



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Interacción de *LRA5* con genes
asociados a defensa en *Arabidopsis***

Albor Dobón Alonso

TESIS DOCTORAL

Director:

Pablo Tornero Feliciano

Brande B. Hertel Wulff

Valencia, 2010



Dr. D. Pablo Tornero Feliciano, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y **Dr. D. Brande B. Hertel Wulff**, Científico Post-Doctoral de The Sainsbury Laboratory,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Interacción de *LRA5* con genes asociados a defensa en *Arabidopsis*” ha sido realizada por Albor Dobón Alonso bajo nuestra dirección, en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (U.P.V – C.S.I.C), y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a ocho de Junio de dos mil diez.

Fdo. Pablo Tornero Feliciano

Fdo. Brande B. Hertel Wulff

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de esta Tesis, principalmente a Pablo Tornero (al que agradezco que me permitiera formar parte de sus proyectos y su generosidad), Brande Wulff (compañero de fatigas), Jonathan B. Nilsen y Juan Vicente Canet (je, je, no sé que poner de ti :). Agradezco también a José Luis su inestimable ayuda, absolutamente altruista, en la resolución de problemas de todo tipo que me he ido encontrando a lo largo de estos años.

Quiero agradecer la ayuda prestada por Pablo Vera y todos mis compañeros del laboratorio 0.04 así como a los de mi laboratorio, 0.06. No me gustaría olvidarme de los compañeros que formaron parte del laboratorio 21 y que en la actualidad ya no se encuentran en el IBMCP, así como a mis segundas mamás que tampoco se encuentran ya aquí. Muchas gracias mamis.

Agradecer muy especialmente a los compañeros que me han permitido compartir sus problemas, alegrías, ... el poder entrar en sus vidas. A aquellos que me dieron su consejo. A los que me han mostrado su cariño y aprecio. A todos, muchas gracias.

A mi familia, Manu, Víctor, Vicenta, Zahara, José Javier y Alicia.

Resumen

La interacción planta-patógeno es una de las relaciones más interesantes que se pueden establecer entre las plantas y los organismos que las rodean. El estudio de mutantes afectados en respuestas de defensa constituye una importante fuente de información acerca de los mecanismos que la componen. *LRA5* fue descrito previamente como un mutante de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) afectado en varios tipos de resistencia y que presenta niveles anormalmente bajos de ácido salicílico (SA), hormona relacionada con la resistencia a patógenos biotrofos. Se ha intentado cartografiar su posición en el genoma de *Arabidopsis*, reduciendo el intervalo de mapeo a tres únicos genes en los que no se ha encontrado alteración en la secuencia ni en la expresión que pudiera explicar el fenotipo de *LRA5*, descubriendo finalmente que se trata de un transgén *NahG* (que codifica para una enzima salicilato hidroxilasa) de origen desconocido.

Para poder caracterizar componentes de la resistencia a biotrofos independientes de la hormona SA, se ha realizado un rastreo de supresores de *LRA5* que restauraran, al menos parcialmente, la resistencia frente a *Pseudomonas syringae pv tomato* (*Pto*). La mayor parte del trabajo se ha centrado en la caracterización de dos mutantes extragénicos, escogidos por su carácter opuesto. *esh1* (de EDWARD SCISSOR HANDS 1) posee un peculiar fenotipo de hojas abigarradas y de silicuas agrupadas en los extremos de las inflorescencias, dependiente del número de días pasados en día corto. Es además capaz de suprimir la susceptibilidad a *Pto* y a otros patógenos, y expresa de manera constitutiva PR1. Por otro lado, *jrc1* (de JAROCKS 1) solo restaura la resistencia a *Pto* y expresa PR1 de manera exacerbada tras la infección con patógeno. Además presenta fenotipos de insensibilidad al ácido jasmónico (JA). Es especialmente llamativo el fenotipo de raíces laterales, cuyo número excede con mucho los niveles de *coi1-1* y *jln1*, otros mutantes en la señalización por JA. Finalmente, el cartografiado ha permitido descubrir que *jrc1* es un alelo de *COI1* no nulo. *COI1* es un gen crucial en las repuestas basadas en la hormona JA, explicando la supresión de *NahG* por la regulación negativa existente entre SA y JA.

Resum

La interacció planta-patògen és una de les relacions més interessants que tenen lloc entre la planta i els organismes que la rodegen. L'estudi de mutants afectats en respostes de defensa constitueix una important font d'informació al voltant dels mecanismes que la componen. *LRA5* és un mutant d'*Arabidopsis* afectat en diversos tipus de resistència i que presenta nivells anormalment baixos d'àcid salicílic (SA), hormona relacionada amb la resistència a patògens biòtrofs. S'ha intentat cartografiar la seua posició en el genoma d'*Arabidopsis*, reduint l'interval de mapeig a tres únics gens en què no s'ha trobat alteració en la seqüència ni en l'expressió que pogués explicar el fenotip de *LRA5*, descobrint finalment que es tracta d'un transgen NahG (que codifica per a un enzim salicilat hidroxilasa) d'origen desconegut.

Per tal de poder caracteritzar components de la resistència a biòtrofs independents de l'hormona SA, s'ha realitzat un rastreig de supressors de *LRA5* (anomenats *sls* o SUPPRESSORS OF *LRA5* SUSCEPTIBILITY) que restauraren, almenys parcialment, la resistència front a Pto. Els mutants extragènics *esh1* (de EDWARD SCISSOR HANDS 1) i *jrc1* (de JAROCKS 1) també presenten capacitats variables en la restauració de la resistència front a Pto i altres patògens. *esh1* i *jrc1* presenten diferents característiques que els fan molt interessants. El primer té un fenotip peculiar de fulles bigarrades i de sil·lques agrupades als extrems de les inflorescències dependent del nombre de dies passats en dia curt. A més a més, és capaç de suprimir la susceptibilitat a Pto i a Pto pv. *tabaci*. I també expressa de manera constitutiva PR1. El segon, *jrc1* únicament és capaç de restaurar la resistència a Pto i expressa PR1 de manera exacerbada després de la infecció amb patògen. És especialment cridaner el fenotip d'arrels laterals, amb un nombre que excedeix moltíssim els nivells de *coi1-1* i *jin1*, uns altres mutants en la senyalització per JA. Finalment, el cartografiat ha permès descobrir que *jrc1* és un al·lel de *COI1* no nul. *COI1* és un gen crucial en les respostes basades en l'hormona JA, explicant la supressió de NahG per la regulació negativa existent entre SA i JA.

Abstract

The plant-pathogen interaction is one of the most interesting relationships found between plants and the organisms surrounding them. The study of mutants affected in defense responses represents an important source of information about the mechanisms they consist of. *LRA5* was described as an *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) mutant that becomes impaired in several resistance responses and shows abnormally low levels of salicylic acid (SA), a hormone involved in resistance to biotrophic pathogens. Its location in the *Arabidopsis* genome was mapped to an interval of three genes. The sequencing of the interval did not reveal any nucleotide mutation, and no change on their expression level was found that could explain the phenotype of *LRA5*, finding lately that it was a transgene carrying a NahG gene (encoding a salicylate hydroxylase enzyme) of unknown nature.

In order to identify new components of the SA-independent biotrophs resistance pathway, a screening of partially restored resistance plants to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto) has been performed. Most of the work has focused on the characterization of two extragenic mutants that were selected based on their different features. *esh1* (EDWARD SCISSOR HANDS 1) shows a phenotype of twisted leaves and silicles grouped at the end of the inflorescence, this phenotype depending on the number of days it has been grown in short day. It is also able to suppress the susceptibility to Pto and other pathogens and constitutively expresses PR1. On the other hand, *jrc1* (JAROCKS 1) only restores the resistance to Pto and hyperactivates the expression of PR1 after pathogen inoculation. It also shows several insensitivity phenotypes to jasmonic acid (JA). One of its most striking phenotypes is related to the lateral roots, that appear in a number which is much more higher than in *coi1-1* and *jln1*, which are other mutants in the JA signaling. Finally the mapping has shown that *jrc1* is a non- null allele of *COI1*. *COI1* gene plays a key role in those responses based on JA, explaining the suppression of the NahG phenotype in terms of the negative crosstalk between SA and JA signalling.

Abreviaturas

ET	Etileno
ETI	<i>"Effector triggered immunity"</i> ; inmunidad activada por efector
ETS	<i>"Effector triggered susceptibility"</i> ; susceptibilidad activada por efector
FAD	FATTY ACID DESATURATION
FAD	Flavín adenina dinucleótido
<i>fliC</i>	Gen de la flagelina
flg22	Péptido de la flagelina de 22 aminoácidos
FLS2	FLAGELIN INSENSITIVE 2
GH3	GENE ENCODING AN AUXIN-CONJUGATING ENZYME
GUS	β -glucuronidasa
HSP	HEAT SHOCK PROTEIN
HR	Respuesta hipersensible
<i>hrc</i>	<i>HR and conserved</i>
<i>hrp</i>	<i>HR and pathogenecity</i>
ICS	Isocorismato sintasa
INA	Ácido 2, 6-dicloroisonicotínico
IPL	Isocorismato piruvato liasa
ISR	Resistencia sistémica inducida
JA	Ácido jasmónico
JA-Ile	JA isoleucina
JAR	JASMONIC ACID RESISTANT
JAZ	JASMONATE ZIM DOMAIN
JRC	JAROCKS
JIN	JASMONATE INSENTIVE
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Laer-0	Ecotipo Landsberg erecta-0 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
LB	Medio Luria-Bertani
lox	Lipoxigenasa
LPT	<i>Lipid transfer protein</i>
LRA	LOSS OF RECOGNITION TO AVRRPM1
LRR	<i>"Leucine-rich repeat"</i> ; repeticiones ricas en leucina
LSD	LESION SIMULATED DISEASE
LZ	<i>"Leucine zipper"</i> ; cremallera de leucina

MAMPs	<i>“Microbe-Associated Molecular Patterns”</i> ; patrones moleculares asociados a microbio
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MeJa	Metil-jasmonato
MeSA	Metil-salicilato
MeSAG	Derivado glucosilado de MeSA
MS	Medio Murashige y Skoog
MYC	Factor de transcripción con dominio básico <i>helix-loop-helix</i>
NAH7	Plasmido de <i>Pseudomas putida</i> que contiene el gen <i>NahG</i>
<i>NahG</i>	<i>Salicylate hydroxylase gene</i>
NB	<i>“Nucleotide binding”</i> ; unión a nucleótido
NCBI	<i>“National Center of Biotechnology Information”</i> ; Centro nacional de información biotecnológica
<i>NDR</i>	<i>NON-RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE</i>
<i>NHO</i>	<i>NONHOST</i>
NO	Óxido nítrico
nos	Nopalina sintasa
<i>NPR1</i>	<i>NON EXPRESSION OF PR1</i>
Nt	Región amino-terminal
OB	<i>“Oxidative burst”</i> ; explosión oxidativa
<i>OCP</i>	<i>OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE</i>
OPDA	Ácido-12-oxo-fitodienoico
<i>OPR</i>	<i>OPDA REDUCTASE</i>
<i>PAD</i>	<i>PHYTOALEXIN-DEFICIENT</i>
PD	<i>Pull down</i>
<i>PEN</i>	<i>PENETRATION</i>
PAMPs	<i>“Pathogen-Associated Molecular Patterns”</i> ; patrones moleculares asociados a patógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PBS</i>	<i>AVRPPHB SUSCEPTIBLE 1</i>
PDF1.2	Defensina
<i>PMR</i>	<i>POWDERY MILDEW RESISTANCE</i>
PR	Proteína relacionada con la patogénesis
PRR	Receptores para el reconocimiento de patrones
PTI	<i>“PAMP triggered immunity”</i> ; inmunidad activada por PAMP
Pto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000
pv.	Patovar
qRT-PCR	<i>Quantitative RT-PCR</i>
R	Gen de resistencia

RAR	<i>REQUIRED FOR MLA12-DEPENDENT RESISTANCE</i>
RIN	<i>RPM1 INTERACTING PROTEIN</i>
RLK	<i>RECEPTOR-LIKE KINASE</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ROI	Intermediarios de oxígeno reactivo
RPM	<i>RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. MACULICOLA</i>
RT-PCR	Transcripción reversa de ARN seguida de PCR
SA	Ácido salicílico
SABP	Proteína de unión al SA
SAG	β -O-D-glucosalicílico
SAGT	SA transferasa
sal	Operón de NAH7
sap	<i>"Peciole exúdate"</i> ; exudado de peciolo
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SCF	<i>SKIP-CULLIN-F Box</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGE	Ester de la saliciloil glucosa
SGT	<i>SUPRESOR OF THE G2 ALLELE OF SKP1</i>
SID	<i>SA INDUCTION DEFICIENT</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive-Factor Association Protein Receptor</i>
SNI	<i>SUPPRESSOR OF NPR1-1, INDUCIBLE</i>
SSI	<i>SUPPRESSOR OF SA INSENSITIVITY</i>
SSLP	Single Sequence Length Polymorphism
T3SS	<i>"Type 3 secretion system"</i> ; sistema de secreción tipo 3
TAIR	<i>"The Arabidopsis Information Resource"</i> ; fuente de información de Arabidopsis
THI2.1	Tionina
TMV	Virus del mosaico del tabaco
TIR	<i>"Toll/interleukin-1 receptor"</i> ; receptor Toll/Interleucina-1
ufc	Unidades formadoras de colonias
Ws-1	Ecotipo Wassilewskija 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
WRKY	Factor de transcripción con motivo Trp-Arg-Lys-Tyr
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido
ZIM	<i>Zinc finger protein</i>

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	i
-------------------	---

TABLA DE CONTENIDO.....	v
----------------------------	---

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	ix
------------------------------------	----

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

1. BARRERAS PREFORMADAS	3
-------------------------------	---

2. LA PERCEPCIÓN DE SEÑALES DE PELIGRO	4
--	---

2.1. INMUNIDAD ACTIVADA POR PAMPS (PTI)	6
---	---

2.2. INMUNIDAD ACTIVADA POR EFECTOR (ETI)	7
---	---

3. RESPUESTAS ESPECÍFICAS AL PATÓGENO	14
---	----

3.1. RESISTENCIA FRENTE A PATÓGENOS BIOTROFOS	15
---	----

3.1.1. <i>Respuestas basadas en ácido salicílico</i>	15
--	----

3.2. RESISTENCIA FRENTE A PATÓGENOS NECROTROFOS.....	24
--	----

3.2.1. <i>Respuestas basadas en ácido jasmónico</i>	24
---	----

3.2.2. <i>Respuestas basadas en etileno</i>	26
---	----

3.2.3. <i>Respuestas basadas en ácido abscísico</i>	30
---	----

3.3. RESPUESTA SAR.....	30
-------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	35
----------------------------	----

1. MATERIAL BIOLÓGICO	37
-----------------------------	----

1.1. BACTERIAS	37
----------------------	----

1.1.1. <i>Pseudomonas syringae</i>	37
--	----

1.1.2. HONGOS.....	37
--------------------	----

1.1.2.1. <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	37
---	----

1.1.2.2. <i>Phytophthora infestans</i>	37
--	----

1.2. PLANTAS Y TRATAMIENTOS	38
-----------------------------------	----

2. CULTIVO DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
--	----

2.1. CULTIVO DE BACTERIAS	40
---------------------------------	----

2.1.1. <i>Cultivo de P. syringae</i>	40
--	----

2.2. CULTIVO DE HONGOS.....	40
-----------------------------	----

2.2.1.	<i>Cultivo de P. cucumerina</i>	40
2.2.2.	<i>Cultivo de P. infestans</i>	41
2.3.	CULTIVO DE PLANTAS.....	41
3.	AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	42
3.1.	PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ADN.....	42
3.1.1.	<i>Purificación de ADN de plantas</i>	42
3.1.2.	<i>Amplificación por PCR</i>	42
3.1.3.	<i>Análisis de metilación de ADN mediante McrBC</i>	43
3.2.	PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ARN	44
3.2.1.	<i>Extracción de ARN de plantas y transcripción reversa</i>	44
3.2.2.	<i>RT-PCR</i>	44
3.2.3.	<i>PCR cuantitativas</i>	45
4.	PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	46
4.1.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE PLANTAS.....	46
4.2.	DOSIFICACIÓN Y ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	46
4.3.	WESTERN BLOT	47
5.	PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS	47
6.	INOCULACIÓN DE PLANTAS	48
6.1.	INOCULACIÓN CON <i>P. SYRINGAE</i>	48
6.1.1.	<i>Evaluación de síntomas y extracción de ARN</i>	48
6.1.2.	<i>Curvas de crecimiento de bacterias</i>	48
6.1.2.1.	Inoculaciones por spray	48
6.1.2.2.	Inoculaciones por infiltración.....	49
6.2.	INOCULACIÓN CON HONGOS FITOPATÓGENOS	49
6.2.1.	<i>Inoculaciones por gota</i>	49
6.2.1.1.	Inoculaciones de <i>P. cucumerina</i>	49
6.2.1.1.2.	Inoculaciones de <i>P. infestans</i>	49
7.	ANÁLISIS GENÉTICOS	50
7.1.	ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LRA5	50
7.2.	CARTOGRAFIADO DE <i>LRA5</i> , <i>ESH1</i> Y <i>JRC1</i>	50
8.	CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDO SALICÍLICO	51
	OBJETIVOS	57
	ANTECEDENTES	53
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
	CAPÍTULO 1	63

1.	CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE <i>LRA5</i> DE <i>A. THALIANA</i>	65
2.	COMPORTEAMIENTO DEL MUTANTE <i>LRA5</i> FRENTE A PATÓGENOS.....	67
2.1.	SUSCEPTIBILIDAD DEL MUTANTE <i>LRA5</i> FRENTE A PATÓGENOS BIOTROFOS.....	67
2.1.1.	<i>Susceptibilidad frente a estirpes de P. syringae virulentas</i>	67
2.1.2.	<i>Susceptibilidad frente a estirpes de P. syringae inespecíficas de Arabidopsis</i>	69
2.1.3.	<i>Susceptibilidad frente a estirpes de P. syringae avirulentas</i>	74
2.1.4.	<i>Interacción con mutantes descritos para la ruta de señalización del SA</i> 77	
2.1.4.1.	Interacción con mutantes que presentan mayor resistencia a <i>Pto</i> ... 77	
2.1.4.2.	Interacción con mutantes en la ruta de señalización del SA dependientes de los receptores TIR-NB-LRR y CC-NB-LRR.....	81
2.2.	INCAPACIDAD PARA DESARROLLAR EL MECANISMO DE SAR	87
2.3.	COMPORTEAMIENTO FRENTE A PATÓGENOS NO BIOTROFOS.....	89
2.3.1.	<i>Comportamiento frente al hemibiotrofo P. infestans</i>	89
2.3.2.	<i>Comportamiento frente al hongo necrotrofo P. cucumerina</i>	91
3.	NIVELES DE SA DEL MUTANTE <i>LRA5</i>	93
4.	MAPEO POSICIONAL DEL MUTANTE <i>LRA5</i>	94
5.	POSIBLE CARÁCTER EPIGENÉTICO DE LA MUTACIÓN <i>LRA5</i>	99
5.1.	MEDIDA DE LOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE LOS GENES DENTRO DEL INTERVALO DE MAPEO100	
5.2.	ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL INTERVALO DE MAPEO DEL MUTANTE <i>LRA5</i>	104
6.	TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO A04 INCLUIDO EN EL INTERVALO DE MAPEO	107
7.	EL MUTANTE <i>LRA5</i> ES UN TRANSGENICO <i>NAHG</i>	108
CAPÍTULO 2		111
1.	JUSTIFICACIÓN DEL RASTREO DE SUPRESORES.....	111
2.	PRUEBA DE CONCEPTO Y RESULTADO DEL RASTREO DE SUPRESORES	113
3.	SUPRESORES INTRAGÉNICOS	119
4.	SUPRESORES EXTRAGÉNICOS.....	124
4.1.	CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE <i>ESH1</i>	127
4.1.1.	<i>Fenotipo macroscópico del mutante esh1</i>	127
4.1.2.	<i>Fenotipo patogénico del mutante esh1</i>	133
4.1.3.	<i>Cartografiado del mutante esh1</i>	138
4.2.	CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE <i>JRC1</i>	139
4.2.1.	<i>Fenotipo del mutante jrc1 frente a patógenos biotrofos</i>	139

4.2.2.	<i>Fenotipo del mutante jrc1 frente a patógenos necrotrofos.....</i>	142
4.2.3.	<i>Caracterización del mutante jrc1 frente a la hormona JA</i>	144
4.2.3.1.	<i>Caracterización en medio de cultivo suplementado con JA</i>	144
4.2.3.2.	<i>Comportamiento frente a respuestas patogénicas específicas de JA y coronatina</i>	149
4.2.3.3.	<i>Respuesta del mutante jrc1 a la aplicación de BTH</i>	153
4.2.4.	CARTOGRAFIADO DEL MUTANTE JRC1	154
CONCLUSIONES.....		161
BIBLIOGRAFÍA.....		165

Índice Figuras y Tablas

Figura 1. Modelo del despliegue de la resistencia bacteriana en plantas.

Figura 2. Rutas de síntesis de SA en Arabidopsis.

Figura 3. Esquema simplificado de las principales rutas de defensa en Arabidopsis.

Figura 4. Eventos implicados en la respuesta SAR.

Tabla 1. Dobles mutantes realizados.

Tabla 2. Cebadores específicos utilizados para las PCR cuantitativas.

Tabla 3. Análisis de segregación de la mutación *LRA5*.

Figura 5. Dominancia por ganancia de función del fenotipo de *LRA5*.

Figura 6. Efecto de la mutación *LRA5* sobre la resistencia a estirpes virulentas de *P. syringae*.

Figura 7. Crecimiento de *Ps pv. tabaci* y *Ps pv. phaseolicola* 3121 en el mutante *LRA5*.

Figura 8. Efecto de la mutación *LRA5* sobre la resistencia a la estirpe *Pto hrpC*.

Figura 9. Comportamiento del mutante *LRA5* frente a las estirpes avirulentas de *Pto avrRpm1* y *avrRpt2*.

Figura 10. Análisis del fenotipo macroscópico y patogénico de los dobles mutantes entre *LRA5* y *cpr1*, *cpr5*, *dnd1* y *lsd1*.

Figura 11. Análisis de la interacción de *LRA5* y mutantes en la ruta del SA determinada por los receptores CC-NB-LRR frente a la resistencia a *Pto*.

Figura 12. Interacción entre *LRA5* y otros mutantes dependientes de la ruta del SA.

Figura 13. Respuesta del mutante *LRA5* frente a compuestos que activan el mecanismo de SAR.

Figura 14. Comportamiento del mutante *LRA5* frente al hongo hemibiotrofo *Phytophthora infestans*.

Figura 15. Medida de las lesiones producidas por el hongo necrotrofo *P. cucumerina* en el mutante *LRA5*.

Figura 16. Niveles de SA libre y total en el mutante *LRA5*.

Tabla 4. Genes comprendidos en el intervalo de mapeo.

Figura 17. Posición en mapa de la mutación *LRA5*.

Figura 18. Expresión de los genes incluidos dentro del intervalo de mapeo del *LRA5* medidos mediante qRT-PCR.

Figura 19. Análisis de metilación del intervalo de mapeo de *LRA5*.

Figura 20. Posibles mecanismos de supresión de *LRA5*.

Figura 21. Prueba de concepto del rastreo de supresores.

Tabla 5. Resumen del análisis estadístico de los supresores de *LRA5*.

Tabla 6. Confirmación de resistencia y alelismo en los supresores intragénicos.

Figura 22. Fenotipo de los supresores intragénicos tras inoculación con *Pto*.

Figura 23. Niveles de SA y expresión del gen *NahG*.

Figura 24. Fenotipo patogénico frente a *Pto* de los supresores *jrc1* y *ehs1*.

Figura 25. Fenotipo del mutante *esh1* en condiciones de día corto y día largo.

Figura 26. Fenotipo *esh* y condiciones de luz.

Figura 27. Relación entre los mutantes *esh1* y *sid2*.

Figura 28. Respuesta del mutante *esh1* a la inoculación con *P.s. pv phaseolicola* y *tabaci*.

Figura 29. Respuesta del mutante *esh1* frente a la infección con *Pto avrRpt2* y *avrRpm1*.

Figura 30. Cartografiado mediante posición en mapa de *esh1*.

Figura 31. Comportamiento de *jrc1* frente a *P.s. pv. phaseolicola* y *P.s. pv. tabaci*.

Figura 32. Comportamiento *jrc1* frente a patógenos específicos.

Figura 33. Comportamiento del mutante *jrc1* frente a *P. cucumerina*.

Figura 34. Fenotipo del mutante *jrc1* en placas suplementadas con MeJA.

Figura 35. Mediciones de peso seco de raíz y parte aérea del mutante *jrc1*.

Figura 36. Respuesta de *jrc1* frente a MeJA, SAR y coronatina.

Figura 37. Sensibilidad del mutante *jrc1* a la aplicación de BTH.

Figura 38. Cartografiado mediante posición de mapa de *jrc1* y fenotipo de F1 de con *coi1-1*.

Figura 39. Representación de la lesión de *jrc1* en *COI1*.

“Todas las familias felices se parecen, las desdichadas lo son cada una a su manera”

León Tolstói, *Ana Karenina*

A mis abuelos

Introducción

Introducción

Las plantas y sus patógenos potenciales establecen entre ellos relaciones tremendamente apasionantes: la riqueza de especies, la espectacular variedad y complejidad de las interacciones, los procesos evolutivos dinámicos y el desafío de su comprensión.

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

Al igual que el resto de las plantas, *Arabidopsis* también debe enfrentarse a estreses de carácter abiótico y biótico para poder llevar a cabo con éxito su ciclo vital. Dentro de los agentes bióticos, tendrá que contraponerse al ataque de multitud de patógenos de muy diversa naturaleza, incluidos bacterias, virus, hongos e insectos entre otros. Para ello, la planta posee una serie de barreras ya formadas pero también una serie de respuestas activas de defensa preparadas para superar estas situaciones.

1. Barreras preformadas

Las barreras preformadas constituyen un mecanismo que, dada su efectividad frente a microorganismos de diversa naturaleza, confieren resistencia inespecífica del patógeno (Heath 2000b). Para ser patogénico, un microbio debe conseguir acceder dentro de la planta, ya sea penetrando la superficie de la hoja o de la raíz a través de heridas (existentes o realizadas por el patógeno) o aperturas naturales (como los

estomas) y posteriormente hacer frente a otro obstáculo, la pared celular (Chisholm *et al.* 2006).

La pared celular es un importante elemento estructural de la planta, que se compone de una matriz ordenada principalmente de polisacáridos y agua y cuyo componente más abundante es la callosa (Vorwerk *et al.* 2004). Algunas modificaciones de la pared celular favorecen la resistencia, así la lignificación la hace más resistente a la presión mecánica aplicada durante la penetración por el apresorio de algunos hongos fitopatógenos (Bechinger *et al.* 1999) y también más impermeable, lo que la convierte en menos accesible a la acción de las enzimas que la degradan (Hückelhoven 2007). Curiosamente, algunos defectos en la composición de la pared también pueden conferir resistencia, como el aumento de pectinas observado en los mutantes de *Arabidopsis pmr5* (*POWDERY MILDEW RESISTANCE 5*) y *pmr6* (*POWDERY MILDEW RESISTANCE 6*) que muestran una mayor resistencia frente a *Erysiphe cichoracearum* (Vogel *et al.* 2004; Vogel *et al.* 2002).

2. La percepción de señales de peligro

Aunque las plantas no poseen un sistema inmunitario *stricto sensu*, si que poseen la capacidad de detectar y montar respuestas de defensa frente a presuntos microorganismos patogénicos, lo que se considera también un sistema de inmunidad asociado a plantas.

Una vez que el patógeno ha conseguido penetrar la pared celular, entra en contacto con receptores situados en la superficie extracelular. Las plantas poseen estos receptores (en inglés, PRRs) para el reconocimiento de patrones o huellas moleculares que identifican toda clase de patógenos (como la quitina de los hongos o los peptidoglucanos de las bacterias) y que la planta no posee, lo que le permite el reconocimiento de estos agentes externos (Boller & Felix 2009) y la inducción de la inmunidad innata de la planta. Se considera actualmente que estos receptores PRR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (en inglés PAMPs) (Chisholm *et al.* 2006) estando englobados estos últimos en un concepto más amplio denominado patrones moleculares asociados a microbios

MAMPs (Boller & He 2009) propuesto tras el descubrimiento de que la planta también es capaz de reconocer de este modo otros microorganismos no patogénicos.

La rotura enzimática de las barreras estructurales que contienen los tejidos de las plantas (como la pared celular) libera al apoplasto subproductos de dicha degradación. Estas moléculas, que actúan como señales de peligro induciendo la inmunidad innata, se consideran patrones moleculares asociados a lesión (en inglés DAMPs).

El reconocimiento de MAMPs y DAMPs es indispensable para la activación de un tipo de inmunidad denominada PTI o Inmunidad activada por PAMPs (Boller & Felix 2009; Jones & Dangl 2006a). Como medida de control, para que se produzca tal activación es necesario superar un umbral en el nivel presente de MAMPs o DAMPs (Bent & Mackey 2007a). El concepto de PTI equivaldría de manera amplia a la conocida anteriormente como resistencia basal u horizontal.

Cuando el microbio es capaz de superar este tipo de inmunidad, debe enfrentarse a un mecanismo de detección mucho más especializado denominado inmunidad activada por efectores ("ETI") (Jones & Dangl 2006a; Chisholm *et al.* 2006) y que contiene a la resistencia basada en genes *R* o resistencia vertical. Los efectores son moléculas que los patógenos utilizan para intentar suprimir la inmunidad PTI y que son específicos de la especie afectada (Bent & Mackey 2007a). En el caso de que la supresión tenga lugar, se producirá la nutrición y dispersión del patógeno dando lugar a la llamada susceptibilidad activada por efector ("ETS") (Jones & Dangl 2006a).

Se cree que la PTI basada en MAMPs sería estable y antigua, mientras que la ETI podría ser el resultado reciente de la pugna coevolutiva entre planta y patógeno por mantener la inmunidad PTI a pesar de los efectores del microbio (Jones & Dangl 2006a).

Ya sea a partir de MAMPs, DAMPs o efectores se activan, al menos en su fase inicial, respuestas de defensa comunes que si bien pueden ser similares en términos cualitativos, la respuesta a cada uno de ellos es diferente en cinética y términos cuantitativos según el tipo de señal de peligro implicada (Boller & Felix 2009).

2.1. Inmunidad activada por PAMPs (PTI)

Como se comentó anteriormente, la lisis enzimática de estructuras tisulares por parte del patógeno provoca la aparición de DAMPs, entre las que se incluyen fragmentos de la pared celular, monómeros de cutina, péptidos de origen citoplasmático como la sistemina o el AtPep1 y péptidos generados a partir de precursores de proteínas secretadas, como HypSyS y RALF (Boller & Felix 2009).

Por otro lado, la planta también es capaz de reconocer MAMPs del patógeno. Los MAMPs pueden tener naturalezas muy distintas, como la quitina y el ergosterol de los hongos o la flagelina o algunos lipopolisacaridos de las bacterias (Zipfel *et al.* 2004).

La relación entre la flagelina y el receptor FLS2 de *Arabidopsis* y el factor de elongación EF-Tu y el receptor EFR de *Arabidopsis* y *Nicotiana benthamiana* constituyen dos de los casos de PTI mejor estudiados.

La flagelina es el componente principal del filamento que forma el flagelo bacteriano. Es un potente inductor de defensa en *Arabidopsis*, pudiéndose encontrar una respuesta similar cuando se aplica un péptido artificial (flg22) obtenido a partir de una región conservada de dicha proteína (Felix *et al.* 1999). No todas las bacterias con flagelo poseen el mismo nivel de conservación de flg22 y por tanto no todas son capaces de elicitar la misma respuesta en *Arabidopsis* (Sun *et al.* 2006).

La flagelina es percibida en *Arabidopsis* a través del receptor FLS2, que se compone de un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR) y otro dominio quinasa, que tras la percepción de la flagelina activa una cascada de señal compuesta por quinasa MAPK (del inglés Mitogen Activated Protein Kinase) (Asai *et al.* 2002). La activación de esta señal por la flagelina tiene como resultado la restricción de la invasión bacteriana contribuyendo a la resistencia (Zipfel *et al.* 2004).

Además no sólo se ha comprobado que la aplicación de flg22 induce resistencia sino que también se ha demostrado que mutaciones en el receptor FLS2 hacen a la planta más susceptible a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto) (Zipfel *et al.* 2004). *Pseudomonas syringae* es una

bacteria fitopatógena gram negativa cuya estirpe DC3000 es patógena de *Arabidopsis* y tomate (Abramovitch & Martin 2004).

El factor de elongación bacteriano EF-Tu es una de las proteínas más abundantes y conservadas en las bacterias (Kunze *et al.* 2004). Su detección a través del receptor ERF (cuya estructura es muy similar a FLS2) activa de igual modo una cadena de quinanasas MAPK cuyo resultado último es también la activación de defensas.

Tras la detección de DAMPs y MAMPs una serie de importantes sucesos tienen lugar en la planta que pueden ser acotados en función de una escala temporal. En el espacio de 1 a 5 minutos se producen una serie de cambios en el flujo de iones a través de la membrana plasmática (Boller 1995) que van acompañados de la liberación de especies reactivas de oxígeno (que aparte de su efecto antibacteriano, también pueden reforzar la pared celular y actuar de señal de estrés para inducir otras respuestas de defensa) (Apel & Hirt 2004), la activación de quinanasas MAPK y cambios en la fosforilación de otras proteínas (Peck *et al.* 2001). Al cabo de 5-30 minutos se induce la biosíntesis de etileno (Spanu *et al.* 1994), la endocitosis de receptores (Boller & Felix 2009) y la activación génica (Zipfel *et al.* 2004). Finalmente al cabo de horas se produce la deposición de callosa (Gómez-Gómez *et al.* 1999), entre otros eventos.

2.2. Inmunidad activada por efector (ETI)

Los efectores, como las toxinas y los factores proteicos, se pueden definir como moléculas derivadas de patógeno con la intención de promover la virulencia mediante la interacción con la planta (Bent & Mackey 2007a). Un efector que da como resultado una respuesta necrotrófica puede actuar como un elicitor limitando la infección en el caso de un patógeno biotrofo, mientras que podría facilitar la infección frente a un patógeno necrotrófo actuando entonces como una toxina. En el caso de un patógeno hemibiotrofo como *Phytophthora infestans* el efector puede actuar como elicitor o toxina dependiendo del estado biotrófico o necrotrófico de la enfermedad (Kamoun 2007).

Los efectores se diferencian de los MAMPs en que los primeros pueden estar ausentes o haber evolucionado substancialmente en algunas de las cepas del patógeno, mientras que los MAMPs son elicitores de defensa que son estables evolutivamente, siendo componentes tan indispensables para el patógeno que no pueden ser sacrificados o incluso alterados sin afectar seriamente su viabilidad (Bent & Mackey 2007a).

Una parte de las bacterias gram negativas (como *P. syringae*), hongos y oomicetos son capaces de secretar un arsenal de efectores dentro de la célula vegetal con el fin de suprimir la inmunidad ETI y permitir la infección parasítica (Kamoun 2007; Alfano & Collmer 2004). En algunos casos la planta no es capaz de detectar estos efectores y se produce la susceptibilidad activada por efector o ETS (Jones & Dangl 2006b).

Para hacer llegar estos efectores al citoplasma celular los microbios han desarrollado complejas estructuras o aparatos como el sistema de secreción tipo III (T3SS) o inyectisoma, que ciertas bacterias adosadas al exterior de la membrana celular utilizan para inyectar los efectores al citosol o a la cara citosólica de la membrana (Cornelis 2006). El aparato consta de un complejo en forma aguja, similar al del flagelo, que se encuentra anclado a la membrana de la bacteria y un *pilus*, en el caso de *P. syringae*, por el que transitan los efectores rumbo a la célula vegetal (Cornelis 2006). Existen también efectores que son depositados en el apoplasto intercelular (Kamoun 2007).

La ruta de los T3SS está codificada por los genes *hrp* (del inglés HR and pathogenecity) y *hrc* (del inglés HR and conserved). Las proteínas Hrc dirigen la secreción de los sustratos de T3SS dentro de la envoltura bacteriana y las proteínas Hrp son secretadas junto con los efectores y los translocan dentro de la célula vegetal (Alfano & Collmer 2004). Mutaciones en algunos de sus componentes como *hrpS* y *hrpA* (denominadas *hrpS* y *hrpA*) no impiden el crecimiento de las estirpes afectadas en el mutante *nho1* (Lu *et al.* 2001b) de *Arabidopsis*. *NHO1* codifica para una proteína glicerol quinasa y es necesario tanto para la resistencia frente a estirpes de *Pseudomonas syringae* inespecíficas (Li *et al.* 2005) como frente al hongo patógeno *Botrytis cinerea* (Kang *et al.* 2003). La proteína HrpS pertenece a la familia de reguladores EBP (enhancer binding protein) que activan la transcripción por interacción con el complejo ARNpolimerasa/ σ ⁵⁴. El gen

hrpA está incluido dentro del operón *hrpZ* y codifica para una subunidad estructural proteica del pilus Hrp (Inoue & Takikawa 2006).

El haustorio fúngico también puede mediar en el transporte de efectores dentro de la célula vegetal (Kamoun 2007). Los haustorios son desarrollados por algunos hongos fitopatógenos, como el oomiceto hemibiotrofo *Phytophthora infestans* (Fitóftora), como estructuras especializadas para la infección. Fitóftora es uno de los patógenos que mayores pérdidas ocasiona a la agricultura, especialmente en patata (Kamoun 2003). Los hongos hemibiotrofos suelen poseer un periodo inicial de comportamiento biotrofo al que seguirá el establecimiento de hifas necrofíticas (Perfect & Green 2001). Los haustorios son estructuras que se desarrollan en el espacio entre las células vegetales, permanecen encasilladas en una membrana modificada de la célula vegetal (conocida como membrana extrahaustorial) y permiten la nutrición del hongo, causando para ello cambios celulares y bioquímicos en las células hospedadoras (Perfect & Green 2001).

Como respuesta al ataque fúngico, estudios microscópicos han mostrado (como réplica del sistema endomembranoso de la célula vegetal) la distribución de una plétora de vesículas derivadas del aparato de Golgi en los puntos de ataque (Hückelhoven 2007). Para que la exocitosis de dichas vesículas sea efectiva, es necesario que la planta posea intacto el complejo PEN1(PENETRATION 1)-tSNARE (Collins *et al.* 2003). Además, para que el mecanismo de resistencia inducido y preinvasivo de la planta frente al hongo sea funcional, es necesaria la función de PEN2 (PENETRATION 2) que es una proteína glicosil-hidrolasa localizada en los peroxisomas (Lipka *et al.* 2005). Ambos mecanismos fueron descubiertos en la búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* que permitieran el crecimiento del hongo patógeno inespecífico *Blumeria graminis f. sp. hordei*.

Entre las toxinas utilizadas por algunos biotrofos como efectores cabe destacar la coronatina, que es utilizada por la bacteria *P. syringae*. Esta molécula es utilizada para evitar el cierre estomático que se produce como consecuencia de la detección de MAMPs y que reduce la entrada de este patógeno a la planta (Melotto *et al.* 2006). La coronatina posee una alta similitud a la hormona ácido jasmónico, y es capaz de superar defensa mediada por esta hormona suprimiendo la señalización por ácido salicílico

y ácido abscísico necesaria para mantener los estomas cerrados (Bent & Mackey 2007b).

Los primeros efectores identificados se denominaron genes *Avr* (de avirulencia) dado que su actividad, detectada a través de los denominados genes de resistencia o genes *R*, induce defensas que previenen su virulencia (Bent & Mackey 2007a). Se ha propuesto una hipótesis, llamada “Del guardián”. Según esta hipótesis, las proteínas *R* son capaces de detectar las perturbaciones que provocan los efectores en sus dianas celulares, activando el correspondiente mecanismo de señalización (van der Biezen & Jones 1998). Por tanto un efector contribuye a la virulencia en tanto en cuanto pueda evitar el reconocimiento por parte de una proteína *R*.

La inhibición de la señalización activada por MAMPs es crítica para la virulencia bacteriana (Bent & Mackey 2007a). Así pues, la bacteria que expresa efectores no adaptados a una planta o es incapaz de introducirlos en la célula vegetal pierde la patogenicidad, al menos en parte, porque falla en la inhibición de la señalización por MAMPs. Un ejemplo descrito de cómo efectores virulentos pueden suprimir la señalización activada por MAMPs es el caso de la flagelina y el gen *NHO1* (*NONHOST 1*) en *Arabidopsis*. La estirpe inespecífica *Arabidopsis* de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* induce la transcripción de *NHO1* de manera dependiente de la flagelina, sin embargo, la estirpe virulenta *Pto* de *Pseudomonas syringae* sólo induce de manera transitoria dicha transcripción, siendo suprimida por la actividad de los efectores introducidos por la bacteria (Li *et al.* 2005). Probablemente sea esta falta de capacidad de supresión la que convierte a *P.s.* pv. *tabaci* en patógeno inespecífico de *Arabidopsis*. De hecho la expresión del efector HopAI1 que promueve virulencia en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, facilita el crecimiento de bacterias no patogénicas (Li *et al.* 2005). Además una estirpe de *P.s.* pv. *tabaci* sin el gen de la flagelina *fliC* es capaz de multiplicarse y producir síntomas de enfermedad en *Arabidopsis* (Li *et al.* 2005). La ausencia de flagelo o problemas en la glicosilación de la proteína flagelina del flagelo de *P.s.* pv. *tabaci* también da lugar a una débil HR y a amarillamientos (similares a síntomas de enfermedad) tras su inoculación en plantas silvestres de *Arabidopsis*, además de una mejor reproducción de estas bacterias en dichas plantas (Ishiga *et al.* 2005), reforzando la idea de que la capacidad del patógeno para inhibir los mecanismos de defensa asociados a la

detección de MAMPs delimita de forma importante la frontera entre patógenos específicos e inespecíficos para un determinado hospedador.

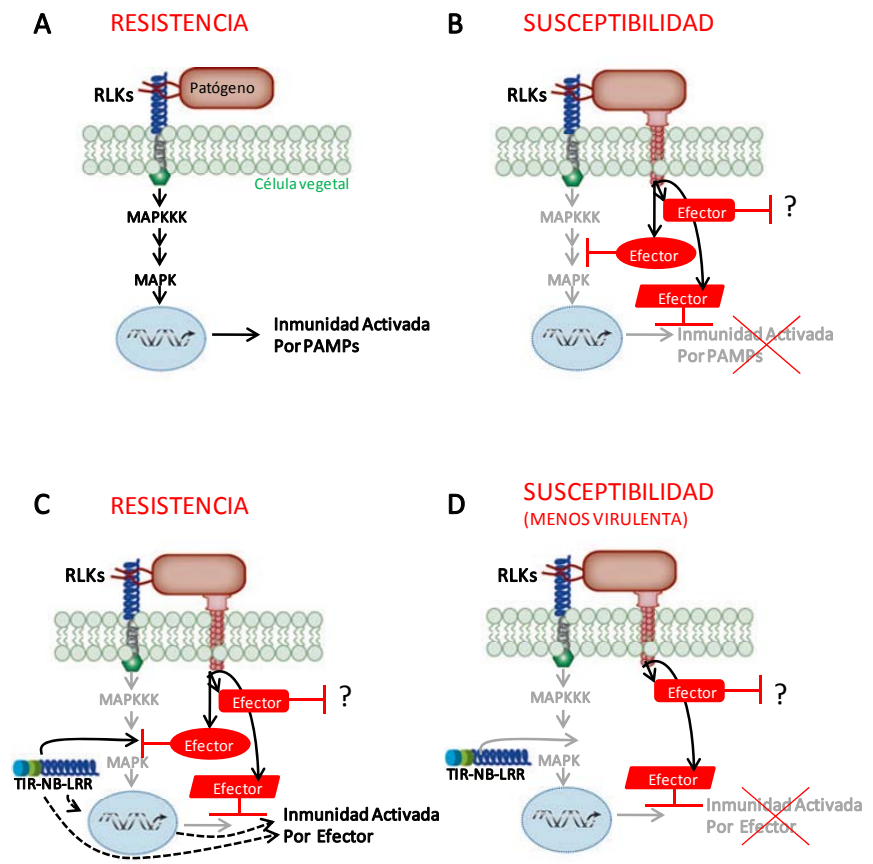


Figura 1. Modelo del despliegue de la resistencia bacteriana en plantas.
A. Reconocimiento de PAMPs (por ejemplo flagelina por un receptor extracelular similar a quinasa (RLKs)) dispara la inmunidad PTI, incluyendo señalización por cascadas de quinasas MAPK y reprogramamiento transcripcional. **B.** Las bacterias patógenas usan el sistema T3SS para inyectar múltiples efectores que actúan sobre dianas celulares y suprimen la PTI causando ETS y permitiendo la acumulación de bacterias en el apoplasto vegetal. **C.** Proteínas de resistencia R (como la TIR-NB-

LRR) reconoce la actividad del efector y restaura la resistencia a través de una fuerte ETI. **D.** El patógeno evita la resistencia basada en genes *R* por modificación o eliminación de los efectores que disparan la defensa. Este estado es parecido al mostrado en B excepto que el patógeno ha tenido que alterar o perder un efector o desplegar un efector adicional, lo cual repercute negativamente en su crecimiento. El modelo puede extrapolarse a otros patógenos.

Modificado de Bent y Mackey 2007.

Como se ha comentado anteriormente, los genes *R* son capaces de detectar perturbaciones causadas por efectores patogénicos y desencadenar una transducción de señales cuyo fin último es la resistencia. La clase más amplia de genes *R* codifican para proteínas receptoras del tipo NB-LRR (NB es un sitio conservado de unión a nucleótido y LRR es un dominio rico en repeticiones de leucina) (Dangl & Jones 2001).

A pesar de su gran variabilidad, los genes NB-LRR pueden subdividirse en función de las características estructurales que poseen en amino terminal en: TIR-NB-LRR (por homología con los dominios de señalización intracelular TOLL de *Drosophila melanogaster* y los receptores (IL)-1 de mamíferos) y CC-NB-LRR (por contener posibles dominios Coiled-Coil), comprendiendo este último tipo varias subfamilias (Dangl & Jones 2001). En algunos casos existen estructuras adicionales a la estructura del gen *R*, como en el caso de algunos genes TIR-NB-LRR que además poseen un dominio WRKY de unión a ADN (Dangl & Jones 2001). Las proteínas WRKY son factores de transcripción que se activan transcripcionalmente durante algunas respuestas de defensa. Las proteínas NB-LRR son intracelulares, aunque algunas de las otras clases de genes *R* codifican para receptores quinasa transmembrana o proteínas similares a receptores con el dominio LRR extracelular que parecen estar más relacionados con la percepción de MAMPs (Bent & Mackey 2007a).

AvrRpm1 y AvrRpt2 son dos de los efectores de *Pseudomonas syringae* mejor descritos en la interacción de dicho patógeno con *Arabidopsis*. Ambos interactúan de forma indirecta con genes *R* de *Arabidopsis*, el primero con la proteína RPM1 (*RESISTANCE TO P. SYRINGAE PV. MACULICOLA 1*) y el segundo con la proteína RPS2 (*RESISTANT TO P. SYRINGAE 2*) (Kunkel *et al.* 1993). Ambas tienen una estructura proteica similar del tipo CC-NB-LRR. La presencia de mutaciones en los genes que los codifican (mutantes *rpm1* y *rps2*, respectivamente) confieren una fuerte

susceptibilidad a las cepas de *Pseudomonas* que producen dichos efectores ((Ritter & Dangl 1995); (Chen *et al.* 2000)).

Pese a su especificidad, es curioso que los aproximadamente 130 genes *R* del tipo NB-LRR que se calcula que posee *Arabidopsis* sean suficientes para mediar en el reconocimiento de todos los efectores codificados por los patógenos. Es por tanto plausible que un gen *R* sea capaz de percibir la presencia de más de un efector patogénico. Así, algunos genes *R* son capaces de detectar dos efectores, como en el caso de *RPM1* (que además de detectar *avrRpm1* también es capaz de detectar *avrB* de *Pseudomonas* (Grant *et al.* 1995). También se han descubierto efectores con más de una diana en el hospedador (Chisholm *et al.* 2005).

Para poder conferir resistencia a enfermedad el lugar de unión a nucleótido de la estructura NB-LRR debe ser funcional. De hecho, el reconocimiento por parte del patógeno provoca cambios conformacionales dependientes de nucleótido que podrían inducir oligomerización de la proteína *R* o proveer de una estructura para la activación de componentes de señalización aguas abajo (Bent & Mackey 2007a). En algunos casos, la activación de los cambios conformacionales tiene lugar tras la detección de las perturbaciones causadas por la correspondiente proteína *Avr* y la subsiguiente liberación de ADP a partir de ATP por el sitio de unión a nucleótido (Ade *et al.* 2007). En el modelo "*jackknife*" el elicitor del patógeno causa interrupciones en las asociaciones intramoleculares liberando los dominios CC, NB y/o LRR para interactuar con otras proteínas (Moffett *et al.* 2002). Además también se han descubierto cerca de 50 genes que codifican proteínas tipo *R* sin el dominio LRR (por ejemplo TIR-NB, TIR o CC-NB) y se cree que pudieran interactuar entre ellas para modular la señalización de defensa (Bent & Mackey 2007a).

3. Respuestas específicas al patógeno

La activación de las proteínas NB-LRR provoca una red de respuestas al patógeno que se interrelacionan y que es desplegada, al menos en parte, para diferenciar el ataque del patógeno biotrofo de aquel necrotrofo (Jones & Dangl 2006a).

Tras la percepción del patógeno se activan rápidamente una serie de respuestas de defensa que incluyen flujo de iones Ca^{2+} , alcalinización del espacio extracelular, estallido oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de NO, actividad proteínquinasa y expresión de genes asociados a defensa (Nurnberger & Scheel 2001). Las funciones de estos genes incluyen la biosíntesis de ácido salicílico (SA), la biosíntesis de etileno, reforzamiento de la pared celular, lignificación, producción de agentes antimicrobianos y un tipo de muerte celular denominada respuesta hipersensible (HR) en el lugar de entrada del patógeno (Dangl & Jones 2001).

Entre la expresión de genes relacionados con defensa cabe destacar la de algunas familias génicas que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Dempsey & Klessig 1994). Las primeras PRs se detectaron en experimentos de susceptibilidad (con producción de HR) con plantas de tabaco y el virus TMV (Van Loon & Van Kammen 1970). Aunque la generación de HR es un mecanismo que comparten la mayoría de genes *R*, es posible la activación de defensas sin la mediación de dicha respuesta, sobre todo en la defensa frente a otros patógenos distintos de los microorganismos (Bent & Mackey 2007a). También es posible encontrar una respuesta parecida a la HR tras el reconocimiento de MAMPs por parte de la planta (Vleeshouwers *et al.* 2000). Por otra parte, se ha observado que la inoculación con un patógeno activa también la muerte celular en hojas distales no inoculadas. Este efecto se conoce como micro HR (Alvarez *et al.* 1998).

La expresión de genes de defensa que precede a la percepción del patógeno también incluye la producción de compuestos fenólicos, algunos con características antimicrobianas como las fitoalexinas (Thomma *et al.* 1999). La camalexina es una de las fitoalexinas mejor estudiadas en la interacción planta-patógeno y que se acumula en respuesta a la infección

con algunas cepas de *Pseudomonas syringae* (Glazebrook & Ausubel 1994). Para determinar que papel tiene en la defensa de plantas se planteó un rastreo de mutantes para la ausencia de este compuesto (Glazebrook & Ausubel 1994). Uno de los mutantes recuperados, *pad4* (*PHYTOALEXIN DEFICIENT 4*), que codifica para una proteína con similitud a lipasas (Jirage *et al.* 1999), presenta una sensibilidad mayor a cepas virulentas de *P. syringae* (Glazebrook & Ausubel 1994), lo que demostraría el papel de la camalexina en la defensa frente a patógenos virulentos.

3.1. Resistencia frente a patógenos biotrofos

3.1.1. Respuestas basadas en ácido salicílico

El SA es otro de los compuestos fenólicos que es sintetizado por las plantas cuando son atacadas por patógenos biotrofos. Su actividad como hormona se ve reflejada en la germinación de las semillas, establecimiento de la plántula, crecimiento celular, respiración, cierre estomatal, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico, termotolerancia basal, nodulación en legumbres y productividad de frutos (Vlot *et al.* 2009). El SA es, además, una señal clave en la regulación de la termogénesis y la resistencia de plantas frente a patógenos, generalmente biotrofos. El uso de derivados del SA también es usado con carácter terapéutico en humanos.

El SA puede ser generado vía dos rutas enzimáticas distintas que requieren el metabolito primario corismato (Wildermuth *et al.* 2001) (Figura 2). En la primera, el derivado L-fenilalanina del corismato es transformado en ácido cinámico a través de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas inicialmente por la fenilalanina amonio liasa (PAL) y que posteriormente será transformado en SA vía intermediarios del benzoato o del ácido coumárico. En la segunda, el corismato también puede ser convertido en SA vía isocorismato en un proceso compuesto de dos pasos catalizados por las enzimas isocorismato sintasa (ICS) y la isocorismato piruvato liasa (IPL). La mayoría del SA inducido por el patógeno es sintetizado de esta última manera en *Arabidopsis*, *Nicotiana benthamiana* y tomate (Catinot *et al.* 2008; Uppalapati *et al.* 2007; Wildermuth *et al.* 2001). Parece además que

la localización plastídica de ICS indica que la producción de SA en esta ruta sucede en el cloroplasto (Wildermuth *et al.* 2001).

Arabidopsis posee dos enzimas ICS, ICS1 e ICS2. Los mutantes que carecen de una enzima ICS1 funcional tienen problemas severos para la producción de SA y una resistencia a patógenos reducida, como en el caso del mutante *sid2-1* (SA INDUCTION-DEFICIENT 2) (Wildermuth *et al.* 2001). Sin embargo la aparición de una cantidad residual de SA en un doble mutante *ics1/ics2* confirma que la ruta ICS no es la única fuente de SA en Arabidopsis (Garcion *et al.* 2008).

El SA que produce la planta puede ser transformado en *O*- β -glucosido de SA (SAG) a través de una SA glucosiltransferasa (SAGT) inducible por patógeno (Song 2006). Arabidopsis codifica para dos enzimas SAGT, una convierte de manera preferente el SA en SAG y la otra produce un derivado del SA menos abundante, el éster de la saliciloil glucosa (SGE) (Vlot *et al.* 2009).

El SA también puede encontrarse como el derivado biológicamente inactivo metil salicilato (MeSA) por la acción de la enzima SA metiltransferasa 1 (SAMT) sobre el SA. El MeSA puede volver a estado activo SA por la función catalítica de la proteína de unión a SA 2 (SABP2). Esta enzima muestra actividad metil salicilato estearasa que puede ser inhibida por el nivel de SA generado (Forouhar *et al.* 2005).

MeSA y/o sus derivados glucosilados MeSAG se acumulan también a niveles relativamente altos *in vivo*. El MeSAG es, al igual que SAG, biológicamente inactivo (Song *et al.* 2008). Sorprendentemente una forma de SA hidroxilado, el ácido 2,5-dihidróxido benzoico (ácido gentísico), que también se acumula en plantas, es capaz de inducir proteínas PR en tomate que no son inducidas por el SA (Bellés *et al.* 1999).

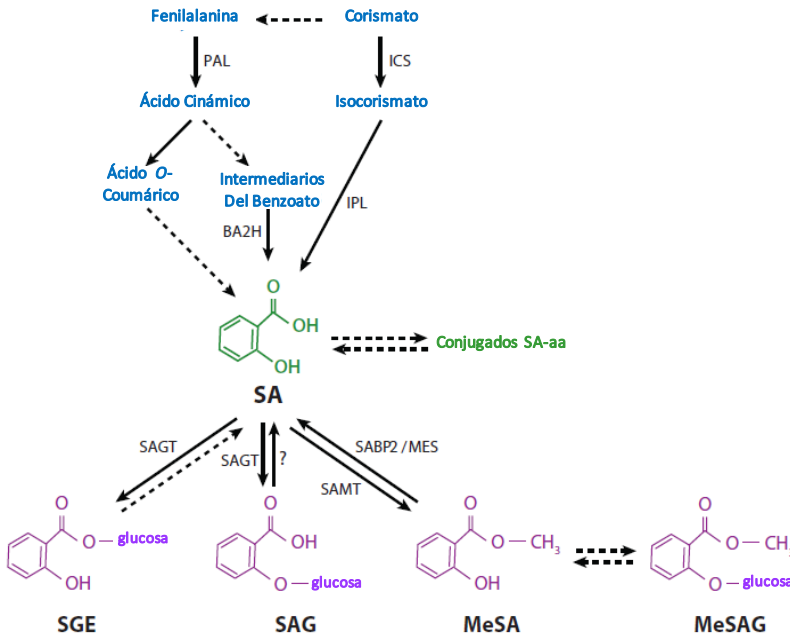


Figura 2. Rutas de síntesis de SA en Arabidopsis.

El SA puede sintetizarse por dos rutas distintas ambas dependientes del corismato. Se puede observar como posteriormente el SA puede generar diversos derivados con distintas actividades biológicas.

Adaptado de Vlot *et al.* 2009.

El SA también puede ser conjugado con aminoácidos, modificación que es realizada por la enzima GH3.5. Esta proteína es un miembro de la familia GH3 de genes de respuesta temprana a auxinas en Arabidopsis (Hagen & Guilfoyle 2002) y esta relacionada no sólo con la conjugación de aminoácidos al SA sino que también los conjuga a la auxina ácido indolacético (Staswick *et al.* 2005). En un primer estudio, la sobreexpresión de GH3.5 provocó la acumulación de SA, resistencia a patógenos y la expresión de genes de defensa (Park *et al.* 2007). Posteriormente se descubrió que la sobreexpresión de GH3.5 también provoca elevados niveles de SA, pero en este caso las plantas mostraron estar comprometidas en la inmunidad ETI (Zhang *et al.* 2007). Esta aparente inconsistencia puede deberse a los distintos estadios de la planta en los que se realizó la inoculación o a los

también distintos métodos de inoculación del patógeno entre ambos estudios (Zhang *et al.* 2007). En este último estudio se configuró un modelo en el que el patógeno intenta modificar el nivel de auxinas a través de la inducción de *GH3.5* que sin embargo también es capaz de modular los niveles de SA para potenciar la respuesta defensiva, aumentándolos de manera muy rápida en caso de infección por *P. syringae* y además, retroalimentándose de manera positiva ante altos niveles de SA.

Otros genes de respuesta a auxinas como *GH3.12* también parecen poseer un papel en la modulación de SA y resistencia a *P. syringae*. En este caso, la enzima parece conjugar amino ácidos derivados de benzoato, actividad que parece inhibida en presencia de SA. Mutaciones en *GH3.12*, como en el caso del mutante *pbs3* (*AVRPPHB SUSCEPTIBLE 3*), provocan acumulación reducida de SA y baja resistencia a patógenos (Vlot *et al.* 2009).

Sin embargo, la evidencia más importante sobre el importante papel del SA como hormona crítica implicada en la señalización de defensa frente a patógenos biotrofos se obtuvo de los estudios realizados en plantas con niveles alterados de SA. El primero de ellos utilizó plantas transgénicas de tabaco y *Arabidopsis* que expresaban el gen bacteriano *NahG* (Delaney *et al.* 1994a). El plásmido NAH7 de *Pseudomonas putida* lleva toda la información genética necesaria para la conversión de naftaleno a piruvato y acetaldehído (You *et al.* 1991). En el operón *sal* de dicho plásmido, se encuentra el gen *NahG* que codifica para una salicilato hidroxilasa (You *et al.* 1991).

La salicilato hidroxilasa de *Pseudomonas putida* es una enzima que cataliza la formación estequiométrica de catecol a partir de SA, reduciendo piridín nucleótido en presencia de flavín adenina dinucleótido (FAD) como cofactor específico (Yamamoto *et al.* 1965). En estas plantas, por tanto, aparecen disminuidos los niveles de SA y también los niveles de PRs, en concreto de PR1, PR2 y PR5 (Delaney *et al.* 1994b; Glazebrook *et al.* 1996; Nawrath & Metraux 1999; Zhou *et al.* 1998). Probablemente debido a estas alteraciones, las plantas transgénicas *NahG* se mostraron más susceptibles a *Pto*, *P. s. pv. tabaci*, *Phytophthora parasitica* y *Cercospora nicotianae* en el caso del tabaco y a *Pto* y razas virulentas y avirulentas de *Peronospora parasitica* en el caso de *Arabidopsis* (Delaney *et al.* 1994b). La aplicación de análogos químicos como el INA (ácido 2,6-dicloroisotínico) restablece la resistencia, lo que indica que las plantas transgénicas *NahG* poseen la

maquinaria de defensa intacta y que la susceptibilidad es causada por la disminución de los niveles de SA, confirmando la importancia del SA en la resistencia a enfermedad (Delaney *et al.* 1994b).

Las plantas transgénicas *NahG* en *Arabidopsis*, al igual que el mutante *nho1*, también son susceptibles a la bacteria *P.s. pv. phaseolicola* (Lu *et al.* 2001b). Sin embargo, posteriormente se ha descubierto que esta susceptibilidad esta causada por la presencia de catecol como producto de la degradación de SA, pudiendo fenocopiarse la susceptibilidad en plantas silvestres por aplicación directa de catecol o induciendo resistencia por la aplicación de catalasa que es capaz de degradar el catecol (van Wees & Glazebrook 2003).

Para poder desentrañar la ruta de defensa en la que interviene el SA como señal principal, se han realizado rastreos en busca de mutantes menos o más resistentes frente a patógenos biotrofos, para los cuales la resistencia basada en SA parece clave.

Uno de los elementos más importantes en la regulación de SA y que ha sido obtenido de forma recurrente en diversos rastreos para mutantes afectados en la señalización por SA es el gen *NPR1/NIM1 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1/NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1)* (Dong 2001). Las plantas *npr1* son más susceptibles a oomicetos y patógenos biotrófos como *Pseudomonas syringae* *pv. maculicola* 4326 (Cao *et al.* 1994).

NPR1 es un gen que codifica para una proteína de 65 kD que contiene repeticiones de la estructura ankyrin (Cao *et al.* 1997; Ryals *et al.* 1997) y cuya función es requerida para el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR). Aunque esta respuesta será tratada más adelante, cabe señalar que SAR es un tipo de resistencia inducida que tiene lugar tras el ataque de un patógeno necrotizante y cuyo efecto se produce en tejido sistémico de la planta, protegiéndola temporalmente frente a posteriores infecciones microbianas (Pieterse & Van Loon 2004). Este efecto de resistencia a distancia coincide con el aumento de SA y la expresión de genes de defensa, como las *PRs*, en dicho tejido sistémico.

La activación de la ruta dependiente de SA provoca la monomerización de *NPR1*, que se encuentra en forma oligomérica en el citosol, y su

translocación al núcleo (Kinkema *et al.* 2000). Una vez en el núcleo, NPR1 promueve la unión de los factores de transcripción TGAs a los promotores de los genes de respuesta a SA (Fan & Dong 2002; Johnson *et al.* 2003). Se ha comprobado que la sobreexpresión de *NPR1* no tiene ningún efecto *per se* en la inducción de PRs o en resistencia (Cao *et al.* 1998; Friedrich *et al.* 2001) y que para ello es necesario un cambio redox que activa la función de *NPR1* (Mou *et al.* 2003). Este cambio redox es producido por la presencia de SA, inducida por el ataque de un patógeno o por la aplicación directa de SA o uno de sus análogos.

En consecuencia, el mutante *npr1* es insensible a la aplicación de análogos de SA como el INA o S-metil éster de benzotiadiazol (BTH) o incluso del propio SA (Dong 2004). La existencia de la mutación *ssi1* (*SUPPRESSOR OF SA INSENSITIVITY 1*) que es capaz de restaurar gran parte de los fenotipos de susceptibilidad y expresión de genes de defensa a niveles próximos a los silvestres en la mutación *npr1-5* (es decir, es una mutación supresora de los fenotipos de *npr1-5*) confirman que existe otra ruta de defensa que actúa de manera independiente del SA (Shah *et al.* 2001). De hecho, *ssi2* (*SUPPRESSOR OF SA INSENSITIVITY 2*) parece regular la inducción de genes *R* de manera independiente de otros componentes dependientes total o parcialmente del SA. Esta regulación estaría basada en ácidos oleicos 18:1 (Chandra-Shekara *et al.* 2007).

La búsqueda de mutantes con mayor susceptibilidad a patógenos ha generado otra serie de mutantes de interés que muestran alteraciones en resistencia, como los *eds* (*ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY*, (Glazebrook *et al.* 1996; Parker *et al.* 1996; Rogers & Ausubel 1997)) o *ndr1* (*NON-RACE SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1*, (Century *et al.* 1995)).

Mutaciones en *SID2/EDS16* (que como se comentó anteriormente codifica para la enzima ICS1) y *SID1/EDS5* (que codifica para un miembro de la familia de los transportadores MATE, necesario para la acumulación de SA) despliegan mayor susceptibilidad a patógenos y/o incapacidad para desarrollar SAR o expresar de manera sistémica genes *PR* (Nawrath & Metraux 1999; Nawrath *et al.* 2002). Estas deficiencias son restauradas con la aplicación de SA, INA o BTH (Vlot *et al.* 2009).

EDS1 es una proteína con similitud a lipasas y que junto a *PAD4* (proteína con la que interacciona y con la que comparte similitud de secuencia)

actúan en pasos anteriores al SA sobre todo en la resistencia a patógenos biotrofos específicos y en la respuesta ETI iniciada principalmente por los genes *R* del tipo TIR-NBS-LRR (Aarts *et al.* 1998; Wiermer *et al.* 2005). La aplicación de SA es capaz de rescatar la inducción de genes de defensa en *eds1* y *pad4* e induce la expresión de *EDS1* y *PAD4* en plantas silvestres (Zhou *et al.* 1998; Falk *et al.* 1999), confirmando que *EDS1* y *PAD4* actúan antes del SA y son regulados positivamente por esta hormona.

NDR1 regula de manera general la señalización a partir de proteínas R del tipo CC-NBS-LRR (Aarts *et al.* 1998). *NDR1* codifica para una proteína glicofosfatidil-inositol anclada a la membrana plasmática que parece interactuar al menos con RIN4 (*RPM1-INTERACTING PROTEIN 4*) proteína esta última que está relacionada con la detección de las perturbaciones que causan ciertos efectores bacterianos (Day *et al.* 2006). En el mutante *ndr1* están suprimidas la inmunidad PTI y ETI, mientras que la sobreexpresión de *NDR1* reduce de manera significativa el crecimiento de bacterias virulentas (Shapiro & Zhang 2001), lo que indicaría la importancia de esta proteína en la transducción de la señal de defensa frente a patógenos biotrofos. Que la aplicación de BTH sea capaz de rescatar el fenotipo de susceptibilidad de *ndr1* indica que *NDR1* también actúa por encima de la síntesis de SA (Shapiro & Zhang 2001; Coppinger *et al.* 2004).

La identificación de *RAR1* como un componente de defensa de *Arabidopsis* ha añadido mayor conocimiento a la señalización por genes *R*. *RAR1* es necesario para la resistencia mediada por múltiples proteínas R, pero al contrario que *EDS1*, *PAD4* o *NDR1*, no está relacionado con un único tipo de proteína R (Muskett *et al.* 2002). *RAR1* podría servir como punto de convergencia para distintas rutas mediadas por proteínas R, aunque no todas las proteínas R que requieren *EDS1*, *PAD4* o *NDR1* requieren necesariamente *RAR1* (Tornero *et al.* 2002b).

RAR1 codifica para una proteína citosólica de función desconocida, pero muy conservada evolutivamente, que posee dos dominios muy similares (pero no iguales) del tipo CHORD (Shirasu *et al.* 1999). Este tipo de dominio también forma parte de la proteína SGT1 (*SUPRESSOR OF THE G2 ALLELE OF SKP1*) (Shirasu *et al.* 1999), con la cual se ha demostrado que interactúa y que también es un componente de la resistencia mediada por proteínas R (Austin *et al.* 2002; Azevedo *et al.* 2002). El

cosilenciamiento de ambas se traduce en un aumento aditivo de susceptibilidad (Azevedo *et al.* 2002).

En *Arabidopsis* existen dos genes homólogos de *SGT1*, *SGT1a* y *SGT1b*. Mutaciones en *SGT1b* permiten una mayor colonización por *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Además exhibe de manera significativa reducción de la HR y también reducción de la acumulación de ROIs en las células atacadas del hospedador (Austin *et al.* 2002) lo que sugiere, que tanto *SGT1* como *RAR1* actúan de forma temprana en la cascada de señales de resistencia de la planta. Este resultado también indica la función no redundante de *SGT1b*, al menos en defensa. *SGT1* también está relacionado con el sistema de ubiquitinación de proteínas mediada por el complejo SCF, donde podría actuar como factor de ensamblaje (Kitigawa *et al.* 1999). Las estructuras predichas de *SGT1* que revelan estas características son compartidas por las cochaperonas HSP90 de animales de las cuales existen 7 isoformas en *Arabidopsis* (Krishna & Gloor 2001). En la actualidad existen evidencias que demuestran la interacción entre HSP90, *SGT1* y *RAR1* (Takahashi *et al.* 2003; Hubert *et al.* 2003).

El complejo HSP90-RAR1-SGT1 podría ser la diana de proteínas R mediante la interacción entre *SGT1* y el dominio LRR de dichas proteínas. Esta acción estabilizaría la proteína R en su conformación activa. Dado que *SGT1* tiene una función en el reclutamiento mediado por la E3 ubiquitín ligasa y la degradación de proteínas, es razonable pensar que la función de *SGT1* en la degradación de proteínas pueda recaer por tanto sobre las proteínas del tipo R. Cuando *SGT1* está unido al complejo HSP90-RAR1-SGT1 la degradación debería ser lo suficientemente lenta como para permitir la señalización mediada por la correspondiente proteína R (Sangster & Queitsch 2005).

El rastreo para mutantes en la respuesta SAR también ha dado como resultado la obtención de plantas que expresan esta respuesta de manera constitutiva. Entre ellos se pueden destacar los *Isd* (*LESION SIMULATING DISEASE*; (Dietrich *et al.* 1994; Weymann *et al.* 1995) o los *cpr* (*CONSTITUTIVE EXPRESSER OF PR GENES*; (Bowling *et al.* 1994; Bowling *et al.* 1997a; Clarke *et al.* 1998) para *cpr1*, *cpr5* y *cpr6* respectivamente)). Estos mutantes acumulan altos niveles de SA y expresión de PRs. También muestran mayor resistencia a patógenos. Otros mutantes, como *dnd1* (*DEFENSE NO DEATH*

1; (Yu *et al.* 1998b)) también presentan resistencia sistémica constitutiva y niveles elevados de SA.

Sin embargo, los fenotipos de resistencia, altos niveles de SA y expresión de PR1 de los mutantes *cpr1* y *cpr6* son bloqueados por mutaciones en *eds5* (Clarke *et al.* 2000) y *pad4* (Jirage *et al.* 2001), localizando los efectos de las mutaciones *cpr* en algún lugar por encima de *PAD4* en la señalización mediada por SA. Además los fenotipos de resistencia a enfermedad mostrados por *cpr1* y *cpr6* son parcialmente bloqueados por mutaciones en *npr1*, demostrando que debe existir un mecanismo de resistencia dependiente de SA pero independiente de *npr1* (Clarke *et al.* 2000). Además, en el doble mutante *dnd1 pad4*, los altos niveles de SA y expresión de PR1 se mantienen pero la susceptibilidad a *Pseudomonas syringae* es tan alta como en *pad4*, lo que sugiere que existe una ruta de resistencia dependiente de *PAD4* pero independiente de SA (Jirage *et al.* 1999). En el caso del mutante *lsd1*, la actividad de los genes *PAD4* y *EDS1* en el fenotipo de formación de lesiones en *lsd1* induce una potenciación de la señal de defensa, por debajo o de manera independiente de la HR. De hecho, los mutantes *pad4* y *eds1* suprimen la muerte celular descontrolada de *lsd1* en respuesta a la aplicación de BTH, hecho que confirmaría esta idea (Rusterucci *et al.* 2001).

3.2. Resistencia frente a patógenos necrotrofos

3.2.1. Respuestas basadas en ácido jasmónico

La resistencia a ciertos patógenos necrotrofos suele estar regulada por otra hormona denominada ácido jasmónico (JA) (Browse 2009). Los jasmonatos son oxilipinas que actúan como moléculas señalizadoras con un papel clave en la regulación de procesos metabólicos, reproducción y defensa frente a patógenos y herbívoros (Devoto & Turner 2003).

El JA se sintetiza a partir del ácido α -linoleico y a través de una ruta enzimática que comienza en el cloroplasto y que incluye reacciones de oxigenación, ciclación, reducción y por último de β -oxidación (que tiene lugar en el peroxisoma), dando lugar al (3R, 7S) ácido jasmónico (Browse 2009). Mutantes para algunas de las enzimas de la ruta de producción del JA han mostrado ser susceptibles a herbívoros o patógenos. Tal es el caso del triple mutante *fad3-2 fad7-2 fad8* (*FATTY ACID DESATURATION*) que es deficiente en el precursor ácido α -linoleico y que muestra susceptibilidad al hongo *Phytophthora jasmonium*, susceptibilidad que es revertida con la aplicación de JA (Vijayan *et al.* 1998). Este triple mutante es también susceptible a herbívoros pero la resistencia es restaurada también tras la aplicación de JA (McConn *et al.* 1997). Otro mutante interesante en la producción del JA es *opr3* (*OPDA REDUCTASE 3*). *OPR3* codifica para una enzima que interviene en la reducción del 12-oxo-fitodienoato (OPDA) que es un precursor del JA. Este mutante está afectado en la fertilidad pero es resistente a hongos y herbívoros (Stintzi *et al.* 2001). Este resultado indica por tanto que el precursor OPDA posee un papel en la defensa de plantas independiente del JA (Stintzi *et al.* 2001).

El JA es sometido a modificaciones enzimáticas para generar moléculas derivadas que difieren en sus actividades biológicas. Entre estos derivados se encuentran el metil-JA (MeJA), que es volátil y activo en la señalización entre plantas y la conjugación de JA a aminoácidos, especialmente aquella que liga la amida del grupo carboxilo del JA a isoleucina (Ile) para la producción de JA-Ile (Browse 2009). En *Arabidopsis* el JA-Ile es sintetizado por una enzima codificada por el gen *JAR1* (*JASMONIC ACID RESISTANT 1*) (Staswick & Tiryaki 2004). Mutantes en el locus *jar1* son deficientes en respuestas a JA (Staswick & Tiryaki 2004; Staswick *et al.* 1998). Este

indicaría que el JA-Ile es una importante señal primaria para algunas respuestas ligadas a JA. Un ejemplo de ello son las heridas mecánicas en hojas de *Arabidopsis*, que provocan un aumento considerable del nivel de JA-Ile, que es dependiente de la síntesis de JA (Suza & Staswick 2008). Así pues, la ruta de síntesis del JA-Ile está positiva y fuertemente regulada por la señalización de JA (Suza & Staswick 2008). Parece además que la inducción de respuestas por parte del JA-Ile es dosis dependiente. De hecho, pese a que los niveles de JA-Ile son hasta diez veces menores en *jar1* que en las plantas silvestres (Suza & Staswick 2008) la inducción de un cierto rango de genes de respuesta y síntesis de JA es similar en *jar1* y en plantas silvestres (Chung *et al.* 2008).

Al igual que en el caso de la regulación por SA, en el caso de la hormona JA también existe un gen requerido para muchas de las respuestas dependientes de JA en diversas especies de plantas, denominado *COI1* (*CORONATINE INSENSITIVITY 1*) (Feys *et al.* 1994; Li *et al.* 2004; Paschold *et al.* 2007; Wang *et al.* 2005b; Xie *et al.* 1998). El descubrimiento de este gen tuvo lugar en un rastreo para mutantes insensibles a la virulencia de la toxina coronatina. El mutante *coi1-1*, que se obtuvo entonces, es estéril, insensible a Me-JA y resistente a algunas bacterias patógenas productoras de coronatina como *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea* (Feys *et al.* 1994). *COI1* es un receptor de JA-Ile (Yan *et al.* 2009) y además es un componente F-box (Xie *et al.* 1998) de un complejo SCF (SKIP-CULLIN-F-box) que actúa como una E₃ ubiquitin ligasa (Zheng *et al.* 2002). Por tanto, parece que la ubiquitinación proteica por el complejo SCF^{COI1} es necesaria para la acción hormonal del JA y requerida para muchas de las respuestas a esta hormona. De hecho mutantes con defectos en otros componentes relacionados con el complejo SCF también poseen fenotipos relacionados con el JA (Browse 2009).

La búsqueda de dianas para el complejo SCF ha sido infructuosa hasta el descubrimiento de las proteínas JAZ y su papel en la señalización por JA. En la actualidad hay descritas 12 proteínas que pertenecen a la familia JAZ y que poseen dos dominios reconocidos, ZIM y Jas (Yan *et al.* 2007). La unión de la proteína JAZ al complejo SCF parece mediada por *COI1*, cuya especificidad de reconocimiento radica en su componente F-box, e implicaría su posterior degradación vía 26S proteasoma en presencia de la hormona JA (Fonseca *et al.* 2009a). Existen evidencias de que el dominio Jas de las JAZ interactúa directamente con *COI1* de manera dependiente de

JA en ensayos de doble híbrido de levadura y pull-down (Chini *et al.* 2009; Melotto *et al.* 2008; Chung & Howe 2009; Fonseca *et al.* 2009b). Además la interacción COI1-JAZ es dependiente de la esteroisomería de la molécula bioactiva JA-Ile, siendo promovida de manera muy activa por la coronatina (Fonseca *et al.* 2009b), que como se ha comentado es utilizada por estirpes de *P. syringae* para inhibir el cierre estomático dependiente de ABA que se produce al detectarse el patógeno. Por tanto la acción de la coronatina requiere una señalización dependiente de COI1 funcional.

Las proteínas JAZ actúan como represores de genes de respuesta a JA con funciones probablemente redundantes entre los miembros de la familia (Browse 2009). De hecho, además de con *COI1*, casi todas las proteínas de esta familia también son capaces de interactuar con MYC2 (codificado por el gen *JIN1*; *JASMONATE INSENSITIVE 1*). Esta proteína es su única diana conocida y a quien reprimen su capacidad de activación de genes regulados por JA (Fonseca *et al.* 2009a), particularmente aquellos que son inducidos en respuesta a herida o al ataque de insectos (Lorenzo *et al.* 2004). Sin embargo, MYC2 reprime varios genes que son inducidos en respuesta a patógenos por la acción del factor de transcripción ERF1 (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*) (Browse 2009). Es más, ERF1 reprime genes de respuesta a herida.

3.2.2. Respuestas basadas en etileno

Los genes *ERF* fueron caracterizados en primer lugar por su inducción por etileno (Lorenzo *et al.* 2003). Además de su papel en defensa, el etileno es una hormona que media multitud de mecanismos en el desarrollo y crecimiento de las plantas, procesos tales como la germinación, senescencia, elongación celular y maduración del fruto (Kieber 1997). Las señalizaciones por etileno y JA son necesarias para la alta expresión de *ERF1*, confirmando la conexión entre la señalización de ambas hormonas. De hecho la expresión constitutiva de *ERF1* induce la expresión de genes de defensa en mutantes alterados en la señalización por JA o etileno (ET) (*coi1* y *ein2* (*ETHYLENE INSENSITIVE 2*) respectivamente) (Lorenzo *et al.* 2003). *EIN2* codifica para una proteína transmembrana con una débil homología a

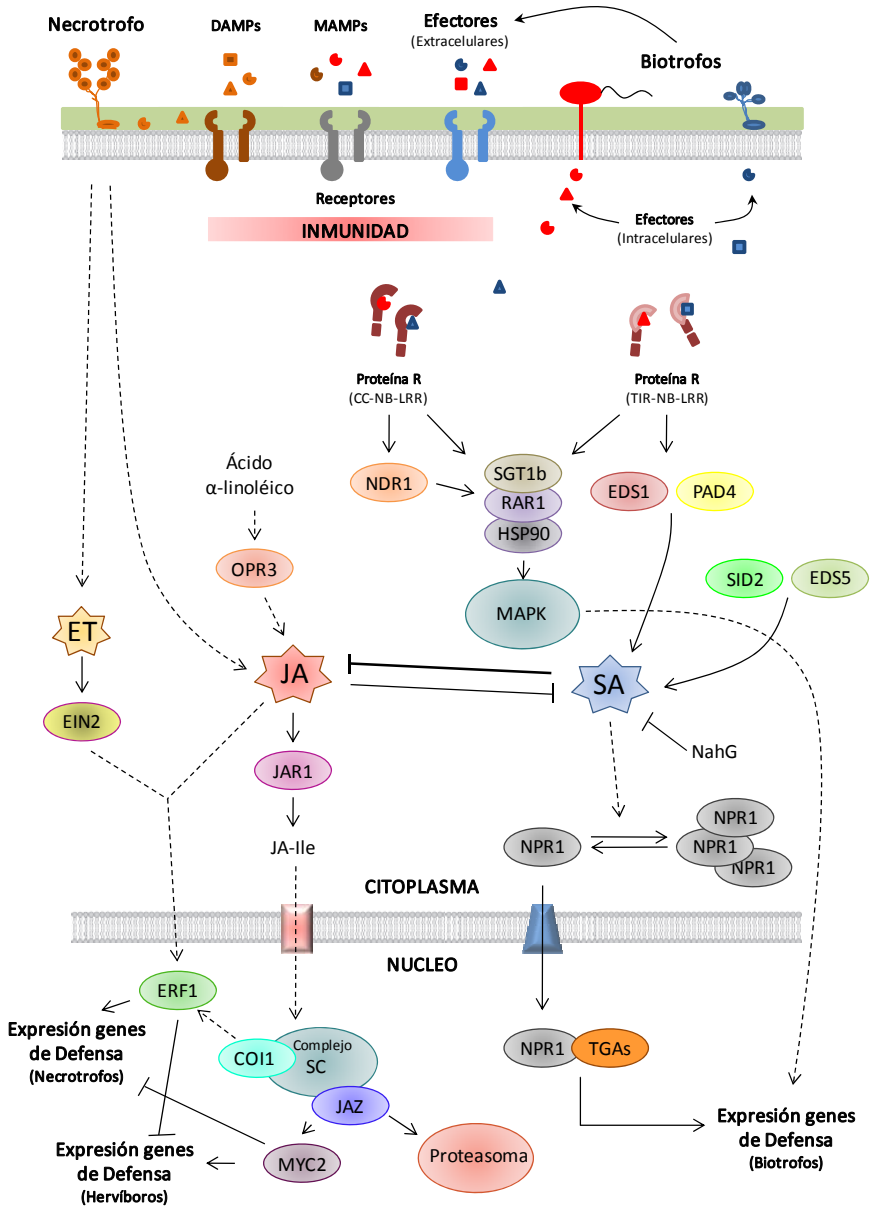
transportadores de metal Nramp (Alonso *et al.* 1999) cuya naturaleza funcional es desconocida.

Otra conexión entre JA y etileno en defensa surge del descubrimiento de que una enzima JAR1 recombinante sintetiza el JA conjugado con ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato, precursor activo del etileno), síntesis que podría ser relevante en la interacción entre la señalización de JA y etileno en la defensa de plantas frente a patógenos necrotrofos (Staswick & Tiryaki 2004). Ambos inducen la acumulación de marcadores antimicrobianos como la proteína PDF1.2 (Penninckx *et al.* 1996; Xu *et al.* 1994; Gundlach *et al.* 1992). Sin embargo, dentro de la defensa frente a patógenos necrotrofos existen algunas divergencias con respecto a la función de JA y ET. Por ejemplo la resistencia frente al hongo necrotrofo *Botrytis cinerea* requiere de la función de *COI1* y *EIN2*, mientras que la resistencia a *Alternaria brassicicola* parece independiente de la función de *EIN2* (Glazebrook 2005).

La señalización de defensa modulada por ET incluye receptores de etileno que son capaces de activar una cascada de quinasas MAPK, cuya señal es transmitida a *EIN2* y que permite la acumulación del factor de transcripción *EIN3* (*ETHYLENE INSENSITIVE 3*) (disminuyendo su degradación vía ubiquitinación dependiente de proteasoma mediada por SCF^{EBF1/2}) y promoviendo a *ERF1* que en último extremo da lugar a la regulación de la expresión génica (Kepinski & Leyser 2003).

Figura 3. (Siguiendo página) Esquema simplificado de las principales rutas de defensa en Arabidopsis.

La detección temprana de MAMPs, DAMPs o efectores extracelulares por parte de receptores de la planta puede generar una reacción de inmunidad tipo PTI que la proteja frente al ataque patogénico. En caso de que el microbio consiga distribuir sus efectores dentro de la célula o consiga penetrar la pared celular, el sistema de defensa de la planta deberá actuar en función del tipo de patógeno, activando la respuesta mediada por SA en caso de biotrofos o las dependientes de JA y ET en caso de necrotrofos. Como se puede observar, las rutas de SA y JA poseen efectos inhibitorios recíprocos, aunque es posible que sea necesaria la modulación de varias respuestas hormonales para una resistencia adecuada a un patógeno determinado. En cualquier caso es necesario que se transmita de manera eficaz la señal de defensa correspondiente para que la resistencia sea efectiva.



3.2.3. Respuestas basadas en ácido abscísico

El ABA no sólo está relacionado en defensa con la acción de la coronatina. El tratamiento de plantas con ET induce la activación de *ABI1* y *ABI2* (*ABA INSENSITIVE 1* y *2*), que son dos reguladores negativos de la señalización por ABA (De Paepe *et al.* 2004). De hecho, la expresión de genes de defensa inducidos por JA/ET es suprimida por ABA exógeno y está inducida en los mutantes deficientes en ABA *aba1* y *aba2* (*ABA DEFICIENT 1* y *2*) (Koornneef *et al.* 1982; Schwartz *et al.* 1997), mostrando este último un aumento de la resistencia a *Fusarium oxysporium* (Anderson *et al.* 2004). Parece, por tanto, que el ABA tiene un papel en la resistencia frente a patógenos necrotrofos. Se ha descubierto que la inoculación con *Alternaria brassicicola* da lugar a la supresión de la acumulación de ABA, sugiriendo que el ABA es un objetivo potencial del mecanismo de virulencia de *A. brassicicola* (Flors *et al.* 2008). Ambos resultados indican entonces que el ABA juega un papel distinto en función de la especie de patógeno estudiado.

Finalmente, parece que ABA y JA a menudo actúan como reguladores positivos en la misma ruta de señalización (Adie *et al.* 2007). Todos estos resultados indicarían que la resistencia frente a necrotrofos parece muy dependiente de la relación entre varias hormonas (ET, JA y ABA) y el sistema patogénico estudiado.

3.3. Respuesta SAR

Una de las primeras apreciaciones que se realizaron en el estudio de la resistencia de plantas fue la existencia de un proceso similar a una memoria inmunológica, por la cual una respuesta de resistencia a nivel local invoca un mecanismo de resistencia en el resto de la planta. Esta respuesta permite la defensa frente a subsecuentes ataques patogénicos y que es patente durante días.

Este mecanismo se denomina resistencia sistémica adquirida o SAR y necesita de la generación de señales a larga distancia por los tejidos infectados que preparan a los tejidos distales para posteriores ataques (Vlot *et al.* 2008). Este efecto sobre los tejidos distales, que evita la

expresión constitutiva de genes de defensa, es conocido como *priming* (Conrath *et al.* 2002).

Un componente necesario pero no suficiente en el establecimiento y mantenimiento de la SAR es el SA (Truman *et al.* 2007). Sin embargo esta molécula ha sido descartada como el factor móvil e inductivo de resistencia en los tejidos sistémicos (Vernooij *et al.* 1994). Como se explicó anteriormente el SA también puede encontrarse conjugado, variando sus actividades biológicas y propiedades biofísicas. Uno de los derivados que se ha propuesto como la señal móvil ha sido el Metil-SA, que además se produce en grandes cantidades en tejido local tras la infección patogénica. Sin embargo, esta hipótesis tiene evidencias en contra (Attaran *et al.* 2009). Aunque ni el SA ni ninguno de sus conjugados parece ser la señal móvil, si que es necesaria para la inducción de SAR la biosíntesis *de novo* de SA y su mediación en la señalización en hojas secundarias (Attaran *et al.* 2009).

Pero el SA no parece ser la única hormona implicada en la respuesta SAR. Mutantes en la señalización por JA tienen disminuida la respuesta SAR y además el JA se acumula con rapidez en exudados vasculares de hojas que han sido inoculadas con estirpes avirulentas de *Pseudomonas syringae* (Truman *et al.* 2007). Sin embargo, la biosíntesis de JA no parece esencial en SAR, de igual modo, esta hormona también parece excluida en la señalización a larga distancia (Attaran *et al.* 2009).

Curiosamente, la aplicación de exudados de peciolo (conocidos en inglés como sap) de hojas infectadas con bacteria en hojas sistémicas ha demostrado tener actividad en el fomento de resistencia frente a bacteria virulenta (Jung *et al.* 2009). El análisis de estos exudados ha permitido identificar el ácido azelaico como otra molécula implicada en SAR. Este compuesto no tiene actividad antimicrobiana, pero su aplicación sobre las hojas induce *priming*, incluyendo la amplificación de la producción de SA y expresión de genes de respuesta a SA en hojas únicamente tras la infección patogénica (Jung *et al.* 2009). Además esta resistencia se induce a través de componentes conocidos de SAR y puede ser transportado por la planta (Jung *et al.* 2009).

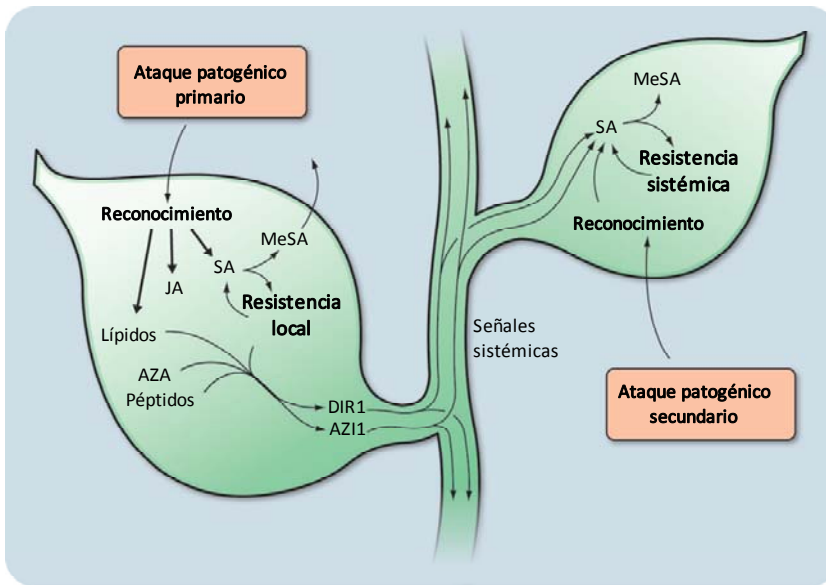


Figura 4. Eventos implicados en la respuesta SAR.

El ataque patogénico primario (necrotizante) desencadena una serie de respuestas convergentes cuya señal es transmitida a tejidos distales de manera dependiente de DIR1 y AZI1. En estos tejidos, el SA desempeña un papel primordial en la preparación del tejido para subsecuentes ataques patogénicos.

Adaptado de Parker 2009.

El mutante por inserción *azi1* (*AZELAIC ACID INDUCED 1*), de un gen inducido tras la aplicación de ácido azelaico o *sap*, no es capaz de inducir SAR pero responde normalmente a las infecciones a nivel local (Jung *et al.* 2009). Así pues, *azi1* es capaz de reconocer la señal o señales de defensa/*priming*, no obstante estas señales no son suficientes para inducir inmunidad sistémica en *azi1* y la aplicación de exudados de este mutante sobre plantas silvestres no es capaz de inducir *priming*, por lo tanto AZI1 parece modular la producción y/o translocación de una señal o señales móviles (Jung *et al.* 2009). AZI1 codifica para un inhibidor de la secreción de proteínas/almacenamiento en semilla/proteína de transferencia de lípidos (LTP). Otro mutante LTP, *dir1* (*DEFECTIVE IN INDUCED REISTANCE 1*), es también necesario para el establecimiento de SAR (Maldonado *et al.* 2002). El mutante *dir1-1* es también insensible al ácido azelaico, lo que sugiere que la señal mediada por *DIR1* es necesaria para la inducción de resistencia modulada por el ácido azelaico (Jung *et al.* 2009). Podría ser factible, a la

vista de estos resultados, que la señal sistémica de resistencia sea, en consecuencia, un lípido modificado o incluso un lipopéptido o una combinación de varias moléculas (Parker 2009).

Materiales y Métodos

1. Material biológico

1.1. Bacterias

1.1.1. *Pseudomonas syringae*

Las bacterias fitopatógenas utilizadas en el presente trabajo han sido: *Pseudomonas syringae* patovar (pv.) *tomato* aislado DC3000 (*Pto*), (Cuppels 1986), *Pto* con el plásmido pVSP61 expresando AvrRpm1 (Ritter & Dangl 1996), *Pto* con el plásmido pVSP61 expresando AvrRpt2 (Ritter & Dangl 1996), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* aislado 3121, y *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* cedidas por el Dr. Jeff Dangl (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, EE. UU).

1.1.2. Hongos

1.1.2.1. *Plectosphaerella cucumerina*

Como hongo fitopatógeno necrotrofo se utilizó *Plectosphaerella cucumerina* aislado del ecotipo Landsberg *erecta* (Laer-0) de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) infectado naturalmente, suministrado por la Dra. Brigitte Mauch-Mani (Universidad de Neuchatel, Suiza) (Ton & Mauch-Mani 2004).

1.1.2.2. *Phytophthora infestans*

Como hongo fitopatógeno hemibiotrofo se utilizó *Phytophthora infestans* aislado CRA 208 suministrado por Felix Mauch (Universidad de Friburgo, Suiza).

1.2. Plantas y tratamientos

Para la realización del presente trabajo se han utilizado los ecotipos Col-0, Laer-0 y Ws-1 cuando han sido necesarios. Se han realizado dobles mutantes por cruces entre plantas con mutaciones sencillas. Los cruzamientos entre estos mutantes y *LRA5* se realizaron utilizando las plantas *LRA5* como receptoras y/o donantes del polen. Los cruzamientos se realizaron mediante polinización de pistilos procedentes de botones florales cerrados emasculados con sumo cuidado en las plantas receptoras para evitar daños. La homocigosidad para cada uno de los loci se confirmó mediante marcadores moleculares CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) o por fenotipo para cada alelo en las poblaciones F2 segregantes. Todos los dobles mutantes generados fueron confirmados en la generación F3. Hay dos grupos de mutantes a utilizar: mutaciones que producen mayor resistencia a patógenos y mutaciones que producen menor resistencia. Estos mutantes se han elegido por que afectan a procesos claves en la resistencia de las plantas. Una vez obtenidos los dobles mutantes se estudió su fenotipo. Ya que los fenotipos son incompatibles (más resistente y menos resistente), el resultado será más parecido a uno de los progenitores que al otro, o quizás será un nuevo fenotipo intermedio. Los alelos mutantes afectados en componentes *non-host* de la planta utilizados para la generación de dobles mutantes con *LRA5* fueron *pen1* y *nho1* ((Collins *et al.* 2003) y (Lu *et al.* 2001a) respectivamente)(Ver Tabla 1).

Doble mutante	Mutante	Referencia
<i>LRA5 npr1</i>	<i>npr1 (Nonexpresser of PR Genes 1)</i>	(Cao <i>et al.</i> 1997)
<i>LRA5 ndr1</i>	<i>ndr1 (Non Race-Specific Disease Resistance 1)</i>	(Century <i>et al.</i> 1995)
<i>LRA5 sid2</i>	<i>sid2 (Salicylic Acid Deficient Induction 2)</i>	(Wildermuth <i>et al.</i> 2001)
<i>LRA5 rar1</i>	<i>rar1 (Required for Mla12-Specified Disease Resistance 1)</i>	(Tornero <i>et al.</i> 2002b)

Doble mutante	Mutante	Referencia
<i>LRA5 sgt1b</i>	<i>sgt1b</i> (Suppressor of G2 allele of SKP1)/ <i>edm1</i> (Enhanced Downey Mildew 1)	(Tor et al. 2002)
<i>LRA5 cpr1</i>	<i>cpr1</i> (Constitutive Expressor of PR1)	(Bowling et al. 1994)
<i>LRA5 cpr5</i>	<i>cpr5</i> (Constitutive Expression of PR 5)	(Bowling et al. 1997b)
<i>LRA5 dnd1</i>	<i>dnd1</i> (Defence, no Death 1)	(Yu et al. 1998a)
<i>LRA5 lsd1</i>	<i>lsd1</i> (Lesion Simulation Disease 1)	(Dietrich et al. 1994)
Doble mutante	Mutante	Referencia
<i>LRA5 nho1</i>	<i>nho1</i> (Non Host 1)	(Lu et al. 2001a)
<i>LRA5 pen1</i>	<i>pen1</i> (Penetration 1)	(Collins et al. 2003)

Tabla 1. Dobles mutantes realizados.

También se realizó el triple mutante *LRA5 ndr1 pad4* (*pad4*, (Jirage et al. 1999)) de manera similar a los dobles mutantes.

Los distintos tratamientos aplicados se llevaron a cabo pulverizando las plantas de *Arabidopsis* hasta completa humidificación de las hojas con las siguientes soluciones; i) ácido salicílico (SA) a una concentración de 0,5 mM de SA; ii) metil-jasmonato (MeJa) a una concentración de 100 μ M en una solución de DMSO 0,04% (v/v) (Sigma-Aldrich) y Silwet L77 0,02% (v/v) (Crompton Corp., Greenwich, EE.UU.); iii) auxinas, como ácido 2-4-diclorofenoxiacético, a una concentración 1 μ M y Silwet 0,02% (v/v); iv) ácido naftiltalámico (npa en inglés), se aplicó a una concentración de 40 μ M y Silwet 0,02% (v/v). Todos los productos químicos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich a menos que se especifique lo contrario.

2. Cultivo del material biológico

2.1. Cultivo de bacterias

2.1.1. Cultivo de *P. syringae*

Las distintas cepas de *P. syringae* utilizadas fueron previamente almacenadas a -80 °C a partir de una mezcla de cultivo saturado en medio Luria-Bertoni (LB) líquido y glicerol 80% (2:1). Para el crecimiento de las bacterias se prepararon placas de LB sólido, a las que se les añadió rifampicina (100 mg/L) o kanamicina (50 mg/L) en caso de bacterias con genes de avirulencia plasmídico. Las bacterias se crecieron a 19 °C. En el caso de bacterias para inoculación posterior de plantas, se crecieron durante 48 h y se extrajeron de la placa por arrastre utilizando una solución de MgCl₂ 10 mM. Para llevar el cultivo a la densidad óptica deseada, se analizó la densidad óptica de la suspensión obtenida mediante la utilización de diluciones 1/10 y 1/20 de la misma y un espectrofotómetro Biophotometer (Eppendorff, Hamburgo, Alemania).

2.2. Cultivo de hongos

2.2.1. Cultivo de *P. cucumerina*

El aislado de *P. cucumerina* fue cultivado en un medio derivado del PDA (0,5 M X PDA, Pronadisa, Madrid, España). El hongo fue crecido en condiciones de día corto (8 horas de luz, 16 horas de oscuridad y 24 °C aprox. de temperatura) durante 14 días. Posteriormente fue recogido por arrastre con 10 mL de MgSO₄ 10 mM. La suspensión se agitó en vortex durante 1 minuto y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua estéril y se lavó dos veces centrifugando a 13000 rpm durante 5 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 1 mL de MgSO₄ 10 mM. La cantidad de esporas se cuantificó usando un microscopio óptico.

2.2.2. Cultivo de *P. infestans*

El aislado de *P. infestans* fue cultivado en medio de avena (3,4 % (p/v) harina de alubias blancas, 1,7 % (p/v) harina de avena, 0,85 % (p/v) sacarosa, 1,5 % (p/v) agar, 5 µg/mL geneticina (G418)) en frascos Erlenmeyer durante 11 días a 18 °C en oscuridad. El micelio fue lavado con 6 mL de agua y mantenido a 4 °C en oscuridad durante 3,5 horas para poder extraer las zoosporas de los esporangios.

2.3. Cultivo de plantas

Las plantas fueron crecidas en cámaras de cultivo en condiciones de día corto, con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Las semillas se estratificaron un mínimo de 48 horas a 4 °C antes de pasar las plantas a condiciones de día corto a fin de favorecer y sincronizar la germinación. La iluminación se realizó con tubos fluorescentes (58 W OSRAM L 58 W/77 Fluora). La cámara de cultivo se mantuvo a 21 °C de día y a 19 °C de noche y una humedad relativa aproximada del 70%. Las plantas también fueron crecidas en invernadero en condiciones de día largo con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con luz artificial cuando fue necesaria.

Como sustrato de crecimiento se utilizó una mezcla de turba, perlita y vermiculita (2:1:1) o discos de turba prensada empapable (Jiffy®, Jiffy International, Oslo, Noruega).

El crecimiento *in vitro* se realizó en placas de agar 0,6% (p/v) enriquecidos con sacarosa 1% (p/v) y suplementado con 2,2 g/L de preparado Murashige y Skoog (MS) (Duchefa Biochemie, Harlem, Holanda). Tras la esterilización se añadieron los compuestos adecuados. En el caso de los experimentos en placa con ácido jasmónico, el medio se preparó según (Johnson *et al.* 1957), añadiendo KH_2PO_4 1mM y metil jasmonato 50 µM (Duchefa Biochemie) tras la esterilización cuando se indica. La esterilización de las semillas se realizó por Cl_2 (generado a partir de 3 mL de HCl en 100 mL de lejía comercial) durante al menos 4 horas.

3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

3.1. Purificación y manipulación de ADN

3.1.1. Purificación de ADN de plantas

Para la extracción de ADN genómico se recogió aproximadamente 100 mg de tejido fresco (principalmente de hojas) de la planta. Este tejido se congeló inmediatamente en N₂ líquido y se trituró usando un homogeneizador (Restch MM300, Haan, Alemania). La extracción del ADN se realizó mediante tampón de extracción (Tris-HCl pH 7.5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, 0.5% SDS (Dodecilsulfato de sodio)) y precipitación con isopropanol (Panreac, Castellar del Vallés, España). En caso de necesitar ADN de extraordinaria pureza se utilizó el kit DNAeasy® Plant Mini (Qiagen, Haiden, Alemania). El ADN obtenido se resuspendió en 200 µL de TE (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 10 mM y agua ultrapura).

3.1.2. Amplificación por PCR

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron utilizando ADN de Arabidopsis y diferentes cebadores según el fragmento que se quisiera amplificar. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL conteniendo 12 µL de agua ultrapura, cebador reverso 1 µM, cebador directo 1 µM (cebadores producidos por Sigma-Aldrich), 0,2 mM dNTP, 2 µL de tampón de PCR 10x con 2mM MgCl₂ (Biotools, Madrid, España), 1 µL de ADN de la muestra y 0.2 U de *Taq* polimerasa Netzyme (Biotools, Madrid, España).

Los programas de amplificación estándar constaron de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, después 40 ciclos compuestos de: 95 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante 30 segundos (hibridación) y 72 °C durante 50 segundos (extensión), seguido de un paso final a 72 °C durante 7 minutos (extensión final). Las temperaturas de hibridación utilizadas se modificaron si la T_m de

los cebadores lo requería. Se utilizó una máquina TECNE TC512 (Scie-Plas, Cambridge, Reino Unido). Los fragmentos de ADN amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa del 1 al 3% (p/v) tamponados con TAE 1× (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, agua ultrapura) o BSB 1× (Na₂B₄O₇ 25 mM, H₃BO₃ 100 mM, pH 8.4) y teñidos con 25 mg/L de bromuro de etidio (Sambrook & Russell 2001).

3.1.3. Análisis de metilación de ADN mediante McrBC

180 ng de ADN, obtenido mediante el sistema DNeasy Plant Mini (Qiagen, Venlo, Holanda) a partir de 100 mg aprox. de material fresco de los distintos genotipos, fue digerido con 22,5 U de la enzima McrBC (New England Biolabs), 1× de NEB Buffer 2 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, Dithiothreitol 1 mM, pH 7.9), 10 μM de GTP, 0,06 μg de BSA (Bovine Serum Albumin) y H₂O en un volumen total de 60 μL. El control para cada genotipo se realizó de igual modo a excepción de que no se añadió enzima McrBC y el volumen correspondiente se rellenó de H₂O. Para amplificar cada fragmento del intervalo de secuenciación se utilizaron oligos específicos y se procedió según 3.1.2. *Amplificación por PCR*. Para el control de ciclofilina se utilizaron oligos específicos para este gen que se añadieron directamente a las reacciones de PCR anteriores. Los productos de PCR de cada genotipo se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

3.2. Purificación y manipulación de ARN

3.2.1. Extracción de ARN de plantas y transcripción reversa

El ARN de las hojas de *Arabidopsis* se obtuvo a partir de extracciones con Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y posteriormente precipitadas con isopropanol. Las muestras fueron resuspendidas en agua tratada con 0,1 % v/v DEPC (dietilpirocarbamato, para inhibir posibles ribonucleasas) y guardadas a -80 °C.

El ARN se dosificó tras ser cuantificado y su pureza establecida según la proporción A_{260} / A_{280} por espectrofotómetro Nano-drop® ND-1000 (Thermo, Waltham, EE.UU.).

Las reacciones de transcripción reversa se realizaron a partir de 1 o 2 µg de ARN total purificado. Para obtener el ADN de copia única (ADNc) se utilizó el kit M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Vilnius, Lituania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando como cebador oligo (dT)₁₈ (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') en un volumen final de 20 µL.

3.2.2. RT-PCR

Las PCR se realizaron utilizando como molde ADNc (obtenido en 6.2.1.) y diferentes cebadores según el fragmento que se quisiera amplificar. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL conteniendo 12 µL de agua MiliQ, 1 µM de cebador reverso, 1 µM de cebador directo, 0,2 µM de dNTP, tampón de PCR 10x con MgCl₂ 2 mM (Biotools, Madrid, España), 1 µL de una dilución 1/10 de ADNc y 0.2 U de *Taq* polimerasa Netzyme (Biotools, Madrid, España). El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, después entre 20 y 30 ciclos (según cebadores) compuestos de: 95 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante 30 segundos (hibridación) y 1 min/kpb a 72 °C (extensión), seguido de un paso final a 72 °C durante 7 minutos (extensión final). Las temperaturas de hibridación utilizadas variaron según el par de cebadores, en función de la T_m de éstos como se ha indicado

anteriormente. Los fragmentos de ADN amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa del 1% (p/v) tamponados con TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, agua milliQ) y teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001).

3.2.3. PCR cuantitativas

Para cuantificar los niveles de transcrito de los genes de interés mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l empleando los siguientes componentes: 300 nM de los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos diseñados con el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.) para cada uno de los genes a analizar (ver Tabla 2), 10 μ l de SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 1 μ l de las reacciones de retrotranscripción (RTs) de las muestras a analizar. Se utilizó el termociclador GeneAmp[®] PCR System 9600 (Applied Biosystems).

En todos los casos se empleó el programa de temperaturas recomendado por el fabricante para los oligonucleótidos diseñados con el programa Primer Express. Inicialmente las reacciones se mantuvieron durante 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C. A continuación las reacciones se continuaron durante 15 segundos a 95 °C y un minuto a 60 °C; esta última fase se repite 40 ciclos. Para cada una de las muestras se realizaron 3 réplicas y se normalizaron los resultados con los oligos de la *ACTINA 2/8*. El resultado obtenido se analizó con el programa 7000 System Software de Applied Biosystems. La Tabla 2 muestra la secuencia de los cebadores utilizados.

Gen	Locus	Cebador	Secuencia	Producto (pb)
<i>APT</i>	At2g46960	sybr <i>APT</i> -F	GTTGCAGGTGTTGAAGCTAGAGGT	64
		sybr <i>APT</i> -R	TGGCACCAATAGCCAACGCAATAG	
<i>PIL1</i>	At2g46970	sybr46970F	CCCATGGGAGAGTAATGACC	96
		sybr46970R	TGAAAGGAAGCATAAAGAAGCA	
<i>UNKNOWN</i>	At2g46980	sybr46980-4F	TGAAAGGAAGCATAAAGAAGCA	87

		sybr46980-4R	CATCGTCCAGTTTTGTCTCG	
IAA20	At2g46990	sybr/IAA20-1F	TGTTCAACGCATCCATTCTTC	60
		sybr/IAA20-1R	CGTGACTCTTTCTCATTGCACA	

Tabla 2. Cebadores específicos utilizados para las PCR cuantitativas.

4. Purificación y manipulación de proteínas

4.1. Extracción de proteínas de plantas

100 mg de tejido fresco de *Arabidopsis* se congelaron con N₂ líquido y redujeron a polvo con un homogeneizador (Restch MM300, Haan, Alemania). La extracción se realizó con tampón 1x TBS (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1x de cóctel inhibidor de proteínas (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron congeladas posteriormente a -80 °C.

4.2. Dosificación y electroforesis de proteínas

Para cuantificar la cantidad de proteínas de las muestras se utilizó el método Bradford (Bradford 1976) basado en el reactivo de su mismo nombre (Sigma-Aldrich). Para inferir los µg de cada muestra a partir de su absorbancia a 595 nm, se realizó una curva de calibrado a partir de cantidades conocidas de albúmina sérica de bovino (New England Biolabs, Ipswich, EE.UU.). Las electroforesis de proteínas se realizaron en geles de poliacrilamida del 12% en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), según lo descrito por (Laemmli 1970). Las muestras fueron cargadas en condiciones reductoras y los geles fueron sometidos a voltaje constante (10 V/m).

4.3. Western blot

Las proteínas fueron transferidas por proceso semiseco a una membrana de PVDF (GE HealthCare, Waukesha, EE.UU.). La inmuno detección se realizó con el kit Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE HealthCare) con una dilución 1:5000 de anticuerpos policlonales contra PR1 (Wang *et al.* 2005a) y una dilución 1:25000 de Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate (Promega, Madison, EE.UU.). La señal quimioluminiscente fue detectada usando un LA-3000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm Life Science, Tokio, Japón).

5. Programas bioinformáticos y bases de datos

Para el análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se utilizó el programa Chromas © (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). Para el diseño de cebadores se utilizó el programa PrimerExpress® (Applied Biosystems).

La información de regiones polimórficas entre los genomas de los ecotipos Col-0 y Laer-0 para el diseño de marcadores moleculares utilizados en el cartografiado genético del mutante *LRA5*, *esh1* y *jrc1* fue consultada en: <http://www.arabidopsis.org/Cereon/index.htm>. También se utilizaron los marcadores facilitados por el INRA (Institute National de la Recherche Agronomique): <http://www.inra.fr/internet/Produits/vast/msat.php>. Además, fueron de utilidad los marcadores obtenidos mediante la página web Marker Tracker:

<http://bbc.botany.utoronto.ca/markertracker/index.spy>

Los análisis de los niveles de expresión de genes en micromatrices de 22 k para Arabidopsis se realizaron a través del programa GENEVESTIGATOR en la página web: <https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp> (Hruz *et al.* 2008).

6. Inoculación de plantas

6.1. Inoculación con *P. syringae*

6.1.1. Evaluación de síntomas y extracción de ARN

Los síntomas se evaluaron en plantas de 4-5 semanas de edad. Las hojas se infiltraron por el lado abaxial mediante jeringuilla sin aguja. En el caso de bacteria virulenta la concentración utilizada fue 1×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc) de *Pto* por mililitro, en $MgCl_2$ 10 mM.

Las plantas para la extracción de ARN se inocularon del mismo modo que el descrito anteriormente. Las muestras se tomaron a los tiempos especificados para cada experimento congelándose en N_2 líquido. Se conservó el material a -80 °C hasta la extracción del ARN (3.2.1.). Cada muestra estaba compuesta por un mínimo de nueve hojas provenientes de tres plantas independientes (tres hojas por planta).

6.1.2. Curvas de crecimiento de bacterias

6.1.2.1. Inoculaciones por spray

El crecimiento bacteriano de plantas inoculadas por spray se evaluó modificando el método presentado por Tornero & Dangl, 2001. Las plantas objeto de estudio se crecieron en jiffys (ver 2.3.) en periodos de día corto. A los 19 días tras la germinación, las plantas fueron inoculadas rociándolas mediante un spray de una solución bacteriana 5×10^7 ufc/mL de la bacteria correspondiente en $MgCl_2$ 10 mM con el mojante Silwet® L-77 0,02% (v/v). El recuento de bacterias se realizó a los días 0, 3 y/o 5 d.p.i., expresándose como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por peso fresco (Log (ufc/mg)) o por plántula (Log (ufc/plántula)). Se tomaron un mínimo de cuatro muestras con cuatro plántulas por muestra.

6.1.2.2. Inoculaciones por infiltración

El crecimiento bacteriano en plantas inoculadas por infiltración se evaluó según (Mayda *et al.* 2000). Las plantas se inocularon a las 4 o 5 semanas de edad. Para la inoculación, se tomó una hoja entera y mediante una jeringuilla sin aguja se infiltró por presión dentro de la hoja una solución bacteriana (de la bacteria correspondiente) a una concentración de 1×10^5 ufc/mL o 1×10^6 ufc/mL en MgCl_2 10 mM. El recuento de bacterias se realizó a los días 0, 3 y/o 5 d.p.i., expresándose como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por unidad de área foliar ($\text{Log (ufc/cm}^2\text{)}$). Se tomaron 4 discos de un mínimo 4 plantas por genotipo y día.

6.2. Inoculación con hongos fitopatógenos

6.2.1. Inoculaciones por gota

6.2.1.1. Inoculaciones de *P. cucumerina*

Las inoculaciones de *P. cucumerina* se realizaron en plantas de 5 semanas crecidas en condiciones de día corto. Se inocularon un mínimo de cuatro hojas por planta, 10 plantas por genotipo. La inoculación consistió en la deposición sobre la superficie de la hoja de un volumen aproximado de 6 μL de una suspensión de 5×10^6 esporas/mL en agua. Las plantas se mantuvieron con humedad relativa del 100%. Los síntomas se evaluaron a los 7-10 d.p.i. y se expresaron como el diámetro de la lesión.

6.2.1.1.2. Inoculaciones de *P. infestans*

Las inoculaciones de *P. infestans* se realizaron en plantas de 4-5 semanas crecidas en condiciones de día corto. Se inocularon el máximo de hojas por planta, 9-10 plantas por genotipo. La inoculación consistió en la deposición sobre la superficie de la hoja de un volumen aproximado de 10 μL de una suspensión de: 5×10^5 esporas/mL, 1×10^5 esporas/mL o 2×10^4 esporas/mL en agua. Las plantas se mantuvieron con humedad relativa del 100%. Los síntomas se evaluaron *de visu* a los 3 d.p.i.

7. Análisis genéticos

7.1. Análisis del fenotipo de *LRA5*

Los estudios encaminados a la caracterización genética del mutante *LRA5* consistieron en test de dominancia, de haploinsuficiencia y de estabilidad. Con objeto de definir la relación de dominancia o recesividad del fenotipo de susceptibilidad se procedió a la realización de los cruzamientos entre plantas silvestres y el mutante *LRA5*. Para discernir si la mutación dominante era producto de una haploinsuficiencia el mutante *LRA5* fue cruzado a una línea tetraploide y se estudió la susceptibilidad de la F1. Finalmente para estudiar la estabilidad del fenotipo de susceptibilidad se analizó la F1 entre Col-0 y *LRA5* y se buscaron plantas que no mostraron fenotipo de susceptibilidad.

7.2. Cartografiado de *LRA5*, *esh1* y *jrc1*

El mutante *LRA5* se cruzó con los ecotipos Col-0 y *Laer-0* generando 2 poblaciones F2 recombinantes con el objeto de localizar físicamente en el genoma la mutación *LRA5*. En estas poblaciones F2 se seleccionaron las plantas homocigotas para la mutación *LRA5* y las plantas recombinantes se identificaron mediante el uso de marcadores SSLPs (Single Sequence Length Polymorphism)(Bell & Ecker 1994). También fue necesario el diseño de nuevos marcadores a partir de las bases de datos presentes en la página web www.arabidopsis.org.

En el caso de los mutantes *esh1* y *jrc1* el método de cartografiado fue el mismo pero en este caso las poblaciones F2 recombinantes se obtuvieron por cruce con el ecotipo *Laer-0*.

8. Cuantificación de los niveles de ácido salicílico

La determinación de los niveles de SA (Yalpani *et al.*, 1994) se hizo a partir de muestras de 0,5 g de hojas de roseta (3 réplicas) en cada una de las muestras a analizar. Para obtener los extractos de SA, las muestras se trituraron en N₂ líquido y tras hacer una extracción metanólica se secaron a vacío. Una vez secas se resuspendió el residuo en 1 ml de ácido tricloroacético al 5 %, se decantó el sobrenadante y seguidamente se realizó una doble extracción orgánica añadiendo 1 ml de una mezcla de disolventes orgánicos (etilacetato:ciclopentano:isopropanol en una proporción 100:99:1). La fase acuosa se secó a vacío en Speed Vac SPD121P de Thermo Savant (Thermo Electron Corp., Waltham, EE.UU.) y el residuo se resuspendió en metanol al 55 %.

En el análisis por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) en fase reversa, se utilizó como eluyente un gradiente de concentraciones de ácido acético (HAc)-metanol (MeOH) durante los primeros 20 minutos con un porcentaje de concentración decreciente de 100 % a 0 % en HAc y un porcentaje creciente de 0 % al 100 % en MeOH, seguidos de 10 minutos de MeOH al 100 %. El sistema tenía acoplado un detector de fluorescencia funcionando a λ excitación SA = 313 nm y λ emisión SA = 405 nm. Para determinar el contenido de SA en las muestras se utilizó una curva patrón que estableció una relación entre área de pico al tiempo de retención del SA y su concentración. El rango de concentraciones de SA en la curva patrón va de 0,1 a 1 μ g, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,9969.

Antecedentes

Antecedentes

El mutante *LRA5* fue obtenido de un rastreo por saturación cuya finalidad era la obtención de más información del gen *RPM1* en *Arabidopsis thaliana*. Para ello se realizó una línea transgénica (denominada *a11*) que a través de un sistema inducible, era capaz de expresar el efector bacteriano *avrRpm1* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* mediante la aplicación exógena de β -estradiol (Tornero *et al.* 2002a). De esta manera las plantas con el sistema inducible desarrollaban una fuerte respuesta de defensa (incluyendo necrosis) cuando eran rociadas con el glucocorticoide.

Posteriormente se realizó una mutagénesis de dicha línea mediante EMS, en busca de plantas que fueran incapaces de desarrollar esta fuerte respuesta tras la aplicación de β -estradiol. Por tanto, las plantas así seleccionadas no serían capaces de reconocer el efector bacteriano *AvrRpm1* en una inoculación con una estirpe de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que poseyera dicho gen. Se comportarían, entonces, igual que el mutante *rpm1* de *Arabidopsis*, que por estar afectado en el gen de resistencia *RPM1* no es capaz de responder de manera efectiva a la infección con dicha estirpe.

En este rastreo se obtuvieron diversos grupos de complementación, perteneciendo la mayoría de los alelos a mutaciones en *RPM1*. Otros lo fueron de un gen relacionado con *RPM1* denominado *PBS2* y otros fueron grupos de complementación de un único alelo. Este es el caso del mutante que aquí se describe, *LRA5* (*LOSS OF RECOGNITION TO AVRRPM1*).

Cuando se comenzó esta tesis en el grupo ya se habían desarrollado algunos experimentos que hubieran podido esclarecer la naturaleza del mutante *LRA5* mucho antes de lo que sucedió posteriormente. A partir de estos experimentos se concluyó (erróneamente) que *LRA5* era un mutante diferente a los descritos previamente.

Objetivos

Objetivos

- Caracterización del mutante *LRA5*, centrándose especialmente en su participación en la defensa frente a patógenos. Relación epistática con otros mutantes implicados en defensa y localización cartográfica de la mutación.
- Búsqueda de supresores de *LRA5*. Caracterización de componentes (generados en este rastreo) de la resistencia a patógenos independientes de SA.

Resultados y Discusión



1. Caracterización del mutante *LRA5* de *A. thaliana*

Para realizar la caracterización genética del mutante *LRA5* de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) se estudió la dominancia o recesividad del fenotipo de susceptibilidad a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) mediante un análisis de segregación. Para ello se cruzó el mutante *LRA5* con los ecotipos Col-0 y Laer-0. Las plantas obtenidas en la segunda generación filial (F2) fueron analizadas para la susceptibilidad a *Pto* obteniéndose una segregación 3:1 (susceptible a resistente) de acuerdo con el patrón de segregación de un gen dominante (Tabla 3):

Cruce	Total plantas F2	Susceptibles	Resistentes	Hipótesis H ₀	χ^2	Carácter de la mutación
<i>LRA5</i> × Col-0	95	74	21	3:1	0,75	Dominante
<i>LRA5</i> × Laer-0	199	146	53	3:1	0,74	Dominante

Tabla 3. Análisis de segregación de la mutación *LRA5*.

Segregación del fenotipo de resistencia y susceptibilidad de la F2 del cruce del mutante *LRA5* y los ecotipos Col-0 y Laer-0. La hipótesis nula (H₀) se acepta, con una probabilidad de error del 5 %, cuando $\chi^2 < 3,84$ para un grado de libertad.

Una vez determinado el carácter de la mutación, se quiso esclarecer la naturaleza de la dominancia mostrada. Para algunas mutaciones dominantes, la inactivación de una de las dos copias del gen reduce el producto de dicho gen por debajo del umbral necesario para obtener un fenotipo normal. Entonces se considera una mutación dominante por pérdida de función provocada por una haploinsuficiencia. Por el contrario, en otros casos el fenotipo de dominancia puede deberse a una nueva propiedad del gen mutado, no a una reducción de su actividad normal. A esta clase es a la que se denomina mutación dominante por ganancia de función (Griffiths *et al.* 2008).

Para poder determinar a qué caso de dominancia pertenece el mutante *LRA5*, este fue cruzado con una planta de fenotipo silvestre pero de dosis génica tetraploide (NASC N3432). La primera generación filial (F1) obtenida mostró fenotipo susceptible tras la inoculación con *Pto* (Figura 5) y por tanto se puede descartar la haploinsuficiencia como causa de la dominancia. Es decir la dominancia se debe a una ganancia de función o a una dominancia negativa.

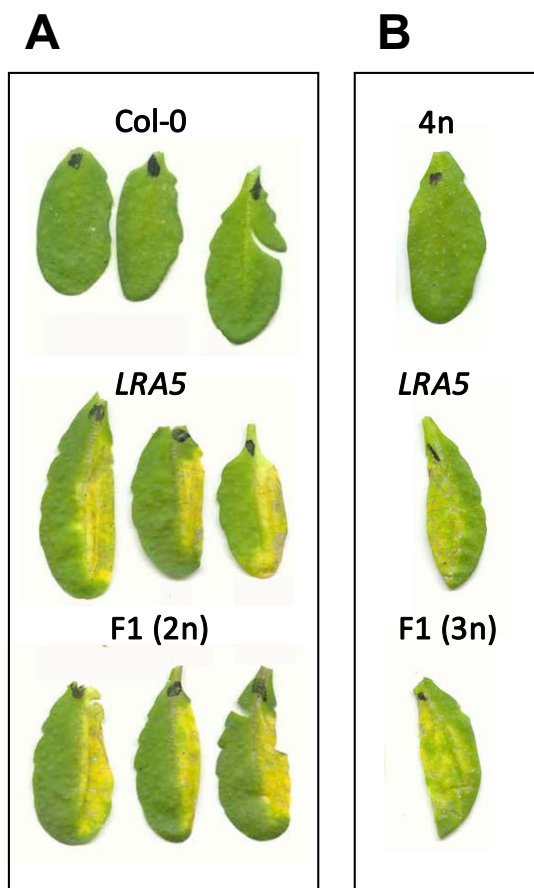


Figura 5. Dominancia por ganancia de función del fenotipo de *LRA5*.

El fenotipo de resistencia/susceptibilidad se estudió por infiltración mediante jeringuilla con *Pto* a 10^5 ufc/mL y los síntomas se fotografiaron a los 5 días posteriores a la inoculación (d.p.i.)

A. Resultado de la infiltración de la progenie F1 diploide entre Col-0 y *LRA5*.

B. Resultado de la infiltración de la progenie F1 triploide entre el cruce 4n y *LRA5*.

2. Comportamiento del mutante *LRA5* frente a patógenos

2.1. Susceptibilidad del mutante *LRA5* frente a patógenos biotrofos

2.1.1. Susceptibilidad frente a estirpes de *P. syringae* virulentas

El mutante *LRA5* fue rescatado de un rastreo para plantas con resistencia mermada frente al efector bacteriano *avrRpm1* (Tornero *et al.* 2002a). Otros grupos de complementación obtenidos en el mismo rastreo también mostraron ser más susceptibles a *Pto* que Col-0. El mutante *LRA5*, que forma un único grupo de complementación, muestra un fenotipo de alta susceptibilidad a *Pto*. Para cuantificar el nivel de susceptibilidad del mutante se realizaron curvas de crecimiento en estadio de plántula de 18 días con *Pto* y además con otras dos estirpes bacterianas que, al igual que *Pto*, carecen del efector de virulencia *AvrRpm1*. Los efectores de virulencia pueden actuar como elicitores o supresores de las defensas de la planta, por tanto su supresión puede alterar la virulencia de la bacteria (Alfano & Collmer 2004). *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* estirpe CR299 es una modificación de la línea parental *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 que posee el efector *AvrRpm1* no funcional por inserciones Tn3-Spice dentro del gen *avrRpm1* (Ritter & Dangl 1995). Por otro lado, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* estirpe 6 ΔE KO no posee el gen de virulencia *avrRpm1* por curación del plásmido pFKN que lo contiene (Rohmer *et al.* 2003). En ambas estirpes, la no funcionalidad del efector *AvrRpm1* confiere una menor virulencia.

El mutante *LRA5* es 10 veces más susceptible a *Pto* que Col-0 (Figura 6). Este resultado es acorde con los síntomas de enfermedad observados durante el rastreo y posteriores inoculaciones. La inoculación con *Ps* pv.

maculicola estirpe CR299 se traduce en un importante crecimiento bacteriano 15 veces superior con respecto al control Col-0 a día 3. Precisamente a los tres días tras la inoculación con esta estirpe, Col-0 tiene un máximo de crecimiento bacteriano que posteriormente disminuye. Sin embargo, en *LRA5* no sólo el crecimiento a día 3 es muy alto, sino que este crecimiento bacteriano se mantiene incluso 6 días después. En el caso de la estirpe *Ps pv. maculicola* 6 ΔE KO el crecimiento bacteriano en el control Col-0 ha sido nulo, incluso a día 6 tras la inoculación. Este hecho sería acorde con la necesidad del gen *avrRpm1* para la virulencia completa de la estirpe. Sin embargo en el mutante *LRA5* la falta de *avrRpm1* en esta estirpe se traduce en un crecimiento de la bacteria 15 veces superior al de Col-0.

A lo largo de esta tesis muchos experimentos de inoculación con patógenos se han realizado con *Pto*. En los distintos experimentos realizados se pueden encontrar diferencias notables en la susceptibilidad de Col-0 y *LRA5*. Estas diferencias son debidas, en la mayoría de los casos, a diferencias en la edad de las plantas y el método de inoculación. Por otra parte, existe una fuerte variación intrínseca en estos experimentos, debido al crecimiento exponencial de la bacteria.

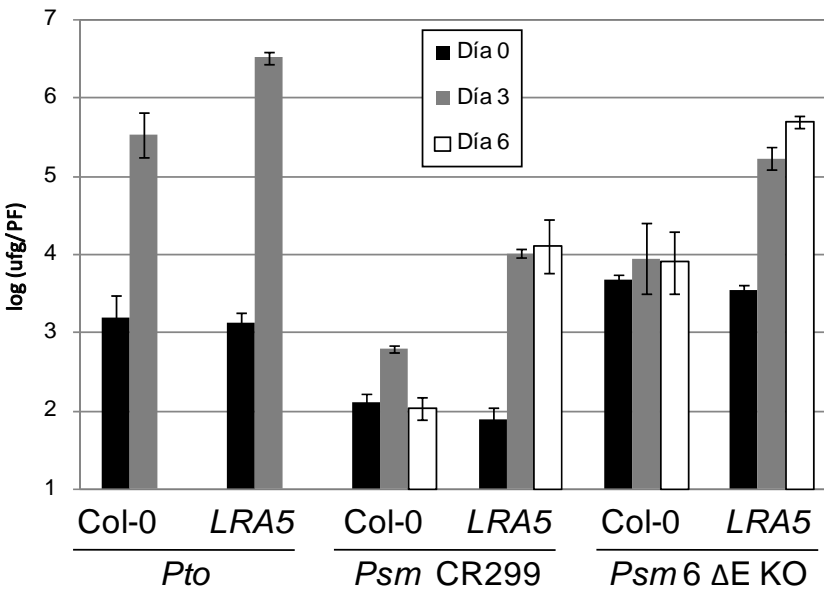


Figura 6. Efecto de la mutación *LRA5* sobre la resistencia a estirpes virulentas de *P. syringae*. Estudio comparativo del crecimiento de las distintas bacterias virulentas sobre el control silvestre Col-0 y mutante *LRA5*. Las estirpes *Pto*, *Psm* CR299 y *Psm6* ΔE KO fueron inoculadas mediante inmersión en $5 \cdot 10^7$ ufc/mL sobre plántulas de 18 días y las curvas fueron evaluadas a los días indicados. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 2 veces con resultados similares.

2.1.2. Susceptibilidad frente a estirpes de *P. syringae* inespecíficas de *Arabidopsis*

Como se comentó en la Introducción, *Arabidopsis* es resistente a la mayoría de patógenos potenciales que la rodean. Sin embargo, existen patógenos que están adaptados para superar los mecanismos de defensa que la planta despliega tras la detección de MAMPs del microbio (inmunidad PTI), son estos los que se suelen considerar patógenos específicos. En contraposición, aquellos que no son capaces de sortear estos mecanismos de la planta se denominan inespecíficos. Alteraciones en el sistema de detección y/o defensa de la planta pueden permitir que un patógeno inespecífico pueda comportarse como específico.

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* y pv. *phaseolicola* son agentes patogénicos específicos de *Nicotiana tabacum* (tabaco) y de *Phaseolus vulgaris* (judía) respectivamente. El primero causa el “fuego salvaje” en tabaco (Garber & Shaeffer 1957) y el segundo es capaz de suprimir los mecanismos de defensa que desencadenan la respuesta hipersensible en judía (Abramovitch & Martin 2004) provocando los síntomas conocidos como “halo blanco”. Ambas estirpes son patógenos inespecíficos de *Arabidopsis*.

La inoculación con *Ps.* pv. *tabaci* de plantas silvestres de *Arabidopsis* da lugar a una HR, con la producción de especies reactivas de oxígeno y muerte celular (Ishiga *et al.* 2005). Alteraciones en *Arabidopsis*, como mutaciones en la proteína NHO1 (del gen *NONHOST1*), que se induce en presencia de flagelina y que es necesaria para la resistencia frente a varias

cepas de *P. syringae* inespecíficas de *Arabidopsis* (Lu *et al.* 2001a), dan como resultado un mayor crecimiento de *Ps. pv. tabaci* silvestre *in planta*.

La proteína NHO1 de *Arabidopsis* es también necesaria para la resistencia frente a *P.s. pv. phaseolicola* (Lu *et al.* 2001a). La inoculación de *P.s. pv. phaseolicola* en plantas silvestres de *Arabidopsis* induce, en primer término, los mismos marcadores asociados a la inoculación con patógenos específicos de *Arabidopsis* como *Pto* (Tatiana & Jürgen 2007), aunque esta última es capaz de superar esta batería de defensa mediante el uso de factores de virulencia (Li *et al.* 2005). Esto podría indicar que *NHO1* forma parte de algún tipo de resistencia gen a gen (Abramovitch & Martin 2004). Curiosamente el mutante *nho1* no tiene alterada la resistencia a *Pto* (Lu *et al.* 2001b). La línea transgénica *NahG* en *Arabidopsis* también es susceptible a *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (Lu *et al.* 2001b). Estudios posteriores han demostrado que el catecol, producto de la degradación de ácido salicílico (SA) por la proteína NahG (salicilato hidroxilasa), es el causante de dicha susceptibilidad (van Wees & Glazebrook) y que la adición de catalasa es capaz de revertir el fenotipo (van Wees & Glazebrook 2003).

Sin embargo, también existe al menos una ruta responsable de la resistencia a patógenos inespecíficos de *Arabidopsis* independiente de SA. Este es el caso del mutante *ocp11/ago4-2* que resultó ser más susceptible que *nho1* frente a *P.s. pv. tabaci* (Agorio & Vera 2007).

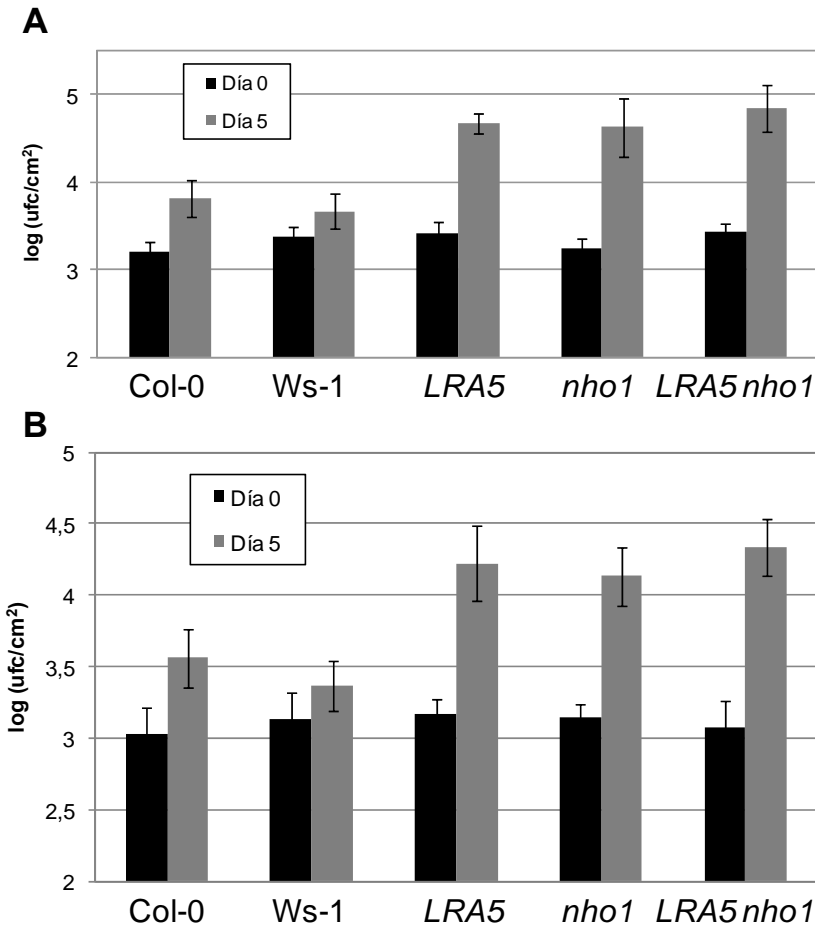


Figura 7. Crecimiento de *Ps. pv. tabaci* y *Ps. pv. phaseolicola* 3121 en el mutante *LRA5*.

Crecimiento de estirpes de *Pseudomonas syringae* inespecíficas tras inoculación mediante jeringuilla (a una concentración de 10^6 ufc/mL) en los controles silvestres (se incluye Ws-1 porque, como se explicará más adelante, *LRA5* es una mezcla de ecotipos), el mutante *LRA5*, en el mutante *nho1* y en el doble mutante *LRA5 nho1*.

A. Crecimiento de *Ps. pv. tabaci*.

B. Crecimiento de *Ps. pv. phaseolicola*.

Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

LRA5 es susceptible a *P.s. pv. tabaci* (Figura 7A). El crecimiento bacteriano es 10 veces mayor que en cualquiera de los controles silvestres y al nivel del mutante *nho1*, que es susceptible a este patógeno tal y como se describió con anterioridad. Además el doble mutante *LRA5 nho1* es igual de susceptible que *LRA5* y *nho1* por separado.

En el caso de *Ps. pv phaseolicola* 3121 el mutante *LRA5* también se muestra más susceptible que los controles silvestres (Figura 7B). En este caso el crecimiento bacteriano es 10 veces superior en el caso del *LRA5*. Para esta estirpe también el mutante *nho1* es susceptible en igual proporción que el mutante *LRA5*. El doble mutante entre ambos es igual de susceptible que los mutantes sencillos.

Aparentemente, en ninguno de los dos casos presentes en la Figura 7 se puede hablar de efectos sinérgicos o aditivos entre los mutantes *nho1* y *LRA5*, pues los dobles mutantes presentan la misma susceptibilidad que los respectivos mutantes por separado. Aunque este resultado puede indicar que ambos genes están posicionados en la misma ruta genética, el alto grado de susceptibilidad que muestran ambos en los dos experimentos podría estar enmascarando un hipotético efecto sinérgico o aditivo difícilmente detectable, por tanto, con estas estirpes. Se planteó entonces el uso de una estirpe afectada en el sistema de secreción tipo III que ampliara la sensibilidad de la curva de crecimiento, cuyo resultado podría posicionar de manera más clara a ambos mutantes en la misma ruta genética o en rutas independientes.

El sistema de secreción tipo III de *Pseudomonas* es de gran importancia para la patogénesis de dicha especie (Alfano & Collmer 2004). El operón *hrpC* de *Pto* contiene 5 elementos: *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, y *hrpV* (Deng *et al.* 1998). *hrcC* es necesario para el sistema Hrp, especialmente para la secreción dependiente de *hrpZ* y el reparto de señales *Avr* (Deng *et al.* 1998). Además, mutaciones en el operón *hrpC* reducen el crecimiento bacteriano en el cultivar Red Kidney de *Phaseolus vulgaris* (alubia) entre 100 y 1000 veces respecto a la cepa silvestre de *P.s. pv. phaseolicola* (Rahme *et al.* 1991). Parece por tanto que el operón *hrpC* es relevante para la virulencia, pero no indispensable para la patogénesis, al menos en judía.

Sin embargo, la resistencia del mutante *LRA5* es efectiva frente el crecimiento de la estirpe *Pto hrpC*, al contrario que el mutante *nho1* (Figura 8). Por tanto la bacteria necesita tener un sistema de secreción funcional para poder infectar *LRA5* y por tanto el mutante no parece afectado en la inmunidad PTI. La susceptibilidad que presenta frente a patógenos inespecíficos parece entonces ser independiente de la ruta de defensa dependiente de *NHO1*.

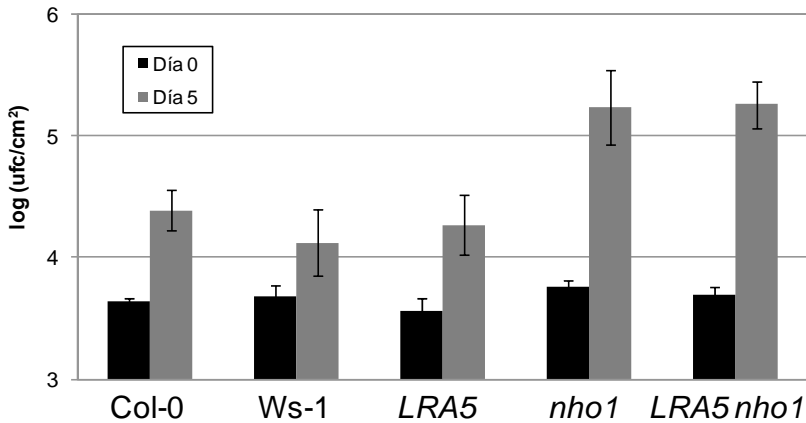


Figura 8. Efecto de la mutación *LRA5* sobre la resistencia a la estirpe *Pto hrpC*. Crecimiento de la bacteria *Pto hrpC* inoculada mediante jeringuilla a una concentración de 10^6 ufc/mL, sobre los controles silvestres, el mutante *LRA5*, el mutante *nho1*, y el doble mutante *LRA5 nho1*. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

2.1.3. Susceptibilidad frente a estirpes de *P. syringae* avirulentas

Una vez descartada la ruta dependiente de *NHO1* como posible causante de la susceptibilidad del mutante *LRA5* a patógenos inespecíficos de *Arabidopsis*, se decidió comprobar si pudiera estar afectado en la inmunidad activada por efector o ETI. En general, esta viene determinada por la capacidad de la planta para detectar, mediante los genes *R* (de resistencia), los efectores (generalmente proteínas o péptidos) que los patógenos utilizan para subvertir procesos del hospedador y promover el ciclo de vida del patógeno (Martin *et al.* 2003). En algunos casos las proteínas interactúan físicamente como es el caso del efector AvrPto de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y la proteína Pto de tomate cuya interacción es detectada por Prf activando entonces las defensas (Dangl & Jones 2001). En otros casos la planta también es capaz de detectar las perturbaciones provocadas por dichos efectores en otras dianas (Kim *et al.* 2005). En cualquier caso, la detección directa o indirecta del patógeno desencadena una cascada de señales que suelen incluir la respuesta HR (Heath 2000a), resultando en la detención del avance del patógeno.

Para el estudio se seleccionaron dos estirpes de *Pto* portadoras de los genes de avirulencia *avrRpt2* y *avrRpm1*. En el caso del mutante *LRA5* se muestra susceptible a *Pto avrRpt2* pero no a la estirpe *Pto avrRpm1* (Figura 9A y 9B). La resistencia frente a *Pto avrRpm1* entra en contradicción con el propio método por el cual se realizó el rastreo de mutantes al que pertenece *LRA5*, aunque es cierto que dentro de todos los mutantes obtenidos en dicho rastreo se encontró cierta variabilidad en la susceptibilidad a la estirpe de *Pto* con *avrRpm1* (Tornero *et al.* 2002a). Las inoculaciones con esta bacteria fueron efectivas pues se obtuvo crecimiento en el mutante *rpm1* (Figura 9A). En el caso de la estirpe con *avrRpt2* si que se obtuvo susceptibilidad en el mutante *LRA5* (Figura 9B). Puede ser significativo que ambas interacciones *avrRpm1-RPM1* y *avrRpt2-RPS2* estén relacionadas con la resistencia basal en *Arabidopsis* (Kim *et al.* 2005). La acción de AvrRpm1 o AvrRpt2 sobre la proteína de la planta RIN4 causa perturbaciones que son detectadas por RPM1 o RPS2 y que activan la respuesta defensiva ((Mackey *et al.* 2002); (Axtell & Staskawicz 2003)). Sin

embargo estos efectores son capaces de inhibir el sistema defensivo PTI de la planta inducido por FLS2 (receptor de la flagelina) y otros posibles receptores MAMPs (Kim *et al.* 2005). Por tanto, podría ser un problema relacionado con la vía RIN4-RPS2 la que pudiera ser causante de la susceptibilidad inespecífica de *LRA5*, aunque esta circunstancia debería ser independiente de RIN4 o aguas abajo de la misma, pues defectos en esta proteína también deberían observarse en la interacción patogénica *Pto avrRpm1-LRA5*.

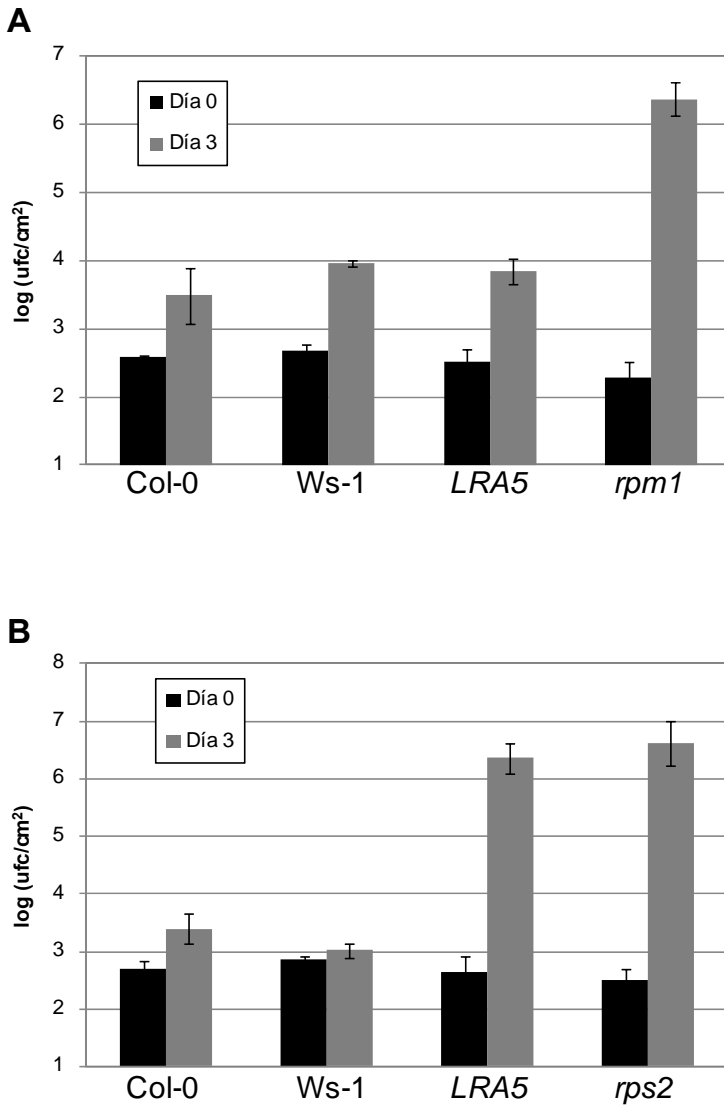


Figura 9. Comportamiento del mutante *LRA5* frente a las estirpes avirulentas de *Pto* *avrRpm1* y *avrRpt2*.

A. Estudio de la resistencia del mutante *LRA5* frente a la estirpe avirulenta *Pto* *avrRpm1*, inoculada mediante jeringuilla a una concentración de 10^6 ufc/mL. Los controles utilizados fueron Col-0 y Ws-1 y el mutante susceptible *rpm1*.

B. Estudio de la resistencia del mutante *LRA5* frente a la estirpe avirulenta *Pto avrRpt2*, inoculada mediante jeringuilla a una concentración de 10^6 ufc/mL. Los controles utilizados fueron Col-0 y Ws-1 y el mutante susceptible *rps2*. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

2.1.4. Interacción con mutantes descritos para la ruta de señalización del SA

Se realizaron una serie de dobles y triples mutantes de genes asociados a las principales rutas de defensa de *Arabidopsis* (ver apartado 1.3 en Materiales y Métodos) con el mutante *LRA5* para de esta manera poder detectar contribuciones aditivas o redundancias funcionales a la resistencia dependiente de *LRA5*.

2.1.4.1. Interacción con mutantes que presentan mayor resistencia a *Pto*

Como se ha descrito en la Introducción, las principales rutas de defensa están representadas por las hormonas SA y JA/ET. En general, SA promueve la resistencia a patógenos biotrofos mientras el JA/ET promueve la resistencia frente a necrotrofos (Robert-Seilaniantz *et al.* 2007). La inducción de resistencia por el SA suele conllevar la expresión de proteínas de defensa como PR1 (Loake & Grant 2007) cuya expresión constitutiva, así como la de otras de proteínas de defensa como PR5, va asociada a una mayor resistencia a patógenos biotrofos. Tal es el caso del mutante *cpr1* (Bowling *et al.* 1994).

Para comprobar la posible reversión del fenotipo de susceptibilidad del mutante *LRA5*, éste se cruzó con mutantes que confieren mayor resistencia (*cpr1*, *cpr5*, *dnd1* y *lsd1*) y se seleccionaron los dobles mutantes. Estos mutantes cubren distintos mecanismos de resistencia. *cpr1* expresa de manera constitutiva PR1 y PR5. El mutante *cpr5* expresa de manera

constitutiva PR1 (Bowling *et al.* 1997b) y esta relacionado con la muerte celular y la biogénesis de la pared celular, entre otros (Brininstool *et al.* 2008). Ambos, *cpr1* y *cpr5*, muestran SAR de manera constitutiva (Clarke *et al.* 2001). El mutante *dnd1* (Yu *et al.* 1998c) es incapaz de producir HR pero sin embargo sí muestra resistencia gen-a-gen y resistencia sistémica constitutiva (Clough *et al.* 2000). Por último *lsd1* muestra una respuesta exacerbada a los iniciadores de muerte celular y es incapaz de frenar esta, de tal manera que exhibe de manera constitutiva los efectos asociados a la HR (Dietrich *et al.* 1997).

Además, los mutantes *cpr1*, *cpr5*, *dnd1* y *lsd1* poseen un fenotipo macroscópico asociado que puede incluir enanismo y/o disminución de la producción de semillas y en algunos casos formación de lesiones espontáneas ((Durrant & Dong 2004), (Clough *et al.* 2000) y (Dietrich *et al.* 1997)).

Como se puede observar en la Figura 10A *LRA5* es capaz de revertir el fenotipo macroscópico de *cpr1* y de *cpr5*. Aunque en este último el doble mutante adquiere un tamaño de roseta normal (con respecto a *LRA5*), no se revierte el fenotipo de ausencia de tricomas. En el caso de la mutación *dnd1* la mutación *LRA5* no es capaz de revertir el fenotipo de enanismo.

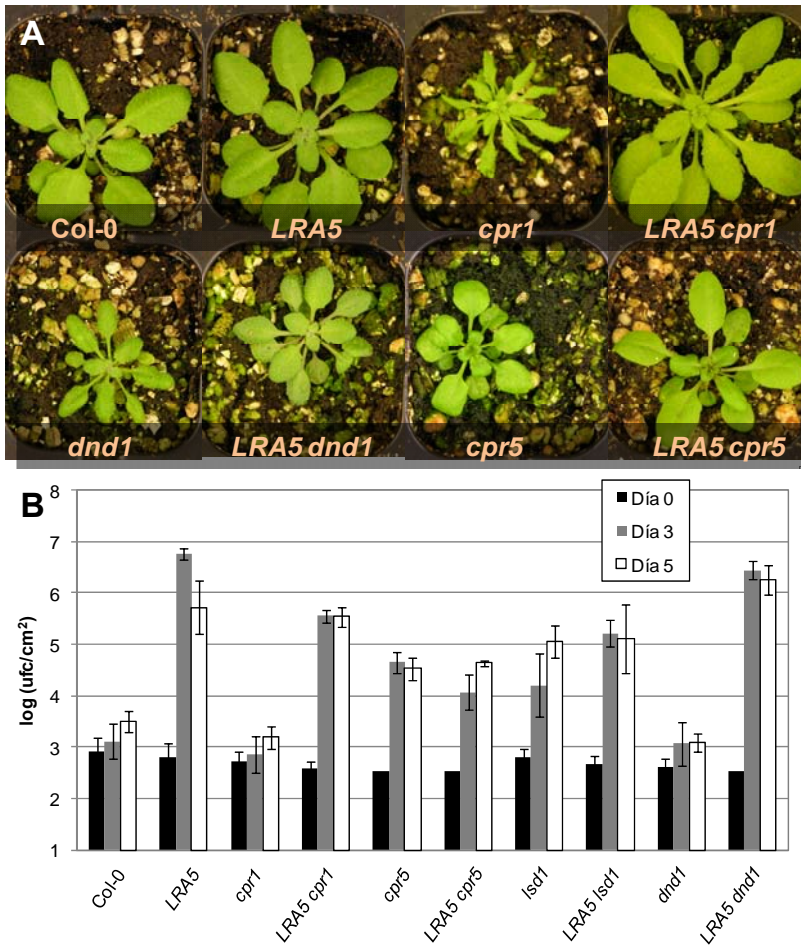


Figura 10. Análisis del fenotipo macroscópico y patogénico de los dobles mutantes entre *LRA5* y *cpr1*, *cpr5*, *dnd1* y *lsd1*.

A. Foto tomada del fenotipo macroscópico a los 33 días de los dobles mutantes *LRA5 cpr1*, *LRA5 dnd1* y *LRA5 cpr5* comparados con sus respectivos controles mutantes y el control silvestre Col-0.

B. Curva de crecimiento de *Pto* inoculada mediante inmersión en $5 \cdot 10^7$ ufc/mL sobre plántulas de 18 días en el control silvestre Col-0 y en los mutantes *LRA5*, *cpr1*, *LRA5 cpr1*, *cpr5*, *LRA5 cpr5*, *lsd1*, *LRA5 lsd1*, *dnd1* y *LRA5 dnd1*.

Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

Se puede postular que si la mutación *LRA5* es capaz de revertir el fenotipo de enanismo de los mutantes (que probablemente esta causada por la expresión constitutiva de genes de defensa), entonces también pueda ser capaz de revertir el fenotipo de resistencia asociado o, por el contrario, que dichos mutantes actúen como supresores del fenotipo de susceptibilidad de *LRA5*. Para responder a estas hipótesis los dobles mutantes fueron inoculados con *Pto* y el resultado de la interacción fue valorado mediante curvas de crecimiento.

Todos los dobles mutantes, excepto el realizado con *dnd1*, son capaces de revertir el fenotipo de susceptibilidad de *LRA5* (Figura 10B). Dentro de los que revierten el fenotipo (*LRA5 cpr1*, *LRA5 cpr5* y *LRA5 lsd1*) existen distintos niveles de resistencia a día 3, siendo la más efectiva la introducida por la mutación *cpr5*, con una disminución de casi 20 veces el crecimiento bacteriano. Los otros dos (*LRA5 cpr1*, *LRA5 lsd1*) muestran un nivel intermedio de resistencia. Finalmente el doble mutante *LRA5 dnd1* es incapaz de revertir la susceptibilidad de *LRA5*. Sin embargo, tal y como se ha indicado anteriormente, la introducción de *LRA5* en el fondo *dnd1* no es capaz de revertir el fenotipo macroscópico de este último (Figura 10A). Por tanto el fenotipo macroscópico de *dnd1* es independiente de *LRA5*, pero no así su resistencia.

En el caso de *cpr1*, la introducción de *LRA5* conlleva la reversión del fenotipo de enanismo y también la pérdida parcial de resistencia. Curiosamente el doble mutante entre *LRA5* y *lsd1* no tiene alterada la resistencia con respecto a la mostrada por el mutante *lsd1* (Figura 10B).

Pero quizá el resultado más interesante sea el doble mutante con *cpr5*. La introducción de la mutación *LRA5* es capaz de revertir el fenotipo macroscópico, sin embargo la resistencia se mantiene al nivel de *cpr5*. Este resultado parece en concordancia con el doble mutante *cpr5 pad4* (Jirage *et al.* 2001). En aquel caso el mutante *cpr5 pad4* mostró un fenotipo macroscópico intermedio entre *pad4* y *cpr5*, sin embargo *cpr5* fue la única mutación de las utilizadas en el artículo (que también incluyó *cpr1* y *dnd1*) capaz de suprimir el fenotipo de susceptibilidad de *pad4* frente a *Pseudomonas syringae*. Además, el mutante *dnd1 pad4* también mostró el fenotipo macroscópico de *dnd1* pero se comportó como *pad4* tras la inoculación con *Pseudomonas syringae*, resultado similar al obtenido en el mutante *LRA5 dnd1*.

2.1.4.2. Interacción con mutantes en la ruta de señalización del SA dependientes de los receptores TIR-NB-LRR y CC-NB-LRR

Para definir la ruta del SA se han obtenido en los últimos años mutantes que afectan a dicha resistencia. Entre ellos se seleccionaron algunos de los más importantes para la obtención de dobles y triples mutantes con *LRA5* (Materiales y Métodos 1.3). Estos mutantes cubren la resistencia a SA activada por la función de algunos genes *R*, tanto con estructura CC-NB-LRR (dependiente de *NDR1*), como con estructura TIR-NB-LRR (dependiente de *PAD4* y *SID2*, entre otros). Estos últimos tienen una estructura similar a los CC-NB-LRR excepto que en el extremo N terminal poseen un dominio (TIR) con homología a dominios de señalización intracelular Toll de *Drosophila melanogaster* y a los receptores (IL)-1 de interleucina de mamíferos (Dangl & Jones 2001). También se seleccionaron mutantes para *RAR1* y *EDM1/SGT1b* que forman un complejo (Shirasu & Schulze-Lefert 2003) del que es dependiente un punto convergente de ambos tipos de genes *R* y que está implicado también en la inducción de HR (Holt *et al.* 2005).

El doble mutante *LRA5 ndr1* muestra un fenotipo de susceptibilidad a *Pto* similar al mostrado por el mutante *LRA5* (Figura 11A). Esto podría indicar que la mutación *LRA5* actúa de manera epistática sobre *NDR1* para el fenotipo observado.

Siguiendo la misma lógica se realizaron dobles mutantes con mutantes para los genes *RAR1* y *SGT1b*, que también son necesarios para señalización de respuestas activadas tanto por genes *R* del tipo CC-NB-LRR como por los del tipo TIR-NB-LRR.

Los resultados muestran que, para infecciones con *Pto*, los mutantes *LRA5 rar1* y *LRA5 sgt1b* son igual de susceptibles que el parental *LRA5* (Figura 11C) lo que de nuevo indica que la mutación *LRA5* actúa de manera epistática a ambos genes para el fenotipo observado. *NDR1* y *RAR1* contribuyen de manera cuantitativa a la resistencia en *Arabidopsis* y esta resistencia es dependiente del gen *R* estudiado (Tornero *et al.* 2002b).

Además *RAR1* y *SGT1b* interaccionan *in vivo* (Azevedo *et al.* 2002). Por ello se realizó el cuádruple mutante *LRA5 rar1 ndr1 sgt1b* y se cuantificó la

susceptibilidad frente a *Pto* (Figura 11). El cuádruple mutante resultó igual de susceptible que los dobles mutantes analizados por separado (Figura 11A-C). El cuádruple mutante *LRA5 rar1 ndr1 sgt1b* es más susceptible que el triple mutante *rar1 ndr1 sgt1b* (Figura 11B) y por tanto parece indicar que *LRA5* actúa de manera epistática a todos ellos para el fenotipo observado.

Dado el método de análisis utilizado para estudiar la interacción entre *LRA5* y los mutantes *ndr1*, *sgt1b* y *rar1* no es posible descartar que pudiera existir cierto efecto sinérgico entre ellos que quedara enmascarado por la alta susceptibilidad del mutante *LRA5* a *Pto*.

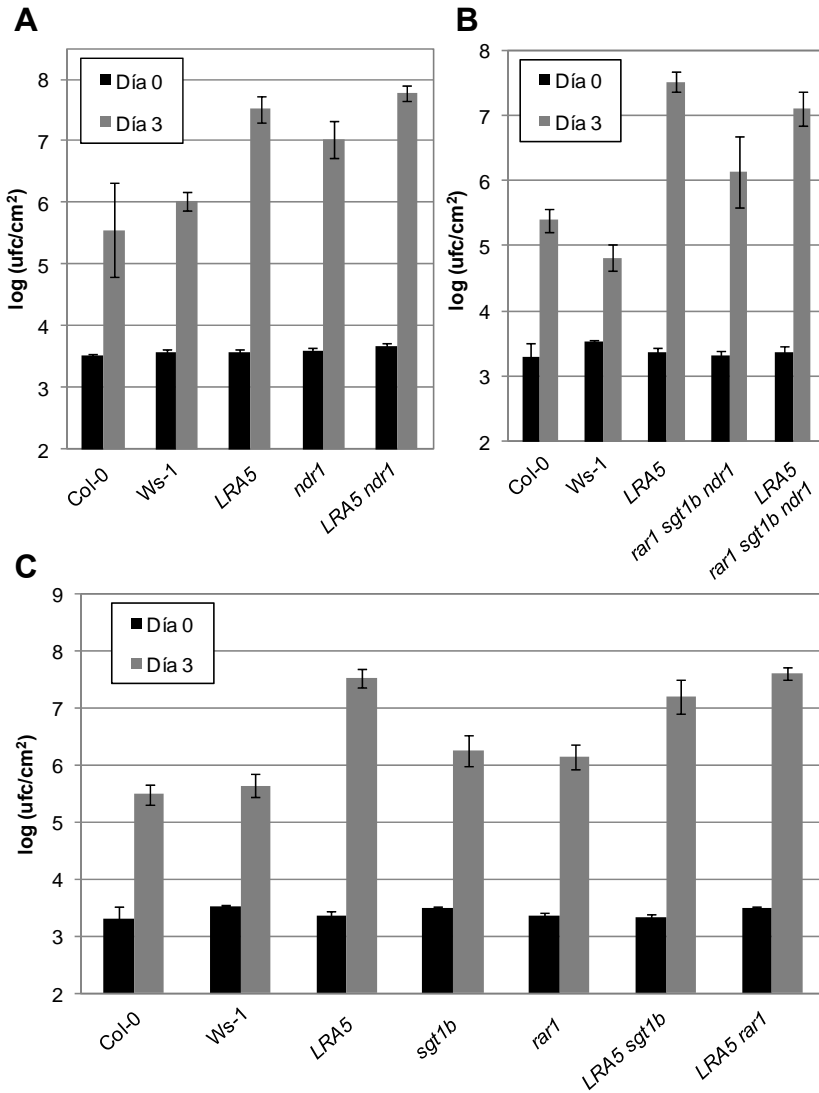


Figura 11. Análisis de la interacción de *LRA5* y mutantes en la ruta del SA determinada por los receptores CC-NB-LRR frente a la resistencia a *Pto*.

Las curvas de crecimiento muestran el comportamiento de plantas de 4 semanas inoculadas con *Pto* mediante aerosol de solución conteniendo $5 \cdot 10^7$ ufc/mL.

A. Interacción entre *LRA5* y *ndr1*. Se inocularon los controles Col-0, Ws-1, *LRA5*, *ndr1* y el doble *LRA5 ndr1*.

B. Interacción entre *LRA5* y el triple mutante *ndr1 sgt1b rar1*. Se inocularon los controles Col-0, *Ws-1*, *LRA5*, el triple mutante *ndr1 sgt1b rar1* y el cuádruple mutante *LRA5 ndr1 sgt1b rar1*.

Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares. **C.** Interacción entre *LRA5*, *sgt1b* y *rar1*. Se inocularon los controles Col-0, *Ws-1*, *LRA5*, *sgt1b* y *rar1* y los dobles mutantes *LRA5 sgt1b* y *LRA5 rar1*.

PAD4 es una proteína con homología a lipasas cuya función es importante en la señalización del SA (Jirage *et al.* 1999). Es, además, necesaria para la mayoría de la resistencia mediada por los genes *R* del tipo TIR-NB-LRR (Eitas *et al.* 2008). *RAR1* y *SGT1b* también son responsables de parte de la resistencia mediada por este tipo de genes *R*, y *LRA5* parece actuar aguas arriba a estos genes (este trabajo; Figura 11). Para comprobar hasta que punto es independiente tanto de la ruta mediada por los genes *R* CC-NB-LRR como de los genes *R* del tipo TIR-NB-LRR se realizó el triple mutante *LRA5 ndr1 pad4* y se cuantificó la susceptibilidad a *Pto*.

La susceptibilidad de *LRA5* es mayor que la obtenida para *ndr1* y *pad4* (Figura 12A). Sin embargo, el triple mutante *LRA5 ndr1 pad4* es mucho más susceptible cada uno de las tres por separado, incluido el *LRA5*. Por tanto, este resultado indicaría que las tres mutaciones están implicadas en rutas distintas de defensa y que la disrupción de las tres por medio de estos mutantes anula de manera importante el sistema de defensa de *Arabidopsis* frente a *Pto*. *NPR1* juega un papel central en la resistencia mediada por SA en *Arabidopsis* (Dong 2004). Modula la producción de SA mediada por ICS1, regular la tolerancia al mismo y participa en la regulación negativa de la ruta promovida por el JA (Zhang *et al.*). Por todo ello se realizó el doble mutante *LRA5 npr1* y se comprobó mediante curvas de crecimiento si ambas mutaciones tienen algún tipo de efecto aditivo o por el contrario participan de funciones redundantes. El doble mutante *LRA5 npr1* muestra un ligero efecto aditivo (Figura 12B), que se evidencia en un mayor crecimiento de la bacteria del doble mutante con respecto al crecimiento de ambas por separado. Por tanto parece que ambas mutaciones afecten a rutas distintas aunque ambas implicadas en la señalización relacionada con el SA.

Para finalizar el estudio de la relación entre *LRA5* y la ruta del SA se realizó el cruce entre *LRA5* y *sid2* (*SALICYLIC-ACID-INDUCTION DEFICIENT2*; *ICS1*), que como se comentó en la introducción es otro mutante susceptible a patógenos biotrofos (Wildermuth *et al.* 2001).

La adición de SA complementa el fenotipo de *sid2*, confirmando que la mutación afecta la síntesis de SA (Shah 2003). *LRA5* contiene menos SA que los controles Col-0 y Ws-1 (resultado mostrado en Apartado 3 del presente Capítulo) pero a diferencia de *sid2*, la adición de SA no complementa el fenotipo de susceptibilidad (ver Apartado siguiente). El resultado de las curvas de crecimiento (Figura 12C) permite observar un efecto epistático entre las mutaciones *LRA5* y *sid2*. Por tanto, *LRA5* podría afectar a otra ruta de producción de SA, o a algún mecanismo de control de la producción de dicha hormona.

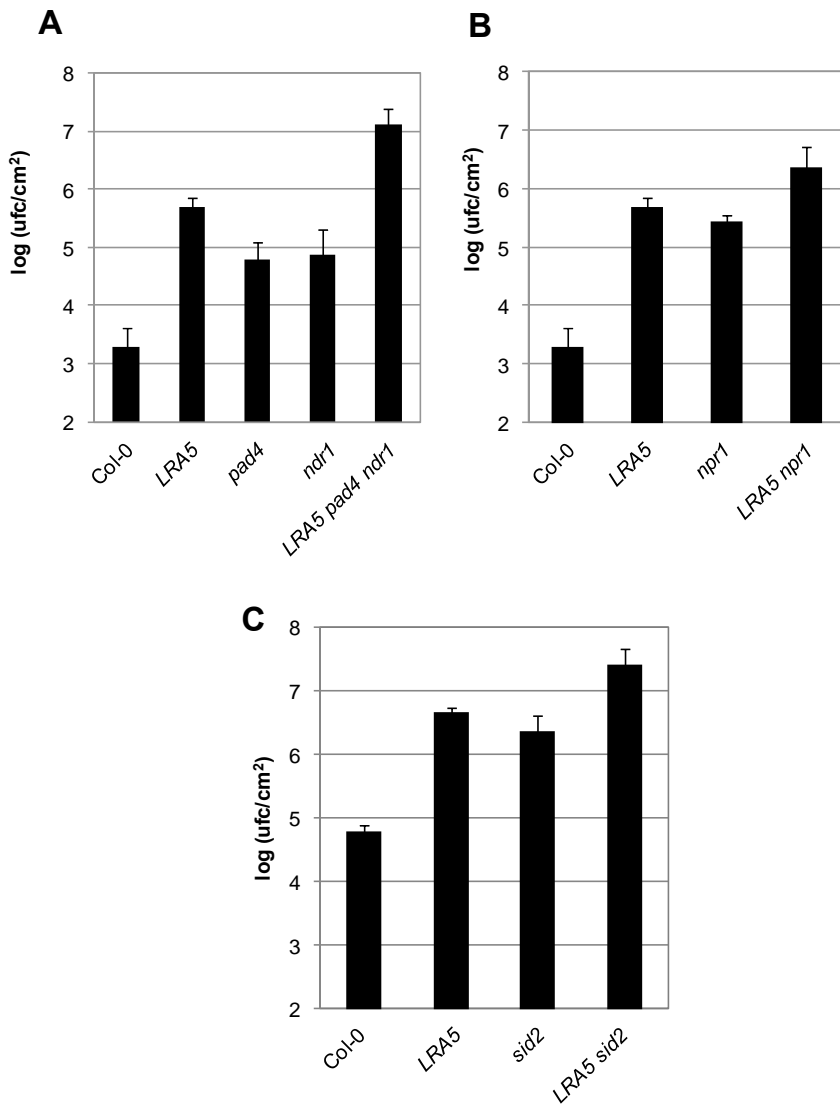


Figura 12. Interacción entre *LRA5* y otros mutantes dependientes de la ruta del SA.

Se inocularon plantas de 4 semanas mediante aerosol con solución de *Pto* a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL y los resultados se analizaron a los 3 días.

A. Interacción entre *LRA5* y el doble mutante *ndr1 pad4*. Para ello se inocularon los controles Col-0, *LRA5*, *ndr1* y *pad4* y el triple mutante *LRA5 ndr1 pad4*.

B. Interacción entre *LRA5* y *npr1*. Para ello se inocularon los controles Col-0, *LRA5* y *npr1* y el doble mutante *LRA5 npr1*.

C. Interacción entre *LRA5* y el mutante en la síntesis de SA *sid2*. Para ello se inocularon los controles Col-0, *LRA5*, *sid2* y el doble mutante *LRA5 sid2*.

Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

2.2. Incapacidad para desarrollar el mecanismo de SAR

Una vez conocida la relación entre el posible defecto en la ruta del SA y la susceptibilidad de *LRA5* se decidió comprobar si el mutante *LRA5* era o no capaz de mostrar la respuesta SAR (acrónimo inglés para Resistencia Sistémica Adquirida). SAR es una respuesta defensiva que confiere resistencia a gran variedad de patógenos normalmente virulentos para ciertas partes de la planta que permanecen no infectadas (Cao *et al.* 1997). Existen ciertos compuestos químicos cuya aplicación exógena es también capaz de inducir SAR. Entre ellos están el propio SA (Uknes *et al.* 1992), el benzotiadiazol o BTH (Lawton *et al.* 1996) que es un análogo químico del ácido salicílico, y el compuesto fungicida Fosetil-Al (Molina *et al.* 1998). La aplicación de estos compuestos sobre *LRA5* produce un abanico de respuestas (Figura 13). La aplicación de SA no produce un efecto claro de resistencia, aunque el nivel de crecimiento de la bacteria con respecto a la aplicación de la solución control es menor. Sucede lo mismo con la aplicación del fungicida Fosetil-Al. La aplicación de dichos compuestos sobre el control Col-0 si que produce un efecto de resistencia, muy leve en el caso del Fosetil-Al, y más concluyente tras la aplicación de SA. Sin embargo la aplicación de BTH si que es efectiva en el desencadenamiento de la respuesta SAR en ambos genotipos. Como se comentó con anterioridad, el BTH es un análogo químico del SA (Lawton *et al.* 1996) que la planta no es capaz de degradar. Por tanto, este resultado indica que *LRA5* posee la ruta de señalización por SA intacta aguas abajo del mismo y que por alguna razón no es capaz de activarlas en presencia del SA, ya sea por un problema en la percepción o un problema en la acumulación del mismo.

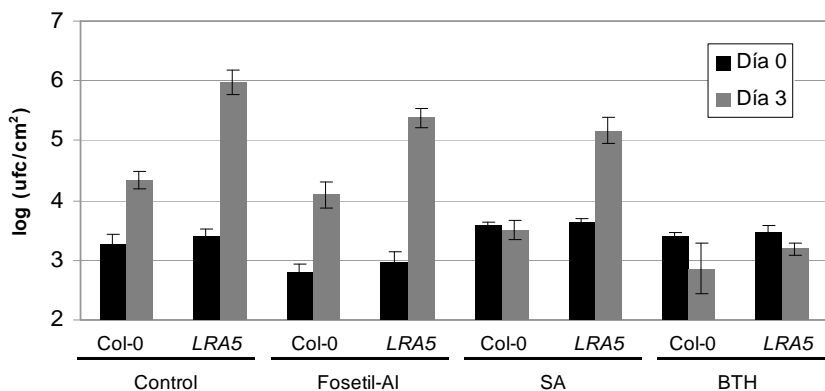


Figura 13. Respuesta del mutante *LRA5* frente a compuestos que activan el mecanismo de SAR.

Plántulas de Col-0 y *LRA5* fueron tratadas con agua (control) o con uno de los compuestos: Fosetil-Al (5 g/L, a los 14 días de edad), SA (500 μ M, a los 17 días de edad) o BTH (350 μ M, a los 17 días de edad). Todas las curvas de crecimiento se realizaron inoculando mediante inmersión con una solución de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL de *Pto* a los 18 días de edad. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

2.3. Comportamiento frente a patógenos no biotrofos

2.3.1. Comportamiento frente al hemibiotrofo *P. infestans*

Los oomicetos son una rama de microorganismos eucariotas entre los que se encuentran algunos patógenos de plantas. Uno de los patógenos más conocidos dentro de los oomicetos es el hemibiotrofo *Phytophthora infestans* (Fitóftora).

Fitóftora produce zoosporas que son capaces de desplazarse y alcanzar la superficie de la hoja o de la raíz, donde germinan e intentan penetrar en el tejido vegetal (Kamoun *et al.* 1999). Generalmente la penetración dentro del tejido suele realizarse con la ayuda de apresorios o estructuras similares que son capaces de adherirse a la superficie vegetal, aunque en el caso de la raíz es posible que el oomiceto penetre sin necesidad de formar estas estructuras (Hardham 2001).

Análisis de microarrays indican que además de la señalización por SA, la ruta de JA/ET es también importante para la resistencia frente a Fitóftora (Thorsten & Volker 2005).

Arabidopsis es capaz de reconocer *P. infestans* y puede formar una importante barrera defensiva (Huitema *et al.* 2003). Aún así existe, al menos, un mutante de *Arabidopsis* denominado *pen2* (*PENETRATION 2*) en el que Fitóftora es capaz de iniciar crecimiento invasivo de manera efectiva y con una alta frecuencia (Lipka *et al.* 2005). El mutante *pen2* se rescató de un rastreo de mutantes que permitieran, con una alta frecuencia, la penetración del patógeno inespecífico de *Arabidopsis* *Blumeria graminis f. sp. hordei* (*Bgh*) (Lipka *et al.* 2005). La proteína PEN2 es una glicosil hidrolasa que se localiza en los peroxisomas y forma parte del mecanismo de defensa inducible y preinvasivo (Lipka *et al.* 2005).

Para estudiar si el mutante *LRA5* permitía el desarrollo de los estadios iniciales de la infección con Fitóftora, se inocularon mediante gota depositada sobre la hoja de plantas de entre 4 y 5 semanas de edad con

distintas concentraciones de esporas y se observó el resultado a los 3 d.p.i. (Materiales y Métodos 6.2.1.2.) Ninguna de las concentraciones de esporas aplicadas resultó en una mayor incidencia de intentos de penetración sobre el mutante *LRA5*, ni tan siquiera se observó una HR apreciable (Figura 14), por lo que *LRA5* es un mutante no alterado en la resistencia a Fitóftora.

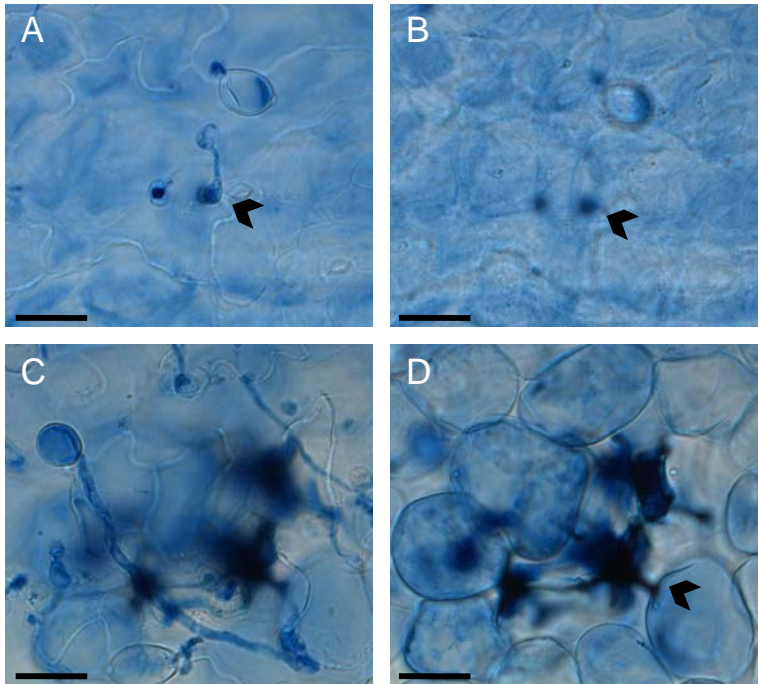


Figura 14. Comportamiento del mutante *LRA5* frente al hongo hemibiotrofo *Phytophthora infestans*.

Inoculación con *P. Infestans* realizada mediante gota depositada en la superficie de hojas del mutante *LRA5* con una concentración de 10^5 esporas/mL. Muestra tomada a los 3 días.

A. Tinción mediante azul de tripano mostrando la formación del apresorio del hongo *P. infestans* en un intento por penetrar el tejido vegetal.

B. Continuación de la foto anterior en una capa inferior, mostrando la ineficacia del hongo a la hora de colonizar el parénquima.

C. Tinción mediante azul de tripano mostrando una HR (zona teñida de azul intenso) que el hongo está intentado utilizar para colonizar capas inferiores del tejido de la hoja.

D. Imagen continuación de la anterior que muestra (ver flecha) la reacción de una célula (ver zona de azul intenso alrededor del perímetro celular) al intento de penetración del hongo.

2.3.2. Comportamiento frente al hongo necrotrofo *P. cucumerina*

Para comprobar el fenotipo del mutante *LRA5* frente a patógenos necrotrofos se realizaron inoculaciones con el hongo necrotrofo *Plectosphaerella cucumerina*. La resistencia a patógenos necrotrofos implica un mecanismo de defensa que no suele participar de muerte celular programada (Glazebrook 2005). Este último punto es de gran importancia si tenemos en cuenta que *P. cucumerina* progresa rápidamente sobre tejido muerto. Sin embargo, si que suele conllevar la participación de la pared celular (Glazebrook 2005). Además, en el caso de la resistencia frente a *Plectosphaerella cucumerina* también se ha demostrado la importancia de la ruta de las auxinas (Llorente *et al.* 2008; Berrocal-Lobo *et al.* 2002).

En la Figura 15A se muestra el gráfico del diámetro de las lesiones producidas por *P. cucumerina* en el mutante *LRA5* y en los controles silvestres. Se observó en repetidas experiencias que el diámetro de la lesión producida por el hongo en el mutante *LRA5* era el mismo que en las plantas silvestres. Además las características de la necrosis provocada por el hongo en el mutante *LRA5* son idénticas a las de los controles silvestres (Figura 15B y C).

En otros mutantes para la ruta del SA como *sid2-1* y *NahG* y en la que también parece implicado *LRA5*, se ha descrito una mayor susceptibilidad a *P. cucumerina*, aunque el método de inoculación y valoración de resultados de los experimentos es significativamente distinto (Llorente *et al.* 2008).

Estos resultados parecen indicar que el mutante *LRA5* sea un componente exclusivo de la ruta de SA, con una ruta de JA/ET aparentemente intacta.

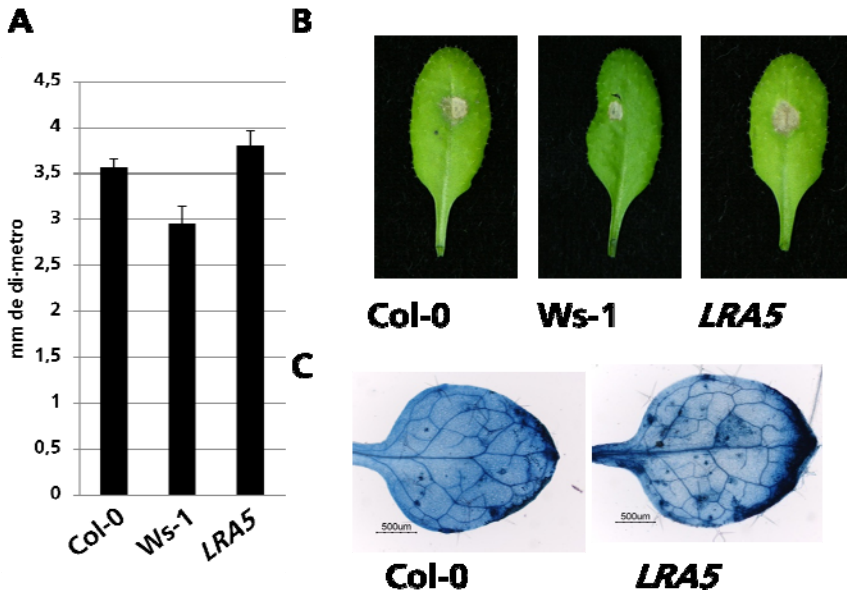


Figura 15. Medida de las lesiones producidas por el hongo necrotrofo *P. cucumerina* en el mutante *LRA5*.

A. Medida de las lesiones producidas por el hongo *P. cucumerina* en el mutante *LRA5* y en los controles silvestres Col-0 y Ws-1. Plantas de 4 semanas fueron inoculadas mediante deposición de gota sobre la superficie de la hoja conteniendo una suspensión de $5 \cdot 10^6$ esporas/mL. El diámetro fue medido 7 días después. Un mínimo de 40 hojas fue contado para realizar la media. Las barras de error representan el error estándar de la media.

B. Imágenes representativas del diámetro de la lesión en hojas del mutante *LRA5* y de los controles silvestres Col-0 y Ws-1 tomada 15 d.p.i.

C. Tinción con azul de tripano de hojas de plántulas de 18 días de edad inoculadas mediante aerosol con una solución de 10^6 esporas/mL. Las fotos fueron tomadas 5 días después de la inoculación.

3. Niveles de SA del mutante *LRA5*

Una vez que todos los resultados de los distintos experimentos pusieron de manifiesto el problema del mutante *LRA5* relacionado con el SA se decidió realizar una extracción y comprobar los niveles de SA total y conjugado en el mutante *LRA5*.

Para la cuantificación del ácido salicílico en el mutante *LRA5* se realizaron extracciones del mismo a partir de material obtenido de plantas no inoculadas. El ácido salicílico es un compuesto fenólico que se encuentra en la mayoría de las plantas. Por lo general, el SA puede conjugarse con distintos radicales, siendo el conjugado más abundante el 2-O-β-d-glucosido (SAG, en inglés) (Enyedi *et al.* 1992); (Lee & Raskin 1998). Para poder cuantificar los niveles de SA total, se realizó una extracción que incluyó un paso de hidrólisis, lo que permitió liberarlo del radical conjugado.

El mutante *LRA5* contiene niveles de SA libre y total significativamente menores a los de los controles silvestres (Figura 16A y B). Además, también se analizaron los niveles de SA de la F1 entre *LRA5* y Col-0 con el fin de determinar si los bajos niveles observados en el mutante *LRA5* tuvieran carácter dominante y por tanto pudiera ser parte del fenotipo de *LRA5*. El análisis de dicha F1 muestra niveles de ácido salicílico similares al del parental *LRA5*, por tanto se puede afirmar que efectivamente es un defecto dominante igual que el fenotipo de susceptibilidad mostrado por *LRA5* frente a *Pseudomonas*. No es extraño que plantas con defectos en el nivel de SA (ya sea en la producción o en la acumulación del mismo) presenten fenotipos de susceptibilidad a patógenos biotrófos, como es el caso del mutante *sid2* y de *NahG*, una planta transgénica con un gen bacteriano que degrada el ácido salicílico y por tanto es incapaz de acumular niveles silvestres de la hormona.

La diferencia observada en los controles, donde los niveles de SA libre son iguales o mayores que los niveles de SA total se debe a que, pese a realizar las dos repeticiones del experimento con muestras obtenidas en las mismas condiciones biológicas (pero en siembras distintas), los datos obtenidos para el SA libre no fueron totalmente consistentes, aunque en ninguna de las repeticiones se observó nivel detectable de SA libre en *LRA5* o su F1. Por el contrario, los niveles de SA total fueron perfectamente

reproducibles en todos los casos. Esta diferencia podría explicar que el nivel de SA total en Col-0 sea inferior al nivel de SA libre.

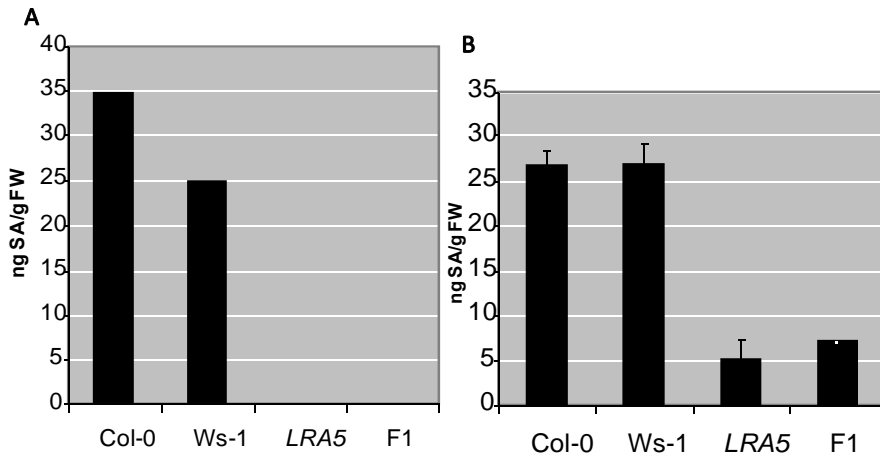


Figura 16. Niveles de SA libre y total en el mutante *LRA5*.

A. Niveles de SA libre en plantas no inoculadas del mutante *LRA5*, de su F1 con Col-0 y de los controles silvestres Col-0 y Ws-1.

B. Niveles de SA total en plantas no inoculadas del mutante *LRA5*, de su F1 con Col-0 y de los controles silvestres Col-0 y Ws-1.

4. Mapeo posicional del mutante *LRA5*

Para descubrir la naturaleza molecular de la mutación en *LRA5* que provoca la susceptibilidad se decidió clonarlo por mapeo posicional. Para ello se cruzó el mutante *LRA5* en fondo Col-0 (Tornero *et al.* 2002a) con otro ecotipo, *Laer-0* y se obtuvo una población F2 segregante para susceptibilidad 3:1 (mutante:silvestre) (Tabla 1). La razón del cruce con otro ecotipo (*Laer-0*) es la generación de polimorfismos que son necesarios para poder determinar la posición relativa de la mutación

A continuación se determinó mediante análisis de ligamiento en que cromosoma y en que brazo se encontraba la mutación causante del fenotipo del *LRA5* (Konieczny & Ausubel 1993). Para ello, se analizaron 45 plantas para 26 marcadores moleculares SSLPs (“Single Sequence Length Polymorphism”) repartidos de manera que los 10 brazos de los cromosomas de *Arabidopsis* tuvieron al menos 3 marcadores (apartado 7.2 de Materiales y Métodos).

Así pudo determinarse que el locus de la mutación cosegregaba con el marcador BIO2 del cromosoma II. El análisis posterior de dicha zona del cromosoma II ubicó *LRA5* en un intervalo de 4,8 Mb entre los marcadores nga361 y BIO2 (Figura 13A).

Durante este proceso se detectó que existían fragmentos de secuencia dentro del intervalo de mapeo para el que los marcadores moleculares (diseñados a partir de polimorfismos entre las secuencias de los ecotipos Col-0 y Laer-0) mostraban ser Laer-0 para todos los 45 recombinantes estudiados.

Este resultado indicaba por tanto que el fondo genético original en el que se encuentra encuadrado el mutante *LRA5* no era homogéneo y probablemente pudiera ser el resultado de una contaminación con el ecotipo Laer-0. Para determinar de manera fehaciente el ecotipo causante de la contaminación, se comprobaron los alelos de 3 marcadores moleculares en una colección de 97 ecotipos, incluyendo 46 que maximizan la diversidad genética en *Arabidopsis* (McKhann *et al.* 2004). Estos marcadores moleculares fueron elegidos por estar presentes en *LRA5* pero no en Col-0 ni en Laer-0.

El resultado mostró que con una alta probabilidad el ecotipo contaminante era Ws-1 (datos no mostrados). Un estudio posterior del genotipo de *LRA5* indica que existen otras pequeñas islas Ws-1 en 3 de los cinco cromosomas, siendo la de mayor longitud (3,4 Mb) la que contiene la lesión de *LRA5* (datos no mostrados). Por tanto para seguir el mapeo fino de *LRA5* era necesario usar marcadores moleculares entre Ws-1 (*LRA5*) y Col-0 o Laer-0.

Se decidió mapear tanto por la presencia como la ausencia de susceptibilidad y se comprobó que efectivamente ambas posiciones de

mapeo eran coincidentes, lo que confirió gran robustez a la posición de mapeo.

Se comenzó un mapeo genético fino por cartografía de alta resolución para acotar el intervalo de mapeo a un número de genes razonable para su posterior secuenciación. Tras analizar 12,264 productos de meiosis se redujo el intervalo de mapeo a 11,5 Kb (Figura 17C), un intervalo que contiene tres genes según The Arabidopsis Information Resource (Swarbreck *et al.* 2008) (Tabla 4).

Gen		Función de la proteína	Referencia
At2g46970	<i>PIL1</i>	Interacciona con TOC1 y el factor de transcripción PIF3	(Makino <i>et al.</i> 2002)
At2g46980	<i>UNKNOWN</i>	Función desconocida	
At2g46990	<i>IAA20</i>	Implicada en la señalización por auxinas	(Dreher <i>et al.</i> 2006)

Tabla 4. Genes comprendidos en el intervalo de mapeo.

Datos obtenidos de The Arabidopsis Information Resource (Swarbreck *et al.* 2008).

Para facilitar la tarea de encontrar la mutación causante del fenotipo de *LRA5*, también se utilizaron como herramienta 3 supresores intragénicos. Aunque en el próximo capítulo de la presente tesis se explicará más en profundidad la parte referente a los supresores de *LRA5*, es necesario comentar que los supresores son mutaciones adicionales, obtenidas en el fondo *LRA5* (producidas por el agente mutagénico sulfonato de etilmetano (EMS)), que son capaces de revertir el fenotipo de susceptibilidad del mutante. Los supresores intragénicos son aquellos en los que la lesión revertiente del fenotipo de susceptibilidad se debe encontrar dentro del gen que causa dicha susceptibilidad. Estos supresores son de utilidad en el mapeo pues, si la presunta mutación causante del fenotipo de susceptibilidad debe de estar dentro de *LRA5* (pero al secuenciar no se encuentra lesión alguna, como en este caso), sería suficiente con secuenciar dichos supresores para el intervalo de mapeo y buscar a que gen o genes afectan dichas lesiones. Para este cometido se seleccionaron los supresores intragénicos *Ira5-10*, *Ira5-25* y *Ira5-26*. La secuenciación del intervalo de mapeo en estos supresores indicó que no existía lesión alguna que pudiera provocar el fenotipo de susceptibilidad a excepción de una

mutación puntual encuadrada dentro del gen At2g46980 en el supresor *Ira5-10*. Aunque hubo dificultades para poder secuenciar un fragmento (denominado A04 y representado en verde en la Figura 17C) en los genotipos *LRA5* y *Ira5-10*, si que fue posible secuenciarlo en el *Ira5-25* y *Ira5-26* (Figura 17D) donde no se encontró ninguna lesión, ni tan siquiera dentro del gen At2g46980. La mutación encontrada en At2g46980 para el supresor *Ira5-10* podría ser entonces una mutación aleatoria. Según la tasa de mutagenesis pueden haber muchas mutaciones en una planta M2, típicamente unas 700 (Till *et al.* 2003). Por lo tanto se puede esperar una mutación cada 171 kb aprox., con lo cual, al secuenciar un fragmento de 11.5 kb en tres alelos, la probabilidad de encontrar una mutación por azar es bastante alta ($p = \sim 0.19$).

Ante la falta aparente de lesiones en la secuencia de ADN de los alelos de *LRA5*, se planteó que el fenotipo de susceptibilidad pudiera estar causado por una alteración en el patrón epigenético de la secuencia.

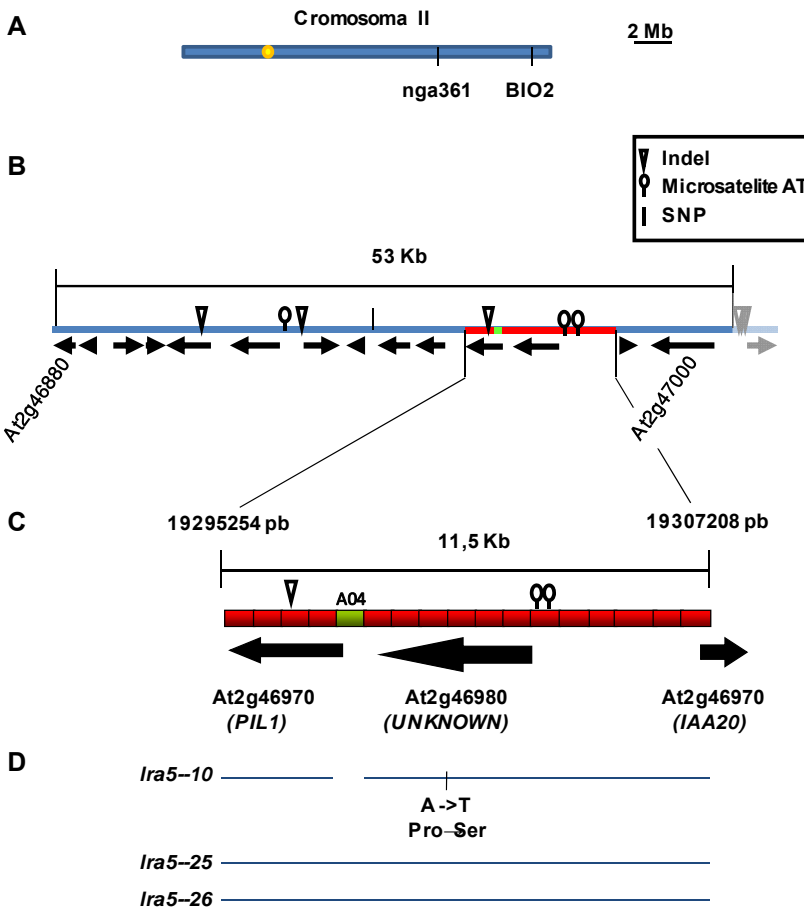


Figura 17. Posición en mapa de la mutación *LRA5*.

A. *LRA5* se localiza entre los marcadores nga361 y BIO2 cubriendo una distancia entre sí de 4,8 Mb.

B. En un primer mapeo de alta resolución el intervalo de mapeo se redujo a 53 kb conteniendo 14 genes, representados por flechas negras y flanqueados por los genes At2g46880 y At2g47000. La secuenciación de prácticamente todo el intervalo en *Ira5-25* y *Ira5-26* no permitió localizar la mutación. Los polimorfismos encontrados entre Col-0 y Ws-1 están indicados.

C. Reducción del intervalo de mapeo a tres genes tras un segundo mapeo de alta resolución. Los rectángulos indican los fragmentos en que se dividió el intervalo de mapeo para su secuenciación. Los rojos indican los que pudieron ser secuenciados en todos los alelos. El verde (denominado A04) sólo pudo ser secuenciado en los supresores *Ira5-25* y *Ira5-26* pero no en *LRA5* ni en *Ira5-10*.

D. Secuenciación de tres supresores intragénicos obtenidos por EMS dentro del intervalo de mapeo. En *lra5-10* esta indicada una mutación puntual encontrada, así como una zona que no fue posible amplificar (coincidente con el fragmento verde).

5. Posible carácter epigenético de la mutación *LRA5*

Muchas mutaciones epigenéticas muestran una naturaleza metaestable. Esto significa que la metilación de ADN muestra una estabilidad parcial, que puede estar causada por gran variedad de factores (Kaminsky *et al.* 2009). Por ejemplo, así como la síntesis de ADN es especialmente precisa (introduciendo un error por cada 10^7 o 10^8 bases copiadas), la metilación de ADN tiene una precisión del 96%, cometiendo un error por aproximadamente cada 25 posiciones metiladas copiadas (Bird 2007). Se consideró de interés estudiar la estabilidad del fenotipo de susceptibilidad de *LRA5* y para ello fueron analizados aproximadamente 3000 individuos de la F1 entre Col-0 y *LRA5*. Se obtuvo de esta manera un revertiente natural del fenotipo de susceptibilidad a *Pto* denominado *lra5-rev1*, lo que encajaría con el presunto carácter epigenético de *LRA5*.

El revertiente natural era heterocigoto para *LRA5* y una vez que se obtuvo la correspondiente línea homocigota, el fenotipo de resistencia a *Pto* se mantuvo también en las progenies F2 y F3 (datos no mostrados). Dado el posible carácter epigenético de *LRA5* y de su revertiente, se consideró de interés introducir este último en los experimentos relacionados con la metilación del mutante.

5.1. Medida de los niveles transcripcionales de los genes dentro del intervalo de mapeo

Existe una diferencia biológica dominante en *LRA5* con respecto a los parentales silvestres. Cabe esperar por tanto que esta diferencia pueda ser extrapolada a una diferencia en la transcripción en uno de los tres genes que se encuentran en el intervalo de mapeo, lo cual conduciría a la identificación del gen responsable del fenotipo del *LRA5*. Dado que nuestra hipótesis de trabajo era que *LRA5* fuese una mutación epigenética dominante por ganancia de función (no debida a haploinsuficiencia) deberíamos esperar que el nivel de transcripción de uno de los genes del intervalo fuera mayor que el de los parentales silvestres. Para ello se realizó una qRT-PCR de ADNc obtenido a partir de material de plantas no inoculadas (Figura 18A). En material no inoculado existe una diferencia biológica entre los controles silvestres y el mutante, concretamente en los niveles de SA (Figura 16), cuyo fenotipo tiene carácter dominante y esto por tanto valida la aproximación mediante qRT-PCR en tejido no inoculado con *Pto*.

Los niveles de transcritos para los genes *UNKNOWN* y *IAA20* son similares a los obtenidos en los parentales. Sin embargo, los niveles de *PIL1* si que están alterados con respecto a los de los parentales Col-0 y Ws-1. Se observa aproximadamente 10 veces menos transcrito de *PIL1* en *LRA5* que en los parentales. Este resultado es el opuesto al resultado esperado para una mutación de carácter epigenética dominante, donde el nivel de transcrito debería ser mayor en el gen afectado por la mutación. Además, la F1 entre *LRA5* y Col-0 muestra un nivel de transcrito intermedio, por tanto el bajo nivel de expresión de *PIL1* no tiene carácter dominante negativo.

Por tanto, ninguno de los niveles de expresión obtenidos en estos experimentos encaja a lo que debería esperarse de una mutación epigenética dominante por ganancia de función de un gen.

Como ya se describió en el mapeo, se obtuvieron tres alelos de la mutación *LRA5* que corresponden a tres supresores intragénicos, obtenidos por mutagénesis con EMS de semillas de *LRA5* (estos supresores serán analizados y caracterizados con mayor detalle en el capítulo II). Estos tres

supresores fueron también utilizados como herramientas para poder dilucidar la implicación de los tres genes que contiene el intervalo de mapeo con los fenotipos dominantes de susceptibilidad y bajo nivel de ácido salicílico de la mutación que afecta a *LRA5*.

Dado que estos tres alelos son supresores intragénicos de *LRA5*, entonces cabe esperar que se produzca una reversión en el contenido de ácido salicílico de los mismos, esto es, los niveles de SA deberían ser, en cualquier caso, superiores a los determinados para *LRA5*.

Como se mostrará en el capítulo II, se confirma que los niveles de SA para los supresores intragénicos son notablemente superiores al del mutante *LRA5*, especialmente en el caso del supresor *lra5-25* en el cual se recuperan los valores silvestres, siendo intermedio el nivel de SA para los otros dos supresores *lra5-10* y *lra5-26*.

Pese a que los niveles de transcrito de los tres genes dentro del intervalo no se corresponden con el modelo dominante propuesto, si que se observó un nivel de expresión de *PIL1* diferente en *LRA5* con respecto a los parentales. Por tanto, una vez demostrado que los supresores intragénicos poseen niveles de SA superiores a los del mutante *LRA5*, se quiso comprobar que la cantidad de transcrito del gen *PIL1* pudiera aumentar en los supresores intragénicos con respecto a *LRA5* de manera proporcional a como lo hace el nivel de SA. Sin embargo, los niveles de expresión obtenidos para los supresores intragénicos fueron bajos (Figura 18B), incluso inferiores a los del mutante *LRA5* y por tanto no proporcionales a los niveles de SA observados.

Los niveles de expresión de los genes *UNKNOWN* y *IAA20* no mostraron estar significativamente alterados con respecto a aquellos de *LRA5* o los parentales Col-0 y Ws-1.

Como conclusión, ninguno de los genes del intervalo mostró un patrón de expresión coherente con el patrón diferencial observado entre los supresores intragénicos y el mutante *LRA5* para los niveles de SA.

Aunque *PIL1* era el principal candidato, ya se vio que su expresión no se ajustaba a los de una mutación dominante para los genotipos estudiados. Además los T-ADN (líneas SALK 025372, SALK 025598, SALK 043937c y SAIL 438c01) no son susceptibles a *Pto*, así como tampoco lo son las líneas de sobreexpresión de *PIL1* (Salter *et al.* 2003) (datos no mostrados). Sin

embargo la F1 entre *LRA5* y Col-0 *OXC₁PIL1* es susceptible (datos no mostrados) por lo que la sobreexpresión o la eliminación de *PIL1* no tiene ningún efecto en la susceptibilidad a *Pto*.

En el caso del gen *UNKNOWN* se descubrió una mutación puntual en el supresor *Ira5-10* lo que lo convierte en un buen candidato, aunque los T-ADNs de este gen no son letales y tampoco susceptibles a *Pto* (datos no mostrados). No se obtuvieron cambios significativos en los niveles de expresión para los genotipos estudiados, pero es posible que los fenotipos estudiados pudieran deberse a cambios en la expresión fuera de la sensibilidad de la qRT-PCR. También es posible que la expresión sea específica del tejido, no siendo la hoja el mejor órgano para el estudio.

Por último, *IAA20* es el menos probable de los tres. La secuencia codificante no se encuentra propiamente dentro del intervalo, pero si que pueden encontrarse dentro elementos reguladores del mismo. No se han encontrado mutaciones en ninguno de los alelos de *LRA5* y tampoco se han encontrado diferencias significativas en la expresión de dicho gen. Los T-ADNs para dicho gen y las plantas transgénicas de sobreexpresión 35S:*cIAA20* (Dreher *et al.* 2006) no muestran el fenotipo de susceptibilidad de *LRA5* (datos no mostrados).

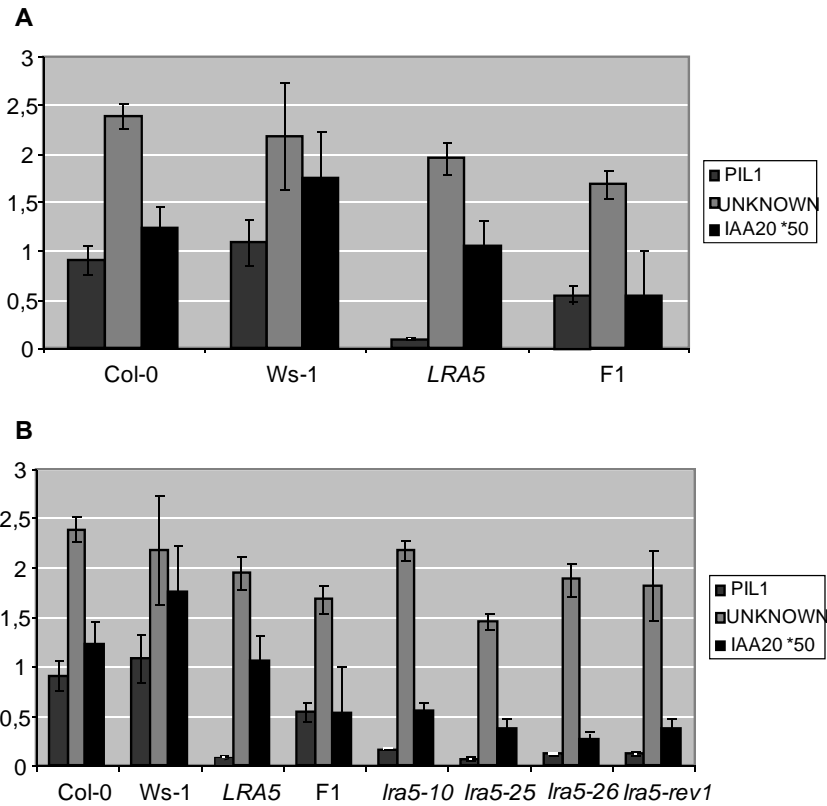


Figura 18. Expresión de los genes incluidos dentro del intervalo de mapeo del *LRA5* medidos mediante qRT-PCR.

A. Los valores en el eje de las X representan la expresión de *PIL1*, *UNKNOWN* e *IAA20* en los cuatro genotipos Col-0, Ws-1, *LRA5* y una F1 del cruce entre Col-0 y *LRA5*. Todos los valores son relativos a la expresión del gen control *APT* en cada genotipo. *IAA20* se expresó mucho menos que *PIL1* y el *UNKNOWN*, así que para poder ser representado en el mismo grafico su valor fue multiplicado por 50.

B. Los valores en el eje de las X representan la expresión de *PIL1*, *UNKNOWN* e *IAA20* en los ocho genotipos Col-0, Ws-1, *LRA5*, F₁ (Col-0 x *LRA5*), *Ira5-10*, *Ira5-25*, *Ira5-26* y *Ira5-rev1*. La gráfica se realizó de igual forma que el apartado (A).

5.2. Análisis de la metilación del intervalo de mapeo del mutante *LRA5*

La metilación del ADN en plantas tiene una doble función: la regulación de la expresión génica y el control sobre los transposones que contiene el genoma (Chan *et al.* 2005). La metilación del ADN suele implicar la adición de un grupo metilo al carbono 5 del anillo pirimidina de la citosina, siendo el contexto más habitual el dinucleótido C_pG. En el caso de las plantas, la metilación suele encontrarse en tres entornos distintos: dos simétricos (C_pG y C_pN_pG) y otro asimétrico (C_pN_pN_p), siendo N cualquier nucleótido. La metilación del ADN conlleva una modificación estructural que por lo general implica la alteración de la expresión de la secuencia afectada. Además, la actividad endonucleasa de algunas enzimas de restricción depende del estado de metilación del ADN, lo que puede ser de utilidad a la hora de diseñar herramientas capaces de comparar niveles de metilación en secuencias específicas de ADN. En el caso del mutante *LRA5*, y haciendo uso de dicha herramienta, se optó por una digestión con endonucleasas de restricción sensibles a metilación y posterior amplificación de secuencias del genoma con cebadores específicos. Si las endonucleasas de restricción son sensibles a metilación, entonces las secuencias hipermetiladas no serán digeridas, y eso se traducirá en una mayor amplificación posterior de la secuencia específica. Una vez amplificadas las muestras de todos los genotipos, las diferencias en la metilación de la secuencia podrán ser observadas como diferencias en la intensidad de banda mediante el uso de un gel teñido con bromuro de etidio.

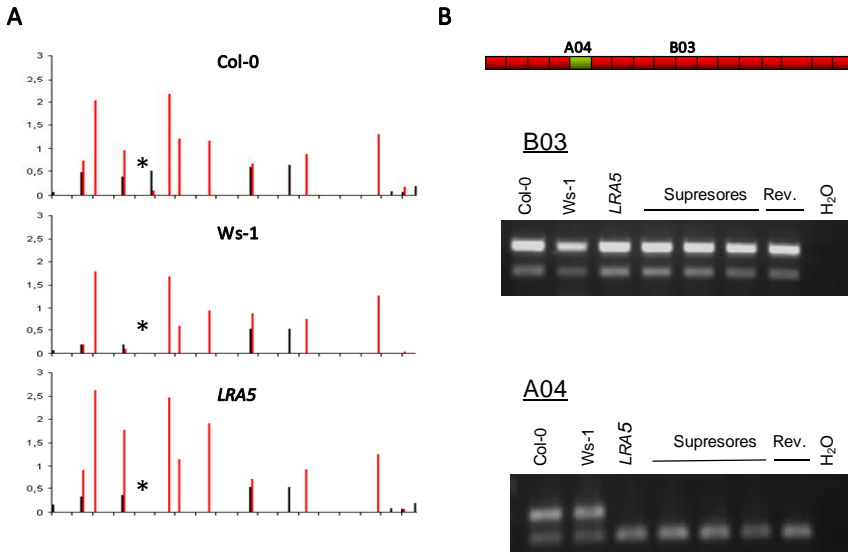
Las enzimas utilizadas para este estudio fueron *Acil*, *Avall*, *Bsal* y *Clal*. Las digestiones fueron agrupadas según la compatibilidad del tampón de digestión, comprendiendo la digestión 1 la enzima *Acil* y la digestión 2 las tres siguientes. Las secuencias amplificadas cubrieron todo el intervalo de mapeo de 11,5 Kb. Las intensidades obtenidas por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro

de etidio fueron comparadas con el resultado de someter al mismo proceso de digestión-amplificación a un gen control, el elemento transponible *AtSN1* (Xie *et al.* 2004), para cada fragmento estudiado. El resultado de las digestiones normalizadas con la obtenida para el control *AtSN1* se muestra en la Figura 19. Tal y como puede observarse, el patrón de metilación en los distintos fragmentos es muy parecido para todos los genotipos. El caso más curioso sea probablemente el del fragmento A04, que ocupa el quinto lugar en el eje de abscisas y está marcado con asterisco (*) en la Figura 19A. Este fragmento se ha podido amplificar en el control Col-0 (además para ambos grupos de enzimas de restricción) pero no en *Ws-1* ni en *LRA5*. Que la banda tampoco aparezca en *Ws-1* es difícil de encuadrar teniendo en cuenta que *Ws-1* no tiene ninguno de los fenotipos observados en *LRA5*. Existen diversas variables que pueden afectar a la intensidad de la señal. Por ejemplo, el número de sitios de restricción que un fragmento puede poseer de las distintas enzimas es un factor a tener en cuenta o la eficiencia de la amplificación por PCR puede verse afectada por factores independientes del grado de metilación de la secuencia.

Figura 19. Análisis de metilación del intervalo de mapeo de *LRA5*.

A. Análisis con enzimas de restricción sensibles a metilación del intervalo de mapeo (digestión 1 con la enzima *Acil* en negro y digestión 2 con las enzimas, *Avall*, *Bsal* y *Clal* en rojo). Intensidad relativa (con respecto al control *AtSN1*) de intensidad de la amplificación obtenida por PCR (de las dos digestiones) en gel de agarosa de 1% con bromuro de etidio. Existe un patrón diferencial para A04, marcado con asterisco.

B. Patrón diferencial obtenido tras la digestión con *McrBC* y posterior amplificación para cada subfragmento en que se dividió el intervalo de mapeo. Comparación entre los resultados obtenidos en un subfragmento cualquiera (B03) con respecto a A04, el único para el que no se obtuvo amplificación. La segunda banda del gel de agarosa muestra el control de amplificación del gen ciclofilina (300 pb aprox.).



Para completar el análisis de metilación del intervalo de mapeo se utilizó también como herramienta la enzima McrBC. Esta enzima es una endonucleasa capaz de reconocer citosinas metiladas en una o ambas cadenas de ADN (Stewart *et al.* 2000). Para realizar su función, la enzima McrBC debe reconocer dos posiciones metiladas del tipo R^mC, generalmente situadas a distancia variable (la óptima se encuentra entre 55 y 100 pb) careciendo de importancia la posición relativa de ambas. Es entonces cuando esta endonucleasa es capaz de digerir. Esta digestión tiene lugar en las proximidades de una de las hebras decantando esta elección los impedimentos físicos que encuentre en la secuencia (Stewart *et al.* 2000). El procedimiento para estudiar la metilación en el intervalo de mapeo con McrBC fue similar al utilizado para las endonucleasas de restricción sensibles a metilación. Se realizó una digestión con McrBC, pero en este caso se procedió con ADN de los genotipos de *LRA5*, de los controles Col-0 y Ws-1, de los supresores intragénicos y del revertiente natural. Posteriormente se amplificó el ADN ya digerido para cada uno de los fragmentos consecutivos y/o solapantes en que se había dividido para su secuenciación el intervalo de mapeo. Los resultados fueron concordantes con los obtenidos en el experimento realizado con las endonucleasas de restricción sensibles a metilación para

todos los fragmentos (datos no mostrados) excepto para el fragmento A04. Para este fragmento los resultados de ambos experimentos no resultaron coherentes. El producto obtenido con las endonucleasas de restricción sensibles a metilación indica que la zona está hipometilada (y por tanto hay ausencia de banda tras la digestión). Sin embargo, el resultado de la digestión con la endonucleasa McrBC señala que el mismo fragmento se encuentra hipermetilado y por ello también hay ausencia de banda tras la digestión. Este resultado es de difícil comprensión y justificación. Que ambos resultados se basen en la ausencia de banda tal vez implique una explicación más sencilla que incluya un problema de amplificación de dicho fragmento, más que un cambio en la metilación de la secuencia.

6. Técnicas empleadas en la secuenciación del fragmento A04 incluido en el intervalo de mapeo

Para comprobar un posible problema en la amplificación de la secuencia incluida en el fragmento A04, se decidió recopilar todos los datos obtenidos de la secuenciación de los genotipos estudiados. Al confrontar estos datos se confirmó que el fragmento A04 era uno de los pocos que no habían podido ser amplificados.

Esta situación nos llevó a plantearnos las causas probables de esta no amplificación. Estas suelen ser: un alto contenido en GC (sobre 65%), poseer repeticiones de dinucleótidos o más nucleótidos, repeticiones Alu u otras repeticiones (directas o invertidas), fuertes estructuras secundarias muy estables, PolyA/PolyT u otras regiones homopolímeras (Kieleczała 2005a). Por lo general añadir un paso de desnaturalización de 95°C durante 5 min antes de añadir la mezcla con la Taq polimerasa suele ser suficiente para secuenciar algunas categorías de moldes difíciles (Kieleczała 2005b). En nuestro caso este método no fue suficiente para conseguir amplificar la región A04 del intervalo de mapeo. Para secuencias ricas en contenido GC es posible la amplificación añadiendo dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración final de 5% (Seto 1990). El DMSO es un disolvente adecuado para compuestos polares así como apolares además de ser miscible en agua y en algunos disolventes orgánicos. En nuestras manos este método

tampoco ayudó a amplificar el fragmento en cuestión, ni tan siquiera en combinación con el anterior.

Por último también se realizó un protocolo desarrollado para secuenciación de regiones muy difíciles (http://www.genome.ou.edu/seq_very_difficult_regions). En este protocolo se conjuga el uso de Tween 20 y Nonidet P 40. El primero es un detergente y emulsificante, el segundo es un detergente no iónico. El uso de ambos, combinados o por separado fue completamente inútil para amplificar el fragmento A04 del intervalo de mapeo.

7. El mutante *LRA5* es un transgenico *NahG*

Tras toda la investigación que ha sido descrita en este capítulo de la tesis se planteo la idea de que la parte no amplificable en *LRA5* fuera una inserción de un transposón o quizá una inserción de T-ADN. Dado que el mutante compartía características con la planta transgénica *NahG* se decidió volver a verificar el resultado de que *LRA5* no fuera un contaminante de una línea *NahG* (P. Tornero, comunicación personal). Al re-analizar *LRA5* por PCR con cebadores de *NahG*, se obtuvo amplificación en *LRA5*, los supresores intragénicos y controles *NahG*, pero no en los controles parentales Col-0 y Ws-1 (datos no mostrados). En resumen, *LRA5* es una línea transgénica de *NahG* y probablemente una mezcla de ecotipos, y de origen desconocido (ya que entre diferentes líneas *NahG* disponibles -Col-0 o Ws-1- no se encuentra la misma inserción que en *LRA5*). La obtención de secuencia cubriendo la zona A04 en los supresores intragénicos *Ira-25* y *Ira-26* (Figura 17) se debe probablemente a la introducción de pequeñas cantidades de contaminación (de Col-0) durante el proceso de extracción de ADN, pues todas las muestras fueron recolectadas al mismo tiempo y la extracción de ADN fue realizada de manera simultanea para todos los genotipos. Contaminaciones realizadas durante el proceso de secuenciación, pese a su baja probabilidad, tampoco son del todo descartables. La baja expresión de *PIL1* en *LRA5* y los supresores intragénicos (Figura 18) se debe entonces a la inserción del T-DNA en la región promotora de *PIL1* (Figura 17).



1. Justificación del rastreo de supresores

Una vez que la mutación que afecta a una ruta genética ha sido caracterizada, rastreos de mutaciones secundarias permiten la disección posterior de la ruta afectada por la mutación (Page & Grossniklaus 2002).

El resultado de estos rastreos suele ser la obtención de modificadores del fenotipo mutante, que pueden conferir un fenotipo más severo denominándose potenciadores (“enhancers”) o pueden restablecer total o parcialmente el fenotipo salvaje a pesar de poseer la mutación original, denominándose entonces supresores (Prelich 1999).

Conocida la causa del fenotipo de susceptibilidad a *Pto* de *LRA5* se decidió realizar un rastreo en busca de supresores que contribuyeran a restablecer total o parcialmente el fenotipo de resistencia característico de las plantas silvestres. De esta manera se podrían obtener nuevos genes que participaran en el mecanismo de defensa frente a *Pto* probablemente de manera independiente de SA.

Existen dos razones principales que apoyan la búsqueda de supresores: la primera es que muchos genes son difíciles de identificar por selecciones genéticas más directas (Prelich 1999). Un mutante como *LRA5*, que confiere un fenotipo de susceptibilidad tan extremo, permite la identificación de componentes adicionales de bajo umbral de resistencia a través de la selección de supresores. La segunda razón y la más importante es que la supresión de un fenotipo ya existente establece una relación genética entre ambos (mutación y supresor) que, en algunos casos, no podría haber sido establecida por otros métodos (Prelich 1999).

En el caso del mutante *LRA5*, la distorsión provocada por un gen no nativo de *Arabidopsis* impone una serie de características a la relación entre ambos que sugieren que tipos de mecanismos de supresión se podrán encontrar con una mayor probabilidad. Que el gen no sea nativo de *Arabidopsis* podría implicar que gran cantidad de los supresores que se obtengan probablemente lo serán por modificación directa del transgén *NahG*. Estos supresores, en los que una mutación primaria es aliviada por una segunda mutación dentro del mismo gen se denominan supresores

intragénicos. Todos los demás supresores que se obtengan se consideraran supresores extragénicos.

Los supresores extrágenicos pueden abarcar variedad de mecanismos capaces de revertir el fenotipo de susceptibilidad del mutante *LRA5* (Figura 20). Existen dos escenarios en los que la obtención de supresores extragénicos de *LRA5* parece más plausible, aquellos en los que se alteraría la ruta en la que está involucrado el mutante (dependiente de la ruta del SA) y aquellos en los que se alteraría una ruta independiente de SA pero también involucrada en la resistencia frente a biotrofos.

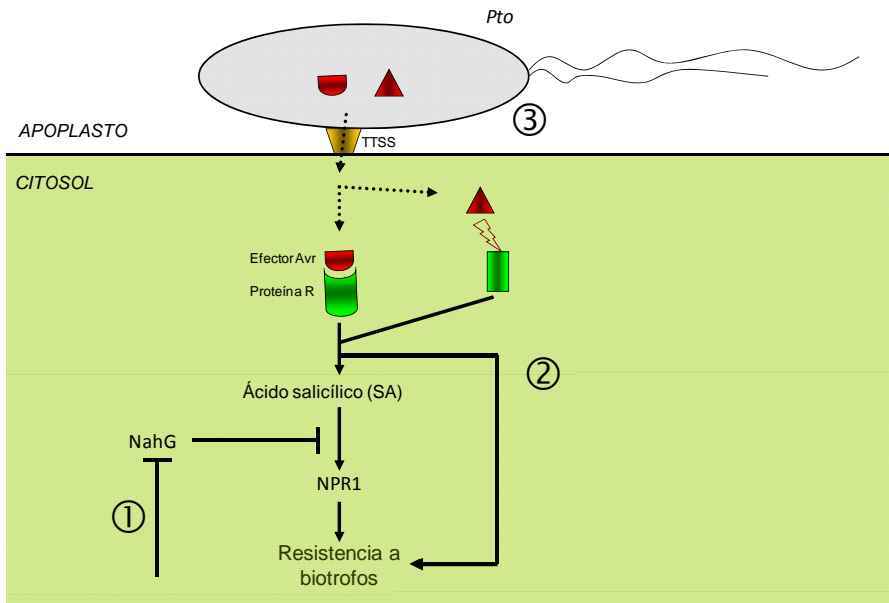


Figura 20. Posibles mecanismos de supresión de *LRA5*.

1. Mutaciones intragénicas sobre el transgén *NahG*.
2. A pesar de poseer una proteína *NahG* funcional podrían potenciarse rutas alternativas que condujeran a la supresión de la susceptibilidad.
3. Mutaciones que afectan a la interacción planta-patógeno al nivel de percepción de la bacteria sobre la planta, por ejemplo lesiones en el sistema T3SS bacteriano u otros.

Supresores que actúan dentro de la misma ruta que la mutación original pero en distintos niveles muestran con frecuencia fenotipos opuestos a los

de la mutación original (Prelich 1999). Dado que el transgén *NahG* degrada el SA, sería posible obtener mutantes en los que se activaran de manera constitutiva elementos de resistencia que de manera silvestre se activan en presencia de SA.

Por otro lado, también sería posible obtener supresores que actuaran sobre rutas distintas del SA pero cuyo efecto fuera también la resistencia. Un fenotipo causado por inactivación de una ruta génica puede ser suprimida con frecuencia por la alteración de una segunda ruta (Prelich 1999). Estos mecanismos pueden implicar desde cambios en otras rutas hormonales hasta posibles variaciones estructurales que impidan la infección por parte del patógeno *Pto* o incluso de otras estirpes inespecíficas de *Pseudomonas* u otros patógenos.

2. Prueba de concepto y resultado del rastreo de supresores

Se realizó una prueba de concepto (Figura 21) que consistió en someter a dobles mutantes entre *LRA5* y algunos de los principales mutantes que poseen resistencia constitutiva (*cpr1*, *cpr5*, *lsd1*, *dnd1*), que habían sido construidos con anterioridad (ver apartado 2.1.4.1. del Capítulo I), a varios tratamientos con una solución de *Pto* a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL. Si estos mutantes fueran supresores de la susceptibilidad de *LRA5*, entonces los dobles mutantes deberían mostrarse resistentes tras las inoculaciones y por tanto podrían ser obtenidos en el rastreo (Figura 21). De todos los dobles mutantes testados tan sólo podría surgir como supresor el mutante *cpr5* (en las condiciones de este rastreo). En todos los demás casos *LRA5* es capaz de suprimir parcialmente (como es el caso de los mutantes *dnd1* y *lsd1*) o totalmente (como en el caso del mutante *cpr1*) el fenotipo de resistencia. Este resultado coincide en parte con el obtenido en Clarke, Aarts *et al.* 2001, donde el mutante *eds1*, que suprime la resistencia mediada por los genes *R* del tipo TIR-NB-LRR, es capaz de suprimir la resistencia de *cpr1* pero no de *cpr5*. Además, el doble mutante *NahG cpr5* acumula niveles de SA libre superiores al control silvestre

(Bowling *et al.* 1997b). En cualquier caso este resultado indica que el diseño del rastreo permitirá encontrar tanto mutantes ya descritos como otros nuevos o con funciones nuevas.

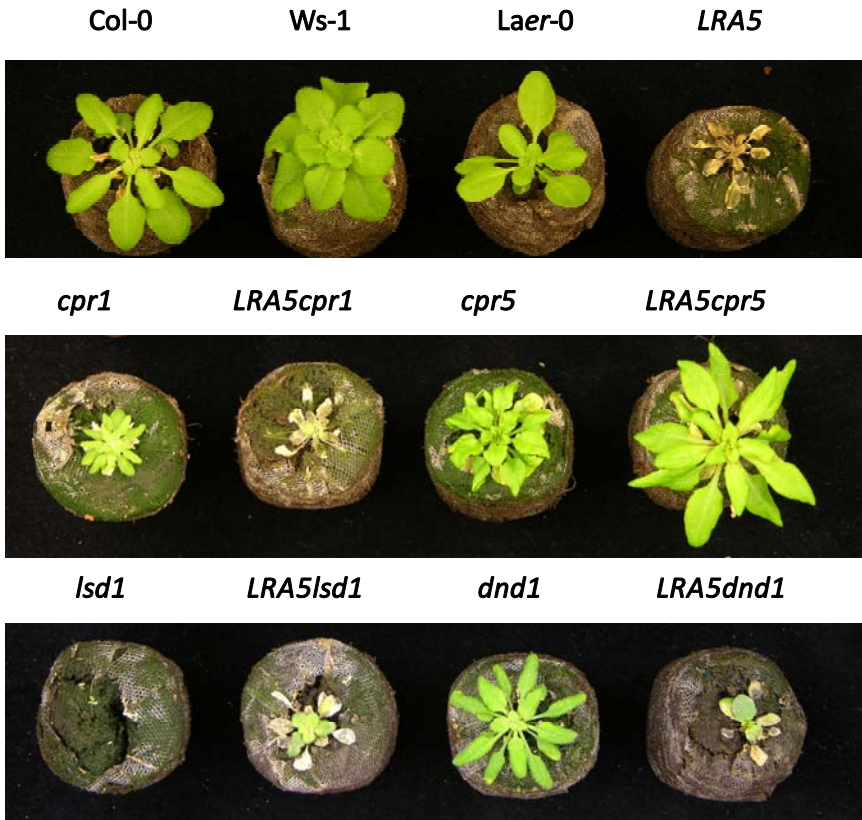


Figura 21. Prueba de concepto del rastreo de supresores.

Imagen de las plantas Col-0, Ws-1, Laer-0, LRA5, *cpr1*, LRA5 *cpr1*, *cpr5*, LRA5 *cpr5*, *lsd1*, LRA5 *lsd1*, *dnd1* y LRA5 *dnd1* tras la inoculación repetida de *Pto* a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL en plantas de 4 semanas.

Para la obtención de supresores de LRA5 se planteó una mutagénesis de semillas de este genotipo mediante el mutágeno sulfonato de etilmetano (EMS). Este es el método más fiable de mutagénesis en *Arabidopsis*. Además la mutagénesis de semillas es la manera más práctica de inducir mutaciones hereditarias (Page & Grossniklaus 2002). Tras la mutagénesis, a

partir de 100 plantas M1 se formaron 60 lotes con 3000 plantas M2, rastreándose en total 6000 familias M2.

El criterio planteado para el rastreo de los supresores fue la reversión a fenotipo silvestre de resistencia en plántulas de 15 días de edad, tras la inoculación mediante aerosol de una solución de *Pto* a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL de manera repetida y con una cadencia de varios días. De esta manera se obtuvieron 89 mutantes viables que eran capaces de suprimir el fenotipo de susceptibilidad a *Pto* de *LRA5*.

De estos 89 mutantes se analizaron en primer término 40 mutantes. Para poder discriminar cuales de estos supresores eran extragénicos o intragénicos se realizaron cruces entre los distintos supresores en fondo *LRA5* y Col-0. Los mutantes intragénicos se nombraron como alelos *Ira5* mientras que los extragénicos se denominaron *sls* (*SUPPRESSOR OF LRA5 SUSCEPTIBILITY*). Tras la obtención de la segunda generación filial (F2) se inocularon plantas independientes con *Pto* a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL y se analizó la segregación entre plantas resistentes (fenotipo supresor) y susceptibles (fenotipo *LRA5*) (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen del análisis estadístico de los supresores de *LRA5*.

Análisis de las segregaciones en las poblaciones F2 generadas a partir de los cruces entres plantas del supresor en fondo *LRA5* y plantas Col-0. Las hipótesis nulas (H0) emitidas se aceptan, asumiendo un error máximo del 5% cuando el valor estadístico $\chi^2 < 3,84$. El carácter de la segregación se determinó con valores obtenidos en una única repetición. Rec. es recesivo, Epist. es epistático, Trans. es transheterocigoto y dom. es dominante.

F2	wt	<i>LRA5</i>	Total	H ₀	χ^2	Carácter
<i>sls1 LRA5</i> × Col-0	65	34	99	9:6/11:5	1,33/0,52	Rec. Letal/Epist
<i>sls2 LRA5</i> × Col-0	38	52	90	6:7	0,42	Trans. Letal dom.
<i>sls3 LRA5</i> × Col-0	42	57	99	6:7	0,37	Trans. Letal dom.
<i>Ira5-10 LRA5</i> × Col-0	87	0	87			Intragénico

F2	wt	LRA5	Total	H ₀	χ^2	Carácter
<i>sIs1 LRA5</i> × Col-0	65	34	99	9:6/11:5	1,33/0,52	Rec. Letal/Epist
<i>sIs2 LRA5</i> × Col-0	38	52	90	6:7	0,42	Trans. Letal dom.
<i>sIs3 LRA5</i> × Col-0	42	57	99	6:7	0,37	Trans. Letal dom.
<i>sIs5 LRA5</i> × Col-0	70	24	94	11:5/13:3	0,88/3,02	Epistasia
<i>sIs6 LRA5</i> × Col-0	62	32	96	11:5	0,45	Epistasia
<i>sIs7 LRA5</i> × Col-0	61	36	97	11:5	1,79	Epistasia
<i>Ira5-20 LRA5</i> × Col-0	88	0	88			Intragénico
<i>sIs9 LRA5</i> × Col-0	70	29	99	11:5	0,13	Epistasia
<i>sIs10 LRA5</i> × Col-0	41	58	99	6:7	0,65	Trans. Letal dom.
<i>sIs11 LRA5</i> × Col-0	61	38	99	9:6	0,11	Recesivo letal
<i>sIs12 LRA5</i> × Col-0	14	10	24	9:6	0,11	Recesivo letal
<i>sIs13 LRA5</i> × Col-0	50	43	93	9:7	0,004	Recesivo
<i>sIs14 LRA5</i> × Col-0	42	57	99	6:7	0,37	Trans. Letal dom.
<i>sIs15 LRA5</i> × Col-0	75	24	99	11:5/13:3	2,13/1,98	Epistasia
<i>Ira5-25 LRA5</i> × Col-0	87	0	87			Intragénico
<i>Ira5-26 LRA5</i> × Col-0	88	0	88			Intragénico
<i>sIs18 LRA5</i> × Col-0	57	35	92	9:6	0,16	Recesivo letal
<i>sIs19 LRA5</i> × Col-0	44	50	94	6:7	0,07	Trans. Letal dom.
<i>sIs20 LRA5</i> × Col-0	24	28	52	6:7	0,01	Trans. Letal dom.
<i>sIs21 LRA5</i> × Col-0	60	39	99	9:6	0,01	Recesivo letal
<i>Ira5-44 LRA5</i> × Col-0	88	9	97			Intragénico
<i>sIs22 LRA5</i> × Col-0	61	35	96	9:6/11:5	0,52/1,39	Rec. Letal/Epist
<i>sIs23 LRA5</i> × Col-0	50	39	89	9:7	0,00	Recesivo
<i>sIs24 LRA5</i> × Col-0	77	22	99	11:5	0,79	Epistasia

F2	wt	LRA5	Total	H ₀	χ ²	Carácter
<i>sls1 LRA5</i> × Col-0	65	34	99	9:6/11:5	1,33/0,52	Rec. Letal/Epist
<i>sls2 LRA5</i> × Col-0	38	52	90	6:7	0,42	Trans. Letal dom.
<i>sls3 LRA5</i> × Col-0	42	57	99	6:7	0,37	Trans. Letal dom.
<i>sls25 LRA5</i> × Col-0	56	43	99	9:7	0,00	Recesivo
<i>sls26 LRA5</i> × Col-0	53	46	99	9:7	0,29	Recesivo
<i>sls27 LRA5</i> × Col-0	23	35	58	10:5	1,35	Trans. Letal rec.
<i>sls28 LRA5</i> × Col-0	46	53	99	6:7	0,04	Trans. Letal dom.
<i>lra5-64 LRA5</i> × Col-0	89	0	89			Intragénico
<i>lra5-65 LRA5</i> × Col-0	88	0	88			Intragénico
<i>sls31 LRA5</i> × Col-0	68	31	99	13:3	0,00	Epistasia
<i>sls32 LRA5</i> × Col-0	25	73	98	10:3	0,33	Dominante letal
<i>sls33 LRA5</i> × Col-0	17	73	90	13:3	0,00	Epistasia
<i>sls34 LRA5</i> × Col-0	23	75	98	13:3	0,00	Epistasia
<i>lra5-81 LRA5</i> × Col-0	88	0	88			Intragénico
<i>lra5-83 LRA5</i> × Col-0	87	1	88			Intragénico
<i>lra5-92 LRA5</i> × Col-0	87	0	87			Intragénico
<i>lra5-97 LRA5</i> × Col-0	88	0	88			Intragénico
<i>lra5-98 LRA5</i> × Col-0	86	1	87			Intragénico

Como se ha comentado, aquellas F2 que no segregaron indicaron que el supresor en cuestión es intragénico. Las F2 segregantes correspondían a supresores extragénicos.

Tras el análisis de los 40 supresores de *LRA5* se decidió continuar trabajando con los supresores intragénicos: *lra5-10*, *lra5-25*, *lra5-26* y los

supresores extragénicos *sls13* (*jrc1*; *JAROCKS 1*) y *sls28* (*esh1*; *EDWARD SCISSORS HANDS 1*). El supresor *sls13* fue elegido por su carácter recesivo no letal y el supresor *sls28* aunque no se ajustaba a un supresor recesivo (de hecho extrañamente se puede encuadrar en una segregación que se corresponde con un transheterocigoto dominante letal) posee un fenotipo de abigarramiento (similar al descrito para algunos genes *cpr*) que se consideró interesante.

3. Supresores intragénicos

Como se explicó anteriormente los supresores intragénicos se pueden distinguir de los supresores extragénicos mediante análisis de ligamiento. En el caso de los supresores intragénicos la mutación supresora debe encontrarse en la secuencia del gen *NahG*. Para poder afirmar con confianza que realmente son intragénicos, se establecieron tres condiciones necesarias a cumplir por los tres supresores intragénicos (Tabla 6):

- Ser supresores también en M₃.
- Ser supresores en F1 y F2 con Col-0.
- Ser alélicos en los cruces de complementación entre ellos.

De esta manera también se comprobó que los tres supresores intragénicos forman parte del mismo grupo de ligamiento.

	M ₃	Col-0 (F1)	Col-0 (F2)	<i>Ira5-10</i> (F1)	<i>Ira5-25</i> (F1)
<i>Ira5-10</i>	R n=17	R n=4	R n=87		
<i>Ira5-25</i>	R n=13	R n=11	R n=87	R n=9	
<i>Ira5-26</i>	R n=5	R n=4	R n=56	R n=4	R n=4

Tabla 6. Confirmación de resistencia y alélismo en los supresores intragénicos.

Se comprobó la resistencia en M₃ (segunda columna por la izq.) así como la falta de complementación con Col-0 en las generaciones filiales F1 y F2 (tercera y cuarta columna resp). Por último se incluyó el test de alélismo.

Inoculaciones realizadas en plantas de 4 semanas con *Pto* inoculada por jeringuilla a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL.

La sintomatología de la infección con *Pto* en los tres supresores intragénicos y en los controles (Figura 22A), indica que los tres supresores son resistentes aunque se puede observar la presencia de amarilleamientos en las hojas del supresor *Ira5-26*. Sin embargo, estos síntomas no son comparables a la necrosis observada en hojas inoculadas de *LRA5* en el mismo experimento.

Además de constatar la resistencia a través de la sintomatología con *Pto*, se realizaron curvas de crecimiento con la misma estirpe (Figura 22B) observándose efectivamente un menor crecimiento del patógeno en las tres líneas de supresores intragénicos estudiadas comparado con el crecimiento observado en el mutante *LRA5*. Pese a ser resistentes, parece existir cierta variabilidad en el crecimiento del patógeno entre los distintos supresores. En concreto la línea *Ira5-25* parece ser la más susceptible de las tres. Sería entonces un supresor débil del fenotipo de *LRA5*. Las líneas *Ira5-10* y *Ira5-26* parecen suprimir casi en su totalidad la susceptibilidad a *Pto*.

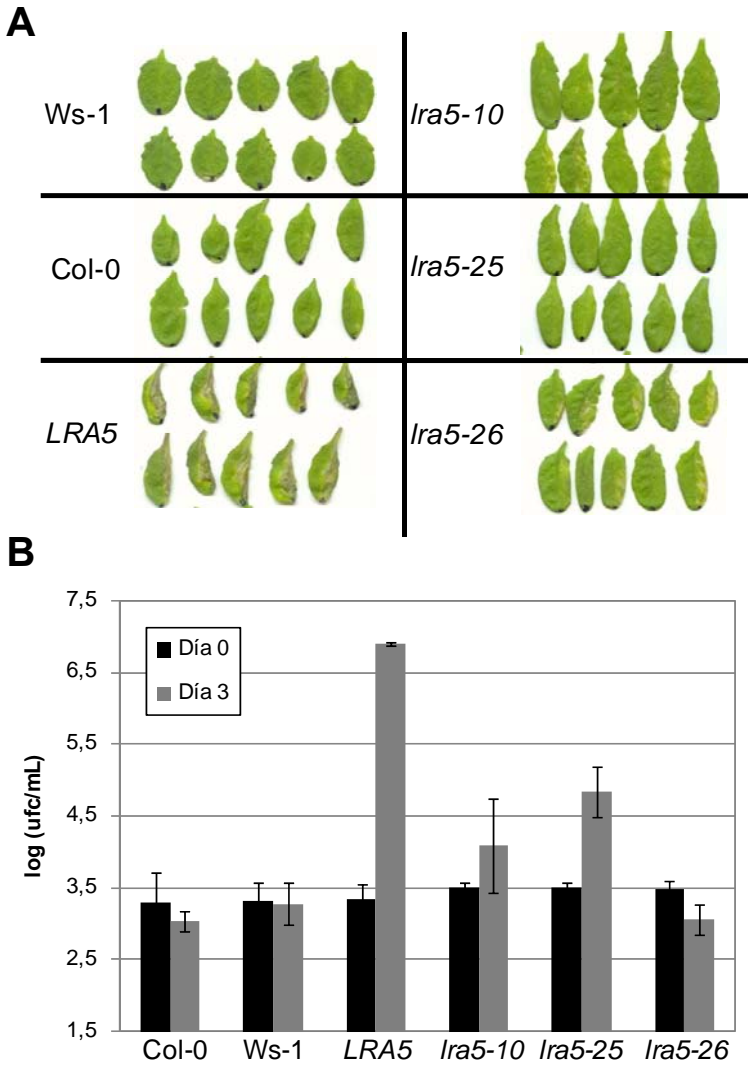


Figura 22. Fenotipo de los supresores intragénicos tras inoculación con *Pto*.

Resultado de la inoculación mediante jeringuilla con *Pto* a $5 \cdot 10^7$ ufc/mL de plantas de 4 semanas de los controles Col-0, Ws-1, LRA5, *Ira5-10*, *Ira5-25* y *Ira5-26*. **A.** Fenotipo macroscópico de las hojas de los distintos genotipos 3 días post inoculación. **B.** Curvas de crecimiento en los distintos genotipos analizados. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

No obstante, estos datos contradicen parcialmente los resultados obtenidos para los niveles de SA en planta no infectada que se muestran en la Figura 23A. En ella puede observarse como los valores más altos de SA de los supresores intragénicos se corresponden con el alelo *Ira5-25*. Estos niveles incluso superan a aquellos de los controles silvestres.

Por tanto el alelo con mayor nivel de SA sería también el alelo más susceptible de los tres supresores intragénicos a *Pto*. Para intentar clarificar esta aparente contradicción se realizaron RT-PCRs (Figura 23B) de la expresión del gen *NahG* en los distintos alelos. El alelo *Ira5-25* muestra un nivel inapreciable de ARNm de *NahG*, lo cual explicaría los altos niveles de SA observados. Sin embargo este resultado contradice de nuevo la susceptibilidad observada en las curvas de crecimiento para este alelo. Aunque los alelos fueron retrocruzados al menos una vez para poder eliminar otras mutaciones adicionales, es posible que permanezca alguna mutación ligada al gen *NahG* que repercute de manera importante en la susceptibilidad a *Pto*.

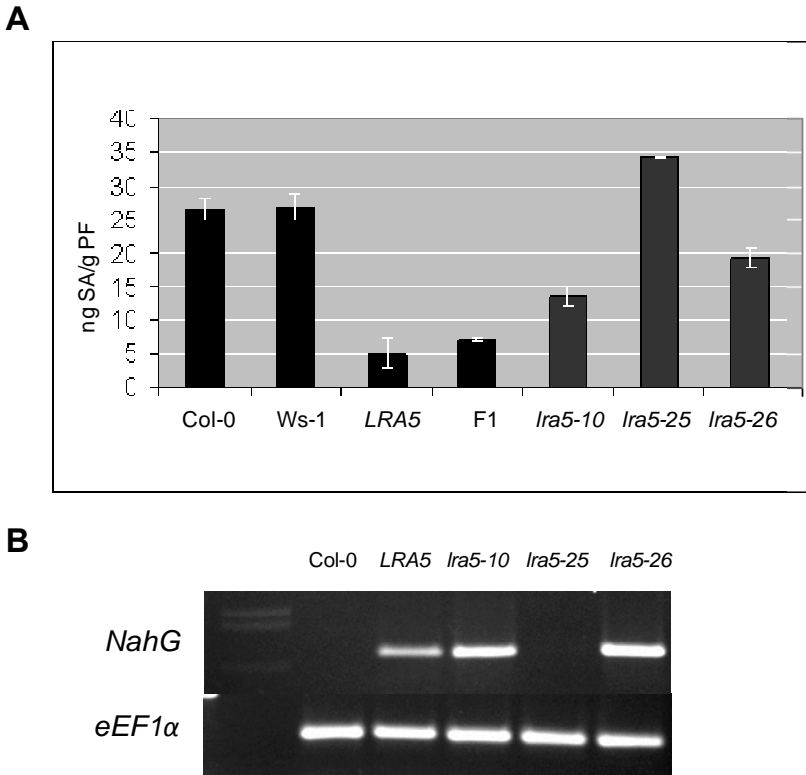


Figura 23. Niveles de SA y expresión del gen *NahG*.

A. Cuantificación de los niveles de SA total en plantas de 4 semanas no inoculadas.
B. Electroforesis en gel 1% de agarosa (teñido con bromuro de etidio) de los productos de RT-PCR semicuantitativa obtenidos con juegos de oligonucleótidos específicos para los genes *NahG* (640 pb) y *eF1α* (396 pb). Como molde se utilizó ADNc obtenido a partir de hojas de *Arabidopsis* no infectadas.

4. Supresores extragénicos

Durante el rastreo de supresores del fenotipo de susceptibilidad de *LRA5* también se obtuvieron supresores extragénicos. Como se describió con anterioridad se obtuvieron 28 mutantes cuya F2 obtenida entre Col-0 y el supresor en fondo *LRA5* fue segregante. Se obtuvieron mutantes con segregaciones ajustables a genes recesivos (4), recesivos letales (4), dominantes letales (1), epistáticos (frecuencia 11:5, 4), epistáticos (frecuencia 13:3, 3), transheterocigotos recesivos letales (1) y transheterocigotos dominantes letales (7). Hay además 2 supresores que se ajustan a la segregación de recesivos letales o epistáticos (frecuencia 13:3) y uno a ambas segregaciones epistáticas.

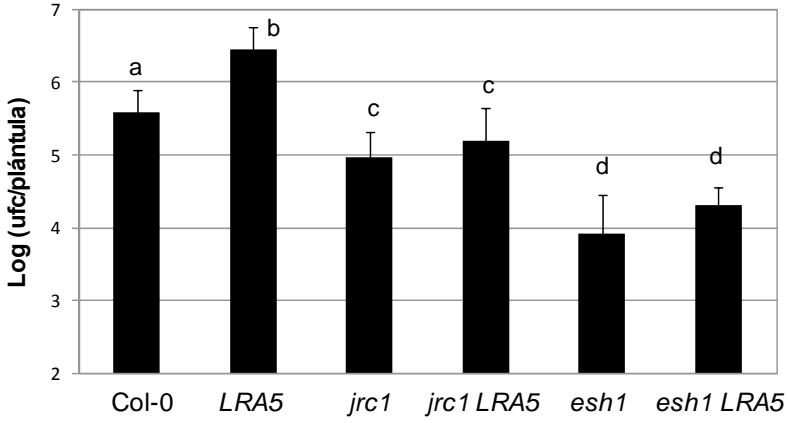
Se decidió continuar el estudio de supresores extragénicos con dos mutantes, *sls28 (esh1)* y *sls13 (jrc1)*. El primero se ajusta perfectamente a una segregación de un gen de carácter recesivo y el segundo no se ajusta a un gen recesivo o dominante, pero el fenotipo abigarrado y resistente (similar a algunos mutantes *cpr*) que mostró durante el rastreo se consideró de importancia suficiente para ser estudiado. Además, características fenotípicas tan dispares podrían anticipar mecanismos de resistencia distintos.

Los supresores extragénicos son más resistentes con y sin *LRA5* en curvas de crecimiento frente a *Pto* (Figura 24A). Aunque existe cierta variabilidad entre ambos *-esh1* es más resistente que *jrc1-* ambos son considerablemente más resistentes que *LRA5*. En cualquier caso estos dos supresores de *LRA5* son al menos tan resistentes como Col-0.

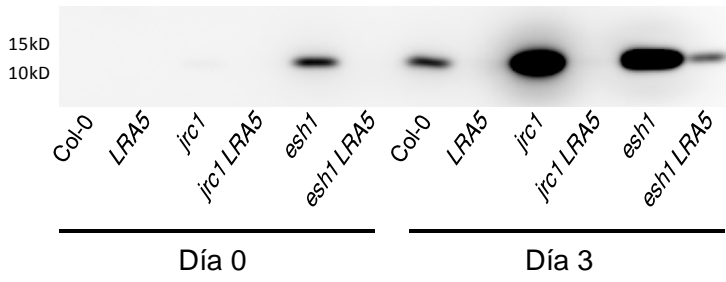
Estos resultados son congruentes con la expresión de la proteína de resistencia PR1 para los mismos mutantes tras la infección con *Pto* (Figura 24B). En el caso del mutante *jrc1* y *jrc1 LRA5*, la expresión a día 0 se corresponde con la del silvestre Col-0 y *LRA5*. Tras la infección, el mutante *jrc1* expresa la proteína exacerbadamente, con un nivel de expresión hasta 3 veces superior al de Col-0 (Figura 24C). El mutante *jrc1 LRA5* no tiene expresión aparente de PR1 a día 3 (con toda probabilidad debido al efecto de la proteína NahG), aunque sorprendentemente esto no afecta a la resistencia frente a *Pto* (Figura 24A). Quizá en este caso la resistencia a *Pto* sea parcialmente independiente de SA. En el caso del mutante *esh1*, existe una expresión constitutiva de PR1 ya a día 0, que no aparece en el mutante

esh1 LRA5. A día 3, *esh1* muestra un nivel de expresión aún mayor. Este nivel es tan alto, que incluso el doble mutante *esh1 LRA5* posee un nivel apreciable de PR1 a día 3. Quizá por ello *esh1* y *esh1 LRA5* son los mutantes que más resistencia presentan (Figura 24A).

A



B



C

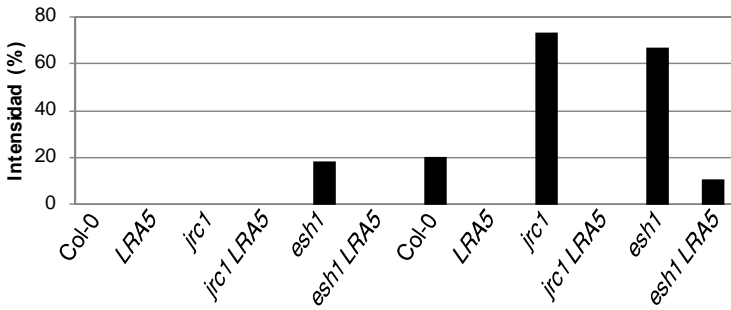


Figura 24. Fenotipo patogénico frente a Pto de los supresores *jrc1* y *esh1*.

Plántulas de Col-0, *LRA5*, *jrc1*, *LRA5 jrc1*, *esh1* y *LRA5 esh1* de 18 días inoculadas mediante aerosol con una suspensión de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL. Los resultados fueron evaluados 3 d.p.i. **A.** Ambos supresores se muestran más resistentes que *LRA5* e incluso que el control Col-0. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Las letras sobre las barras designan grupos diferentes según estadístico ANOVA de medias. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares. **B.** Expresión de proteína PR1 obtenida mediante Western blot en Col-0, *LRA5*, *jrc1*, *jrc1 LRA5*, *esh1* y *esh1 LRA5* a día 0 y día 3 d.p.i. **C.** Gráfico en el que se representa el nivel de expresión (en porcentaje) de los distintos controles y mutantes en el Western blot representado en B (ver Materiales y Métodos 4.3.)

4.1. Caracterización del mutante *esh1*

Este mutante fue seleccionado, aparte de su resistencia, por su característico fenotipo. Como se puede observar en la Figura 25A, el mutante muestra un fenotipo de abigarramiento que le confiere un tamaño inferior al del que procede *LRA5*. Como fenotipo pleiotrópico adicional, cuando el mutante crece en condiciones de día largo, la inflorescencia principal parece perder la dominancia apical (Figura 25B) igualándose la altura de las inflorescencias laterales y confiriendo a la planta un fenotipo característico similar al de un arbusto.

4.1.1. Fenotipo macroscópico del mutante *esh1*

El fenotipo de hojas pequeñas y retorcidas es una alteración común en algunos tipos de mutantes y puede tener diversas causas. *cpr1* es un mutante que también presenta una alta resistencia frente a *Pto* y que además también presenta un fenotipo de hojas pequeñas y retorcidas (Bowling *et al.* 1994). Sin embargo, en la prueba de concepto se descartó

cpr1 como posible mutante obtenido en el rastreo. El fenotipo de enanismo, hojas pequeñas y retorcidas y dominancia apical reducida son también alteraciones asociadas a mutantes relacionados con la hormona auxina (Park *et al.* 2009). Para comprobar si las auxinas están involucradas en el fenotipo del mutante *esh1* se decidió obtener el mutante *esh1* en el fondo de la planta transgénica *DR5:GUS*. Esta planta posee el promotor sintético DR5 que consiste en 7 copias (posicionadas en tándem) de repeticiones directas de la secuencia de unión a ARF del promotor G3 de soja, unido a un promotor mínimo 35S del Virus de la Coliflor (CaMV) y a la secuencia codificante del gen reportador de la β -Glucuronidasa (GUS) (Ulmasov *et al.* 1997). La actividad de este marcador refleja el nivel endógeno de auxinas en distintas partes de la planta (Bai & DeMason 2008). Los resultados de las tinciones GUS sobre los dobles mutantes de 6 líneas homocigotas para ambos genes no mostraron diferencias en la actividad del gen reportador con respecto a la línea transgénica control (datos no mostrados), lo que indicaría que el mutante *esh1* no tiene incrementados los niveles endógenos de auxinas. La aplicación directa de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético, análogo químico de auxinas) o de npa (ácido naftilftalámico, inhibidor del transporte polar de las auxinas) en plantas de 4 semanas de edad tampoco permitió obtener un fenotipo diferencial con respecto a los controles silvestres y *LRA5* (datos no mostrados).

Existen también hipótesis alternativas que no hemos testado. Por ejemplo, desregulaciones en los niveles de brasinoesteroides también han sido asociados al fenotipo de plantas de pequeño tamaño (Klahre *et al.* 1998) y a pérdida de dominancia apical (Gampala *et al.* 2007) aunque.

Paradójicamente cuando plantas del supresor *esh1* son crecidas en día corto o cuando la mutación supresora se encuentra en fondo *LRA5* (ya sea en estado heterocigoto u homocigoto) aparece un fenotipo muy característico en el que las silicuas aparecen agrupadas al final de los tallos de la inflorescencia. Este fenotipo tan característico inspiró para nombrar al mutante como *esh1* (*EDWARD SCISSOR HANDS 1* (*EDUARDO MANOS TIJERAS 1*)) (Figura 25C, detalle de la posición de las silicuas en 25D y 25E).

La agrupación de silicuas que muestra el fenotipo *esh* parece debida a una reducción en la longitud de los internodos. Los genes *KNOX* (*KNOTTED LIKE HOMEODOMAIN*) son los encargados del patrón de los tejidos en desarrollo en angiospermas (Bharathan *et al.* 1999). Estos genes pueden ser diferenciados en dos grupos (I y II), dependiendo de su filogenia (Bharathan

et al. 1999). BP es una proteína de *Arabidopsis* con homología a proteínas del grupo KNOX I (Venglat *et al.* 2002). El locus *BP* es responsable, entre otros, del desarrollo y crecimiento de los internodos de las inflorescencias en *Arabidopsis* (Venglat *et al.* 2002). De hecho, mutaciones en dicho locus provocan el crecimiento de silicuas agrupadas debido a la reducida longitud de sus internodos (Venglat *et al.* 2002). Fenotipos que incluyen silicuas agrupadas también se han obtenido como resultado de la interacción entre *bp* y *pny*, ambos pertenecientes al grupo de KNOX I (Smith & Hake 2003). Aunque no se ha descrito relación entre los genes *KNOX* y defensa, se sabe que algunos patógenos provocan su expresión ectópica para provocar síntomas de enfermedad (Depuydt *et al.* 2008).

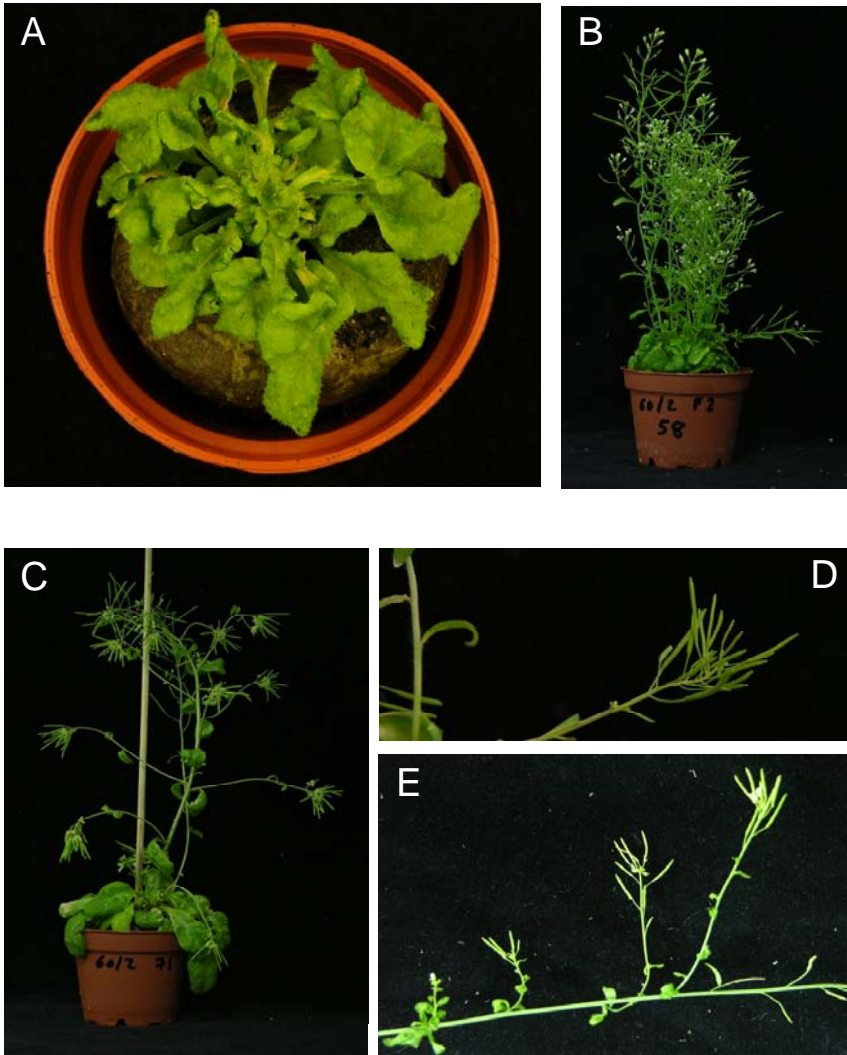
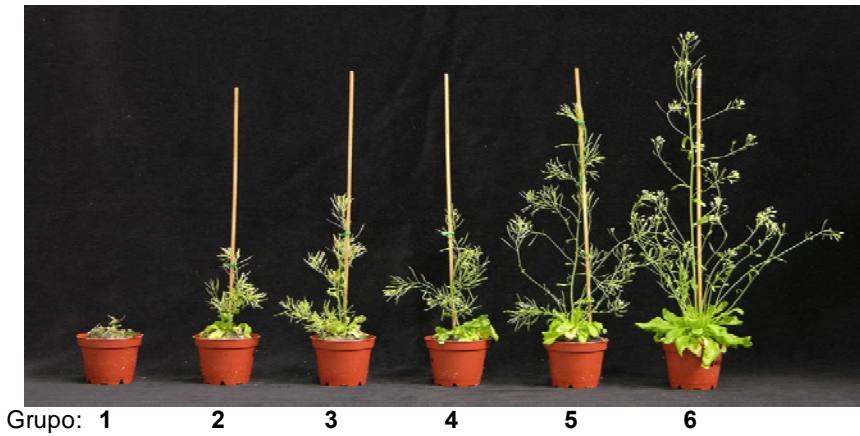


Figura 25. Fenotipo del mutante *esh1* en condiciones de día corto y día largo.

Fenotipo del mutante *esh1* crecido en condiciones de día largo, antes (A) y después de la floración (B). Se puede observar el aspecto de arbusto que el mutante desarrolla en estas condiciones. Cuando el mutante es crecido en condiciones de día corto, este adquiere un fenotipo muy particular que se ha denominado *esh* (Edward Scissor Hands) (C). Se pueden observar detalles de la posición de las siliculas en los extremos del tallo (D y E).

La severidad del fenotipo *esh* parece muy relacionada con las condiciones ambientales, siendo determinante el número de horas de luz que la planta recibe por día.

Para poder relacionar las condiciones de luz recibidas con la exhibición del fenotipo *esh* se realizó un experimento (Figura 26) en el que plantas del mutante *esh1* fueron crecidas en condiciones de día corto, siendo trasladadas a condiciones de día largo a intervalos regulares de 1 semana. Por tanto, una tanda de plantas pasó sólo una semana en día corto y el resto del experimento (6 semanas) en día largo. Otra tanda estuvo 2 semanas en día corto y el resto del experimento (5 semanas) en día largo y así sucesivamente hasta la tanda que estuvo 5 semanas en día corto y 2 semanas en día largo. Un grupo de plantas control se creció durante todo el tiempo del experimento (7 semanas) en condiciones de día largo. Durante el experimento se pudo comprobar que el fenotipo *esh* es dependiente del tiempo que la planta pasa en condiciones de día corto, de tal manera que 3 o 4 semanas es suficiente para que el fenotipo *esh* pueda desarrollarse posteriormente en condiciones de día largo.



Grupo	Semanas pasadas en día corto	Semanas pasadas en día largo
1	0	7
2	1	6
3	2	5
4	3	4
5	4	3
6	5	2

Figura 26. Fenotipo *esh* y condiciones de luz.

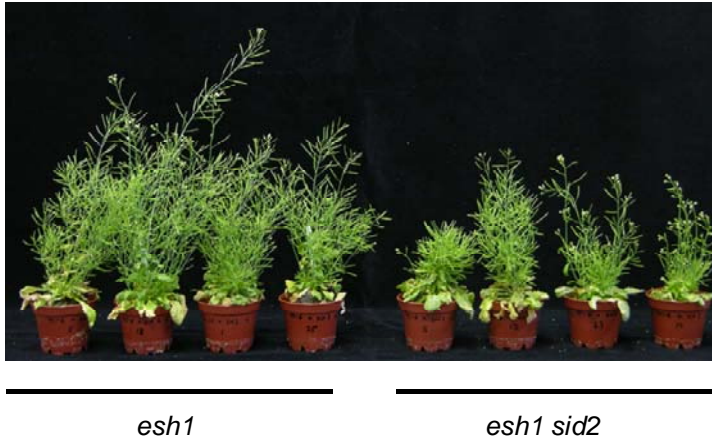
Fenotipo de plantas *esh* (ver foto) en función del grupo al que pertenece (1, 2, 3, 4, 5 y 6). En la tabla se recoge el número de semanas en día corto y día largo que pasó cada grupo. El tiempo pasado en día corto siempre antecedió al tiempo en día largo. Se puede observar como a mayor tiempo en día corto el fenotipo *esh* se agudiza.

4.1.2. Fenotipo patogénico del mutante *esh1*

Para comprobar hasta que punto los fenotipos estudiados en el mutante *esh1* están relacionados con la hormona SA se realizó el cruce entre *esh1* y el mutante en la producción de SA *sid2* (afectado en la enzima ICS1) y se obtuvo el doble mutante. Como se puede observar en la Figura 27A las plantas *esh1 sid2* tienen un fenotipo de enanismo mucho más pronunciado que las *esh1*. Por consiguiente, al igual que sucede con el mutante *esh1 NahG*, la reducción de los niveles de SA no es suficiente para devolver el fenotipo macroscópico silvestre a *esh1*, lo que podría indicar que dicho fenotipo es independiente del SA, pudiendo ser la resistencia observada en el mutante un posible efecto secundario encuadrado dentro del carácter pleiotrópico de la mutación supresora.

Por otro lado, se realizaron curvas de crecimiento que incluyeron este doble mutante. Como se puede observar en la Figura 27B, la introducción de *esh1* en el fondo *sid2* no es suficiente para restablecer la resistencia. Curiosamente, en los mutantes *cpr1*, *cpr5* y *cpr6* el gen *ICS1* se encuentra expresado de manera constitutiva (Wildermuth *et al.* 2001). Que el mutante *esh1* no sea capaz de revertir el fenotipo de susceptibilidad de *sid2* pero si de *NahG* indicaría que ambas situaciones de reducción de niveles de SA no son equivalentes, al menos en lo referido al mutante *esh1* y la reversión a resistencia. Probablemente el mecanismo de resistencia necesario para revertir el fenotipo de susceptibilidad de *sid2* demande la activación de defensas distintas a las necesarias por la degradación de SA producida por *NahG*. Sorprendentemente, en el mutante *NahG* los niveles de PR1, PR2 y PR5 son apenas detectables, mientras que en *sid2* sólo PR1 posee un nivel de expresión inferior al silvestre (Nawrath & Metraux 1999), no obstante la expresión de manera constitutiva de PR1 en *esh1* no parece suficiente para revertir la susceptibilidad. Esto indicaría que la lesión en *ICS1* por *sid2* podría afectar a algo más que la resistencia dependiente de SA. De hecho, la inducción de *ICS1* necesita otra señal sistémica además de SA (Wildermuth *et al.* 2001).

A



B

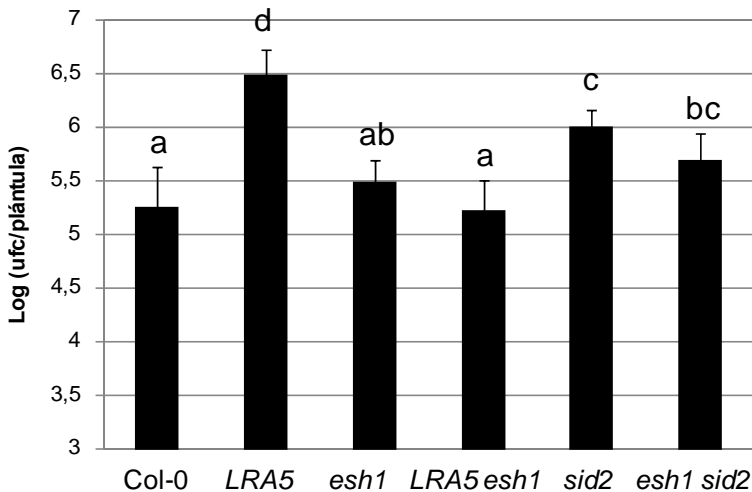


Figura 27. Relación entre los mutantes *esh1* y *sid2*.

A. Fenotipo del mutante *esh1* y del doble mutante *esh1 sid2*. El fenotipo del doble mutante se ve agudizado en el fondo *sid2*. **B.** Curva de crecimiento de los genotipos Col-0, *LRA5*, *esh1*, *esh1 LRA5*, *sid2* y *esh1 sid2*. Las plántulas de 18 días fueron inoculadas mediante aerosol con una solución de *Pto* a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL. El crecimiento fue evaluado a los 3 dpi. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Las letras sobre las barras designan grupos diferentes según estadístico ANOVA de medias. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

El transgen *NahG* confiere a *Arabidopsis* no sólo susceptibilidad frente a *Pto*, sino que además también aporta susceptibilidad frente a patógenos inespecíficos de *Arabidopsis*. Como se describió en el Capítulo I el mutante *LRA5* es susceptible a las estirpes inespecíficas de *Arabidopsis* *P.s. pv. phaseolicola* y *P.s. pv. tabaci*, por lo que se inocularon plantas del mutante *esh1* en fondo silvestre y en fondo *LRA5* con ambos patógenos. (Figura 28).

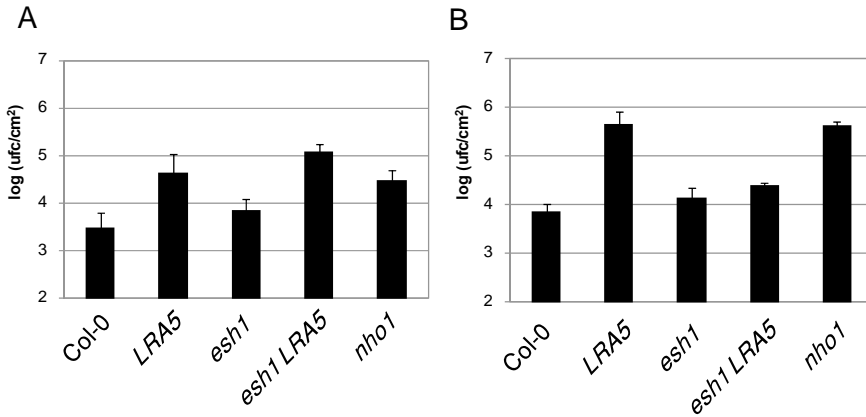


Figura 28. Respuesta del mutante *esh1* a la inoculación con *P.s. pv phaseolicola* y *tabaci*.

Plantas de 4 semanas de *Col-0*, *LRA5*, *esh1*, *esh1 LRA5* y *nho1* fueron inoculadas mediante jeringuilla con a una concentración de 10^6 ufc/mL de **A.** *P.s. pv. phaseolicola* y **B.** *P.s. pv. tabaci*. Los resultados fueron evaluados a los 3 días post inoculación. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

La mutación *esh1* no es capaz de revertir el fenotipo de *LRA5* frente a *P.s. pv phaseolicola*. Pese a que esta mutación posee inducida PR1 de forma basal, este hecho no es suficiente para mostrar resistencia frente al patógeno cuando la mutación se encuentra en fondo *LRA5*. Sin embargo, el mutante *esh1* es tan resistente como *Col-0*. La susceptibilidad a *P.s. pv phaseolicola* de *NahG* viene determinada por la producción de catecol a partir de la degradación de SA por parte del transgén más que por la ausencia del mismo SA (van Wees & Glazebrook 2003). Por tanto, mientras

LRA5 posea copias funcionales de *NahG* continuará la producción de catecol y la susceptibilidad a la estirpe.

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Cuando las plantas *NahG* son tratadas con catalasa pierden la capacidad de ser infectadas por *P.s. pv phaseolicola* pese a seguir teniendo niveles muy bajos de SA (van Wees & Glazebrook 2003). Quizá sería posible obtener plantas supresoras del fenotipo de *LRA5* frente a *P.s. pv phaseolicola* que actuaran a nivel de catalasas endógenas, pero para ello debería plantearse un rastreo de supresores basado en dicha estirpe y no en *Pto*, que es en el que se encontró *esh1*.

Aún así el doble mutante *esh1 LRA5* sí que se muestra resistente frente a *P.s. pv tabaci*. En este caso el supresor es capaz de revertir el fenotipo de susceptibilidad. La resistencia a *P.s. pv tabaci* necesita del gen *NHO1* (Kang *et al.* 2003). Además inoculaciones de *Arabidopsis* con concentraciones altas de *P.s. pv tabaci* provocan una marcada HR con una rápida muerte celular y generación de especies reactivas de oxígeno (Ishiga *et al.* 2005). Este tipo de respuesta está estrechamente relacionada con la hormona SA y la subsecuente producción de PRs. La expresión de PR1 podría estar implicado en la resistencia frente a *P.s. pv tabaci*. El mutante *esh1* expresa de manera constitutiva PR1 y esta podría ser la causa de la resistencia que presenta el doble mutante *esh1 LRA5*, que pese a la presencia de *NahG* sigue poseyendo un nivel de expresión de PR1 que podría ser suficiente para la resistencia frente a este patógeno.

LRA5 también está afectado en la resistencia específica. De hecho, *LRA5* es capaz de responder de manera efectiva a la infección con *Pto (avrRpm1)* pero falla frente a la infección con *Pto (avrRpt2)*. Se planteo la pregunta si el supresor *esh1* es capaz de mantener y/o revertir estos fenotipos.

En la infección con *Pto (avrRpt2)*, el doble mutante *esh1 LRA5* no es capaz de revertir el fenotipo de susceptibilidad mostrado por *LRA5* (Figura 29A). Sin embargo el doble mutante sigue manteniendo la resistencia frente a *Pto (avrRpm1)* (Figura 29B).

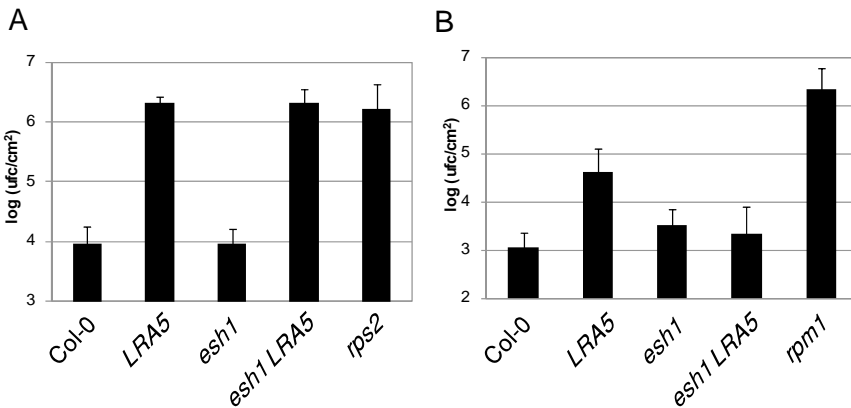


Figura 29. Respuesta del mutante *esh1* frente a la infección con *Pto avrRpt2* y *avrRpm1*.

Curvas de crecimiento realizadas en plantas de 4 semanas de Col-0, *LRA5*, *esh1*, *esh1 LRA5*, *rps2* y *rpm1* inoculadas mediante jeringuilla a una concentración de 10^6 ufc/mL y los resultados fueron evaluados a 3 dpi. **A.** Inoculación con *Pto (avrRpt2)* y **B.** inoculación con *Pto (avrRpm1)*. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

El efector bacteriano AvrRpt2 promueve la susceptibilidad en *Arabidopsis* sin modular los niveles endógenos de SA, aunque también suprime la producción de PRs en plantas infectadas (Chen *et al.* 2004). Además su virulencia es independiente del gen *RPM1* (Chen *et al.* 2004). Puede que los niveles de PR1 de *esh1* no sean suficientes para recuperar la resistencia frente a esta estirpe. Como se comentó en el apartado anterior en *NahG* no sólo está afectado el nivel de PR1 sino que también está alterado el de otras proteínas de resistencia. Podría suceder también que la susceptibilidad a la estirpe *Pto (avrRpt2)* podría verse afectada por la presencia de catecol, al igual que sucedía con la resistencia frente a *P.s. pv. phaseolicola*.

4.1.3. Cartografiado del mutante *esh1*

El proceso de mapeo se realizó cruzando el mutante *esh1* con *Laer-0* y obteniendo una población segregante F2. La frecuencia de presuntos recombinantes obtenida fue muy baja, aproximadamente de 3 por cada 100 plantas de F2 (lo que podría indicar una posible interacción con *Laer-0*). Analizando 30 cromosomas de plantas confirmadas en F3 se determinó la posición de mapeo en el cromosoma 4, en un intervalo de aprox. 2,4 Mb (Figura 30) en el que abundan los genes relacionados con defensa (<http://www.arabidopsis.org>) entre ellos genes del tipo NBS-LRR. La sobreexpresión de genes R del tipo NBS-LRR como en el caso del gen *bal1* (Stokes *et al.* 2002) o en el de *adr1* (Grant *et al.* 2003) también provocan fenotipos de plantas pequeñas y abigarradas muy parecidas al mutante *esh1*. Estas además presentan un mayor nivel de resistencia frente a infecciones con *Pto*. La desregulación de este tipo de genes puede dar lugar a mutantes con fenotipos similares a *esh1*. En este cluster se encuentra el gen *bal-1*, que posee un fenotipo de enanismo y abigarramiento de hojas similar a *esh1* y que además es también capaz de suprimir el fenotipo de susceptibilidad a *Pto* de *NahG* (Stokes *et al.* 2002).

Finalmente, dada la baja frecuencia de recombinantes, y la elevada posibilidad de que se tratase de nuevo de una desregulación de un gen *R*, se dio prioridad al otro supresor, que se describe a continuación.

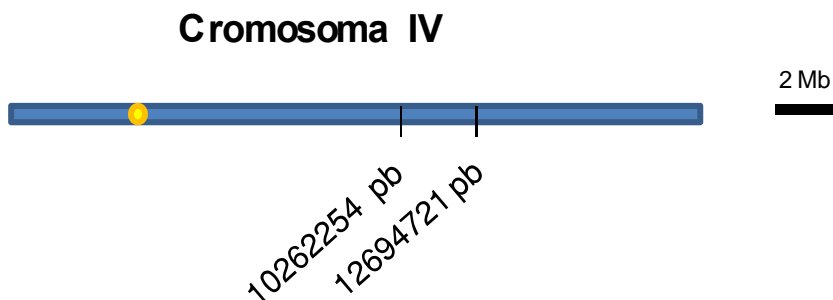


Figura 30. Cartografiado mediante posición en mapa de *esh1*.

El mutante *esh1* mapea en un área de aprox. 2,4 Mb en el cromosoma IV. Se muestra la posición en dicho cromosoma de la región de mapeo y la posición relativa de los marcadores utilizados.

4.2. Caracterización del mutante *jrc1*

El mutante *sls13/jrc1* es un supresor extragénico de carácter recesivo frente a Col-0 (Tabla 5) y también frente a Laer-0. El mutante *sls13/jrc1* posee un fenotipo macroscópico similar al silvestre *LRA5*. Como se ha comentado con anterioridad el doble *jrc1 LRA5* es resistente a *Pto* y además responde a la infección produciendo más PR1 que el control Col-0.

Debido al fenotipo descubierto en el mutante (que se describirá más adelante) y que lo relaciona con la hormona ácido jasmónico (JA) se nombró como *jrc1* (*JAROCKS 1*).

4.2.1. Fenotipo del mutante *jrc1* frente a patógenos biotrofos

Para comprobar el grado de supresión del fenotipo de susceptibilidad frente a otras estirpes de *Pseudomonas syringae* (para las que *LRA5* presenta fenotipo de susceptibilidad o resistencia) se realizaron nuevos experimentos. Estos experimentos con *Pseudomonas* comparten controles con los experimentos realizados para *esh1* con las mismas estirpes.

El mutante *jrc1* no es capaz de promover resistencia en el fondo *LRA5* frente a *P.s. pv. phaseolicola* (Figura 31A). De igual manera que en el caso del mutante *esh1*, la susceptibilidad que provoca la acumulación de catecol no es revertida por la presencia de *jrc1*.

Al contrario que el caso del mutante *esh1*, el mutante *jrc1* tampoco es capaz de revertir la susceptibilidad al *P.s. pv. tabaci* (Figura 31B). Aunque el mutante *jrc1* es capaz de inducir la producción de PR1 de manera efectiva tras la infección con *Pto*, incluso con una intensidad muy superior al control Col-0, parece que este hecho no es suficiente para obtener resistencia frente al patógeno. Entonces, podría suceder que la producción de PR1 no conlleve la resistencia a esta estirpe lo que indicaría que *esh1* es capaz de mostrar resistencia a *P.s. pv. tabaci* de manera independiente a la inducción de PR1.

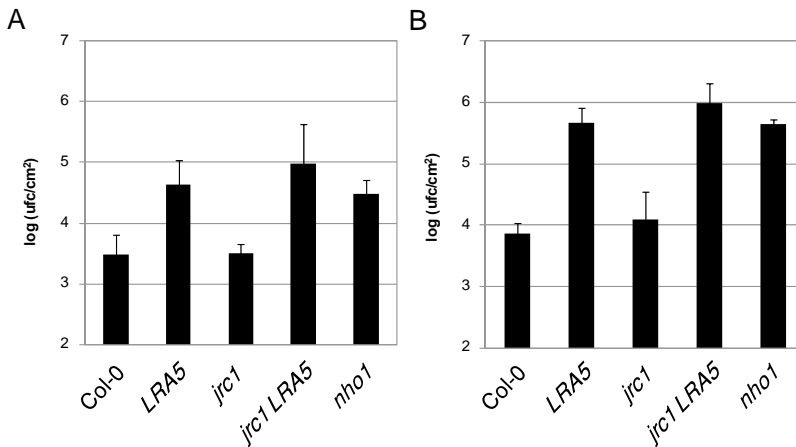


Figura 31. Comportamiento de *jrc1* frente a *P.s. pv. phaseolicola* y *P.s. pv. tabaci*. Inoculación de plantas de 4 semanas de edad de los genotipos Col-0, *LRA5*, *jrc1*, *jrc1 LRA5* y *nho1*. Las plantas fueron inoculadas mediante jeringuilla a una concentración de 10^6 ufc/mL de **A.** *P.s. pv. phaseolicola* o **B.** *P.s. pv. tabaci*. Las curvas fueron realizadas a los 3 d.p.i. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

Tras analizar el fenotipo de *jrc1* frente a patógenos inespecíficos de *Arabidopsis* se decidió comprobar el fenotipo frente a patógenos específicos. *LRA5* es susceptible a *Pto* (*avrRpt2*) y resistente a *Pto*

(*avrRpm1*). Aunque el mutante *jrc1* es al menos tan resistente como Col-0 (Figura 32), en el doble mutante *jrc1 LRA5* es prácticamente igual de susceptible que *LRA5* a ambos patógenos. Parece, por tanto, que la resistencia que el mutante *jrc1* induce frente a *Pto*, incluso en el fondo *LRA5*, es independiente de la resistencia que es necesaria frente a ambos patógenos específicos.

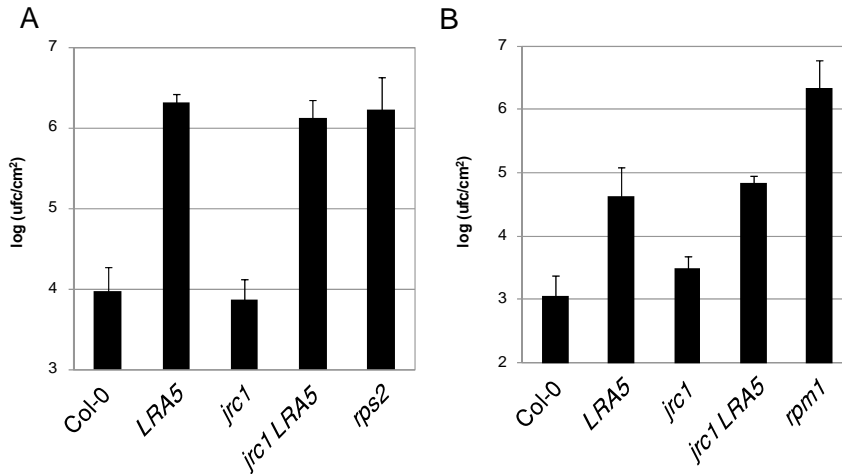


Figura 32. Comportamiento *jrc1* frente a patógenos específicos.

Inoculación de plantas de 4 semanas de edad de los genotipos Col-0, *LRA5*, *jrc1*, *jrc1 LRA5* y *rps2* (A) o *rpm1* (B). Las plantas fueron inoculadas mediante jeringuilla a una concentración de 10^6 ufc/mL de **A.** *Pto* (*avrRpt2*) o **B.** *Pto* (*avrRpm1*). El crecimiento bacteriano fue evaluado a los 3 d.p.i. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

4.2.2. Fenotipo del mutante *jrc1* frente a patógenos necrotrofos

Aunque las relaciones entre las hormonas SA y JA son complejas en el ámbito de la defensa frente a patógenos, en general se considera que la activación de una de las rutas tiene efectos inhibitorios sobre la otra y viceversa (Koornneef & Pieterse 2008). Así pues, una vez explorado el comportamiento del mutante *jrc1* frente a patógenos biotrofos, se quiso comprobar el fenotipo del mutante frente a patógenos necrotrofos. Para ello se realizaron una serie de experimentos con el patógeno necrotrofo *Plectosphaerella cucumerina* (Figura 33).

El mutante *jrc1* aislado o en el fondo *LRA5* es susceptible al hongo necrotrofo *P. cucumerina* (Figura 33). Cuando plantas de *jrc1* y *jrc1 LRA5* son inoculadas mediante gota de una suspensión de esporas del hongo y las plantas se dejan crecer en condiciones de alta humedad, el diámetro de la lesión causada por el hongo en ambos mutante es significativamente superior a la causada en los controles Col-0, *Ws-1* y *LRA5*.

Además, los mutantes *jrc1* y *jrc1 LRA5* son incapaces de frenar la infección causada por el hongo y tras dos semanas desde la inoculación las hojas inoculadas están totalmente muertas o muy afectadas (Figura 33B).

Que el mutante *jrc1* se vea afectado por patógenos necrotrofos puede indicar que está afectado en la ruta de defensa mediada por la hormona JA (Glazebrook 2005). Está descrito que mutantes susceptibles a hongos necrotrofos como *coi1* (Feys *et al.* 1994) son también insensibles a JA. Dado que esta hormona compromete el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* cuando se encuentra en el medio de crecimiento (Staswick *et al.* 1992) la insensibilidad se puede constatar cuando el mutante crece en placas suplementadas con metil-jasmonato (MeJA), derivado del JA que es efectivo incluso a bajas concentraciones (Staswick *et al.* 1992).

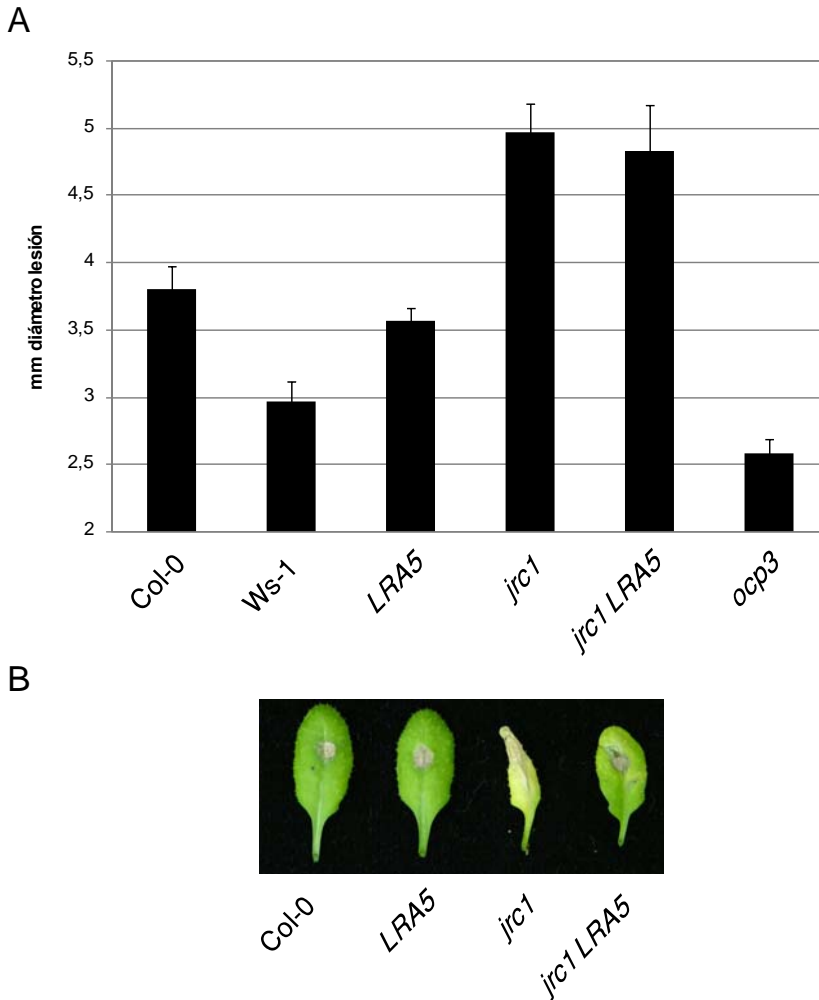


Figura 33. Comportamiento del mutante *jrc1* frente a *P. cucumerina*.

A. Plantas de 4 semanas fueron inoculadas mediante deposición de gota sobre la superficie de la hoja conteniendo una suspensión de $5 \cdot 10^6$ esporas/mL. Para el experimento se introdujeron como controles los ecotipos Col-0 y Ws-1, el mutante *LRA5* (que es el fondo del supresor *jrc1*) y el mutante *ocp3* que es resistente a *P. cucumerina* (Coego et al. 2005). El diámetro de las lesiones fue medido 7 días después. Un mínimo de 40 hojas fue contado para realizar la media. Las barras de error representan el error estándar de la media. El experimento fue repetido 2

veces. **B.** Imagen representativa de la propagación del hongo sobre la hoja en los controles Col-0, *LRA5* y los mutantes *jrc1* y *jrc1 LRA5* a los 14 dpi.

4.2.3. Caracterización del mutante *jrc1* frente a la hormona JA

4.2.3.1. Caracterización en medio de cultivo suplementado con JA

Para comprobar si *jrc1* era también insensible a JA se creció dicho mutante junto a los correspondientes controles en placas suplementadas con MeJA (Figura 34). El mutante *jrc1* es claramente insensible al JA; el crecimiento de *jrc1* en placas con MeJA revela que, aunque la raíz no alcanza los niveles de crecimiento de los mutantes control insensibles a MeJA *jin1* (*JASMONATE INSENSITIVE 1*), *jin4* (*JASMONATE INSENSITIVE 4*) y *coi1-1* (*CORONATINE INSENTIVE 1*), si que es superior a la del control silvestre Col-0 y *LRA5*. Cuando las longitudes de las raíces crecidas en MeJA se cuantificaron y se referenciaron a los valores de las raíces crecidas sin tratamiento alguno (Longitud relativa) los valores obtenidos para *jrc1* y *jrc1 LRA5* fueron intermedios entre los controles silvestres y los controles insensibles a MeJA (Figura 34B). La longitud relativa es útil para descartar que la diferencia observada en el medio con MeJA no es debida a un crecimiento exacerbado de la raíz en el medio control.

Además de poseer el fenotipo de longitud de raíz en placa suplementada con MeJA descrito, el mutante *jrc1* también presenta en esas condiciones una mayor densidad de raíces laterales (Figura 34A) que supera a la observada para la mayoría de los controles (sensibles o no a MeJA) estudiados. Para poder evaluar este fenotipo, las raíces de plantas de 20 días de edad (crecidas en medio con y sin MeJA) fueron desecadas y posteriormente fueron pesadas evaluándose el peso relativo de igual manera a como se procedió con la longitud relativa (Figura 35A). Se observó también que la parte aérea del mutante *jrc1* era de mayor tamaño que la de los controles *jin1* y *jin4* y se decidió entonces evaluar el peso relativo por el mismo método descrito (Figura 35B).

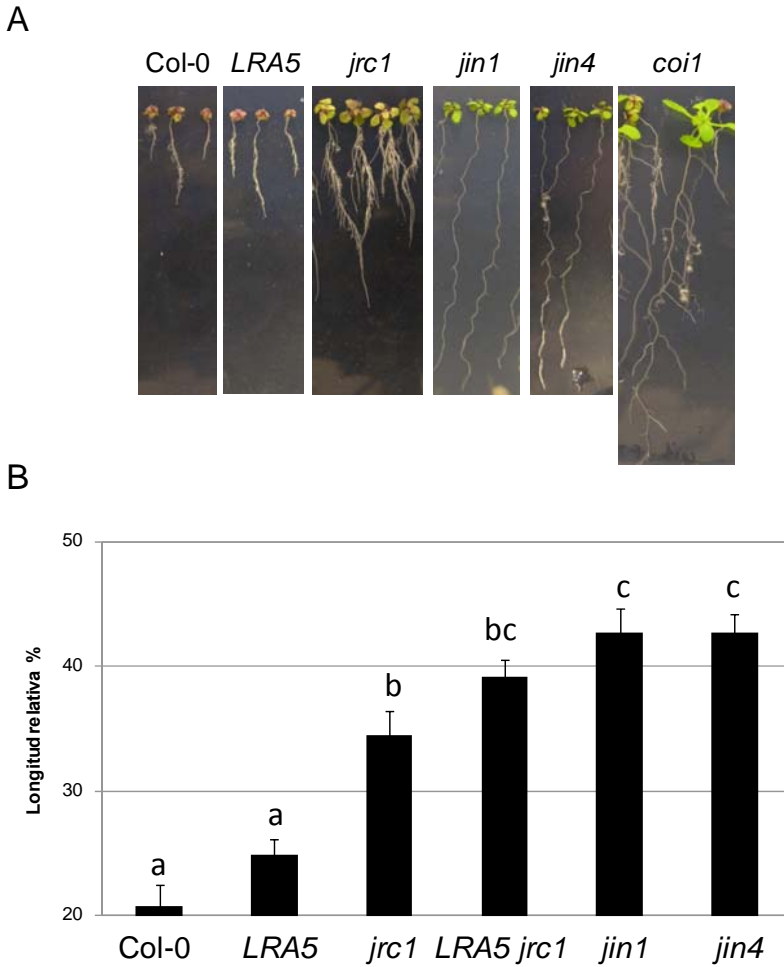


Figura 34. Fenotipo del mutante *jrc1* en placas suplementadas con MeJA.

Fenotipo obtenido en placas de medio Jonhson (Johnson *et al.* 1957) suplementadas con MeJA 50 μ M.

A. Imágenes obtenidas de los genotipos Col-0, *LRA5*, *jrc1*, *jin1*, *jin4* y *coi1* crecidos en placas de MeJA durante 20 días. Todas las imágenes son comparables entre si y corresponden a un mismo experimento.

B. Longitud relativa de la raíz (obtenida entre la medida de la longitud con y sin MeJA) expresada como porcentaje, de los genotipos Col-0, *LRA5*, *jrc1*, *jrc1 LRA5*, *jin1* y *jin4*. Las mediciones se realizaron en plantas de 10 días de edad.

El mutante *jrc1* presenta mayor peso relativo de la raíz que el resto de controles testados, excepto *coi1* (Figura 35A). No obstante, la longitud de la raíz principal de *coi1* en medio con MeJA puede duplicar la longitud de la raíz principal de *jrc1* crecido en el mismo medio (datos no mostrados). Por tanto no se puede correlacionar la similitud de peso de ambos a poseer igual número de raíces secundarias. Aún así, en el caso de *jin1* y *jin4* la raíz principal también es más larga que en el mutante *jrc1* (Figura 35) pero pese a ello, el peso de las raíces de estos mutantes es casi la mitad del peso de la raíz de *jrc1*.

Las proteínas JAZ (que poseen el dominio JASMONATE-Zim) están involucradas en la señalización por JA. Estas proteínas son represoras de los genes de respuesta a JA y tras la aplicación de jasmonatos son diana del complejo SCF^{COI} para su degradación vía proteasoma (Chini *et al.* 2007). No obstante, la expresión de *JAZ1/TIFY10A* no sólo se induce por JA sino que también lo hace por auxinas involucrándolo de manera consistente en el desarrollo radicular (Grunewald *et al.* 2009). Paradójicamente las líneas KOs de *JAZ1/TIFY10A* mostraron una inhibición del crecimiento de la raíz principal en medio suplementado con MeJA y sin embargo el número de raíces laterales aumentó de manera muy significativa (Grunewald *et al.* 2009). En el caso del mutante *jrc1* suceden ambos hechos a la vez, no sólo la raíz es más larga sino que además posee mayor número de raíces laterales. Curiosamente en un experimento preliminar en placa suplementada con 2,4-D (análogo químico de las auxinas) no se encontró ningún fenotipo interesante en *jrc1* (datos no mostrados).

También se puede apreciar en la Figura 35 como el peso relativo de la parte aérea en el mutante *jrc1* es superior al de los controles excepto para *sgt1b* y, nuevamente, para *coi1*. Probablemente en este caso el mayor peso de la parte aérea en *jrc1* se deba a la mayor cantidad de raíces laterales lo que permitiría que la planta pudiera absorber mayor cantidad de nutrientes y alcanzar mayor desarrollo. Esta hipótesis podría verse reforzada por el comportamiento de *jin1* y *jin4*, que pese a ser insensibles cuando son crecidos en MeJA, tienen un tamaño de parte aérea muy inferior que se correlacionaría con una menor cantidad de raíces laterales.

El fenotipo de mayor peso relativo en la parte aérea del mutante *jrc1* va acompañado también de un mayor tamaño, de tal manera que, a parte de la longitud de raíz, esta característica fenotípica puede ser utilizada para

recuperar plantas *jrc1* en placas suplementadas con MeJA (Figura 35C, F2 segregante obtenida entre Col-0 y *jrc1*).

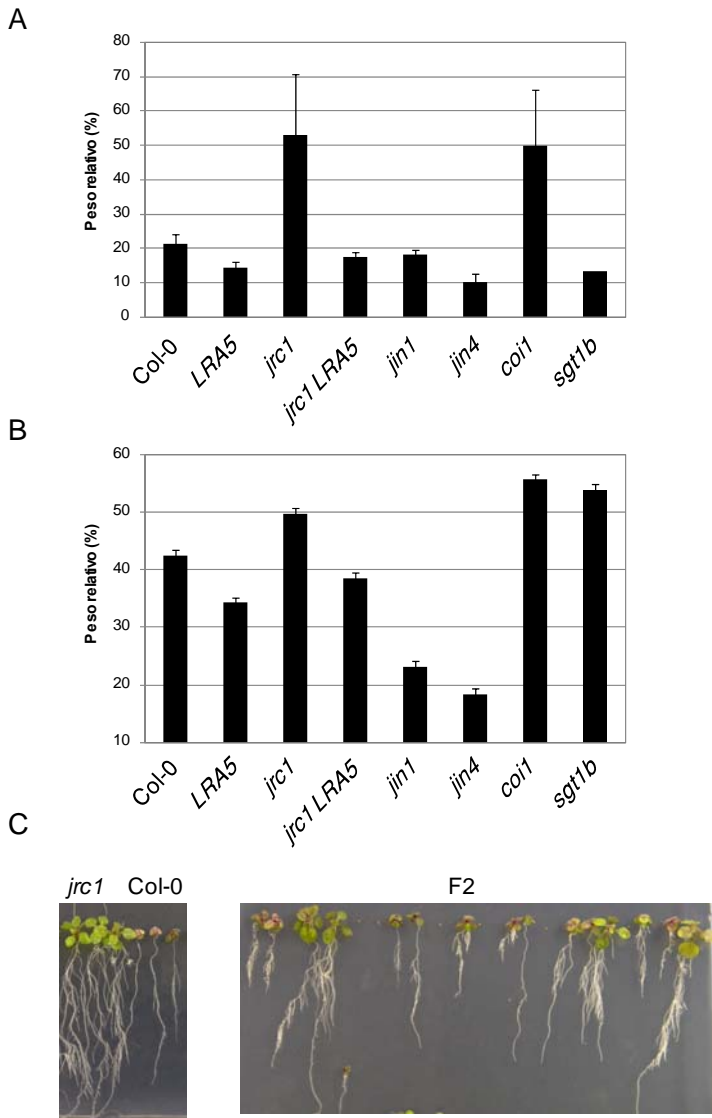


Figura 35. Mediciones de peso seco de raíz y parte aérea del mutante *jrc1*.

Plantas de los genotipos Col-0, *LRA5*, *jrc1*, *jrc1 LRA5*, *jin1*, *jin4*, *coi1-1* y *sgt1b* fueron crecidas en placas suplementada sin y con 50 μ M de MeJA. A los 17 días las plantas fueron rescatadas, se separaron la parte aérea de la raíz y ambas fueron desecadas a 65°C durante 72h para evaluar únicamente el peso seco. Los resultados se presentan en la gráfica A. para la raíz y B. para la parte aérea representándose en ambos el peso relativo.

C. Segunda generación filial (F2) entre *jrc1* y Col-0. Obsérvese la cosegregación entre los fenotipos de parte aérea grande y mayor cantidad de raíces laterales.

Los experimentos fueron repetidos al menos 2 veces con similares resultados

4.2.3.2. Comportamiento frente a respuestas patogénicas específicas de JA y coronatina

Una vez determinada la insensibilidad del mutante *jrc1* al JA y la susceptibilidad a hongos necrotrofos se realizaron nuevos experimentos para confirmar fenotipos patogénicos que generalmente van asociados con el fenotipo de insensibilidad.

Pese a que el JA es un inhibidor de la resistencia mediada por el SA (Niki *et al.* 1998) la aplicación exógena de JA a plantas de Arabidopsis, previamente a su inoculación con *Pto*, induce un mecanismo de resistencia, mejorando incluso la resistencia en genotipos ya resistentes al patógeno (Truman *et al.* 2007). Se propuso determinar cual sería la respuesta a la inoculación con *Pto* tras la aplicación exógena de JA (Figura 36A). Mientras que Col-0 y *LRA5* son capaces de responder a la aplicación de JA con inducción de resistencia frente a *Pto*, los mutantes *jrc1*, *jrc1 LRA5* y *jin1* son insensibles a la aplicación y la resistencia a *Pto* es similar ya sea pretratando con o sin MeJA. Entonces la insensibilidad no sólo se manifiesta cuando el MeJA es aplicado en el medio de cultivo sino también cuando se aplica de manera exógena a la parte aérea.

La señal basada en JA podría contribuir a la inmunidad sistémica SAR antes de la acumulación sistémica de SA (Truman *et al.* 2007). La incapacidad de los mutantes *jrc1* y *jrc1LRA5* de responder a la aplicación de JA podría causar un problema en el establecimiento de SAR, ya que se ha descrito que mutantes en la ruta de síntesis del JA como *opr3* (*OPDA REDUCTASE 3*) o factores de transcripción inducidos por jasmonatos como *jin1* son incapaces de mostrar SAR tras la preinoculación con *Pto* (*avrRpm1*) (Truman *et al.* 2007). Sin embargo, recientes estudios sobre el mecanismo de SAR y mutantes en la producción y señalización por JA han mostrado

resultados opuestos (Attaran *et al.* 2009), justificando los resultados expuestos en (Truman *et al.* 2007) por un problema de dosis en la inducción de SAR. En los experimentos realizados en esta tesis, el mutante *jrc1* y el mutante *jrc1 LRA5* también son incapaces de producir SAR a pesar de la preinoculación con *Pto* (*avrRpm1*) (Figura 36B). Extrañamente en estos mutantes no sólo no crece menos *Pto* en las plantas preinoculadas con *Pto* (*avrRpm1*) sino que lo hace más. Parece, por tanto, que la preinoculación con *Pto* (*avrRpm1*) ha inducido sensibilidad en vez de resistencia frente a una infección posterior con *Pto*. Aún así no es la primera vez que se observa que una preinmunización desencadene susceptibilidad, la preinmunización con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* provoca mayor susceptibilidad a posteriores inoculaciones con la misma bacteria (Cui *et al.* 2005). Además la preinmunización con *Pto* provoca mayor susceptibilidad a un herbívoro. (Truman *et al.* 2007).

Por último también se quiso comprobar la respuesta diferencial del mutante *jrc1* frente a estirpes de *Pseudomonas* que producen y no producen coronatina. La coronatina es un metabolito secundario producido por algunos patovares de *Pseudomonas syringae* y que actúa como fitotoxina inespecífica de la planta hospedadora (Ma *et al.* 1991). De hecho, la coronatina es utilizada por *Pseudomonas* como factor de virulencia para suprimir la defensa estomática de *Arabidopsis* (Melotto *et al.* 2006). La coronatina parece actuar suplantando al precursor activo OPDA (jasmonato del ácido 12-oxo-fitodienoico) del JA y su similitud estructural permite encontrar mutantes afectados en la ruta de JA rastreando para mutantes insensibles a coronatina, como en el caso de *coi1-1* (Feys *et al.* 1994). Mutantes insensibles a JA como *jin1* son también insensibles a estirpes que expresan coronatina, mientras que otros como *jar1* (JASMONATE RESISTANT 1) responden de manera silvestre (Laurie-Berry *et al.* 2006). Al igual que el mutante *jin1*, los mutantes *jrc1* y *jrc1 LRA5* son insensibles a coronatina (Figura 36C).

Sin embargo, el crecimiento en estos tres mutantes de la estirpe sin coronatina es superior al del control Col-0 y próximo al de *LRA5*. En un estudio realizado sobre 95 estirpes de *Pseudomonas syringae* se encontró que menos del 40% produce algún tipo de toxina. De hecho, tan sólo 14 producen coronatina y sólo dos de ellas producen otra toxina adicional (Hwang *et al.* 2005). Por tanto la producción de coronatina y otras toxinas parece suponer un gran coste para la bacteria. Probablemente este coste

inhiba la producción de otras toxinas o efectores que si pueden ser inducidos y expresados en las bacterias que no producen coronatina. Estos presuntos efectores podrían actuar como factores de virulencia y ser capaces de producir enfermedad en plantas afectadas en la respuesta defensiva mediada por JA pero no en plantas silvestres, donde quizá actuaran como factores de avirulencia.

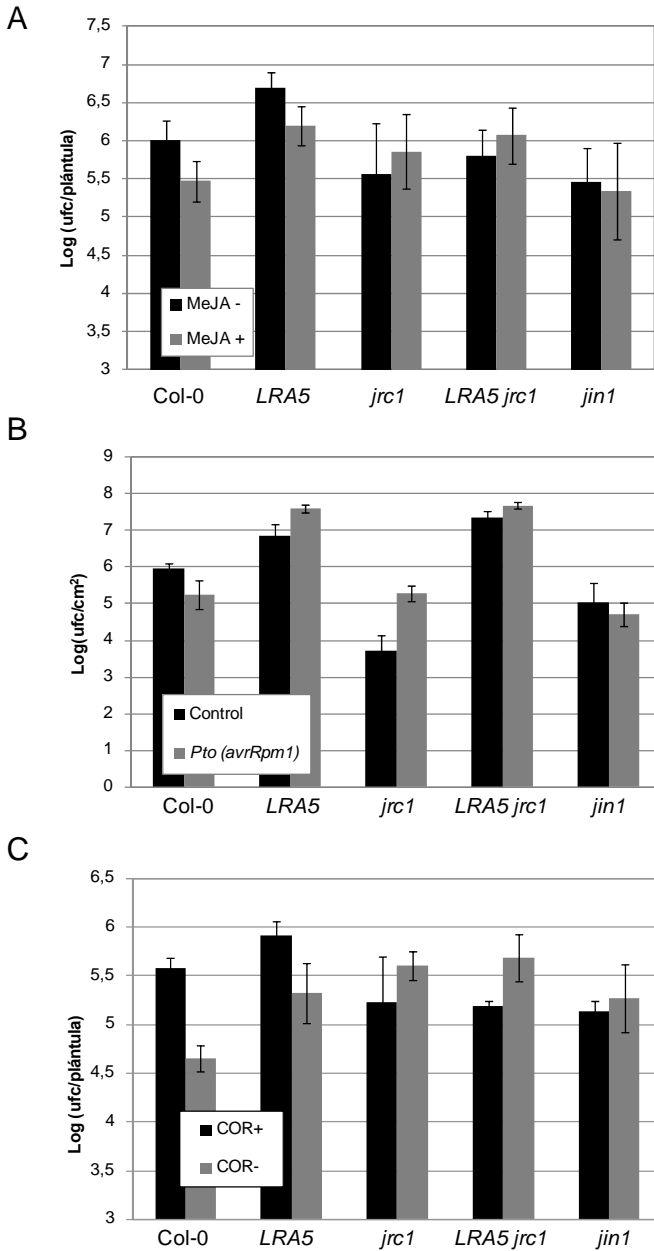


Figura 36. (Siguiete página) Respuesta de *jrc1* frente a MeJA, SAR y coronatina. Plantas de Col-0, *jrc1*, *jrc1 LRA5* y *jin1* fueron sometidas a tres tratamientos distintos:

A. 24 h antes de la inoculación con *Pto* $5 \cdot 10^7$ ufc/mL las plantas de 19 días fueron tratadas mediante un aerosol con una solución control compuesta de DMSO 0,1% (v/v) y Silwet 0,02% (v/v) o con metil-jasmonato (MeJa) a una concentración de 100 μ M en una solución de DMSO 0,1% (v/v) y Silwet 0,02% (v/v). Las curvas fueron realizadas a los 3 dpi.

B. Plantas de cuatro semanas fueron preinmunizadas inoculando mediante jeringuilla 3 hojas con una solución control con $MgCl_2$ o con *Pto* (*avrRpm1*) a $5 \cdot 10^5$ ufc/mL dos días antes de la inoculación mediante jeringuilla de 3 hojas sistémicas con *Pto* $5 \cdot 10^4$ ufc/mL. Los resultados fueron evaluados 3 dpi.

C. Plantas de 19 días fueron inoculadas mediante aerosol con dos estirpes de *Pto*, una que produce coronatina (COR+) y otra que no (COR-), a una concentración de $5 \cdot 10^7$ ufc/mL. Las plantas fueron analizadas 3 dpi.

Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

4.2.3.3. Respuesta del mutante *jrc1* a la aplicación de BTH

Por último, y una vez conocida la incapacidad del mutante *jrc1* para inducir la respuesta SAR, se quiso comprobar la respuesta del mutante a la pérdida de peso que provoca la aplicación de BTH, que como se vio en el Capítulo I (Apartado 2.5) es un potente inductor de dicha respuesta incluso en plantas con niveles muy bajos de SA como el mutante *LRA5*. La aplicación repetida de BTH induce en las plantas pérdida de peso, excepto en mutantes incapaces de mostrar SAR como *npr1* que es insensible al tratamiento con BTH (Cao *et al.* 1997). Probablemente este hecho este relacionado más con una restricción de nutrientes al patógeno que con el gasto energético derivado de la activación de los mecanismos de resistencia (Canet *et al.* 2010). Estudios previos han demostrado que la aplicación de SA o BTH puede suprimir las respuestas dependientes del JA en *Arabidopsis* (van Wees *et al.* 1999). Los mutantes en la ruta del JA son capaces de responder igual o mejor a la aplicación de BTH que Col-0 (Canet *et al.* 2010). Este es, además, el caso del mutante *jrc1* (Figura 37). Se puede observar que la sensibilidad mostrada frente al BTH es mayor que la encontrada en el control Col-0. Esta mayor respuesta indicaría que la insensibilidad al JA provoca una mayor sensibilidad al SA (o en este caso a su análogo BTH), resultado que encajaría con la mayor producción de la

proteína PR1 en *jrc1* con respecto a Col-0 observada tras la inoculación con *Pto* (Apartado 4 Figura 24).

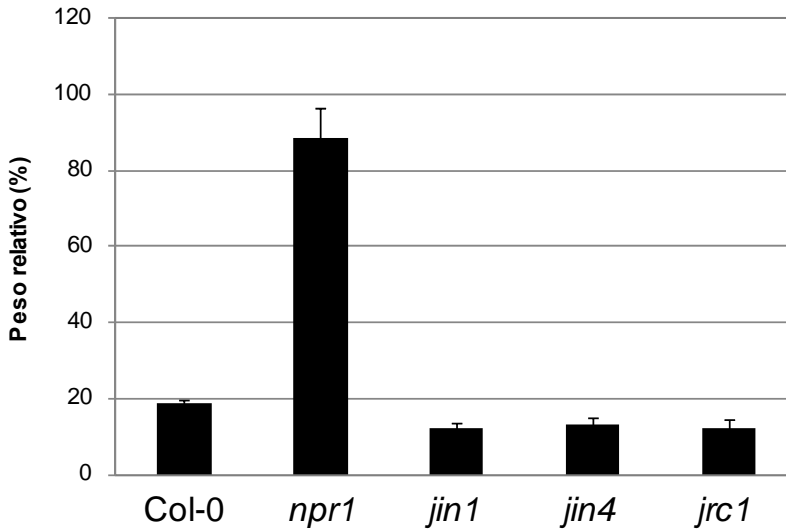


Figura 37. Sensibilidad del mutante *jrc1* a la aplicación de BTH. Plantas de *Arabidopsis* fueron tratadas 4 veces con BTH (a la edad de 8, 11, 15 y 18 días) a una concentración de 350 μ M y la pérdida de peso frente a un tratamiento control fue analizada a la edad de 21 días. Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas. Experimento repetido al menos 3 veces con resultados similares.

4.2.4. Cartografiado del mutante *jrc1*

Una vez que se consideró de interés el fenotipo del mutante se comenzó el mapeo para localizar la posible lesión en el genoma de *jrc1*. Para ello el supresor original en fondo *LRA5* fue cruzado por *Laer-0* y la segunda generación filial (F2) fue analizada en placas de medio Johnson suplementadas con 50 μ M de MeJA. Las plantas se seleccionaron por fenotipo de parte aérea grande acompañado de

fenotipo de raíz insensible y gran cantidad de raíces laterales. Las plantas seleccionadas en F2 como presuntas homocigotas *jrc1* fueron testadas en F3 nuevamente en placas de composición similar e iguales condiciones ambientales de cultivo *in vitro*. Se analizaron 40 plantas que determinaron un intervalo de mapeo en el cromosoma II de aprox. 5,09 Mb entre los marcadores C2-12916335 y BIO2 (Figura 38A). Este fragmento incluye parcialmente un área Ws-1 donde se encuentra el transgén *LRA5* y también, con mayor importancia, el gen indispensable para la señalización por JA *COI1*. Aunque algunas de las características del mutante *jrc1* discrepan con la posibilidad de que este sea *COI1*, se realizó el cruce entre *jrc1* y *coi1-1* y se analizó el fenotipo de la F1 en placas suplementadas con JA (Figura 38B). Las plantas F1 mostraron el fenotipo del parental *jrc1*, lo que indicaría que en caso de ser *COI1* el alelo *jrc1* sería dominante sobre el alelo *coi1-1*. También cabe la posibilidad de que sean mutaciones distintas pero que una única copia de ambas sea suficiente para mostrar el fenotipo de insensibilidad a JA. Por último también es posible (aunque poco probable) que la mutación encontrada no este relacionada realmente con el fenotipo estudiado a falta de una prueba de complementación que por falta de tiempo escapa del dominio de esta tesis.

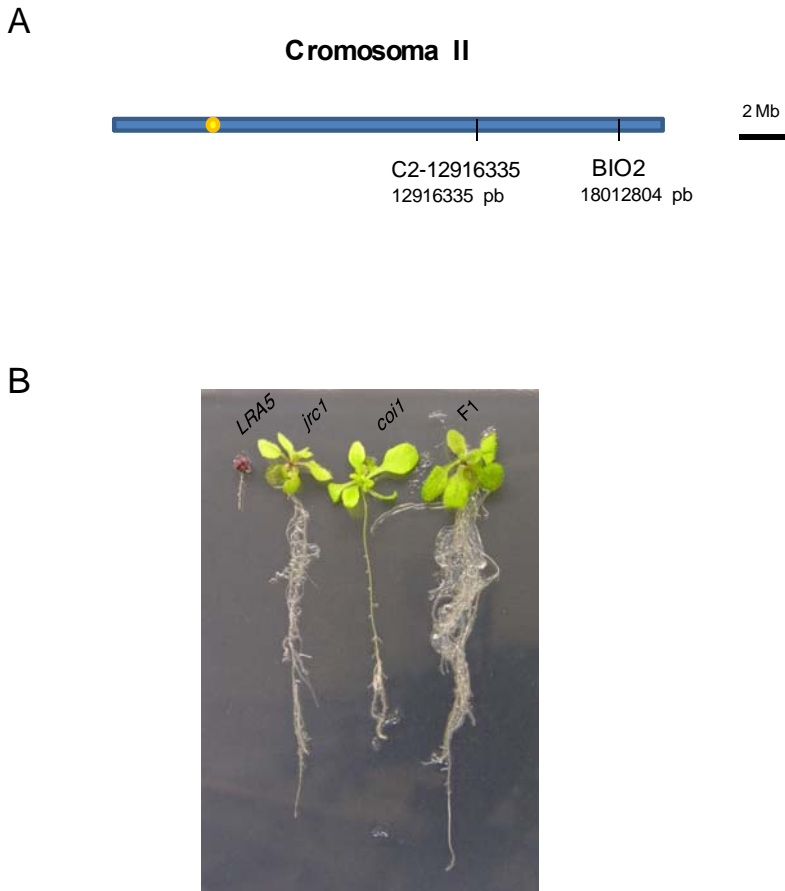


Figura 38. Cartografiado mediante posición de mapa de *jrc1* y fenotipo de F1 de con *coi1-1*.

A. Posición de mapa del mutante *jrc1* en el cromosoma 2. **B.** Fenotipo de la F1 entre *jrc1* y *coi1-1* en placa suplementada con 50 μ M. Plantulas de 18 días de edad.

La secuenciación del gen *COI1* en el mutante *LRA5* reveló un cambio en la secuencia que afecta al aminoácido 22 (Figura 39C), en el que se produce la sustitución de ácido glutámico (E) por lisina (K), que supone el cambio de un aminoácido con carácter ácido por un aminoácido con carácter básico. Este cambio además está encuadrado en el dominio F-box de la proteína

(Figura 39D). Posteriormente se comprobó que la falta de complementación se extendía a la población F2 (datos no mostrados) por lo que se renombró *jrc1* como *coi1-40*.

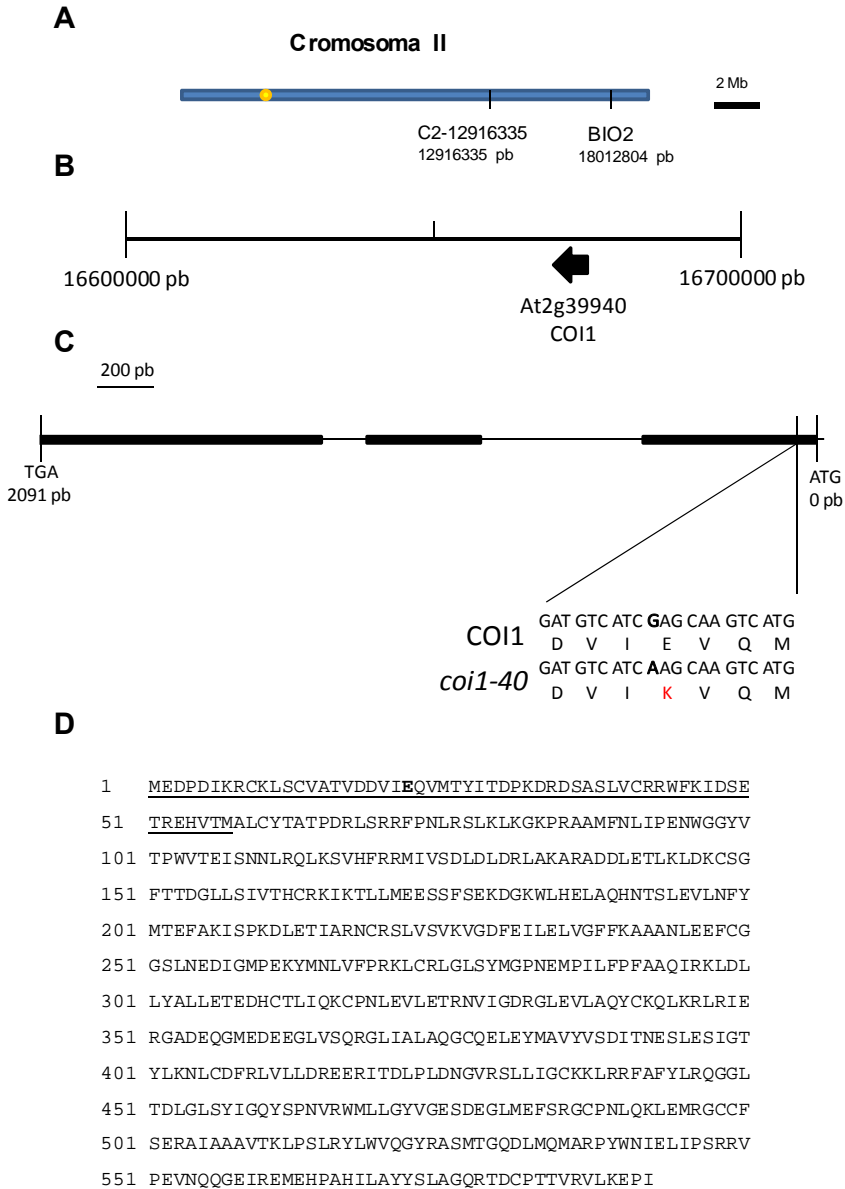


Figura 39. Representación de la lesión de *jrc1* en *COI1*

A. Intervalo de mapeo en el cromosoma II. **B.** Posición de *COI1* dentro del intervalo de mapeo. **C.** Posición de la lesión en *COI1*. Se puede observar el cambio en la secuencia (G por A) que se traduce en un cambio de E (ácido glutámico) por K (lisina). **D.** Secuencia completa de *COI1* donde esta subrayado el dominio F-Box y donde esta situado el aminoácido alterado (en negrita) dentro de dicho dominio.

COI1 interacciona con las proteínas ASK1, CUL1 y RBX1 para formar el complejo SCF^{COI1}. Este complejo está implicado en la degradación de proteínas por ubiquitinación. En este proceso, el complejo SCF^{COI1} tiene la función de ligar a la proteína diana la ubiquitina (que ha sido activada en secuencias enzimáticas anteriores) y por ello también es denominado complejo E3 ubiquitin ligasa. Esta proteína así marcada será sustrato para la maquinaria de degradación, con frecuencia realizada por el proteasoma 26S. En cualquier caso, la especificidad del sistema de degradación viene determinada por el dominio F-Box de *COI1*. Una sustitución de ácido glutámico (Glu) por alanina (Ala) también en el aminoácido 22 altera el complejo SCF^{COI1} y simultáneamente suprime la respuesta a JA en una línea transgénica (Xu *et al.* 2002). El análisis funcional del *COI1*_{E22A} mostró que las plantas eran resistentes a JA, deficientes en la producción viable de granos de polen y semillas e incapaces de expresar genes inducibles por JA como *PDF1.2* (Xu *et al.* 2002). El fenotipo de raíces laterales de *jrc1/coi1-40* no aparece descrito en este artículo. Desgraciadamente estas semillas ya no están disponibles (comunicación personal del Dr. Xie). El desarrollo de raíces laterales viene determinado por la distribución de auxinas de manera basipétala en la raíz y acropétala en la hoja (Casimiro *et al.* 2001). De hecho, estudios fisiológicos han indicado que la aplicación de auxinas estimula la formación de raíces laterales (Celenza *et al.* 1995) mientras que la aplicación de inhibidores del transporte polar de auxinas previene la formación de las mismas (Casimiro *et al.* 2001; Himanen *et al.* 2002). Algunos mutantes en componentes de la maquinaria SCF^{COI1} han mostrado tener fenotipos relacionados con respuestas a auxinas. Mutantes descritos para CUL1, como *cul1-7*, han demostrado tener respuestas alteradas a auxinas, entre otras hormonas (Gilkerson *et al.* 2009). Otros mutantes para el mismo gen, *axr6-1*, *axr6-2* y *axr6-3*, muestran fenotipos relacionados con auxinas que son el resultado de cambios en CUL1 que interfieren con el ensamblaje activo del complejo SCF (Gilkerson *et al.* 2009; Quint *et al.* 2005; Ren *et al.* 2005).

Los complejos E3 basados en CUL están regulados así mismo por otra proteína denominada RUB, cuya conjugación es dependiente de AXR1. La supresión de esta última da como resultado la aparición de varios fenotipos relacionados con hormonas, como la alteración de la longitud de raíces en experimentos de JA (Tiryaki & Staswick 2002).

Por otro lado, se ha descrito la función del gen *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE α 1*), que codifica para una proteína implicada con la biosíntesis de auxinas, en la inducción de raíces laterales en presencia de JA (Sun *et al.* 2009). Al parecer, este gen es inducido también en caso de herida e infección patogénica (Niyogi & Fink 1992). Análisis de expresión han mostrado que la expresión de *ASA1* es dependiente de *COI1* en la medida en que mutantes *coi1-1* presentan niveles de expresión de *ASA1* indetectables tras la aplicación de MeJA. Finalmente *ASA1* podría actuar como nodo de integración a través del cual el JA ejerce su efecto en la biosíntesis de auxinas regulando de esta manera la formación de raíces laterales.

Por tanto, el fenotipo observado en *coi1-40* podría deberse a alteraciones relacionadas con los niveles de auxinas debidas, probablemente, a perturbaciones en el ensamblaje del complejo SCF^{COI1} y/o a alteraciones en la expresión del gen *ASA1*.

El mutante *coi1-40* comparte varias características con el alelo *coi1-20* (Kloek *et al.* 2001). Este mutante también es resistente a *Pto*, no obstante el doble mutante *coi1-20 NahG* es igual de susceptible que *NahG*, en inoculaciones de plantas de 4-5 semanas de edad. Además, este mutante también induce un fuerte aumento de PR1 tras la inoculación con la misma estirpe, aunque no expresa esta proteína de manera constitutiva (Kloek *et al.* 2001). Sin embargo existe una diferencia fundamental: el mutante *coi1-20* es estéril y para la obtención de semillas requiere mantenerse en heterocigosis, mientras que el alelo *coi1-40* que se ha descrito en esta tesis es fértil.

Así pues, *coi1-40* es un alelo nuevo de *COI1*, que presenta las principales características de algunos mutantes para este gen (susceptibilidad a necrotrofos, insensibilidad a JA y coronatina, supresión de respuesta SAR), pero posee características nuevas como la mayor cantidad de raíces laterales o la fertilidad silvestre. Aunque todavía se han de hacer experimentos para comprobar el mecanismo molecular de los fenotipos producidos por *coi1-40*, se especula que la mutación E22K en *COI1* produce una insensibilidad parcial al JA. De esta forma, los procesos que requieren un nivel bajo de JA como formación del polen no se ven afectados,

mientras que los procesos que requieren un nivel de JA por encima de un umbral, como inducción de defensa frente a patógenos necrotrofos, no funcionarían correctamente. La desregulación en la producción de raíces podría deberse a la inducción del gen *ASA1* en un contexto en que los niveles de JA inducen un cierto nivel de señalización por auxinas.

Conclusiones

Conclusiones

- *LRA5* es una planta transgénica para un gen *NahG* de origen desconocido.
- El rastreo de mutantes supresores de *LRA5* dio como resultado la obtención de 12 mutantes con carácter intragénico y 28 mutantes con carácter extragénico.
- Los supresores intragénicos de *LRA5* son capaces de restaurar, al menos en parte, la resistencia de *LRA5* a niveles silvestres.
- *esh1* es un mutante extragénico con fenotipo macroscópico de silicuas agrupadas en los extremos de las inflorescencias que es dependiente del número de horas de luz del día.
- *esh1* expresa de manera constitutiva PR1, y es capaz de revertir la susceptibilidad de *LRA5* frente a *Pto* y *P.s. pv. tabaci*.
- *jrc1* es un supresor extragénico de *LRA5*.
- *jrc1* expresa exacerbadamente PR1 como respuesta al ataque patogénico, y es capaz de revertir la susceptibilidad de *LRA5* a *Pto* pero no a *P.s. pv. tabaci*.
- *jrc1* es insensible a JA, a coronatina y se muestra incapaz de desarrollar la respuesta SAR.
- *jrc1* presenta fenotipo de crecimiento de raíz y mayor número de raíces laterales que sus controles silvestres y *LRA5* cuando es crecido en placas de cultivo con medio suplementado con MeJA.
- *jrc1* no complementa a *coi1-1* en F1, siendo un alelo de *COI1* por un cambio de ácido glutámico por lisina en el amino ácido 22.
- Este cambio afecta al dominio F-Box de la proteína que podría afectar a la formación del complejo SCF^{COI1}.

Bibliografía

- Aarts N., Metz M., Holub E., Staskawicz B.J., Daniels M.J. and Parker J.E., 1998. Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene mediated signalling pathways in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10306-11.
- Abramovitch R.B. and Martin G.B., 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 356-64.
- Ade J., DeYoung B.J., Golstein C. and Innes R.W., 2007. Indirect activation of a plant nucleotide binding site leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 2531-6.
- Adie B.A.T., Perez-Perez J., Perez-Perez M.M., Godoy M., Sanchez-Serrano J.-J., Schmelz E.A. and 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.
- Agorio A. and Vera P., 2007. ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 3778-90. Epub 2007 Nov 9.
- Alfano J.R. and Collmer A., 2004. TYPE III SECRETION SYSTEM EFFECTOR PROTEINS: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 385-414.
- Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S. and Ecker J.R., 1999. EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis. *Science*, 284, 2148-52.
- Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.J., Ishikawa A., Dixon R.A. and Lamb C., 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92, 773-84.
- Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R. and Kazan K., 2004. Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 16, 3460-79.

- Apel K. and Hirt H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-99.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.-L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M. and Sheen J., 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, 415, 977-83.
- Attaran E., Zeier T.E., Griebel T. and Zeier J., 2009. Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling Are Not Essential for Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 21, 954-71.
- Austin M.J., Muskett P.J., Kahn K., Feys B.J., Jones J.D.G. and Parker J.E., 2002. Regulatory role of *SGT1* in early R-mediated plant defenses. *Science*, 295, 2077-80.
- Axtell M.J. and Staskawicz B.J., 2003. Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell*, 112, 369-77.
- Azevedo C., Sadanandom A., Kitigawa K., Freialdenhoven A., Shirasu K. and Schulze-Lefert P., 2002. The RAR1 interactor SGT1 is an essential component of R-gene triggered disease resistance. *Science*, 295, 2073-6.
- Bai F. and DeMason D.A., 2008. Hormone interactions and regulation of PsPK2::GUS compared with DR5::GUS and PID::GUS in Arabidopsis thaliana. *Am. J. Bot.*, 95, 133-45.
- Bechinger C., Giebel K.-F., Schnell M., Leiderer P., Deising H.B. and Bastmeyer M., 1999. Optical Measurements of Invasive Forces Exerted by Appressoria of a Plant Pathogenic Fungus. *Science*, 285, 1896-9.
- Bell C.J. and Ecker J.R., 1994. Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of Arabidopsis. *Genomics*, 19, 137-44.
- Bellés J.M., Garro R., Fayos J., Navarro P., Primo J. and Conejero V., 1999. Gentisic Acid As a Pathogen-Inducible Signal, Additional to Salicylic Acid for Activation of Plant Defenses in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 227-35.
- Bent A.F. and Mackey D., 2007a. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 399-436.

- Bent A.F. and Mackey D., 2007b. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*, 45, 399-436.
- Berrocal-Lobo M., Molina A. and Solano R., 2002. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J*, 29, 23-32.
- Bharathan G., Janssen B.J., Kellogg E.A. and Sinha N., 1999. Phylogenetic relationships and evolution of the KNOTTED class of plant homeodomain proteins. *Mol Biol Evol*, 16, 553-63.
- Bird A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396-8.
- Boller T., 1995. Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 189-214.
- Boller T. and Felix G., 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.
- Boller T. and He S.Y., 2009. Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, 324, 742-4.
- Bowling S.A., Clarke J.D., Liu Y., Klessig D.F. and Dong X., 1997a. The cpr5 mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependant and NPR1-independent resistance. *PLANT CELL*, 9, 1573 - 84.
- Bowling S.A., Clarke J.D., Liu Y., Klessig D.F. and Dong X., 1997b. The cpr5 Mutant of Arabidopsis Expresses Both NPR1-Dependent and NPR1-Independent Resistance. *PLANT CELL*, 9, 1573-84.
- Bowling S.A., Guo A., Cao H., Gordon A.S., Klessig D.F. and Dong X., 1994. A Mutation in Arabidopsis That Leads to Constitutive Expression of Systemic Acquired Resistance. *PLANT CELL*, 6, 1845-57.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.

- Brininstool G., Kasili R., Simmons L.A., Kirik V., Hulskamp M. and Larkin J., 2008. Constitutive Expressor of Pathogenesis-Related Genes5 affects cell wall biogenesis and trichome development. *BMC Plant Biology*, 8, 58.
- Browse J., 2009. Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
- Canet J.V., Dobón A., Ibáñez F., Perales L. and Tornero P., 2010. Resistance and biomass in Arabidopsis: a new model for Salicylic Acid perception. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 126-41.
- Cao H., Bowling S.A., Gordon A.S. and Dong X., 1994. Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *PLANT CELL*, 6, 1583-92.
- Cao H., Glazebrook J., Clarke J.D., Volko S. and Dong X., 1997. The Arabidopsis NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. 88, 57-63.
- Cao H., Li X. and Dong X., 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6531-6.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inze D., Sandberg G., Casero P.J. and Bennett M., 2001. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *PLANT CELL*, 13, 843-52.
- Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E. and Metraux J.-P., 2008. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, 582, 473-8.
- Celenza J.L., Grisafi P.L. and Fink G.R., 1995. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 9, 2131-42.
- Century K.S., Holub E.B. and Staskawicz B.J., 1995. NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6597-601.
- Clarke J.D., Aarts N., Feys B.J., Dong X. and Parker J.E., 2001. Constitutive disease resistance requires *EDS1* in the *Arabidopsis* mutants *cpr1* and *cpr6* and is partially *EDS1*-dependent in *cpr5*. *Plant J.*, 26, 409-20.
- Clarke J.D., Liu Y., Klessig D.F. and Dong X., 1998. Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: Characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *PLANT CELL*, 10, 557-69.
- Clarke J.D., Volko S.M., Ledford H., Ausubel F.M. and Dong X., 2000. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. *PLANT CELL*, 12, 2175-90.
- Clough S.J., Fengler K.A., Yu I.C., Lippok B., Smith R.K., Jr. and Bent A.F., 2000. The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9323-8.
- Coego A., Ramirez V., Gil M.J., Flors V., Mauch-Mani B. and Vera P., 2005. An *Arabidopsis* Homeodomain Transcription Factor, OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3, Mediates Resistance to Infection by Necrotrophic Pathogens. *PLANT CELL*, 17, 2123-37.
- Collins N.C., Thordal-Christensen H., Lipka V., Bau S., Kombrink E., Qiu J.-L., Huckelhoven R., Stein M., Freialdenhoven A., Somerville S.C. and Schulze-Lefert P., 2003. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 425, 973-7.
- Conrath U., Pieterse C.M. and Mauch-Mani B., 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 7, 210-6.
- Coppinger P., Repetti P.P., Day B., Dahlbeck D., Mehlert A. and Staskawicz B.J., 2004. Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 40, 225-37.
- Cornelis G.R., 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Micro*, 4, 811-25.

- Cui J., Bahrami A.K., Pringle E.G., Hernandez-Guzman G., Bender C.L., Pierce N.E. and Ausubel F.M., 2005. *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1791-6.
- Cuppels D.A., 1986. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 323-7.
- Chan S.W.L., Henderson I.R. and Jacobsen S.E., 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 6, 351-60.
- Chandra-Shekara A.C., Venugopal S.C., Barman S.R., Kachroo A. and Kachroo P., 2007. Plastidial fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 7277-82.
- Chen Z., Kloek A.P., Boch J., Katagiri F. and Kunkel B.N., 2000. The *Pseudomonas syringae* *avrRpt2* gene product promotes pathogenicity from inside the plant cell. *Mol. Plant Pathol.*, 13, 1312-21.
- Chen Z., P. Kloek A., Cuzick A., Moeder W., Tang D., W. Innes R., Klessig D.F., McDowell J.M. and Kunkel B.N., 2004. The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 functions downstream or independently of SA to promote virulence on *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 37, 494-504.
- Chini A., Fonseca S., Chico J., M. , Fernández-Calvo P. and Solano R., 2009. The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *The Plant Journal*, 59, 77-87.
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J.M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L. and Solano R., 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448, 666-71.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B.J., 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124, 803-14.

- Chisholm S.T., Dahlbeck D., Krishnamurthy N., Day B., Sjolander K. and Staskawicz B.J., 2005. Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2087-92.
- Chung H.S. and Howe G.A., 2009. A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 21, 131-45.
- Chung H.S., Koo A.J.K., Gao X., Jayanty S., Thines B., Jones A.D. and Howe G.A., 2008. Regulation and Function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-Domain Genes in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiol.*, 146, 952-64.
- Dangl J.L. and Jones J.D., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-33.
- Day B., Dahlbeck D. and Staskawicz B.J., 2006. NDR1 Interaction with RIN4 Mediates the Differential Activation of Multiple Disease Resistance Pathways in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 18, 2782-91.
- De Paepe A., Vuylsteke M., Van Hummelen P., Zabeau M. and Van Der Straeten D., 2004. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 39, 537-59.
- Delaney T., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessman H., Ward E. and Ryals J., 1994a. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266, 1247-50.
- Delaney T.P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E. and Ryals J., 1994b. A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science*, 266, 1247-50.
- Dempsey D.M.A. and Klessig D.F., 1994. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol.*, 4.
- Deng W.-L., Preston G., Collmer A., Chang C.-J. and Huang H.-C., 1998. Characterization of the hrpC and hrpRS Operons of *Pseudomonas syringae* Pathovars *Syringae*, Tomato, and

- Glycinea and Analysis of the Ability of hrpF, hrpG, hrcC, hrpT, and hrpV Mutants To Elicit the Hypersensitive Response and Disease in Plants. *J. Bacteriol.*, 180, 4523-31.
- Depuydt S., Dolezal K., Van Lijsebettens M., Moritz T., Holsters M. and Vereecke D., 2008. Modulation of the Hormone Setting by *Rhodococcus fascians* Results in Ectopic KNOX Activation in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 146, 1267-81.
- Devoto A. and Turner J.G., 2003. Regulation of Jasmonate-mediated Plant Responses in Arabidopsis. *Ann Bot*, 92, 329-37.
- Dietrich R.A., Delaney T.P., Uknes S.J., Ward E.J., Ryals J.A. and Dangl J.L., 1994. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77, 565-78.
- Dietrich R.A., Richberg M.H., Schmidt R., Dean C. and Dangl J.L., 1997. A novel zinc-finger protein is encoded by the Arabidopsis *lsl1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, 88, 685-94.
- Dong X., 2001. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 309-14.
- Dong X., 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 547-52.
- Dreher K.A., Brown J., Saw R.E. and Callis J., 2006. The Arabidopsis Aux/IAA Protein Family Has Diversified in Degradation and Auxin Responsiveness. *PLANT CELL*, 18, 699-714.
- Durrant W.E. and Dong X., 2004. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185-209.
- Eitas T.K., Nimchuk Z.L. and Dangl J.L., 2008. Arabidopsis TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 6475-80.
- Enyedi A.J., Yalpani N., Silverman P. and Raskin I., 1992. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 2480-4.
- Falk A., Feys B., Frost L.N., Jones J.D.G., Daniels M.J. and Parker J.E., 1999. *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated

- disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96, 3292-7.
- Fan W. and Dong X., 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 14, 1377-89.
- Felix G., Duran J.D., Volko S. and Boller T., 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.*, 18, 265-76.
- Feys B.J.F., Benedetti C.E., Penfold C.N. and Turner J.G., 1994. Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *PLANT CELL*, 6, 751-9.
- Flors V., Ton J., Doorn R.v., Jakab G., García-Agustín P. and Mauch-Mani B., 2008. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal*, 54, 81-92.
- Fonseca S., Chico J.M. and Solano R., 2009a. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 539-47.
- Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A., Kramell R., Miersch O., Wasternack C. and Solano R., 2009b. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol*, 5, 344-50.
- Forouhar F., Yang Y., Kumar D., Chen Y., Fridman E., Park S.W., Chiang Y., Acton T.B., Montelione G.T., Pichersky E., Klessig D.F. and Tong L., 2005. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 1773-8.
- Friedrich L., Lawton K., Dietrich R., Willits M., Cade R. and Ryals J., 2001. NIM1 overexpression in Arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol Plant Microbe Interact*, 14, 1114-24.
- Gampala S.S., Kim T.-W., He J.-X., Tang W., Deng Z., Bai M.-Y., Guan S., Lalonde S., Sun Y., Gendron J.M., Chen H., Shibagaki N., Ferl R.J., Ehrhardt D., Chong K., Burlingame A.L. and Wang Z.-Y., 2007. An Essential Role for 14-3-3

- Proteins in Brassinosteroid Signal Transduction in Arabidopsis. 13, 177-89.
- Garber E.D. and Shaeffer S.G., 1957. Methionine Biosynthesis and Utilization in *Pseudomonas tabaci* and *Ps. angulata*. *Nature*, 180, 1282-3.
- Garcion C., Lohmann A., Lamodiére E., Catinot J., Buchala A., Doermann P. and Metraux J.-P., 2008. Characterization and Biological Function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 147, 1279-87.
- Gilkerson J., Hu J., Brown J., Jones A., Sun T.-p. and Callis J., 2009. Isolation and Characterization of *cull1-7*, a Recessive Allele of CULLIN1 That Disrupts SCF Function at the C Terminus of CUL1 in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, 181, 945-63.
- Glazebrook J., 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-27.
- Glazebrook J. and Ausubel F.M., 1994. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91, 8955-9.
- Glazebrook J., Rogers E.E. and Ausubel F.M., 1996. Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, 143, 973-82.
- Glazebrook J., Rogers E.E. and Ausubel F.M., 1997. USE OF ARABIDOPSIS FOR GENETIC DISSECTION OF PLANT DEFENSE RESPONSES. *Annual Review of Genetics*, 31, 547-69.
- Gómez-Gómez L., Felix G. and Boller T., 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 18, 277-84.
- Grant J.J., Chini A., Basu D. and Loake G.J., 2003. Targeted Activation Tagging of the Arabidopsis NBS-LRR gene, ADR1, Conveys Resistance to Virulent Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 669-80.
- Grant M.R., Godiard L., Straube E., Ashfield T., Lewald J., Sattler A., Innes R.W. and Dangl J.L., 1995. Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269, 843-6.

- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C. and Carroll S.B., 2008. *Introduction to genetic analysis*. New York :: W.H. Freeman and Co.
- Grunewald W., Vanholme B., Pauwels L., Plovie E., Inze D., Gheysen G. and Goossens A., 2009. Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep*, 10, 923-8.
- Gundlach H., Muller M.J., Kutchan T.M. and Zenk M.H., 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 89, 2389-93.
- Hagen G. and Guilfoyle T., 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol*, 49, 373-85.
- Hardham A.R., 2001. The cell biology behind Phytophthora pathogenicity. *Australasian Plant Pathology*, 30, 91-8.
- Heath M.C., 2000a. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44, 321-34.
- Heath M.C., 2000b. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 315-9.
- Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inze D. and Beeckman T., 2002. Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. *PLANT CELL*, 14, 2339-51.
- Holt B.F., III, Belkhadir Y. and Dangl J.L., 2005. Antagonistic Control of Disease Resistance Protein Stability in the Plant Immune System. *Science*, 309, 929-32.
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W. and Zimmermann P., 2008. Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 420747
- Hubert D., Tornero P., Belkhadir Y., Krishna P., Takahashi A., Shirasu K. and Dangl J., 2003. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO J.*, 22, 5679-89.
- Hückelhoven R., 2007. Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 101-27.

- Huitema E., Vleeshouwers V.G.A.A., Francis D.M. and Kamoun S., 2003. Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 4, 487-500.
- Hwang M.S.H., Morgan R.L., Sarkar S.F., Wang P.W. and Guttman D.S., 2005. Phylogenetic Characterization of Virulence and Resistance Phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 5182-91.
- Inoue Y. and Takikawa Y., 2006. The *hrpZ* and *hrpA* genes are variable, and useful for grouping *Pseudomonas syringae* bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 26-33.
- Ishiga Y., Takeuchi K., Taguchi F., Inagaki Y., Toyoda K., Shiraishi T. and Ichinose Y., 2005. Defense responses of *Arabidopsis thaliana* inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* wild type and defective mutants for flagellin (Δ fliC) and flagellin-glycosylation (Δ orf1). *Journal of General Plant Pathology*, 71, 302-7.
- Jirage D., Tootle T.L., Reuber T.L., Frost L.N., Feys B.J., Parker J.E., Ausubel F.M. and Glazebrook J., 1999. *Arabidopsis thaliana* *PAD4* encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96, 135883-13588.
- Jirage D., Zhou N., Cooper B., Clarke J.D., Dong X. and Glazebrook J., 2001. Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires *PAD4*. *Plant J.*, 26, 395-407.
- Johnson C., Boden E. and Arias J., 2003. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 15, 1846-58.
- Johnson C.M., Stout P.R., Broyer T.C. and Carlton A.B., 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant and Soil*, 8, 337-53.
- Jones J.D. and Dangl J.L., 2006a. The plant immune system. *Nature.*, 444, 323-9.
- Jones J.D.G. and Dangl J.L., 2006b. The plant immune system. *Nature*, 444, 323-9.

- Jung H.W., Tschaplinski T.J., Wang L., Glazebrook J. and Greenberg J.T., 2009. Priming in Systemic Plant Immunity. *Science*, 324, 89-91.
- Kaminsky Z.A., Tang T., Wang S.-C., Ptak C., Oh G.H.T., Wong A.H.C., Feldcamp L.A., Virtanen C., Halfvarson J., Tysk C., McRae A.F., Visscher P.M., Montgomery G.W., Gottesman I.I., Martin N.G. and Petronis A., 2009. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet*, 41, 240-5.
- Kamoun S., 2003. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell*, 2, 191-9.
- Kamoun S., 2007. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 358-65.
- Kamoun S., Huitema E. and Vleeshouwers V.G., 1999. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci*, 4, 196-200.
- Kang L., Li J., Zhao T., Xiao F., Tang X., Thilmony R., He S. and Zhou J.-M., 2003. Interplay of the Arabidopsis nonhost resistance gene NHO1 with bacterial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3519-24.
- Kepinski S. and Leyser O., 2003. SCF-Mediated Proteolysis and Negative Regulation in Ethylene Signaling. *Cell*, 115, 647-8.
- Kieber J.J., 1997. THE ETHYLENE RESPONSE PATHWAY IN ARABIDOPSIS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 277-96.
- Kieleczawa J., 2005a. Sequencing of Difficult DNA Templates. In: Kieleczawa J., ed. *DNA sequencing: Optimizing the process and Analysis*. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Publishers. (1.)
- Kieleczawa J., 2005b. Simple modifications of the standard DNA sequencing protocol allow for sequencing through siRNA hairpins and other repeats. *J Biomol Tech*, 16, 220-3.
- Kim M.G., da Cunha L., McFall A.J., Belkhadir Y., DebRoy S., Dangl J.L. and Mackey D., 2005. Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in Arabidopsis. 121, 749-59.

- Kinkema M., Fan W. and Dong X., 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *PLANT CELL*, 12, 2339-50.
- Kitigawa K., Skowrya D., Elledge S.J., Harper J.W. and Hieter P., 1999. *SGT1* encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the eSCF ubiquitin complex. *Molec. Cell*, 4, 21-33.
- Klahre U., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yokota T., Nomura T., Yoshida S. and Chua N.-H., 1998. The Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1 Gene Encodes a Protein Involved in Steroid Synthesis. *PLANT CELL*, 10, 1677-90.
- Kloek A.P., Verbsky M.L., Sharma S.B., Schoelz J.E., Vogel J., Klessig D.F. and Kunkel B.N., 2001. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation. *Plant J.*, 26, 509-22.
- Konieczny A. and Ausubel F.M., 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.*, 4, 403-10.
- Koornneef A. and Pieterse C.M.J., 2008. Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiol.*, 146, 839-44.
- Koornneef M., Jorna M.L., Brinkhorst-van der Swan D.L.C. and Karssen C.M., 1982. The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 61, 385-93.
- Krishna P. and Gloor G., 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones*, 6, 238-46.
- Kunkel B.N., Bent A.F., Dahlbeck D., Innes R.W. and Staskawicz B.J., 1993. RPS2, an *Arabidopsis* disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *PLANT CELL*, 5, 865-75.
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T. and Felix G., 2004. The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in *Arabidopsis* Plants. *PLANT CELL*, 16, 3496-507.

- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Laurie-Berry N., Joardar V., Street I.H. and Kunkel B.N., 2006. The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 789-800.
- Lawton K.A., Friedrich L., Hunt M., Weymann K., Delaney T., Kessmann H., Staub T. and Ryals J., 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J*, 10, 71-82.
- Lee H.-i. and Raskin I., 1998. Glucosylation of Salicylic Acid in *Nicotiana tabacum* Cv. Xanthi-nc. *Phytopathology*, 88, 692-7.
- Li L., Zhao Y., McCaig B.C., Wingerd B.A., Wang J., Whalon M.E., Pichersky E. and Howe G.A., 2004. The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *PLANT CELL*, 16, 126-43.
- Li X., Lin H., Zhang W., Zou Y., Zhang J., Tang X. and Zhou J.-M., 2005. Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12990-5.
- Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S. and Schulze-Lefert P., 2005. Pre- and Postinvasion Defenses Both Contribute to Nonhost Resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 310, 1180-3.
- Loake G. and Grant M., 2007. Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 466-72.
- Lorenzo O., Chico J.M., Sanchez-Serrano J.J. and Solano R., 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between

- Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 16, 1938-50.
- Lorenzo O., Piqueras R., Sanchez-Serrano J.J. and Solano R., 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell*, 15, 165-78.
- Lu M., Tang X. and Zhou J.-M., 2001a. Arabidopsis NHO1 Is Required for General Resistance against Pseudomonas Bacteria. *PLANT CELL*, 13, 437-47.
- Lu M., Tang X. and Zhou J.M., 2001b. Arabidopsis NHO1 Is Required for General Resistance against Pseudomonas Bacteria. *PLANT CELL*, 13, 437-47.
- Llorente F., Muskett P., Sanchez-Vallet A., Lopez G., Ramos B., Sanchez-Rodriguez C., Jorda L., Parker J. and Molina A., 2008. Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Mol Plant*, 1, 496-509.
- Ma S.W., Morris V.L. and Cuppels D.A., 1991. Characterization of a DNA Region Required for Production of the Phytotoxin Coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4, 6.
- Mackey D., Holt III B.F., Wiig A. and Dangl J.L., 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* Type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Cell*, 108, 743-54.
- Makino S., Matsushika A., Kojima M., Yamashino T. and Mizuno T., 2002. The APRR1/TOC1 Quintet Implicated in Circadian Rhythms of Arabidopsis thaliana: I. Characterization with APRR1-Overexpressing Plants. *Plant Cell Physiol.*, 43, 58-69.
- Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C.J. and Cameron R.K., 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature*, 419, 399-403.
- Martin G.B., Bogdanove A.J. and Sessa G., 2003. UNDERSTANDING THE FUNCTIONS OF PLANT DISEASE RESISTANCE PROTEINS. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 23-61.

- Mayda E., Mauch-Mani B. and Vera P., 2000. Arabidopsis dth9 Mutation Identifies a Gene Involved in Regulating Disease Susceptibility without Affecting Salicylic Acid-Dependent Responses. *PLANT CELL*, 12, 2119-28.
- McConn M., Creelman R.A., Bell E., Mullet J.E. and Browse J., 1997. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94, 5473-7.
- McKhann H.I., Camilleri C., Bérard A., Bataillon T., L. David J., Reboud X., Corre V.L., Caloustian C., Gut I.G. and Brunel D., 2004. Nested core collections maximizing genetic diversity in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 38, 193-202.
- Melotto M., Mecey C., Niu Y., Chung H.S., Katsir L., Yao J., Zeng W., Thines B., Staswick P., Browse J., Howe G.A. and He J.-X., 2008. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *The Plant Journal*, 55, 979-88.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K. and He S.Y., 2006. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*, 126, 969-80.
- Moffett P., Farnham G., Peart J. and Baulcombe D.C., 2002. Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J*, 21, 4511-9.
- Molina A., Hunt M.D. and Ryals J.A., 1998. Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. *PLANT CELL*, 10, 1903-14.
- Mou Z., Fan W. and Dong X., 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113, 935-44.
- Muskett P.R., Kahn K., Austin M.J., Moisan L.J., Sadanandom A., Shirasu K., Jones J.D. and Parker J.E., 2002. Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *PLANT CELL*, 14, 979-92.
- Nawrath C., Heck S., Parinthewong N. and Metraux J.P., 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *PLANT CELL*, 14, 275-86.

- Nawrath C. and Metraux J.P., 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *PLANT CELL*, 11, 1393-404.
- Niki T., Mitsuhashi I., Seo S., Ohtsubo N. and Ohashi Y., 1998. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. *Plant Cell Physiol.*, 39, 500-7.
- Niyogi K.K. and Fink G.R., 1992. Two Anthranilate Synthase Genes in *Arabidopsis*: Defense-Related Regulation of the Tryptophan Pathway. *PLANT CELL*, 4, 721-33.
- Nurnberger T. and Scheel D., 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, 6, 372-9.
- Page D.R. and Grossniklaus U., 2002. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 3, 124-36.
- Park J.-E., Park J.-Y., Kim Y.-S., Staswick P.E., Jeon J., Yun J., Kim S.-Y., Kim J., Lee Y.-H. and Park C.-M., 2007. GH3-mediated Auxin Homeostasis Links Growth Regulation with Stress Adaptation Response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 10036-46.
- Park S.-W., Liu P.-P., Forouhar F., Vlot A.C., Tong L., Tietjen K. and Klessig D.F., 2009. Use of a Synthetic Salicylic Acid Analog to Investigate the Roles of Methyl Salicylate and Its Esterases in Plant Disease Resistance. *J. Biol. Chem.*, 284, 7307-17.
- Parker J.E., 2009. The Quest for Long-Distance Signals in Plant Systemic Immunity. *Sci. Signal.*, 2, pe31-.
- Parker J.E., Holub E.B., Frost L.N., Falk A., Gunn N.D. and Daniels M.J., 1996. Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *PLANT CELL*, 8, 2033-46.
- Paschold A., Halitschke R. and Baldwin I., T., 2007. Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *The Plant Journal*, 51, 79-91.
- Peck S.C., Nuhsu T.S., Hess D., Iglesias A., Meins F. and Boller T., 2001. Directed proteomics identifies a plant-specific protein

- rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *PLANT CELL*, 13, 1-11.
- Penninckx I.A.M.A., Eggermont K., Terras B.P.H., Thomma J., DeSamblanx G.W., Buchala A., Metraux J.-P., Manners J.M. and Broekaert W.F., 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *PLANT CELL*, 8, 2309-23.
- Perfect S.E. and Green J.R., 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 2, 101-8.
- Pieterse C.M. and Van Loon L.C., 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol.*, 7, 456-64.
- Prelich G., 1999. Suppression mechanisms: themes from variations. *Trends Genet*, 15, 261-6.
- Quint M., Ito H., Zhang W. and Gray W.M., 2005. Characterization of a novel temperature-sensitive allele of the *CUL1/AXR6* subunit of SCF ubiquitin-ligases. *The Plant Journal*, 43, 371-83.
- Rahme L.G., Mindrinos M.N. and Panopoulos N.J., 1991. Genetic and transcriptional organization of the *hrp* cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.*, 173, 575-86.
- Ren C., Pan J., Peng W., Genschik P., Hobbie L., Hellmann H., Estelle M., Gao B., Peng J., Sun C. and Xie D., 2005. Point mutations in *Arabidopsis* Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response. *The Plant Journal*, 42, 514-24.
- Ritter C. and Dangl J.L., 1995. The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 444-53.
- Ritter C. and Dangl J.L., 1996. Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes. *PLANT CELL*, 8, 251-7.
- Robert-Seilantantz A., Navarro L., Bari R. and Jones J.D.G., 2007. Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 372-9.

- Rogers E.E. and Ausubel F.M., 1997. Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in *PR-1* gene expression. *PLANT CELL*, 9, 305-16.
- Rohmer L., Kjemtrup S., Marchesini P. and Dangl J.L., 2003. Nucleotide sequence, functional characterization and evolution of pFKN, a virulence plasmid in *Pseudomonas syringae* pathovar *maculicola*. *Mol Microbiol*, 47, 1545-62.
- Rusterucci C., Aviv D.H., Holt B.F., Dangl J.L. and Parker J.E., 2001. The Disease Resistance Signaling Components *EDS1* and *PAD4* Are Essential Regulators of the Cell Death Pathway Controlled by *LSD1* in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13, 2211-24.
- Ryals J., Weymann K., Lawton K., Friedrich L., Ellis D., Steiner H.Y., Johnson J., Delaney T.P., Jesse T., Vos P. and Uknes S., 1997. The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *PLANT CELL*, 9, 425-39.
- Salter M.G., Franklin K.A. and Whitelam G.C., 2003. Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature*, 426, 680-3.
- Sambrook J. and Russell D.V., 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual, third edition*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sangster T.A. and Queitsch C., 2005. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 86-92.
- Schwartz S.H., Leon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. and Zeevaart J.A., 1997. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*, 114, 161-6.
- Seto D., 1990. An improved method for sequencing double stranded plasmid DNA from minipreps using DMSO and modified template preparation. *Nucl. Acids Res.*, 18, 5905-6.
- Shah J., 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol.*, 6, 365-71.
- Shah J., Kachroo P., Nandi A. and Klessig D.F., 2001. A recessive mutation in the Arabidopsis *SSI2* gene confers SA- and *NPRI*-

- independent expression of *PR* genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J.*, 25, 563-74.
- Shapiro A.D. and Zhang C., 2001. The Role of NDR1 in Avirulence Gene-Directed Signaling and Control of Programmed Cell Death in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 127, 1089-101.
- Shirasu K., Lahaye T., Tan M.-W., Zhou F., Azavedo C. and Schulze-Lefert P., 1999. A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell*, 99, 355-66.
- Shirasu K. and Schulze-Lefert P., 2003. Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends in Plant Science*, 8, 252-8.
- Smith H.M.S. and Hake S., 2003. The Interaction of Two Homeobox Genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, Regulates Internode Patterning in the Arabidopsis Inflorescence. *PLANT CELL*, 15, 1717-27.
- Somerville C. and Koornneef M., 2002. A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nat Rev Genet*, 3, 883-9.
- Song J.T., 2006. Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in Arabidopsis thaliana. *Mol Cells*, 22, 233-8.
- Song J.T., Koo Y.J., Seo H.S., Kim M.C., Choi Y.D. and Kim J.H., 2008. Overexpression of AtSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*, 69, 1128-34.
- Spanu P., Grosskopf D.G., Felix G. and Boller T., 1994. The Apparent Turnover of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Tomato Cells Is Regulated by Protein Phosphorylation and Dephosphorylation. *Plant Physiol.*, 106, 529-35.
- Staswick P.E., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M.T., Maldonado M.C. and Suza W., 2005. Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *PLANT CELL*, 17, 616-27.
- Staswick P.E., Su W. and Howell S.H., 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are

- decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6837-40.
- Staswick P.E. and Tiryaki I., 2004. The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in *Arabidopsis*. *PLANT CELL*, 16, 2117-27.
- Staswick P.E., Yuen G., Y. and Lehman C., C., 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal*, 15, 747-54.
- Stewart F.J., Panne D., Bickle T.A. and Raleigh E.A., 2000. Methyl-specific DNA binding by McrBC, a modification-dependent restriction enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 298, 611-22.
- Stintzi A., Weber H., Reymond P., Browse J. and Farmer E.E., 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 12837-42.
- Stokes T.L., Kunkel B.N. and Richards E.J., 2002. Epigenetic variation in *Arabidopsis* disease resistance. *Genes & Development*, 16, 171-82.
- Sun J., Xu Y., Ye S., Jiang H., Chen Q., Liu F., Zhou W., Chen R., Li X., Tietz O., Wu X., Cohen J.D., Palme K. and Li C., 2009. *Arabidopsis* ASA1 Is Important for Jasmonate-Mediated Regulation of Auxin Biosynthesis and Transport during Lateral Root Formation. *PLANT CELL*, 21, 1495-511.
- Sun W., Dunning F.M., Pfund C., Weingarten R. and Bent A.F., 2006. Within-Species Flagellin Polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and Its Impact on Elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-Dependent Defenses. *PLANT CELL*, 18, 764-79.
- Suza W. and Staswick P., 2008. The role of JAR1 in Jasmonoyl-l-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta*, 227, 1221-32.
- Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini T.Z., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P. and Huala E., 2008. The *Arabidopsis* Information Resource

- (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucl. Acids Res.*, 36, D1009-14.
- Takahashi A., Casais C., Ichimura K. and Shirasu K., 2003. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11777-82.
- Tatiana E.M. and Jürgen Z., 2007. Bacterial non-host resistance: interactions of *Arabidopsis* with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. *Physiologia Plantarum*, 131, 448-61.
- Thomma B.P.H.J., Nelissen I., Eggermont K. and Broekaert W.F., 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Aternaria brassicicola*. *Plant J.*, 19, 163-71.
- Thorsten N. and Volker L., 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, 6, 335-45.
- Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R., Young K., Taylor N.E., Henikoff J.G., Comai L. and Henikoff S., 2003. Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With High-Throughput TILLING. *Genome Research*, 13, 524-30.
- Tiryaki I. and Staswick P.E., 2002. An Arabidopsis Mutant Defective in Jasmonate Response Is Allelic to the Auxin-Signaling Mutant *axr1*. *Plant Physiol.*, 130, 887-94.
- Ton J. and Mauch-Mani B., 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal*, 38, 119-30.
- Tor M., Gordon P., Cuzick A., Eulgem T., Sinapidou E., Mert-Turk F., Can C., Dangl J.L. and Holub E.B., 2002. Arabidopsis SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *PLANT CELL*, 14, 993-1003.
- Tornero P., Chao R.A., Luthin W.N., Goff S.A. and Dangl J.L., 2002a. Large scale structure-function analysis of the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *The Plant Cell*, 14, 435-50.
- Tornero P., Merritt P., Sadanandom A., Shirasu K., Innes R.W. and Dangl J.L., 2002b. RAR1 and NDR1 Contribute

- Quantitatively to Disease Resistance in Arabidopsis, and Their Relative Contributions Are Dependent on the R Gene Assayed. *PLANT CELL*, 14, 1005-15.
- Truman W., Bennett M.H., Kubigsteltig I., Turnbull C. and Grant M., 2007. Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 1075-80.
- Uknes S., Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E. and Ryals J., 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 4, 645-56.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. and Guilfoyle T.J., 1997. Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *PLANT CELL*, 9, 1963-71.
- Uppalapati S.R., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel B.N., Anand A., Mysore K.S. and Bender C.L., 2007. The Phytotoxin Coronatine Contributes to Pathogen Fitness and Is Required for Suppression of Salicylic Acid Accumulation in Tomato Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 955-65.
- van der Biezen E.A. and Jones J.D.G., 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trend. Biochem Sci.*, 23, 454-6.
- Van Loon L.C. and Van Kammen A., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40, 199-211.
- van Wees S.C., Luijendijk M., Smoorenburg I., van Loon L.C. and Pieterse C.M., 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol Biol*, 41, 537-49.
- van Wees S.C.M. and Glazebrook J., 2003. Loss of non-host resistance of Arabidopsis NahG to *Pseudomonas syringae* pv.

- phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J*, 33, 733-42.
- Venglat S.P., Dumonceaux T., Rozwadowski K., Parnell L., Babic V., Keller W., Martienssen R., Selvaraj G. and Datla R., 2002. The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 4730-5.
- Vernooij B., Friedrich L., Morse A., Reist R., Kolditz-Jawhar R., Ward E., Uknes S., Kessmann H. and Ryals J., 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance, but is required in signal transduction. *PLANT CELL*, 6, 959-65.
- Vijayan P., Shockey J., Lévesque A., Cook R.J. and Browse J., 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc.Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 7209-14.
- Vleeshouwers V.G., van Dooijeweert W., Govers F., Kamoun S. and Colon L.T., 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, 210, 853-64.
- Vlot A.C., Dempsey D.M.A. and Klessig D.F., 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206.
- Vlot A.C., Klessig D.F. and Park S.-W., 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 436-42.
- Vogel J.P., Raab T.K., Schiff C. and Somerville S.C., 2002. PMR6, a Pectate Lyase-Like Gene Required for Powdery Mildew Susceptibility in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 14, 2095-106.
- Vogel J.P., Raab T.K., Somerville C.R. and Somerville S.C., 2004. Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *The Plant Journal*, 40, 968-78.
- Vorwerk S., Somerville S. and Somerville C., 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. 9, 203-9.
- Wang D., Weaver N.D., Kesarwani M. and Dong X., 2005a. Induction of Protein Secretory Pathway Is Required for Systemic Acquired Resistance. *Science*, 308, 1036-40.

- Wang Z., Dai L., Jiang Z., Peng W., Zhang L., Wang G. and Xie D., 2005b. GmCOI1, a Soybean F-Box Protein Gene, Shows Ability to Mediate Jasmonate-Regulated Plant Defense and Fertility in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 1285-95.
- Weymann K., Hunt M., Uknes S., Neuenschwander U., Lawton K., Steiner H.Y. and Ryals J., 1995. Suppression and Restoration of Lesion Formation in Arabidopsis lsd Mutants. *PLANT CELL*, 7, 2013-22.
- Wiermer M., Feys B.J. and Parker J.E., 2005. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol.*, 8, 383-9.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G. and Ausubel F.M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562-5.
- Xie D.-X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M. and Turner J.G., 1998. COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280, 1091-4.
- Xie Z., Johansen L.K., Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E. and Carrington J.C., 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2, E104.
- Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W.L., Ma H., Peng W., Huang D. and Xie D., 2002. The SCFCOI1 Ubiquitin-Ligase Complexes Are Required for Jasmonate Response in Arabidopsis. *PLANT CELL*, 14, 1919-35.
- Xu Y., Chang P.F.L., Liu D., Narasimhan M.L., Raghothama K.G., Hasegawa P.M. and Bressan R.A., 1994. Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *PLANT CELL*, 6, 1077-85.
- Yamamoto S., Katagiri M., Maeno H. and Hayaishi O., 1965. Salicylate Hydroxylase, a Monooxygenase Requiring Flavin Adenine Dinucleotide. I. PURIFICATION AND GENERAL PROPERTIES. *J. Biol. Chem.*, 240, 3408-13.
- Yan J., Zhang C., Gu M., Bai Z., Zhang W., Qi T., Cheng Z., Peng W., Luo H., Nan F., Wang Z. and Xie D., 2009. The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *PLANT CELL*, tpc.109.065730.

- Yan Y., Stolz S., Chetelat A., Reymond P., Pagni M., Dubugnon L. and Farmer E.E., 2007. A Downstream Mediator in the Growth Repression Limb of the Jasmonate Pathway. *PLANT CELL*, 19, 2470-83.
- You I.S., Ghosal D. and Gunsalus I.C., 1991. Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (nahG) and its 3'-flanking region. *Biochemistry*, 30, 1635-41.
- Yu I.-C., Parker J. and Bent A.F., 1998a. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 7819-24.
- Yu I.C., Parker J. and Bent A.F., 1998b. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7819-24.
- Yu I.c., Parker J. and Bent A.F., 1998c. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7819-24.
- Zhang X., Chen S. and Mou Z., 2010. Nuclear localization of NPR1 is required for regulation of salicylate tolerance, isochorismate synthase 1 expression and salicylate accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, In Press, Corrected Proof.
- Zhang Z., Li Q., Li Z., Staswick P.E., Wang M., Zhu Y. and He Z., 2007. Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiol*, 145, 450-64.
- Zheng N., Schulman B.A., Song L., Miller J.J., Jeffrey P.D., Wang P., Chu C., Koepp D.M., Elledge S.J., Pagano M., Conaway R.C., Conaway J.W., Harper J.W. and Pavletich N.P., 2002. Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416, 703-9.
- Zhou N., Tootle T.L., Klessig D.F. and Glazebrook J., 1998. *PAD4* functions upstream of salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *PLANT CELL*, 10, 1021-30.
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D.G., Felix G. and Boller T., 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428, 764-7.

