que se debiera a interferencias del tejido necrosado en la inmunoprecipitación del tejido. El hecho de que el nivel de recuperación de H3 en el gen constitutivo fuera similar en las plantas CTL y en las INF, indicaba que las diferencias observadas se podrían correlacionar con el aumento de transcripción en este cultivo, que podría estar asociado a una menor densidad de nucleosomas en las plantas INF. Por ello se consideró que era una característica propia de este cultivo y se decidió normalizar los resultados obtenidos para las marcas de histonas epigenéticas, con respecto a H3 y no al INPUT, como se hizo en *A. thaliana*. Los resultados del análisis realizado, con anti-RNAPII, no se normalizaron respecto a H3 al no depender tan directamente de esta proteína (por no ser una subpoblación de la misma).

Resultados y discusión

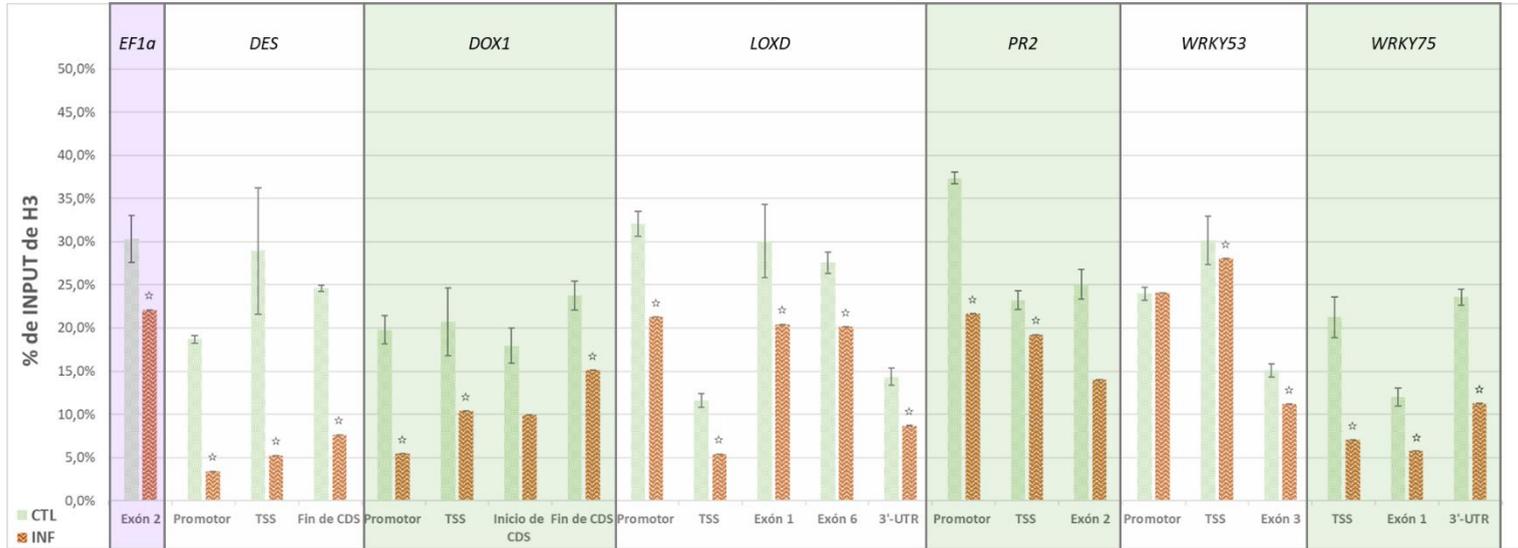


Figura 82 Estudio epigenético de H3 en *S. lycopersicum*

Se observan los resultados de plantas de *S. lycopersicum* infectadas con *B. cinerea* tras 24 h (y CTL). Se muestra la normalización de H3 con respecto al INPUT en los siete genes estudiados, el constitutivo *EF1a* (sombreado en lila) y los inducidos *DES*, *DOX1*, *LOXD*, *PR2*, *WRKY53* y *WRKY75* sombreados en amarillo claro o verde alternativamente para distinguirlos con facilidad. En el eje "Y", se muestra el porcentaje de recuperación y, en el "X", las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

Resultados y discusión

3.4.3. Estudio epigenético de *EF1a*, *DES*, *DOX1*, *LOXD*, *PR2*, *WRKY53* y *WRKY75*

Inicialmente se analizó la marca H3K4me3, ya que era la que mejores resultados había ofrecido con *A. thaliana*. Una vez validado el protocolo en este patosistema con dicha marca, se analizó la presencia de la otra marca activadora H3K9ac que, como se ha mencionado anteriormente, suele acompañar a H3K4me3. También se puso a punto la detección de la RNAPII en las distintas regiones de los genes estudiados, utilizando anti-RNAPII, siendo la primera vez que se analiza su presencia en plantas de *S. lycopersicum*.

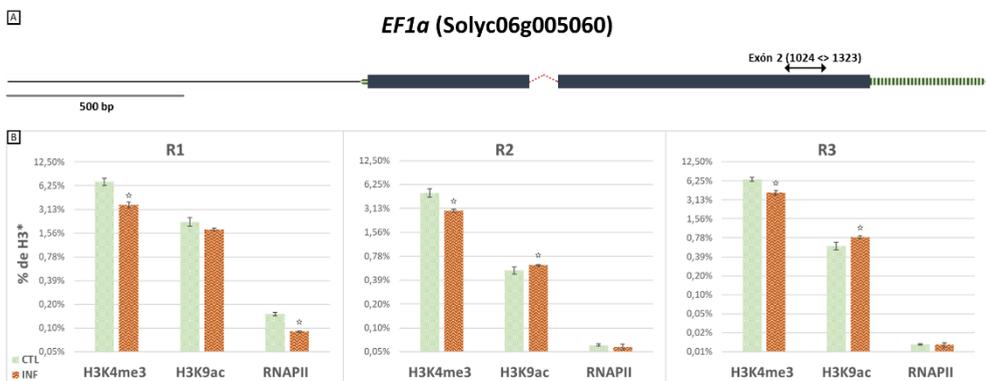


Figura 83 Esquema y resultados de *EF1a*

(A) Nombre, código y esquema del gen *EF1a* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIP y RTqPCR. (B) De izquierda a derecha: normalización de H3K4me3 y H3K9ac con respecto a H3 y de RNAPII con respecto a INPUT. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

El gen *EF1a* utilizado como constitutivo se encuentra en el cromosoma seis de *S. lycopersicum*, siendo de tamaño mediano, con dos exones y un pequeño intrón (4,5 % de la secuencia total). En este caso, se estudió una zona localizada en la parte final de la CDS del segundo exón y, aunque se observó un leve enriquecimiento de la modificación H3K4me3 en las plantas INF, no se observaron diferencias significativas en H3K9ac, ni en la RNAPII. Esto llevó a plantearse la posibilidad de

normalizar respecto a este gen constitutivo los resultados obtenidos en los genes estudiados (sección 2.9.). Sin embargo, aunque los resultados mejoraban sensiblemente en cuanto a reproducibilidad, no se han incluido porque es un tipo de normalización que raramente se utiliza y que complica notablemente los cálculos. Además, estrictamente habría que normalizar cada zona de los genes analizados con su equivalente en este gen, lo cual, por la diversa naturaleza de los genes, no siempre resulta factible (Haring et al., 2007).

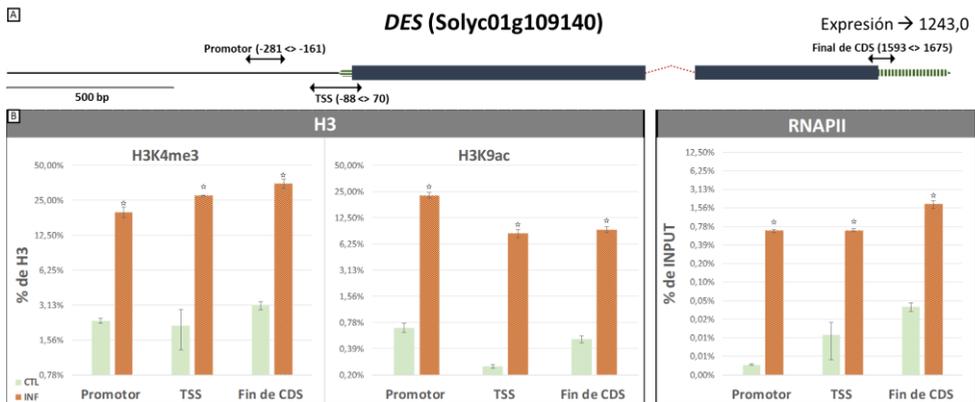


Figura 84 Esquema y resultados de *DES*

(A) Nombre, código y esquema del gen *DES* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIP y RTqPCR. En la parte superior izquierda se muestra la ratio de expresión INF/CTL de las plantas de *S. lycopersicum* a 24 hpi con *B. cinerea*. (B) De izquierda a derecha: normalización de H3K4me3 y H3K9ac con respecto a H3 y de RNAPII con respecto a INPUT. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

DES es un gen de tamaño medio, con unas características estructurales similares a *EF1a* (dos exones separados por un pequeño intrón), que se encuentra en el cromosoma seis. En este gen se estudiaron tres regiones: la correspondiente a la zona del promotor, la TSS y el final de la CDS. Fue el que presentó mayor inducción en este patosistema, lo que se correlacionó con un significativo enriquecimiento en las modificaciones activadoras H3K4me3 y H3K9ac, así como con la presencia de la RNAPII en las tres zonas estudiadas (promotor, TSS y fin de la CDS (figura 84)).

Resultados y discusión

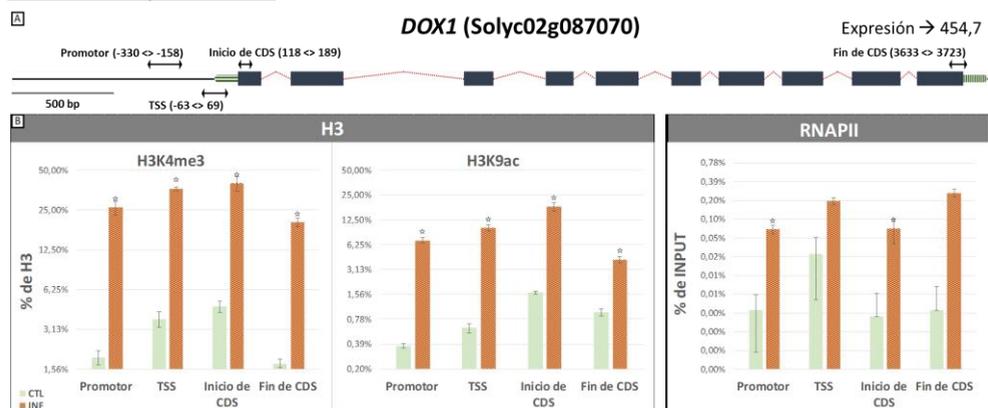


Figura 85 Esquema y resultados de *DOX1*

(A) Nombre, código y esquema del gen *DOX1* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIP y RTqPCR. En la parte superior izquierda se muestra la ratio de expresión INF/CTL de las plantas de *S. lycopersicum* a 24 hpi con *B. cinerea*. (B) De izquierda a derecha: normalización de H3K4me3 y H3K9ac con respecto a H3 y de RNAPII con respecto a INPUT. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

DOX1 es un gen de tamaño grande y de bastante complejidad estructural, al poseer diez exones, que se encuentra en el cromosoma dos. En este caso se estudiaron cuatro regiones: la zona del promotor, la TSS, el inicio de la CDS (situado en el primer exón) y el final de la CDS del último exón. Su nivel de inducción fue elevado, aunque sensiblemente menor que el de *DES*. Las dos modificaciones de histonas analizadas, mostraron un aumento significativo y similar en todas las zonas analizadas. En este caso la RNAPII solo mostró un enriquecimiento reproducible en el promotor y en el inicio de la CDS del exón uno, aunque con unos niveles de recuperación considerablemente inferiores a los encontrados en *DES*.

LOXD es el gen más grande de los estudiados a nivel epigenético en ambos patosistemas, con 4454 bp y ocho exones de tamaños bastante homogéneos. Se localiza en el cromosoma tres y muestra cierta similitud estructural con *DOX1*. Se induce significativamente a 24 hpi, aunque a un nivel decenas de veces menor que *DES* y *DOX1*. En este gen se analizaron cinco regiones en los ensayos de H3 y

H3K4me3 (promotor, TSS, exón uno, exón seis y 3'-UTR) y todas, excepto el exón seis, en el resto de ensayos de ChIP.

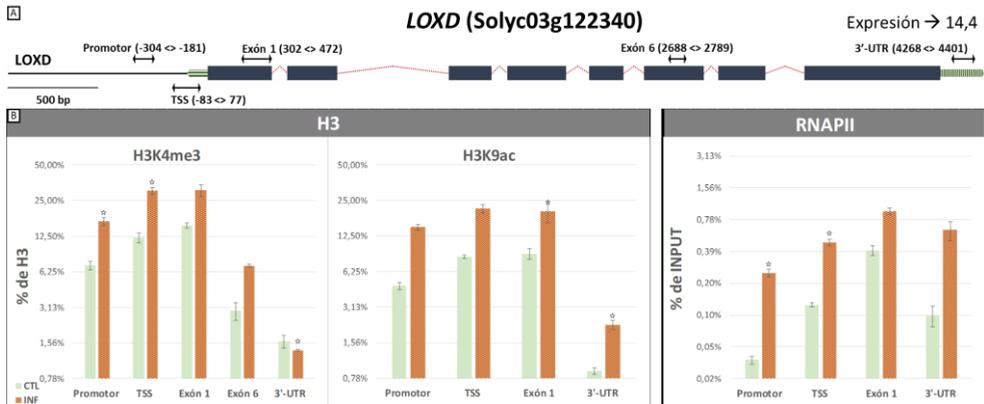


Figura 86 Esquema y resultados de *LOXD*

(A) Nombre, código y esquema del gen *LOXD* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIP y RTqPCR. En la parte superior izquierda se muestra la ratio de expresión INF/CTL de las plantas de *S. lycopersicum* a 24 hpi con *B. cinerea*. (B) De izquierda a derecha: normalización de H3K4me3 y H3K9ac con respecto a H3 y de RNAPII con respecto a INPUT. En el eje “Y” se muestra el porcentaje de recuperación y en el “X” las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

Las modificaciones epigenéticas analizadas mostraron un perfil algo más complejo que en los genes anteriores, quizá debido a su gran tamaño. En el caso de H3K4me3 se vio un enriquecimiento claro en las zonas del promotor y de TSS, pero, aunque había cierta tendencia en las réplicas a mostrar incremento, no se pudo concluir si este se producía en las zonas del exón uno y seis. Contrariamente, en la 3'-UTR, dicha modificación parecía estar empobrecida con respecto a la CTL. Esto último cuadraría más con la disposición a lo largo del gen descrita previamente para esta marca que, quizá, en los genes anteriormente estudiados no se observó por su menor tamaño, o por la disposición de los exones. En H3K9ac y RNAPII no se estudió el exón seis dados los resultados anteriores. En el caso de la marca H9K9ac no se obtuvieron resultados reproducibles en las dos zonas del lado 5' del gen (promotor y TSS) y, sin embargo, en el exón uno y en la 3'-UTR si se observó un enriquecimiento claro, siendo esto poco habitual ya que esta modificación suele acompañar a H3K4me3. Los resultados obtenidos con RNAPII fueron opuestos a los

Resultados y discusión

observados para la marca H3K9ac, puesto que se observó un incremento reproducible en las zonas del promotor y TSS de la INF, mientras que en las otras regiones analizadas los resultados no fueron reproducibles.

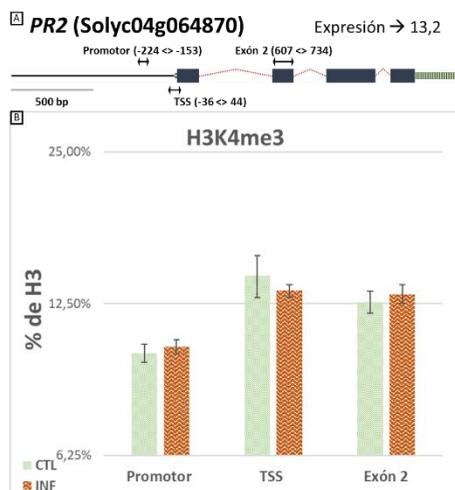


Figura 87 Esquema y resultados de *PR2*

(A) Nombre, código y esquema del gen *PR2* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIP y RTqPCR. En la parte superior izquierda se muestra la ratio de expresión INF/CTL de las plantas de *S. lycopersicum* a 24 hpi con *B. cinerea*. (B) Normalización de H3K4me3 con respecto a H3. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

El gen *PR2* tiene un tamaño medio, con cuatro exones y una 5'-UTR inusualmente pequeña (19 bp). Se encuentra en el cromosoma cuatro y se induce a 24 hpi a un nivel similar al de *LOXD* (figura 78). En este gen se estudiaron tres zonas (promotor, TSS y exón dos), en las que se analizó la marca H3K4me3. Curiosamente, en este caso esta marca no presentó cambios en las zonas estudiadas, a pesar de su inducción en las plantas INF (figura 87). Este gen requerirá un estudio posterior más completo para establecer su regulación epigenética.

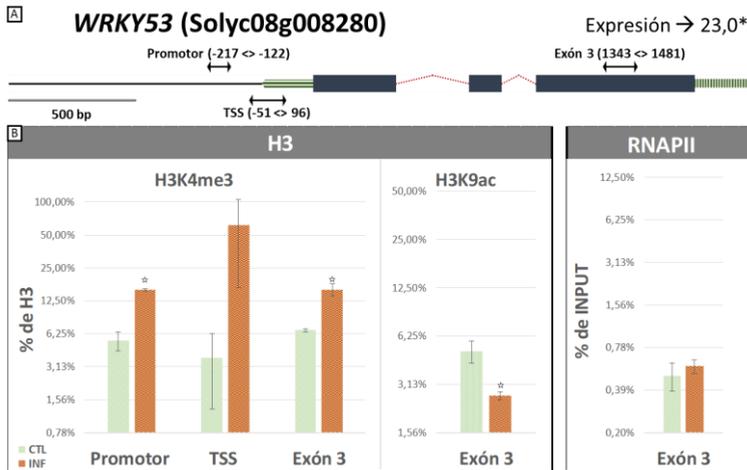


Figura 88 Esquema y resultados de *WRKY53*

(A) Nombre, código y esquema del gen *WRKY53* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIP y RTqPCR. En la parte superior izquierda se muestra el ratio de expresión INF/CTL de las plantas de *S. lycopersicum* a 24 hpi con *B. cinerea*. (B) De izquierda a derecha: normalización de H3K4me3 y H3K9ac con respecto a H3 y de RNAPII con respecto a INPUT. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueran reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

WRKY53 es un gen de tamaño medio con tres exones, localizado en el cromosoma ocho, que mostró un nivel de inducción superior al de *LOXD* y *PR2* (figura 78). Se estudiaron tres zonas (promotor, TSS y zona central del exón tres) en el análisis de la marca H3K4me3 y el exón tres en el caso de H3K9ac y RNAPII. Se observó un incremento reproducible de la marca H3K4me3 en el promotor y en el exón tres en INF, mientras que la modificación H3K9ac se redujo en dicho exón. En estas condiciones, la RNAPII mostró el mismo nivel en el exón tres en las muestras INF y CTL.

Finalmente, el gen *WRKY75* está localizado en el cromosoma cinco y es el gen con la estructura más peculiar de los estudiados pues, teniendo un tamaño moderadamente grande (2702 bp), solo cuenta con dos pequeños exones separados por un gran intrón (solo un 27,2 % del gen es codificante, por lo que la proteína es de solo 172 aa, frente a los 360 aa del *WRKY53*). En este gen se

Resultados y discusión

estudiaron dos zonas localizadas en el extremo 5' del intrón, la zona TSS y un fragmento codificante del exón (no fue posible diseñar oligos válidos en la zona del promotor), y en el otro extremo del gen se analizó la 3'-UTR. *WRKY75* mostró un considerable nivel de inducción a 24 hpi (figura 78). El análisis epigenético mostró que la modificación H3K4me3 se enriqueció en la INF, en el exón uno y en la región 3'-UTR (figura 89). H3K9ac también se enriqueció en la zona 3'-UTR, pero no en el exón uno (de forma significativa) y, al contrario de lo que se observó en H3K4me3, sí se incrementó en la zona TSS (figura 89). Por su parte, la RNAPII mostró un importante y significativo incremento en la INF, a lo largo de las tres zonas estudiadas (figura 89).

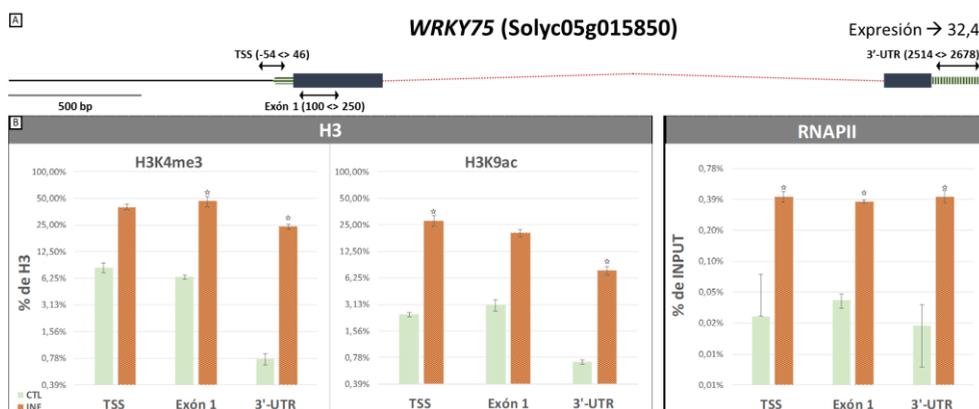


Figura 89 Esquema y resultados de *WRKY75*

(A) Nombre, código y esquema del gen *WRKY75* con los amplicones de las zonas utilizadas en la ChIP y RTqPCR. En la parte superior izquierda se muestra la ratio de expresión INF/CTL de las plantas de *S. lycopersicum* a 24 hpi con *B. cinerea*. (B) De izquierda a derecha: normalización de H3K4me3 y H3K9ac con respecto a H3 y de RNAPII con respecto a INPUT. En el eje "Y" se muestra el porcentaje de recuperación y en el "X" las zonas génicas examinadas en ambas condiciones. Las barras de error indican la s.e.m. (n = 3). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se indica con una estrella aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas entre la CTL y la INF, que fueron reproducibles en al menos tres réplicas biológicas.

Analizando globalmente las modificaciones epigenéticas observadas en genes de *S. lycopersicum* se puede concluir que estas mostraron un perfil similar al observado en *A. thaliana*, con presencia de las marcas H3K4me3 y H3K9ac de forma homogénea, sin centrarse especialmente en la zona 5' o en el promotor, estando

en ocasiones más enriquecidas en la zona central o 3' del gen. Los porcentajes de recuperación, respecto al INPUT, fueron parecidos en este cultivo a los de *A. thaliana*, aunque el hecho de que H3 fuera menos abundante en las plantas INF, marcó una considerable diferencia con los resultados obtenidos en las que era similar en ambas condiciones. Esta circunstancia llevó a que la normalización tuviera que realizarse de forma diferente.

Cabe destacar que los ensayos de CHIP realizados con anti-RNAPII en plantas de *S. lycopersicum*, han permitido correlacionar la presencia de la RNAPII con las marcas epigenéticas en los genes estudiados. En estudios posteriores se abordará su estudio en plantas de *A. thaliana*.

3.5. Análisis conjunto de los resultados en ambos cultivos

Tras superar las dificultades, se ha puesto a punto un conjunto de protocolos funcionales en *A. thaliana*, que permiten el estudio epigenético de genes implicados en la respuesta temprana frente al hongo necrótrofo *B. cinerea*. Esto ha posibilitado determinar los perfiles de marcas epigenéticas de distinta naturaleza (H3k4me3, H3k9ac y H3K27me3) en varios genes de interés (*PR1*, *CYP71A13*, *ELI3*, *EXL7*, *BGLU23*, y *VSP2*).

El gen *PR1*, altamente inducido en este patosistema, es un conocido marcador de la ruta del SA, cuya función efectora aún se desconoce. El análisis realizado muestra un enriquecimiento en las marcas activadoras H3K4me3 y H3K9ac, en zonas no descritas previamente. Los datos epigenéticos aportados para *CYP71A13* son novedosos y particularmente relevantes, ya que la camalexina se considera un marcador de la resistencia frente a patógenos y es esencial frente a *B. cinerea*.

En *A. thaliana* se ha observado que los niveles de las distintas marcas epigenéticas se correlacionan con el grado de expresión del gen, mostrando una compleja relación entre ellas que apoya la importancia del balance de varias marcas de histonas.

Resultados y discusión

Los diversos cambios necesarios para adaptar los protocolos a *S. lycopersicum* denotan la mayor dificultad de los estudios realizados en esta especie, especialmente en las condiciones experimentales producidas por la infección de *B. cinerea*. Esto podría explicar la carencia de datos epigenéticos en este patosistema. Los resultados obtenidos indican que en *S. lycopersicum* podría variar la densidad nucleosomal con la activación de los genes, lo que hizo necesario utilizar la normalización con respecto a H3, reflejando también las diferencias con *A. thaliana*. Los genes analizados en *S. lycopersicum*, tienen un perfil de las marcas epigenéticas analizadas similar al determinado en los genes de *A. thaliana*, a pesar de la mayor complejidad de su genoma.

Cabe destacar que los estudios realizados en *S. lycopersicum*, aunque más complejos, son singularmente valiosos dadas las cuantiosas pérdidas económicas debidas a la infección por *B. cinerea*.

En conjunto, la información obtenida en esta tesis podría ser útil para determinar la posible herencia transgeneracional de las marcas epigenéticas como respuesta a este necrótrofo. Este trabajo también proporciona marcas de histonas en genes, que podrían ser candidatos a biomarcadores para el diagnóstico temprano de la infección producida por *B. cinerea*.

4. Conclusiones

Puesta a punto del protocolo de extracción e inmunoprecipitación de cromatina:

- Se ha puesto a punto un protocolo funcional de extracción de cromatina en plantas de *A. thaliana* infectadas con el hongo necrótrofo *B. cinerea*.
- Utilizando la cromatina extraída, se ha puesto a punto un protocolo de CHIP en este patosistema.
- Ha sido posible la adaptación de ambos protocolos en el patosistema compuesto por *S. lycopersicum* y *B. cinerea*.
- La determinación de la presencia de la RNAPII ha sido realizada exitosamente en el patosistema *S. lycopersicum-B. cinerea*.
- La puesta a punto de estos protocolos ha requerido la inclusión de un nuevo protocolo de infección que aumenta la cantidad de tejido infectado a tiempo corto, reduciendo las interferencias provocadas por la necrosis.

Resultados experimentales:

- Se han determinado las marcas epigenéticas H3K4me3, H3K9a y H3K27me3 en los genes *BGLU23*, *CYP71A13*, *ELI3*, *EXL7*, *PR1* y *VSP2* de *A. thaliana*
- Los resultados obtenidos apoyan que la inducción o represión de un gen depende de un balance de marcas activadoras (H3K4me3 y H3K9ac) y represoras (H3K27me3) en *A. thaliana*.
- Se ha podido establecer que a lo largo del proceso infectivo pueden variar las marcas epigenéticas, siendo su balance el que se correlaciona con el nivel de expresión de los genes.
- Se han analizado marcas epigenéticas en genes que no se habían estudiado previamente a este nivel, como *BGLU23*, *CYP71A13*, *ELI3* y *EXL7*. También se han examinado nuevas zonas y combinaciones de marcas epigenéticas en genes ya estudiados previamente, como *PR1* y *VSP2*.

Conclusiones

- Se han determinado las marcas epigenéticas H3K4me3, H3K9ac y la presencia de RNAPII en los genes *DES*, *DOX1*, *LOXD*, *PR2*, *WRKY53* y *WRKY75* de *S. lycopersicum*, siendo los primeros datos epigenéticos aportados en plantas de *S. lycopersicum* infectadas con *B. cinerea*.
- La presencia de RNAPII se ha podido correlacionar con las modificaciones activadoras y con la expresión de diversos genes en el patosistema *S. lycopersicum-B. cinerea*.
- El perfil de las marcas activadoras H3K4me3 y H3K9ac es similar en los genes estudiados en ambos cultivos.

5. Bibliografía

- ABBOTT, R. J. & GOMES, M. F. 1989. Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Heredity*, 62, 411.
- ABUQAMAR, S., CHAI, M. F., LUO, H., SONG, F. & MENGISTE, T. 2008. Tomato protein kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell*, 20, 1964-83.
- ABUQAMAR, S., CHEN, X., DHAWAN, R., BLUHM, B., SALMERON, J., LAM, S., DIETRICH, R. A. & MENGISTE, T. 2006. Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *Plant J*, 48, 28-44.
- ABUQAMAR, S., MOUSTAFA, K. & TRAN, L. S. 2017. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Crit Rev Biotechnol*, 37, 262-274.
- ADE, J., DEYOUNG, B. J., GOLSTEIN, C. & INNES, R. W. 2007. Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2531-6.
- ADIE, B. A., PEREZ-PEREZ, J., PEREZ-PEREZ, M. M., GODOY, M., SANCHEZ-SERRANO, J. J., SCHMELZ, E. A. & SOLANO, R. 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 1665-81.
- AHLFORS, R., BROSCHE, M., KOLLIST, H. & KANGASJARVI, J. 2009. Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 58, 1-12.
- AHUJA, I., KISSEN, R. & BONES, A. M. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci*, 17, 73-90.
- ALVAREZ, M. E., NOTA, F. & CAMBIAGNO, D. A. 2010. Epigenetic control of plant immunity. *Mol Plant Pathol*, 11, 563-76.
- AMASINO, R. 2009. Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome Biol*, 10, 228.
- AMSELEM, J., CUOMO, C. A., VAN KAN, J. A., VIAUD, M., BENITO, E. P., COULOUX, A., COUTINHO, P. M., DE VRIES, R. P., DYER, P. S., FILLINGER, S., FOURNIER, E., GOUT, L., HAHN, M., KOHN, L., LAPALU, N., PLUMMER, K. M., PRADIER, J. M., QUEVILLON, E., SHARON, A., SIMON, A., TEN HAVE, A., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P., WINCKER, P., ANDREW, M., ANTHOUARD, V., BEEVER, R. E., BEFFA, R., BENOIT, I., BOUZID, O., BRAULT, B., CHEN, Z., CHOQUER, M., COLLEMARE, J., COTTON, P., DANCHIN, E. G., DA SILVA, C., GAUTIER, A., GIRAUD, C., GIRAUD, T., GONZALEZ, C., GROSSETETE, S., GULDENER, U., HENRISSAT, B., HOWLETT, B. J., KODIRA, C., KRETSCHMER, M., LAPPARTIENT, A., LEROCH, M., LEVIS, C., MAUCELI, E., NEUVEGLISE, C., OESER, B., PEARSON, M., POULAIN, J., POUSSEREAU, N., QUESNEVILLE, H., RASCLE, C., SCHUMACHER, J., SEGURENS, B., SEXTON, A., SILVA, E., SIRVEN,

Bibliografía

- C., SOANES, D. M., TALBOT, N. J., TEMPLETON, M., YANDAVA, C., YARDEN, O., ZENG, Q., ROLLINS, J. A., LEBRUN, M. H. & DICKMAN, M. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet*, 7, e1002230.
- AN, C. & MOU, Z. 2013. The function of the Mediator complex in plant immunity. *Plant Signal Behav*, 8, e23182.
- ANGULO, C., DE LA, O. L. M., FINITI, I., LOPEZ-CRUZ, J., FERNANDEZ-CRESPO, E., GARCIA-AGUSTIN, P. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2015. Role of dioxygenase alpha-DOX2 and SA in basal response and in hexanoic acid-induced resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants against *Botrytis cinerea*. *J Plant Physiol*, 175, 163-73.
- APPEL, H. M. & COCROFT, R. B. 2014. Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing. *Oecologia*, 175, 1257-66.
- ARANEGA-BOU, P., DE LA, O. L. M., FINITI, I., GARCIA-AGUSTIN, P. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2014. Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Front Plant Sci*, 5, 488.
- ARTHUR, D. C. 2009. Numbers of Living Species in Australia and the World. 2nd edition. *Australian Government, Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts. Canberra, Australia.*
- ASSELBERGH, B., ACHUO, A. E., HOFTE, M. & VAN GIJSEGEM, F. 2008. Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Pathol*, 9, 11-24.
- ASSELBERGH, B., CURVERS, K., FRANCA, S. C., AUDENAERT, K., VUYLSTEKE, M., VAN BREUSEGEM, F. & HOFTE, M. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol*, 144, 1863-77.
- ATTARAN, E., ZEIER, T. E., GRIEBEL, T. & ZEIER, J. 2009. Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 954-71.
- AUDENAERT, K., DE MEYER, G. B. & HOFTE, M. M. 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol*, 128, 491-501.
- BAKER, C. J. & ORLANDI, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*, 33, 299-321.
- BARTH, T. K. & IMHOF, A. 2010. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends Biochem Sci*, 35, 618-26.
- BAUER, U.-M., DAUJAT, S., NIELSEN, S. J., NIGHTINGALE, K. & KOUZARIDES, T. 2002. Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Reports*, 3, 39-44.
- BEEVER, R. E. & WEEDS, P. L. 2007. *Taxonomy and Genetic Variation of Botrytis and Botryotinia*, Netherlands, Springer, Dordrecht.

- BENELOUJAEPHAJRI, E., COSTA, A., L'HARIDON, F., METRAUX, J. P. & BINDA, M. 2013. Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium. *BMC Plant Biol*, 13, 160.
- BERNATAVICHUTE, Y. V., ZHANG, X., COKUS, S., PELLEGRINI, M. & JACOBSEN, S. E. 2008. Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 3, e3156.
- BERR, A., MCCALLUM, E. J., ALIOUA, A., HEINTZ, D., HEITZ, T. & SHEN, W. H. 2010. *Arabidopsis* histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol*, 154, 1403-14.
- BERR, A., MENARD, R., HEITZ, T. & SHEN, W. H. 2012. Chromatin modification and remodelling: a regulatory landscape for the control of *Arabidopsis* defence responses upon pathogen attack. *Cell Microbiol*, 14, 829-39.
- BESSON-BARD, A., COURTOIS, C., GAUTHIER, A., DAHAN, J., DOBROWOLSKA, G., JEANDROZ, S., PUGIN, A. & WENDEHENNE, D. 2008. Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol Plant*, 1, 218-28.
- BILLON-GRAND, G., RASCLE, C., DROUX, M., ROLLINS, J. A. & POUSSEREAU, N. 2012. pH modulation differs during sunflower cotyledon colonization by the two closely related necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol Plant Pathol*, 13, 568-78.
- BIRD, A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396-8.
- BIRKENBIHL, R. P., DIEZEL, C. & SOMSSICH, I. E. 2012. *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol*, 159, 266-85.
- BOND, D. M. & FINNEGAN, E. J. 2007. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends Plant Sci*, 12, 211-6.
- BRISSON, L. F., TENHAKEN, R. & LAMB, C. 1994. Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell*, 6, 1703-1712.
- BROOKS, D. M., BENDER, C. L. & KUNKEL, B. N. 2005. The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol*, 6, 629-39.
- CASSELTON, L. A. & KÜES, U. 2007. The origin of multiple mating types in the model mushrooms *Coprinopsis cinerea* and *Schizophyllum commune*. In: HEITMAN, J., KRONSTAD, J. W., TAYLOR, J. W. & CASSELTON, L. A. (eds.) *Sex in Fungi*.
- CAVICCHIOLI, R., CURMI, P. M., SAUNDERS, N. & THOMAS, T. 2003. Pathogenic archaea: do they exist? *Bioessays*, 25, 1119-28.
- CECCONI, D., ORZETTI, S., VANDELLE, E., RINALDUCCI, S., ZOLLA, L. & DELLEDONNE, M. 2009. Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis*, 30, 2460-8.

Bibliografía

- CELL SIGNALING TECHNOLOGY, I. 2007. *Histone Modification Table* [Online]. Available: <https://www.cellsignal.com/contents/resources-reference-tables/histone-modification-table/science-tables-histone> [Accessed].
- CILIBERTI, N., FERMAUD, M., ROUDET, J. & ROSSI, V. 2015. Environmental Conditions Affect Botrytis cinerea Infection of Mature Grape Berries More Than the Strain or Transposon Genotype. *Phytopathology*, 105, 1090-6.
- CLARKE, J. T., WARNOCK, R. C. & DONOGHUE, P. C. 2011. Establishing a time-scale for plant evolution. *New Phytol*, 192, 266-301.
- CLERGEOT, P. H., GOURGUES, M., COTS, J., LAURANS, F., LATORSE, M. P., PEPIN, R., THARREAU, D., NOTTEGHEM, J. L. & LEBRUN, M. H. 2001. PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen Magnaporthe grisea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6963-8.
- CLOUSE, S. D. & SASSE, J. M. 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 427-451.
- COERTZE, S., HOLTZ, G. & SADIE, A. 2001. Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of Botrytis cinerea. *Plant Disease*, 85, 668-677.
- COLMENARES, A. J., ALEU, J., DURAN-PATRON, R., COLLADO, I. G. & HERNANDEZ-GALAN, R. 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of Botrytis cinerea. *J Chem Ecol*, 28, 997-1005.
- COLLAZO, C., CHACÓN, O. & BORRÁ, O. 2006. Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals. *Biotecnología Aplicada*, 23.
- CONRATH, U. 2006. Systemic acquired resistance. *Plant Signal Behav*, 1, 179-84.
- CONRATH, U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci*, 16, 524-31.
- CONRATH, U., AMOROSO, G., KOHLE, H. & SULTEMEYER, D. F. 2004. Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *Plant J*, 38, 1015-22.
- COSGROVE, D. J., LI, L. C., CHO, H. T., HOFFMANN-BENNING, S., MOORE, R. C. & BLECKER, D. 2002. The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol*, 43, 1436-44.
- CRAWFORD, N. M. & GUO, F. Q. 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci*, 10, 195-200.
- CRESPO-SALVADOR, O., ESCAMILLA-AGUILAR, M., LOPEZ-CRUZ, J., LOPEZ-RODAS, G. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2017. Determination of histone epigenetic marks in Arabidopsis and tomato genes in the early response to Botrytis cinerea. *Plant Cell Rep*.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T. & LEWIS, N. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W. & JONEAS, R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Biologists.

- CUESTA ARENAS, Y., KALKMAN, E. R. I. C., SCHOUTEN, A., DIEHO, M., VREDENBREGT, P., UWUMUKIZA, B., OSÉS RUIZ, M. & VAN KAN, J. A. L. 2010. Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 376-386.
- CHAHWAN, R., WONTAKAL, S. N. & ROA, S. 2011. The multidimensional nature of epigenetic information and its role in disease. *Discov Med*, 11, 233-43.
- CHAPMAN, E. J. & CARRINGTON, J. C. 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*, 8, 884-96.
- CHATURVEDI, R., VENABLES, B., PETROS, R. A., NALAM, V., LI, M., WANG, X., TAKEMOTO, L. J. & SHAH, J. 2012. An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *Plant J*, 71, 161-72.
- CHAW, S. M., CHANG, C. C., CHEN, H. L. & LI, W. H. 2004. Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes. *J Mol Evol*, 58, 424-41.
- CHEN, L., YANG, Y., LIU, C., ZHENG, Y., XU, M., WU, N., SHENG, J. & SHEN, L. 2015a. Characterization of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 464, 962-8.
- CHEN, X., LIU, X., ZHAO, Y. & ZHOU, D. X. 2015b. Histone H3K4me3 and H3K27me3 regulatory genes control stable transmission of an epimutation in rice. *Sci Rep*, 5, 13251.
- CHENG, M. C., LIAO, P. M., KUO, W. W. & LIN, T. P. 2013. The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol*, 162, 1566-82.
- CHERNOFF, Y. O. 2016. Are there prions in plants? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 6097-9.
- CHOI, J., HUH, S. U., KOJIMA, M., SAKAKIBARA, H., PAEK, K. H. & HWANG, I. 2010. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. *Dev Cell*, 19, 284-95.
- CHOI, W. G., HILLEARY, R., SWANSON, S. J., KIM, S. H. & GILROY, S. 2016. Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol*, 67, 287-307.
- DADAKOVA, K., HAVELKOVA, M., KURKOVA, B., TLOLKOVA, I., KASPAROVSKY, T., ZDRAHAL, Z. & LOCHMAN, J. 2015. Proteome and transcript analysis of *Vitis vinifera* cell cultures subjected to *Botrytis cinerea* infection. *J Proteomics*, 119, 143-53.
- DALMAIS, B., SCHUMACHER, J., MORAGA, J., P, L. E. P., TUDZYNSKI, B., COLLADO, I. G. & VIAUD, M. 2011. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol Plant Pathol*, 12, 564-79.

Bibliografia

- DE JONG, J. C., MCCORMACK, B. J., SMIRNOFF, N. & TALBOT, N. J. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, 389, 244-245.
- DE LEON, I. P., SANZ, A., HAMBERG, M. & CASTRESANA, C. 2002. Involvement of the Arabidopsis alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J*, 29, 61-2.
- DE LORENZO, G., BRUTUS, A., SAVATIN, D. V., SICILIA, F. & CERVONE, F. 2011. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Lett*, 585, 1521-8.
- DE MICCOLIS ANGELINI, R. M., ROTOLO, C., POLLASTRO, S. & FARETRA, F. 2016. Molecular analysis of the mating type (MAT1) locus in strains of the heterothallic ascomycete *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*, 65, 1321-1332.
- DEAL, R. B. & HENIKOFF, S. 2011. Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 14, 116-22.
- DEAN, R., VAN KAN, J. A., PRETORIUS, Z. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., DI PIETRO, A., SPANU, P. D., RUDD, J. J., DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J. & FOSTER, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13, 414-30.
- DEIGHTON, N., MUCKENSCHNABEL, I., COLMENARES, A. J., COLLADO, I. G. & WILLIAMSON, B. 2001. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 57, 689-92.
- DEMPSEY, D. A. & KLESSIG, D. F. 2012. SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci*, 17, 538-45.
- DEMPSEY, D. A., SHAH, J. & KLESSIG, D. F. 1999. Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18, 547-575.
- DEMPSEY, D. A., VLOT, A. C., WILDERMUTH, M. C. & KLESSIG, D. F. 2011. Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*, 9, e0156.
- DIAZ, M., ACHKOR, H., TITARENKO, E. & MARTINEZ, M. C. 2003. The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett*, 543, 136-9.
- DING, B. & WANG, G. L. 2015. Chromatin versus pathogens: the function of epigenetics in plant immunity. *Front Plant Sci*, 6, 675.
- DING, Y., FROMM, M. & AVRAMOVA, Z. 2012. Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in Arabidopsis. *Nat Commun*, 3, 740.
- DIXON, R. A., HARRISON, M. J. & LAMB, C. J. 1994. Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 32:479-501.
- DOONAN, J. H. & SABLowski, R. 2010. Walls around tumours - why plants do not develop cancer. *Nat Rev Cancer*, 10, 794-802.
- EBERHARTER, A. & BECKER, P. B. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*, 3, 224-9.

- ECKARDT, N. A. 2008. Oxylin signaling in plant stress responses. *Plant Cell*, 20, 495-7.
- EL OIRDI, M., EL RAHMAN, T. A., RIGANO, L., EL HADRAMI, A., RODRIGUEZ, M. C., DAAFY, F., VOJNOV, A. & BOUARAB, K. 2011. Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell*, 23, 2405-21.
- ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P. & DELEN, N. 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Springer Netherlands.
- EMELYANOV, V. V. 2003. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur J Biochem*, 270, 1599-618.
- ESPINAS, N. A., SAZE, H. & SAIJO, Y. 2016. Epigenetic Control of Defense Signaling and Priming in Plants. *Front Plant Sci*, 7, 1201.
- FERNÁNDEZ-CRESPO E., J. A.-N., MARTA SERRA-SORIANO, IVÁN FINITI, PILAR GARCÍA-AGUSTÍN, VICENTE PALLÁS, CARMEN GONZÁLEZ-BOSCH 2017. Hexanoic acid treatment prevents systemic MNSV movement in Cucumis melo plants by priming hormonal signalling and callose deposition. *Frontieres in Plant Science*.
- FERRARI, S., PLOTNIKOVA, J. M., DE LORENZO, G. & AUSUBEL, F. M. 2003. Arabidopsis local resistance to Botrytis cinerea involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J*, 35, 193-205.
- FERRARI, S., SAVATIN, D. V., SICILIA, F., GRAMEGNA, G., CERVONE, F. & LORENZO, G. D. 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front Plant Sci*, 4, 49.
- FINITI, I., DE LA, O. L. M., VICEDO, B., GOMEZ-PASTOR, R., LOPEZ-CRUZ, J., GARCIA-AGUSTIN, P., REAL, M. D. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2014. Hexanoic acid protects tomato plants against Botrytis cinerea by priming defence responses and reducing oxidative stress. *Mol Plant Pathol*, 15, 550-62.
- FINITI, I., LEYVA, M. O., LOPEZ-CRUZ, J., CALDERAN RODRIGUES, B., VICEDO, B., ANGULO, C., BENNETT, A. B., GRANT, M., GARCIA-AGUSTIN, P. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2013. Functional analysis of endo-1,4-beta-glucanases in response to Botrytis cinerea and Pseudomonas syringae reveals their involvement in plant-pathogen interactions. *Plant Biol (Stuttg)*, 15, 819-31.
- FLOR, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-296.
- FLORES-PEREZ, U., SAURET-GUETO, S., GAS, E., JARVIS, P. & RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. 2008. A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *Plant Cell*, 20, 1303-15.
- FLORS, V., LEYVA MDE, L., VICEDO, B., FINITI, I., REAL, M. D., GARCIA-AGUSTIN, P., BENNETT, A. B. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2007. Absence of the endo-beta-

Bibliografía

- 1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant J*, 52, 1027-40.
- FLORS, V., TON, J., VAN DOORN, R., JAKAB, G., GARCIA-AGUSTIN, P. & MAUCHMANI, B. 2008. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J*, 54, 81-92.
- FONTANA, G. A., RIGAMONTI, A., LENZKEN, S. C., FILOSA, G., ALVAREZ, R., CALOGERO, R., BIANCHI, M. E. & BARABINO, S. M. 2017. Oxidative stress controls the choice of alternative last exons via a Brahma-BRCA1-CstF pathway. *Nucleic Acids Res*, 45, 902-914.
- FOURIE, J. F. & HOLZ, G. 1994. Infection of plum and nectarine flowers by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*. 309-315.
- FOURNIER, E., GIRAUD, T., ALBERTINI, C. & BRYGOO, Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*, 97, 1251-67.
- FU, J. & WANG, S. 2011. Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. *Front Plant Sci*, 2, 74.
- FUJIOKA, S. & YOKOTA, T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 137-64.
- GACHON, C. & SAINDRENAN, P. 2004. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem*, 42, 367-71.
- GAGETE, A. P., FRANCO, L. & ISABEL RODRIGO, M. 2011. The *Pisum sativum* psp54 gene requires ABI3 and a chromatin remodeller to switch from a poised to a transcriptionally active state. *New Phytol*, 192, 353-63.
- GAGETE MATEOS, A. P. 2009. *Caracterización y análisis funcional del factor transcripcional PsABI3. Interacción con la cromatina en el gen psp54 de guisante*. Bioquímica, Universidad de Valencia.
- GAMBLE, M. J., FRIZZELL, K. M., YANG, C., KRISHNAKUMAR, R. & KRAUS, W. L. 2010. The histone variant macroH2A1 marks repressed autosomal chromatin, but protects a subset of its target genes from silencing. *Genes Dev*, 24, 21-32.
- GARCIA-ABELLAN, J. O., EGEA, I., PINEDA, B., SANCHEZ-BEL, P., BELVER, A., GARCIA-SOGO, B., FLORES, F. B., ATARES, A., MORENO, V. & BOLARIN, M. C. 2014. Heterologous expression of the yeast HAL5 gene in tomato enhances salt tolerance by reducing shoot Na⁺ accumulation in the long term. *Physiol Plant*, 152, 700-13.
- GARCIA-BRUGGER, A., LAMOTTE, O., VANDELLE, E., BOURQUE, S., LECOURIEUX, D., POINSSOT, B., WENDEHENNE, D. & PUGIN, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 711-24.
- GATEHOUSE, A. M., FERRY, N. & RAEMAEEKERS, R. J. 2002. The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. *Trends Genet*, 18, 249-51.

- GENG, X., JIN, L., SHIMADA, M., KIM, M. G. & MACKEY, D. 2014. The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 240, 1149-65.
- GIMENEZ-IBANEZ, S., BOTER, M., FERNANDEZ-BARBERO, G., CHINI, A., RATHJEN, J. P. & SOLANO, R. 2014. The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 12, e1001792.
- GLAZEBROOK, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 205-27.
- GLAZEBROOK, J. & AUSUBEL, F. M. 1994. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8955-9.
- GLAZEBROOK, J., ZOOK, M., MERT, F., KAGAN, I., ROGERS, E. E., CRUTE, I. R., HOLUB, E. B., HAMMERSCHMIDT, R. & AUSUBEL, F. M. 1997. Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics*, 146, 381-92.
- GONG, T., SHU, D., YANG, J., DING, Z. T. & TAN, H. 2014. Sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster of abscisic acid-producing *Botrytis cinerea*. *Int J Mol Sci*, 15, 17396-410.
- GONZALEZ-BOSCH, C. 2017. Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radic Biol Med*.
- GONZALEZ, R. M., RICARDI, M. M. & IUSEM, N. D. 2013. Epigenetic marks in an adaptive water stress-responsive gene in tomato roots under normal and drought conditions. *Epigenetics*, 8, 864-72.
- GOODYEAR, C. S. & SILVERMAN, G. J. 2003. Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin. *J Exp Med*, 197, 1125-39.
- GOURGUES, M., BRUNET-SIMON, A., LEBRUN, M. H. & LEVIS, C. 2003. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology*, 51, 619-629.
- GOURGUES, M., BRUNET-SIMON, A., LEBRUN, M. H. & LEVIS, C. 2004. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Mol Microbiol*, 51, 619-29.
- GOVRIN, E. M. & LEVINE, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol*, 10, 751-7.
- GRENE, R. 2002. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *Arabidopsis Book*, 1, e0036.
- GRSIC, S., SAUERTEIG, S., NEUHAUS, K., ALBRECHT, M., ROSSITER, J. & LUDWIG-MÜLLER, J. 1998. Physiological analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana*

Bibliografia

- plants expressing one nitrilase isoform in sense or antisense direction. *Journal of Plant Physiology*, 153, 446-456.
- GUPTA, K. J., FERNIE, A. R., KAISER, W. M. & VAN DONGEN, J. T. 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci*, 16, 160-8.
- GUTZAT, R. & MITTELSTEN SCHEID, O. 2012. Epigenetic responses to stress: triple defense? *Curr Opin Plant Biol*, 15, 568-73.
- HAHN, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *J Chem Biol*, 7, 133-41.
- HAN, Y., JOOSTEN, H. J., NIU, W., ZHAO, Z., MARIANO, P. S., MCCALMAN, M., VAN KAN, J., SCHAAP, P. J. & DUNAWAY-MARIANO, D. 2007. Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *J Biol Chem*, 282, 9581-90.
- HARBERD, N. P. 2003. Botany. Relieving DELLA restraint. *Science*, 299, 1853-4.
- HARING, M., OFFERMANN, S., DANKER, T., HORST, I., PETERHANSEL, C. & STAM, M. 2007. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods*, 3, 11.
- HEDDEN, P. & SPONSEL, V. 2015. A Century of Gibberellin Research. *J Plant Growth Regul*, 34, 740-60.
- HELLER, J. & TUDZYNSKI, P. 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu Rev Phytopathol*, 49, 369-90.
- HEMSLEY, P. A., HURST, C. H., KALIYADASA, E., LAMB, R., KNIGHT, M. R., DE COTHI, E. A., STEELE, J. F. & KNIGHT, H. 2014. The Arabidopsis mediator complex subunits MED16, MED14, and MED2 regulate mediator and RNA polymerase II recruitment to CBF-responsive cold-regulated genes. *Plant Cell*, 26, 465-84.
- HEO, K., KIM, H., CHOI, S. H., CHOI, J., KIM, K., GU, J., LIEBER, M. R., YANG, A. S. & AN, W. 2008. FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Mol Cell*, 30, 86-97.
- HOLLAND, H. D. 2006. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361, 903-15.
- HOWE, G. A., MAJOR, I. T. & KOO, A. J. 2018. Modularity in Jasmonate Signaling for Multistress Resilience. *Annu Rev Plant Biol*, 69, 387-415.
- HUDGINS, J. W. & FRANCESCHI, V. R. 2004. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiol*, 135, 2134-49.
- HUFFAKER, A., PEARCE, G. & RYAN, C. A. 2006. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10098-103.

- IGAMBERDIEV, A. U., SEREGELYES, C., MANAC'H, N. & HILL, R. D. 2004. NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta*, 219, 95-102.
- IMADA, K., TANAKA, S., IBARAKI, Y., YOSHIMURA, K. & ITO, S. 2014. Antifungal effect of 405-nm light on *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology*, 59, 670-676.
- ITO, A. & HOWE, G. A. 2001. Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450. *J Biol Chem*, 276, 3620-7.
- JASKIEWICZ, M., CONRATH, U. & PETERHANSEL, C. 2011a. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep*, 12, 50-5.
- JASKIEWICZ, M., PETERHANSEL, C. & CONRATH, U. 2011b. Detection of histone modifications in plant leaves. *J Vis Exp*.
- JENUWEIN, T. & ALLIS, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-80.
- JIANG, D. & BERGER, F. 2017. Histone variants in plant transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1860, 123-130.
- JIANG, S., YAO, J., MA, K. W., ZHOU, H., SONG, J., HE, S. Y. & MA, W. 2013. Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathog*, 9, e1003715.
- JONES, J. D. & DANGL, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, 323-9.
- JURGENSEN, C. W. & MADSEN, A. 2009. Exposure to the airborne mould *Botrytis* and its health effects. *Ann Agric Environ Med*, 16, 183-96.
- KADOTA, Y., SHIRASU, K. & ZIPFEL, C. 2015. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol*, 56, 1472-80.
- KALUNKE, R. M., TUNDO, S., BENEDETTI, M., CERVONE, F., DE LORENZO, G. & D'OVIDIO, R. 2015. An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Front Plant Sci*, 6, 146.
- KARS, I., KROOSHOF, G. H., WAGEMAKERS, L., JOOSTEN, R., BENEN, J. A. & VAN KAN, J. A. 2005. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J*, 43, 213-25.
- KAUFMANN, K., MUINO, J. M., OSTERAS, M., FARINELLI, L., KRAJEWSKI, P. & ANGENENT, G. C. 2010. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of plant transcription factors followed by sequencing (ChIP-SEQ) or hybridization to whole genome arrays (ChIP-CHIP). *Nat Protoc*, 5, 457-72.
- KAWASHIMA, T., LORKOVIC, Z. J., NISHIHAMA, R., ISHIZAKI, K., AXELSSON, E., YELAGANDULA, R., KOHCHI, T. & BERGER, F. 2015. Diversification of histone H2A variants during plant evolution. *Trends Plant Sci*, 20, 419-25.
- KAZAN, K. & LYONS, R. 2014. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *Plant Cell*, 26, 2285-2309.
- KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2013. MYC2: the master in action. *Mol Plant*, 6, 686-703.

Bibliografia

- KETTNER, J. & DÖRFFLING, K. 1995. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Springer-Verlag*, 196, 627–634.
- KIEDROWSKI, S., KAWALLECK, P., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I. E. & DANGL, J. L. 1992. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance locus. *Embo j*, 11, 4677-84.
- KIM, H. S., PARK, Y. H., NAM, H., LEE, Y. M., SONG, K., CHOI, C., AHN, I., PARK, S. R., LEE, Y. H. & HWANG, D. J. 2014. Overexpression of the Brassica rapa transcription factor WRKY12 results in reduced soft rot symptoms caused by *Pectobacterium carotovorum* in *Arabidopsis* and Chinese cabbage. *Plant Biol (Stuttg)*, 16, 973-81.
- KLESSIG, D. F., TIAN, M. & CHOI, H. W. 2016. Multiple Targets of Salicylic Acid and Its Derivatives in Plants and Animals. *Front Immunol*, 7, 206.
- KOBAYASHI, M., OHURA, I., KAWAKITA, K., YOKOTA, N., FUJIWARA, M., SHIMAMOTO, K., DOKE, N. & YOSHIOKA, H. 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell*, 19, 1065-80.
- KONDRASHOV, F. A., KOONIN, E. V., MORGUNOV, I. G., FINOGENOVA, T. V. & KONDRASHOVA, M. N. 2006. Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. *Biol Direct*, 1, 31.
- KOORNNEEF, A. & PIETERSE, C. M. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol*, 146, 839-44.
- KRAVCHUK, Z., VICEDO, B., FLORS, V., CAMANES, G., GONZALEZ-BOSCH, C. & GARCIA-AGUSTIN, P. 2011. Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect *Arabidopsis* against *B. cinerea*. *J Plant Physiol*, 168, 359-66.
- KUAI, X., MACLEOD, B. J. & DESPRES, C. 2015. Integrating data on the *Arabidopsis* NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Front Plant Sci*, 6, 235.
- KUMAR, D., HAZRA, S., DATTA, R. & CHATTOPADHYAY, S. 2016. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* mutants suggests a crosstalk between ABA, ethylene and GSH against combined cold and osmotic stress. *Sci Rep*, 6, 36867.
- L'HARIDON, F., BESSON-BARD, A., BINDA, M., SERRANO, M., ABOU-MANSOUR, E., BALET, F., SCHOONBEEK, H. J., HESS, S., MIR, R., LEON, J., LAMOTTE, O. & METRAUX, J. P. 2011. A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathog*, 7, e1002148.
- LAI, Z., SCHLUTTENHOFER, C. M., BHIDE, K., SHREVE, J., THIMMAPURAM, J., LEE, S. Y., YUN, D. J. & MENGISTE, T. 2014. MED18 interaction with distinct transcription factors regulates multiple plant functions. *Nat Commun*, 5, 3064.

- LALOI, C. & HAVAUX, M. 2015. Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Front Plant Sci*, 6, 39.
- LALUK, K., LUO, H., CHAI, M., DHAWAN, R., LAI, Z. & MENGISTE, T. 2011. Biochemical and genetic requirements for function of the immune response regulator BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 in plant growth, ethylene signaling, and PAMP-triggered immunity in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 2831-49.
- LALUK, K. & MENGISTE, T. 2010. Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *Arabidopsis Book*, 8, e0136.
- LEE, S., FU, F., XU, S., LEE, S. Y., YUN, D. J. & MENGISTE, T. 2016. Global Regulation of Plant Immunity by Histone Lysine Methyl Transferases. *Plant Cell*, 28, 1640-61.
- LEE, Y. H. & DEAN, R. A. 1993. cAMP Regulates Infection Structure Formation in the Plant Pathogenic Fungus Magnaporthe grisea. *Plant Cell*, 5, 693-700.
- LEITNER, M., VANDELLE, E., GAUPELS, F., BELLIN, D. & DELLEDONNE, M. 2009. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12, 451-8.
- LEVECQUE, K., ANSEEL, F., DE BEUCKELAER, A., VAN DER HEYDEN, J. & GISLE, L. 2017. Work organization and mental health problems in PhD students. *Research Policy*, 46, 868-879.
- LI, B., CAREY, M. & WORKMAN, J. L. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128, 707-19.
- LI, W., LIN, Y. C., LI, Q., SHI, R., LIN, C. Y., CHEN, H., CHUANG, L., QU, G. Z., SEDEROFF, R. R. & CHIANG, V. L. 2014. A robust chromatin immunoprecipitation protocol for studying transcription factor-DNA interactions and histone modifications in wood-forming tissue. *Nat Protoc*, 9, 2180-93.
- LIAO, C. J., LAI, Z., LEE, S., YUN, D. J. & MENGISTE, T. 2016. Arabidopsis HOOKLESS1 Regulates Responses to Pathogens and Abscisic Acid through Interaction with MED18 and Acetylation of WRKY33 and ABI5 Chromatin. *Plant Cell*, 28, 1662-81.
- LINDERMAYR, C., SAALBACH, G. & DURNER, J. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 137, 921-30.
- LINDNER, J. 1975. [Gunther Schallock (12, 6, 1906 - 10, 10, 1974)]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 59, 625-31.
- LITT, M., QIU, Y. & HUANG, S. 2009. Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep*, 29, 131-41.
- LIU, H., DUAN, X., YU, S. & SUN, X. 2011. Analysis of nucleosome positioning determined by DNA helix curvature in the human genome. *BMC Genomics*, 12, 72.
- LIU, N. & AVRAMOVA, Z. 2016. Molecular mechanism of the priming by jasmonic acid of specific dehydration stress response genes in Arabidopsis. *Epigenetics Chromatin*, 9, 8.

Bibliografía

- LIU, S., KRACHER, B., ZIEGLER, J., BIRKENBIHL, R. P. & SOMSSICH, I. E. 2015. Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards *Botrytis cinerea* 2100. *Elife*, 4, e07295.
- LIU, X., YANG, S., ZHAO, M., LUO, M., YU, C. W., CHEN, C. Y., TAI, R. & WU, K. 2014. Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. *Mol Plant*, 7, 764-72.
- LOPEZ-CRUZ, J., FINITI, I., FERNANDEZ-CRESPO, E., CRESPO-SALVADOR, O., GARCIA-AGUSTIN, P. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2014. Absence of endo-1,4-beta-glucanase KOR1 alters the jasmonate-dependent defence response to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *J Plant Physiol*, 171, 1524-32.
- LOPEZ-CRUZ, J., OSCAR, C. S., EMMA, F. C., PILAR, G. A. & CARMEN, G. B. 2017. Absence of Cu-Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in Arabidopsis and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Mol Plant Pathol*, 18, 16-31.
- LOPEZ-GALIANO, M. J., GONZALEZ-HERNANDEZ, A. I., CRESPO-SALVADOR, O., RAUSELL, C., REAL, M. D., ESCAMILLA, M., CAMANES, G., GARCIA-AGUSTIN, P., GONZALEZ-BOSCH, C. & GARCIA-ROBLES, I. 2018. Epigenetic regulation of the expression of WRKY75 transcription factor in response to biotic and abiotic stresses in Solanaceae plants. *Plant Cell Rep*, 37, 167-176.
- LOPEZ-GALIANO, M. J., RUIZ-ARROYO, V. M., FERNANDEZ-CRESPO, E., RAUSELL, C., REAL, M. D., GARCIA-AGUSTIN, P., GONZALEZ-BOSCH, C. & GARCIA-ROBLES, I. 2017. Oxylipin mediated stress response of a miraculin-like protease inhibitor in Hexanoic acid primed eggplant plants infested by Colorado potato beetle. *J Plant Physiol*, 215, 59-64.
- LORENZO, O., PIQUERAS, R., SANCHEZ-SERRANO, J. J. & SOLANO, R. 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15, 165-78.
- LUDWIG-MULLER, J. 2015. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *J Plant Physiol*, 172, 4-12.
- LUNA, E., BRUCE, T. J., ROBERTS, M. R., FLORS, V. & TON, J. 2012. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol*, 158, 844-53.
- LUNA, E., LOPEZ, A., KOOIMAN, J. & TON, J. 2014. Role of NPR1 and KYP in long-lasting induced resistance by beta-aminobutyric acid. *Front Plant Sci*, 5, 184.
- LYNDON, R. 1998. The Shoot Apical Meristem: Its Growth and Development. *Cambridge University Press*.
- LLORENTE, F., MUSKETT, P., SANCHEZ-VALLET, A., LOPEZ, G., RAMOS, B., SANCHEZ-RODRIGUEZ, C., JORDA, L., PARKER, J. & MOLINA, A. 2008. Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Mol Plant*, 1, 496-509.

- MANTEAU, S., ABOUNA, S., LAMBERT, B. & LEGENDRE, L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Ecol*, 43, 359-66.
- MARGULIS, L. 2011. Symbiogenesis. A new principle of evolution rediscovery of Boris Mikhaylovich Kozo-Polyansky (1890–1957). *Paleontological Journal*, 44, 1525-1539.
- MARTINEZ-AGUILAR, K., RAMIREZ-CARRASCO, G., HERNANDEZ-CHAVEZ, J. L., BARRAZA, A. & ALVAREZ-VENEGAS, R. 2016. Use of BABA and INA As Activators of a Primed State in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Front Plant Sci*, 7, 653.
- MATTHEWS, J. B., WRIGHT, H. J., ROBERTS, A., COOPER, P. R. & CHAPPLE, I. L. 2007. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol*, 147, 255-64.
- MATTIROLI, F., BHATTACHARYYA, S., DYER, P. N., WHITE, A. E., SANDMAN, K., BURKHART, B. W., BYRNE, K. R., LEE, T., AHN, N. G., SANTANGELO, T. J., REEVE, J. N. & LUGER, K. 2017. Structure of histone-based chromatin in Archaea. *Science*, 357, 609-612.
- MBENGUE, M., NAVAUD, O., PEYRAUD, R., BARASCUD, M., BADET, T., VINCENT, R., BARBACCI, A. & RAFFAELE, S. 2016. Emerging Trends in Molecular Interactions between Plants and the Broad Host Range Fungal Pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front Plant Sci*, 7, 422.
- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., KOCZAN, J., NOMURA, K. & HE, S. Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126, 969-80.
- MERCK. 2018. 17-371 | EZ-ChIP™ FAQ [Online]. Available: http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/EZ-ChIP,MM_NF-17-371?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2F&bd=1#anchor_FAQ [Accessed].
- MIROUZE, M. & PASZKOWSKI, J. 2011. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 14, 267-74.
- MITTLER, R. 2017. ROS Are Good. *Trends Plant Sci*, 22, 11-19.
- MIYA, A., ALBERT, P., SHINYA, T., DESAKI, Y., ICHIMURA, K., SHIRASU, K., NARUSAKA, Y., KAWAKAMI, N., KAKU, H. & SHIBUYA, N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19613-8.
- MOCK, K. E., ROWE, C. A., HOOTEN, M. B., DEWOODY, J. & HIPKINS, V. D. 2008. Clonal dynamics in western North American aspen (*Populus tremuloides*). *Mol Ecol*, 17, 4827-44.
- MONEY, N. P. 2002. Mushroom stem cells. *Bioessays*, 24, 949-52.
- MORGAN, W. M. 1985. Influence of energy-saving night temperature regimes on *Botrytis cinerea* in an early-season glasshouse tomato crop. *Crop Protection*, 4, 99-110.

Bibliografia

- MOUSTAFA, K., ABUQAMAR, S., JARRAR, M., AL-RAJAB, A. J. & TREMOUILLAUX-GUILLER, J. 2014. MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Rep*, 33, 1217-25.
- MUCKENSCHNABEL, I., GOODMAN, B. A., WILLIAMSON, B., LYON, G. D. & DEIGHTON, N. 2002. Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J Exp Bot*, 53, 207-14.
- MUR, L. A., LAARHOVEN, L. J., HARREN, F. J., HALL, M. A. & SMITH, A. R. 2008. Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiol*, 148, 1537-46.
- MUR, L. A., PRATS, E., PIERRE, S., HALL, M. A. & HEBELSTRUP, K. H. 2013. Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ ethylene plant defense pathways. *Front Plant Sci*, 4, 215.
- MUR, L. A., SIVAKUMARAN, A., MANDON, J., CRISTESCU, S. M., HARREN, F. J. & HEBELSTRUP, K. H. 2012. Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *J Exp Bot*, 63, 4375-87.
- NAFISI, M., FIMOIGNARI, L. & SAKURAGI, Y. 2015. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry*, 112, 63-71.
- NAFISI, M., GOREGAOKER, S., BOTANGA, C. J., GLAWISCHNIG, E., OLSEN, C. E., HALKIER, B. A. & GLAZEBROOK, J. 2007. *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell*, 19, 2039-52.
- NAVARRO, L., BARI, R., ACHARD, P., LISON, P., NEMRI, A., HARBERD, N. P. & JONES, J. D. 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol*, 18, 650-5.
- NEMHAUSER, J. L., MOCKLER, T. C. & CHORY, J. 2004. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2, E258.
- NERI, L. M., RIEDERER, B. M., VALMORI, A., CAPITANI, S. & MARTELLI, A. M. 1997. Different concentrations of Mg⁺⁺ ions affect nuclear matrix protein distribution during thermal stabilization of isolated nuclei. *J Histochem Cytochem*, 45, 1317-28.
- NIEUWENHUIS, B. P. & JAMES, T. Y. 2016. The frequency of sex in fungi. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371.
- O'DONNELL, P. J., CALVERT, C., ATZORN, R., WASTERACK, C., LEYSER, H. M. O. & BOWLES, D. J. 1996. Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science*, 274, 1914-7.
- OGRYZKO, V. V. 2008. Erwin Schroedinger, Francis Crick and epigenetic stability. *Biol Direct*, 3, 15.
- OHTAKE, M., YAMAMOTO, H. & UCHIYAMA, T. 1999. Influences of Metabolic Inhibitors and Hydrolytic Enzymes on the Adhesion of Appressoria of

- Pyricularia oryzae to Wax-coated Cover-glasses. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 978-82.
- OIDE, S., BEJAI, S., STAAL, J., GUAN, N., KALIFF, M. & DIXELIUS, C. 2013. A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 200, 1187-99.
- OLIVER, F., AMON, E. U., BREATHNACH, A., FRANCIS, D. M., SARATHCHANDRA, P., BLACK, A. K. & GREAVES, M. W. 1991. Contact urticaria due to the common stinging nettle (*Urtica dioica*)--histological, ultrastructural and pharmacological studies. *Clin Exp Dermatol*, 16, 1-7.
- OLIVER, R. P. & SOLOMON, P. S. 2010. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Curr Opin Plant Biol*.
- OROZCO-CARDENAS, M., MCGURL, B. & RYAN, C. A. 1993. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8273-6.
- PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. M., EMERINE, D. K. & MUKHTAR, M. S. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci*, 18, 402-11.
- PALLAS, J. A., PAIVA, N. L., CHRIS, L. & RICHARD, A. D. 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia - lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 10.
- PAPE, S., THUROW, C. & GATZ, C. 2010. The *Arabidopsis* PR-1 promoter contains multiple integration sites for the coactivator NPR1 and the repressor SNI1. *Plant Physiol*, 154, 1805-18.
- PARISY, V., POINSSOT, B., OWSIANOWSKI, L., BUCHALA, A., GLAZEBROOK, J. & MAUCH, F. 2007. Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant J*, 49, 159-72.
- PARK, S. W., LI, W., VIEHHAUSER, A., HE, B., KIM, S., NILSSON, A. K., ANDERSSON, M. X., KITTLE, J. D., AMBAVARAM, M. M., LUAN, S., ESKER, A. R., THOLL, D., CIMINI, D., ELLERSTROM, M., COAKER, G., MITCHELL, T. K., PEREIRA, A., DIETZ, K. J. & LAWRENCE, C. B. 2013. Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9559-64.
- PAVET, V., QUINTERO, C., CECCHINI, N. M., ROSA, A. L. & ALVAREZ, M. E. 2006. *Arabidopsis* displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 577-87.
- PECENKOVA, T., PLESKOT, R. & ZARSKY, V. 2017. Subcellular Localization of *Arabidopsis* Pathogenesis-Related 1 (PR1) Protein. *Int J Mol Sci*, 18.
- PERALTA, I. E. & SPOONER, D. M. 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Am J Bot*, 88, 1888-902.

Bibliografia

- PERVOUCHINE, D. D., DJEBALI, S., BRESCHI, A., DAVIS, C. A., BARJA, P. P., DOBIN, A., TANZER, A., LAGARDE, J., ZALESKI, C., SEE, L. H., FASTUCA, M., DRENKOW, J., WANG, H., BUSSOTTI, G., PEI, B., BALASUBRAMANIAN, S., MONLONG, J., HARMANCI, A., GERSTEIN, M., BEER, M. A., NOTREDAME, C., GUIGO, R. & GINGERAS, T. R. 2015. Enhanced transcriptome maps from multiple mouse tissues reveal evolutionary constraint in gene expression. *Nat Commun*, 6, 5903.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PICHERSKY, E. & GANG, D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci*, 5, 439-45.
- PIETERSE, C. M., VAN DER DOES, D., ZAMIOUDIS, C., LEON-REYES, A. & VAN WEES, S. C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 489-521.
- PIKAARD, C. S. & MITTELSTEN SCHEID, O. 2014. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a019315.
- PO-WEN, C., SINGH, P. & ZIMMERLI, L. 2013. Priming of the Arabidopsis pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria. *Mol Plant Pathol*, 14, 58-70.
- PONTIER, D., BALAGUE, C. & ROBY, D. 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C R Acad Sci III*, 321, 721-34.
- PRATS, E., MUR, L. A., SANDERSON, R. & CARVER, T. L. 2005. Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol Plant Pathol*, 6, 65-78.
- PRINS, T. W., WAGEMAKERS, L., SCHOUTEN, A. & VAN KAN, J. A. 2000. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* double dagger. *Mol Plant Pathol*, 1, 169-78.
- QI, L., YAN, J., LI, Y., JIANG, H., SUN, J., CHEN, Q., LI, H., CHU, J., YAN, C., SUN, X., YU, Y., LI, C. & LI, C. 2012. Arabidopsis thaliana plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. *New Phytol*, 195, 872-82.
- RAMIREZ-FERNANDEZ, J., BOTUBOL, J. M., BUSTILLO, A. J., ALEU, J., COLLADO, I. G. & HERNANDEZ-GALAN, R. 2011. Botcinolide/botcinin: asymmetric synthesis of the key fragments. *Nat Prod Commun*, 6, 443-50.
- RAVI, M., SHIBATA, F., RAMAHI, J. S., NAGAKI, K., CHEN, C., MURATA, M. & CHAN, S. W. 2011. Meiosis-specific loading of the centromere-specific histone CENH3 in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet*, 7, e1002121.
- REUBER, T. L., PLOTNIKOVA, J. M., DEWDNEY, J., ROGERS, E. E., WOOD, W. & AUSUBEL, F. M. 1998. Correlation of defense gene induction defects with

- powdery mildew susceptibility in Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J*, 16, 473-85.
- RHA, E., PARK, H. J., KIM, M. O., CHUNG, Y. R., LEE, C. W. & KIM, J. W. 2001. Expression of exo-polygalacturonases in Botrytis cinerea. *FEMS Microbiol Lett*, 201, 105-9.
- RIBOT, C., ZIMMERLI, C., FARMER, E. E., REYMOND, P. & POIRIER, Y. 2008. Induction of the Arabidopsis PHO1;H10 gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Physiol*, 147, 696-706.
- RICARDI, M. M., GONZALEZ, R. M. & IUSEM, N. D. 2010. Protocol: fine-tuning of a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) protocol in tomato. *Plant Methods*, 6, 11.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A., GRANT, M. & JONES, J. D. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol*, 49, 317-43.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A., NAVARRO, L., BARI, R. & JONES, J. D. 2007. Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol*, 10, 372-9.
- ROLKE, Y., LIU, S., QUIDDE, T., WILLIAMSON, B., SCHOUTEN, A., WELTRING, K. M., SIEWERS, V., TENBERGE, K. B., TUDZYNSKI, B. & TUDZYNSKI, P. 2004. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in Botrytis cinerea: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol Plant Pathol*, 5, 17-27.
- ROMERO-PUERTAS, M. C., LAXA, M., MATTE, A., ZANINOTTO, F., FINKEMEIER, I., JONES, A. M., PERAZZOLLI, M., VANDELLE, E., DIETZ, K. J. & DELLEDONNE, M. 2007. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell*, 19, 4120-30.
- ROSSI, F. R., KRAPP, A. R., BISARO, F., MAIALE, S. J., PIECKENSTAIN, F. L. & CARRILLO, N. 2017. Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus Botrytis cinerea. *Plant J*, 92, 761-773.
- ROWE, H. C. & KLIEBENSTEIN, D. J. 2007. Elevated genetic variation within virulence-associated Botrytis cinerea polygalacturonase loci. *Mol Plant Microbe Interact*, 20, 1126-37.
- RYAN, C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*, 1477, 112-21.
- SAHU, P. P., PANDEY, G., SHARMA, N., PURANIK, S., MUTHAMILARASAN, M. & PRASAD, M. 2013. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Rep*, 32, 1151-9.
- SAKAMOTO, A., UEDA, M. & MORIKAWA, H. 2002. Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett*, 515, 20-4.

Bibliografía

- SALEH, A., ALVAREZ-VELEGAS, R. & AVRAMOVA, Z. 2008. An efficient chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for studying histone modifications in Arabidopsis plants. *Nat Protoc*, 3, 1018-25.
- SANTNER, A., CALDERON-VILLALOBOS, L. I. & ESTELLE, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*, 5, 301-7.
- SATOH, M., TOKAJI, Y., NAGANO, A. J., HARA-NISHIMURA, I., HAYASHI, M., NISHIMURA, M., OHTA, H. & MASUDA, S. 2014. Arabidopsis mutants affecting oxylipin signaling in photo-oxidative stress responses. *Plant Physiol Biochem*, 81, 90-5.
- SAZE, H., TSUGANE, K., KANNO, T. & NISHIMURA, T. 2012. DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol*, 53, 766-84.
- SCALSCHI, L., VICEDO, B., CAMANES, G., FERNANDEZ-CRESPO, E., LAPENA, L., GONZALEZ-BOSCH, C. & GARCIA-AGUSTIN, P. 2013. Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Mol Plant Pathol*, 14, 342-55.
- SCHOLTHOF, K. B., ADKINS, S., CZOSNEK, H., PALUKAITIS, P., JACQUOT, E., HOHN, T., HOHN, B., SAUNDERS, K., CANDRESSE, T., AHLQUIST, P., HEMENWAY, C. & FOSTER, G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 12, 938-54.
- SCHOUTEN, A., TENBERGE, K. B., VERMEER, J., STEWART, J., WAGEMAKERS, L., WILLIAMSON, B. & VAN KAN, J. A. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*, 3, 227-38.
- SCHOUTEN, A., VAN BAARLEN, P. & VAN KAN, J. A. 2008. Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytol*, 177, 493-505.
- SCHRODER, F., LISSO, J. & MUSSIG, C. 2011. EXORDIUM-LIKE1 promotes growth during low carbon availability in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 156, 1620-30.
- SCHUEGGER, R., NAFISI, M., MANSOUROVA, M., PETERSEN, B. L., OLSEN, C. E., SVATOS, A., HALKIER, B. A. & GLAWISCHNIG, E. 2006. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol*, 141, 1248-54.
- SCHUMACHER, J. 2017. How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet Biol*, 106, 26-41.
- SCHUMACHER, J., GAUTIER, A., MORGANT, G., STUDDT, L., DUCROT, P. H., LE PECHEUR, P., AZEDDINE, S., FILLINGER, S., LEROUX, P., TUDZYNSKI, B. & VIAUD, M. 2013. A functional bikaverin biosynthesis gene cluster in rare strains of *Botrytis cinerea* is positively controlled by VELVET. *PLoS One*, 8, e53729.
- SCHWARTZ, S., MESHORER, E. & AST, G. 2009. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 990-5.

- SCHWELM, A., BADSTOBER, J., BULMAN, S., DESOIGNIES, N., ETEMADI, M., FALLOON, R. E., GACHON, C. M. M., LEGREVE, A., LUKES, J., MERZ, U., NENAROKOVA, A., STRITTMATTER, M., SULLIVAN, B. K. & NEUHAUSER, S. 2018. Not in your usual Top 10: protists that infect plants and algae. *Mol Plant Pathol*, 19, 1029-1044.
- SEGAL, E., FONDUFE-MITTENDORF, Y., CHEN, L., THASTROM, A., FIELD, Y., MOORE, I. K., WANG, J. P. & WIDOM, J. 2006. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 442, 772-8.
- SHABALINA, S. A. & KOONIN, E. V. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol*, 23, 578-87.
- SHAH, J., CHATURVEDI, R., CHOWDHURY, Z., VENABLES, B. & PETROS, R. A. 2014. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant J*, 79, 645-58.
- SHAH, P., GUTIERREZ-SANCHEZ, G., ORLANDO, R. & BERGMANN, C. 2009. A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics*, 9, 3126-35.
- SHAKEEL, S. N., WANG, X., BINDER, B. M. & SCHALLER, G. E. 2013. Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants*, 5, plt010.
- SHAM, A., AL-AZZAWI, A., AL-AMERI, S., AL-MAHMOUD, B., AWWAD, F., AL-RAWASHDEH, A., IRATNI, R. & ABUQAMAR, S. 2014. Transcriptome analysis reveals genes commonly induced by *Botrytis cinerea* infection, cold, drought and oxidative stresses in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 9, e113718.
- SHAM, A., MOUSTAFA, K., AL-SHAMISI, S., ALYAN, S., IRATNI, R. & ABUQAMAR, S. 2017. Microarray analysis of *Arabidopsis* WRKY33 mutants in response to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS One*, 12, e0172343.
- SHERAMETI, I., VENUS, Y., DRZEWIECKI, C., TRIPATHI, S., DAN, V. M., NITZ, I., VARMA, A., GRUNDLER, F. M. & OELMULLER, R. 2008. PYK10, a beta-glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J*, 54, 428-39.
- SHIN, J. H., WANG, H. L., LEE, J., DINWIDDIE, B. L., BELOSTOTSKY, D. A. & CHEKANOVA, J. A. 2013. The role of the *Arabidopsis* Exosome in siRNA-independent silencing of heterochromatic loci. *PLoS Genet*, 9, e1003411.
- SHINE, M. B., YANG, J. W., EL-HABBAK, M., NAGYABHYRU, P., FU, D. Q., NAVARRE, D., GHABRIAL, S., KACHROO, P. & KACHROO, A. 2016. Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. *New Phytol*, 212, 627-636.
- SIVAKUMARAN, A., AKINYEMI, A., MANDON, J., CRISTESCU, S. M., HALL, M. A., HARREN, F. J. & MUR, L. A. 2016. ABA Suppresses *Botrytis cinerea* Elicited NO Production in Tomato to Influence H₂O₂ Generation and Increase Host Susceptibility. *Front Plant Sci*, 7, 709.

Bibliografia

- SJOBRING, U., BJORCK, L. & KASTERN, W. 1991. Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties. *J Biol Chem*, 266, 399-405.
- SONG, S., QI, T., FAN, M., ZHANG, X., GAO, H., HUANG, H., WU, D., GUO, H. & XIE, D. 2013. The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. *PLoS Genet*, 9, e1003653.
- SONG, Y. S., SEO, D. J. & JUNG, W. J. 2017. Identification, purification, and expression patterns of chitinase from psychrotolerant *Pedobacter* sp. PR-M6 and antifungal activity in vitro. *Microb Pathog*, 107, 62-68.
- SPIKER, S., MURRAY, M. G. & THOMPSON, W. F. 1983. DNase I sensitivity of transcriptionally active genes in intact nuclei and isolated chromatin of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 815-9.
- SPOEL, S. H., KOORNNEEF, A., CLAESSENS, S. M., KORZELIUS, J. P., VAN PELT, J. A., MUELLER, M. J., BUCHALA, A. J., METRAUX, J. P., BROWN, R., KAZAN, K., VAN LOON, L. C., DONG, X. & PIETERSE, C. M. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15, 760-70.
- SPRINGER, N. M. 2013. Epigenetics and crop improvement. *Trends Genet*, 29, 241-7.
- STROTHER, P. K., BATTISON, L., BRASIER, M. D. & WELLMAN, C. H. 2011. Earth's earliest non-marine eukaryotes. *Nature*, 473, 505-9.
- SUTTON, J. C., LI, D.-W., PENG, G., YU, H. & ZHANG, P. 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant disease*, 81, 316-328.
- SZYNDLER, M. W., HAYNES, K. F., POTTER, M. F., CORN, R. M. & LOUDON, C. 2013. Entrapment of bed bugs by leaf trichomes inspires microfabrication of biomimetic surfaces. *J R Soc Interface*, 10, 20130174.
- TADA, Y., SPOEL, S. H., PAJEROWSKA-MUKHTAR, K., MOU, Z., SONG, J., WANG, C., ZUO, J. & DONG, X. 2008. Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321, 952-6.
- TAN, K. K. 1976. Light-induced synchronous conidiation in the fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*, 93, 278-282.
- TEN HAVE, A., BREUIL, W. O., WUBBEN, J. P., VISSER, J. & VAN KAN, J. A. 2001. *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet Biol*, 33, 97-105.
- TEN HAVE, A., ESPINO, J. J., DEKKERS, E., VAN SLUYTER, S. C., BRITO, N., KAY, J., GONZALEZ, C. & VAN KAN, J. A. 2010. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet Biol*, 47, 53-65.
- THOMMA, B. P., NELISSEN, I., EGGERMONT, K. & BROEKAERT, W. F. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J*, 19, 163-71.

- TILGNER, H., NIKOLAOU, C., ALTHAMMER, S., SAMMETH, M., BEATO, M., VALCARCEL, J. & GUIGO, R. 2009. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 996-1001.
- TIRAJOH, A., AUNG, T. S., MCKAY, A. B. & PLANT, A. L. 2005. Stress-responsive alpha-dioxygenase expression in tomato roots. *J Exp Bot*, 56, 713-23.
- TOLLERVEY, J. R. & LUNYAK, V. V. 2012. Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics*, 7, 823-40.
- TON, J., D'ALESSANDRO, M., JOURDIE, V., JAKAB, G., KARLEN, D., HELD, M., MAUCH-MANI, B. & TURLINGS, T. C. 2007. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J*, 49, 16-26.
- TON, J., FLORS, V. & MAUCH-MANI, B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci*, 14, 310-7.
- TORRES, M. A. & DANGL, J. L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 397-403.
- TRUMAN, W., DE ZABALA, M. T. & GRANT, M. 2006. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J*, 46, 14-33.
- TSUDA, K. & KATAGIRI, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 13, 459-65.
- TSUKADA, K., TAKAHASHI, K. & NABETA, K. 2010. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, 71, 2019-23.
- TUR, G., GEORGIEVA, E. I., GAGETE, A., LOPEZ-RODAS, G., RODRIGUEZ, J. L. & FRANCO, L. 2010. Factor binding and chromatin modification in the promoter of murine *Egr1* gene upon induction. *Cell Mol Life Sci*, 67, 4065-77.
- TURLINGS, T. C., LOUGHRIN, J. H., MCCALL, P. J., ROSE, U. S., LEWIS, W. J. & TUMLINSON, J. H. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4169-74.
- TURNER, B. M. 2007. Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol*, 9, 2-6.
- TURNER, J. G., ELLIS, C. & DEVOTO, A. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14 Suppl, S153-64.
- TURRION-GOMEZ, J. L. & BENITO, E. P. 2011. Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Mol Plant Pathol*, 12, 606-16.
- UEHLING, J., DEVEAU, A. & PAOLETTI, M. 2017. Do fungi have an innate immune response? An NLR-based comparison to plant and animal immune systems. *PLoS Pathog*, 13, e1006578.

Bibliografia

- VAN DE POEL, B. & VAN DER STRAETEN, D. 2014. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front Plant Sci*, 5, 640.
- VAN DER DOES, D., LEON-REYES, A., KOORNNEEF, A., VAN VERK, M. C., RODENBURG, N., PAUWELS, L., GOOSSENS, A., KORBES, A. P., MEMELINK, J., RITSEMA, T., VAN WEES, S. C. & PIETERSE, C. M. 2013. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell*, 25, 744-61.
- VAN HOLDE, K. E. 1989. *Chromatin*, New York, Springer-Verlag.
- VAN KAN, J. A. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci*, 11, 247-53.
- VAN KAN, J. A., STASSEN, J. H., MOSBACH, A., VAN DER LEE, T. A., FAINO, L., FARMER, A. D., PAPASOTIRIOU, D. G., ZHOU, S., SEIDL, M. F., COTTAM, E., EDEL, D., HAHN, M., SCHWARTZ, D. C., DIETRICH, R. A., WIDDISON, S. & SCALLIET, G. 2017. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*, 18, 75-89.
- VAN LOON, L. C., GERAATS, B. P. & LINTHORST, H. J. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, 11, 184-91.
- VAN WEES, S. C., CHANG, H. S., ZHU, T. & GLAZEBROOK, J. 2003. Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiol*, 132, 606-17.
- VANYUSHIN, B. F. & ASHAPKIN, V. V. 2011. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 1809, 360-8.
- VAZQUEZ, F., LEGRAND, S. & WINDELS, D. 2010. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci*, 15, 337-45.
- VELLOSILLO, T., MARTINEZ, M., LOPEZ, M. A., VICENTE, J., CASCON, T., DOLAN, L., HAMBERG, M. & CASTRESANA, C. 2007. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, 19, 831-46.
- VENKATESH, S. & WORKMAN, J. L. 2015. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 178-89.
- VICEDO, B., FLORS, V., DE LA, O. L. M., FINITI, I., KRAVCHUK, Z., REAL, M. D., GARCIA-AGUSTIN, P. & GONZALEZ-BOSCH, C. 2009. Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 1455-65.
- VIDHYASEKARAN, P. 2014. *PAMP Signals in Plant Innate Immunity, Signal Perception and Transduction*, Springer Netherlands.
- VISNOVITZ, T., VILAGI, I., VARRO, P. & KRISTOF, Z. 2007. Mechanoreceptor Cells on the Tertiary Pulvini of *Mimosa pudica* L. *Plant Signal Behav*, 2, 462-6.
- WAGNER, E. J. & CARPENTER, P. B. 2012. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 115-26.

- WANG, C., DING, Y., YAO, J., ZHANG, Y., SUN, Y., COLEE, J. & MOU, Z. 2015. Arabidopsis Elongator subunit 2 positively contributes to resistance to the necrotrophic fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J*, 83, 1019-33.
- WANG, D., PAJEROWSKA-MUKHTAR, K., CULLER, A. H. & DONG, X. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol*, 17, 1784-90.
- WANG, M., MOK, M. W., HARPER, H., LEE, W. H., MIN, J., KNAPP, S., OPPERMANN, U., MARSDEN, B. & SCHAPIRA, M. 2010a. Structural genomics of histone tail recognition. *Bioinformatics*, 26, 2629-30.
- WANG, Y., LIN, A., LOAKE, G. J. & CHU, C. 2013. H₂O₂-induced leaf cell death and the crosstalk of reactive nitric/oxygen species. *J Integr Plant Biol*, 55, 202-8.
- WANG, Y., RIES, A., WU, K., YANG, A. & CRAWFORD, N. M. 2010b. The Arabidopsis Prohibitin Gene PHB3 Functions in Nitric Oxide-Mediated Responses and in Hydrogen Peroxide-Induced Nitric Oxide Accumulation. *Plant Cell*, 22, 249-59.
- WASTERNAK, C., GOETZ, S., HELLWEGE, A., FORNER, S., STRNAD, M. & HAUSE, B. 2012. Another JA/COI1-independent role of OPDA detected in tomato embryo development. *Plant Signal Behav*, 7, 1349-53.
- WEBER, C. M., RAMACHANDRAN, S. & HENIKOFF, S. 2014. Nucleosomes are context-specific, H2A.Z-modulated barriers to RNA polymerase. *Mol Cell*, 53, 819-30.
- WEBER, H. 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci*, 7, 217-24.
- WEINER, A., HUGHES, A., YASSOUR, M., RANDO, O. J. & FRIEDMAN, N. 2010. High-resolution nucleosome mapping reveals transcription-dependent promoter packaging. *Genome Res*, 20, 90-100.
- WILDERMUTH, M. C., DEWDNEY, J., WU, G. & AUSUBEL, F. M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562-5.
- WILLIAMS, B., KABBAGE, M., KIM, H. J., BRITT, R. & DICKMAN, M. B. 2011. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathog*, 7, e1002107.
- WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P. & VAN KAN, J. A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol*, 8, 561-80.
- WINDRAM, O., MADHOU, P., MCHATTIE, S., HILL, C., HICKMAN, R., COOKE, E., JENKINS, D. J., PENFOLD, C. A., BAXTER, L., BREEZE, E., KIDDLE, S. J., RHODES, J., ATWELL, S., KLIEBENSTEIN, D. J., KIM, Y. S., STEGLE, O., BORGWARDT, K., ZHANG, C., TABRETT, A., LEGAIE, R., MOORE, J., FINKENSTADT, B., WILD, D. L., MEAD, A., RAND, D., BEYNON, J., OTT, S., BUCHANAN-WOLLASTON, V. & DENBY, K. J. 2012. Arabidopsis defense

Bibliografia

- against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell*, 24, 3530-57.
- WOO, H., DAM HA, S., LEE, S. B., BURATOWSKI, S. & KIM, T. 2017. Modulation of gene expression dynamics by co-transcriptional histone methylations. *Exp Mol Med*, 49, e326.
- WU, M., ZHANG, L., LI, G., JIANG, D. & GHABRIAL, S. A. 2010. Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology*, 406, 117-26.
- XIAO, J., WATANABE, T., KAMAKURA, T., OHSHIMA, A. & YAMAGUCHI, I. 1994. Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 44, 227-236.
- YANG, Y. X., WANG, M. M., YIN, Y. L., ONAC, E., ZHOU, G. F., PENG, S., XIA, X. J., SHI, K., YU, J. Q. & ZHOU, Y. H. 2015. RNA-seq analysis reveals the role of red light in resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in tomato plants. *BMC Genomics*, 16, 120.
- YASUDA, M., ISHIKAWA, A., JIKUMARU, Y., SEKI, M., UMEZAWA, T., ASAMI, T., MARUYAMA-NAKASHITA, A., KUDO, T., SHINOZAKI, K., YOSHIDA, S. & NAKASHITA, H. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20, 1678-92.
- YELAGANDULA, R., STROUD, H., HOLEC, S., ZHOU, K., FENG, S., ZHONG, X., MUTHURAJAN, U. M., NIE, X., KAWASHIMA, T., GROTH, M., LUGER, K., JACOBSEN, S. E. & BERGER, F. 2014. The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in *Arabidopsis*. *Cell*, 158, 98-109.
- YU, M., LAMATTINA, L., SPOEL, S. H. & LOAKE, G. J. 2014. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol*, 202, 1142-56.
- YUN, B. W., FEECHAN, A., YIN, M., SAIDI, N. B., LE BIHAN, T., YU, M., MOORE, J. W., KANG, J. G., KWON, E., SPOEL, S. H., PALLAS, J. A. & LOAKE, G. J. 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, 478, 264-8.
- ZANDER, M., LA CAMERA, S., LAMOTTE, O., METRAUX, J. P. & GATZ, C. 2010. *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *Plant J*, 61, 200-10.
- ZANINOTTO, F., LA CAMERA, S., POLVERARI, A. & DELLEDONNE, M. 2006. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol*, 141, 379-83.
- ZAREMBA-NIEDZWIEDZKA, K., CACERES, E. F., SAW, J. H., BACKSTROM, D., JUZOKAITE, L., VANCAESTER, E., SEITZ, K. W., ANANTHARAMAN, K., STARNAWSKI, P., KJELDSSEN, K. U., STOTT, M. B., NUNOURA, T., BANFIELD, J. F., SCHRAMM, A., BAKER, B. J., SPANG, A. & ETTEMA, T. J. 2017. Asgard

- archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 541, 353-358.
- ZEIDLER, D., ZAHNINGER, U., GERBER, I., DUBERY, I., HARTUNG, T., BORS, W., HUTZLER, P. & DURNER, J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15811-6.
- ZHAO, Y., HULL, A. K., GUPTA, N. R., GOSS, K. A., ALONSO, J., ECKER, J. R., NORMANLY, J., CHORY, J. & CELENZA, J. L. 2002. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev*, 16, 3100-12.
- ZHENG, X. Y., SPIVEY, N. W., ZENG, W., LIU, P. P., FU, Z. Q., KLESSIG, D. F., HE, S. Y. & DONG, X. 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe*, 11, 587-96.
- ZHENG, Z., QAMAR, S. A., CHEN, Z. & MENGISTE, T. 2006. *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J*, 48, 592-605.
- ZHU, F., XI, D. H., YUAN, S., XU, F., ZHANG, D. W. & LIN, H. H. 2014. Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 27, 567-77.
- ZUPAN, J. R. & ZAMBRYSKI, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol*, 107, 1041-7.