

Universidad de La Laguna

TESIS DOCTORAL

Grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Programa de Ciencias de la Vida y Medio Ambiente

**Caracterización de la familia multigénica *ToFZY*
de *Solanum lycopersicum* y su implicación en el estrés biótico**

Marino Expósito Rodríguez, fecha 2010



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA Y GENÉTICA



INSTITUTO DE PRODUCTOS NATURALES Y
AGROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE AGROBIOLOGÍA Y
MEDIO AMBIENTE

D. JOSÉ ANTONIO PÉREZ PÉREZ Y D. ANDRÉS ANTONIO BORGES, DIRECTOR y CO-DIRECTOR, RESPECTIVAMENTE, DE LA TESIS DOCTORAL QUE PRESENTA D. MARINO EXPÓSITO RODRÍGUEZ,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación resumido en la memoria titulada “Caracterización de la familia multigénica *ToFZY* en *Solanum lycopersicum* y su implicación en el estrés biótico”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por el Lcdo. D. Marino Expósito Rodríguez, como alumno adscrito al Área de Genética del Departamento de Parasitología Ecología y Genética de la Universidad de La Laguna, y vinculado al grupo de Activadores Químicos de las Defensa Naturales de las Plantas del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC. Considerando que el mencionado trabajo reúne las condiciones de calidad y rigor científico, autorizamos su presentación y defensa ante el tribunal nombrado al efecto, para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en San Cristóbal de La Laguna, a 3 de septiembre del 2010.

Fdo.: D. José Antonio Pérez Pérez
DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL

Fdo.: D. Andrés A. Borges Rodríguez
CO-DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL

INDICE

I.	Abreviaturas	1
II.	Fórmulas químicas	3
1.	INTRODUCCIÓN	
1.1.	Interacciones.....	8
1.3.	Lugares de síntesis del ácido indolacético (IAA)	9
1.4.	Síntesis de IAA a través de múltiples rutas	9
1.5.	Síntesis de IAA independiente del triptófano.....	11
1.6.	Síntesis de IAA dependiente de triptófano	11
1.6.1.	Vía de la indolacetamida (IAM)	11
1.6.2.	Vía del ácido indolpirúvico (IPA)	12
1.6.3.	Vía de la indolacetaldoxima (IAOx).....	12
1.6.4.	Vía de la triptamina (TAM).....	13
1.7.	Papel de las auxinas en la interacción entre plantas y sus patógenos bacterianos.....	20
1.8.	Antecedentes que relacionan la síntesis de IAA vía triptamina con las interacciones planta-patógeno bacteriano.....	22
2.	OBJETIVOS	27
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1.	Material biológico.....	31
3.1.1.	Cultivares de tomate y condiciones de crecimiento.....	31
3.1.2.	Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo de bacterias.....	32
3.2.	Infección de plantas de tomate con bacterias.....	34
3.2.1.	Infiltración de bacterias <i>Pst</i> DC3000 en plantas de tomate.....	34
3.2.2.	Co-infiltración de bacterias y ácido indolacético.....	34
3.3.	Recolección de muestras vegetales.....	35
3.3.1.	Análisis espacio-temporal de la expresión génica.....	35
3.3.2.	Análisis de la interacción planta-bacteria.....	36
3.4.	Purificación de ácidos nucleicos.....	38
3.5.	Cuantificación espectrofotométrica y análisis de la integridad de ácidos nucleicos.....	38
3.6.	Electroforesis de ácidos nucleicos.....	39

3.7.	Síntesis de ADN complementario.....	39
3.8.	Diseño de oligonucleótidos	40
3.9.	Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
3.9.1.	PCR y RT-PCR en condiciones estándar.....	41
3.9.2.	PCR cebada con oligonucleótidos degenerados.....	41
3.9.3.	PCR inversa.....	42
3.9.4.	PCR a tiempo real.....	43
3.10.	Secuenciación de ADN.....	44
3.11.	Herramientas bioinformáticas.....	44
3.12.	Cuantificación de ADN mediante PCR a tiempo real.....	45
3.12.1.	Normalización de los datos de cuantificación.....	46
3.12.1.1.	Normalización en la cuantificación de la expresión génica.....	46
3.12.1.2.	Monitorización del crecimiento bacteriano.....	46
3.12.2.	Selección de genes candidatos a referencias internas.....	47
3.12.3.	Análisis estadístico de la estabilidad de expresión.....	47
3.12.3.1.	geNorm.....	48
3.12.3.2.	NormFinder.....	48
3.12.3.3.	Coeficiente de variación (CV) de las cantidades relativas normalizadas (NRQ).....	49
3.12.3.3.	Clasificación consenso de los genes candidatos.....	50
3.12.4.	Determinación del número óptimo de genes de referencia.....	50
3.12.5.	Cálculo de la eficiencia de las reacciones de amplificación.....	51
3.12.6.	Cuantificación absoluta.....	51
3.12.7.	Cuantificación relativa.....	52
3.13.	Análisis histoquímico de la actividad beta-glucuronidasa.....	53
3.14.	Expresión de una proteína recombinante en <i>E. coli</i>	54
3.14.1.	Clonación <i>in vitro</i> de la secuencia codificadora del gen <i>ToFZY</i>	54
3.14.2.	Digestión con restrictasas y ligado de fragmentos de restricción.....	55
3.14.3.	Transformación de bacterias.....	55
3.14.4.	Inducción de la proteína recombinante.....	56
3.14.5.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	57
3.14.6.	Extracción de proteínas en condiciones nativas.....	58
3.14.7.	Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad.....	58
3.15.	Síntesis química de un estándar de N-hidroxil-triptamina.....	59
3.16.	Análisis de la actividad de la proteína ToFZY1 recombinante.....	60

3.16.1.	Ensayo enzimático.....	60
3.16.2.	Detección mediante HPLC de los productos de la reacción enzimática.....	60
4.	RESULTADOS	
4.1.	Identificación y caracterización estructural de genes de <i>S. lycopersicum</i> que codifican FMOs de tipo YUCCA.....	63
4.1.1.	Identificación y análisis de la secuencia del gen <i>ToFZY1</i>	63
4.1.2.	Identificación y caracterización de nuevos genes <i>ToFZY</i>	67
4.2.	Análisis filogenético de la familia de genes <i>ToFZY</i>	69
4.3.	Caracterización bioquímica de la proteína ToFZY1.....	71
4.3.1.	Producción de ToFZY1 como una proteína recombinante en <i>E. coli</i>	71
4.3.2.	Síntesis de un patrón de N-hidroxil-triptamina.....	73
4.3.3.	Ensayo de la actividad flavin-monooxigenasa de la proteína ToFZY1.....	73
4.4.	Patrón de expresión de los genes <i>ToFZY</i> durante el proceso de desarrollo de <i>Solanum lycopersicum</i>	75
4.4.1.	Normalización de la cuantificación de ARNm.....	75
4.4.1.1.	Selección de genes candidatos a referencias internas.....	75
4.4.1.2.	Prestaciones de los cebadores de amplificación.....	77
4.4.1.3.	Adquisición de los datos de Cq.....	80
4.4.1.4.	Estabilidad de expresión de los genes candidatos en la serie completa del desarrollo.....	80
4.4.1.5.	Estabilidad de expresión de los genes candidatos durante el desarrollo de órganos particulares.....	82
4.4.2.	Niveles de ARNm de los genes <i>ToFZY</i> durante el desarrollo.....	84
4.4.2.1.	Controles de calidad de RT-qPCR a tiempo real.....	84
4.4.2.2.	Patrón de expresión de genes <i>ToFZY</i> individuales en la serie completa del desarrollo.....	87
4.4.2.3.	Patrón de expresión de la familia de genes <i>ToFZY</i> durante el desarrollo de órganos particulares.....	92
4.5.	Nivel de ARNm de los genes <i>YUC</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
4.6.	Detección de IAA en muestras de tomate basada en tinciones histoquímicas de la actividad beta-glucuronidasa.....	101
4.7.	Relación del IAA y la expresión de los genes <i>ToFZY</i> con procesos de interacción planta-bacteria.....	103
4.7.1.	Estímulo de la infección bacteriana ejercida por IAA exógeno en el sistema tomate- <i>Pseudomonas</i>	103
4.7.2.	Monitorización del proceso de infección bacteriana.....	104

4.7.3.	Cambios en el patrón de expresión de genes <i>ToFZY</i> inducidos por <i>Pseudomonas</i>	105
4.7.3.1.	Normalización de la cuantificación de ARNm.....	105
4.7.3.2.	Niveles de ARNm de los genes <i>ToFZY</i> durante el proceso de infección bacteriana.....	105
5.	DISCUSIÓN	
5.1.	Caracterización de la familia multigénica <i>ToFZY</i> de <i>Solanum lycopersicum</i>	114
5.2.	Relación de la familia multigénica <i>ToFZY</i> con el estrés biótico.....	127
6.	CONCLUSIONES	131
7.	BIBLIOGRAFÍA	135

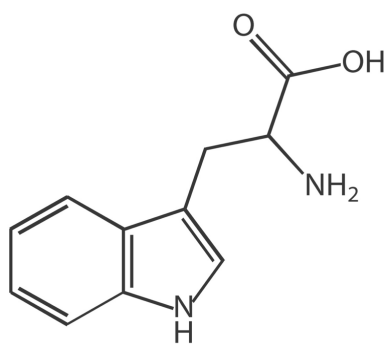
I. Abreviaturas

A _{xxx}	Absorbancia de luz a XXX nm
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARNm	ARN mensajero
Cq	Ciclo de cuantificación
CV	Coeficiente de variación
cv.	Cultivar
DNasa	Desoxirribonucleasa
dpi	días post-infección
hpi	horas post-infección
DOP-PCR	PCR cebada con oligonucleótidos degenerados
EDTA	Etilén-diamino-tetra-acético
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FAD	Flavin-adenin-dinucleótido
FMO*	Flavin-monooxigenasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAA	Acido indolacético
IAM	Indolacetamida
IAN	Indolacetonitrilo
IAAld	indolacetaldehído
IAOx	Indolacetaldoxima
IG	Indolglucosinolato
IPA	Acido indolpirúvico
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranósido
KDa	KiloDalton
NADP	Nicotin-adenin-dinucleótido fosfato
NHT	N-hidroxil-triptamina
NF	Factor de normalización
NRQ	Cantidad relativa normalizada
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

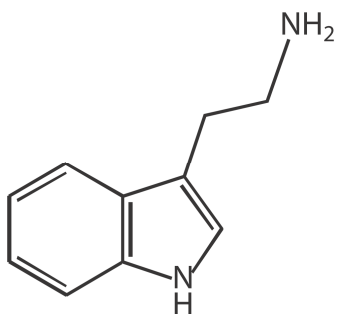
<i>Pst</i> DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000
pv	patovar o variedad patológica
qPCR	PCR cuantitativa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNasa	Ribonucleasa
RQ	cantidad relativa
RT-PCR	PCR acoplada a transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAM	Triptamina
TBE	Tris bórico EDTA
TDC	triptófano-descarboxilasa
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
T _m	Temperatura de fusión
ufc	unidades formadoras de colonias
UTR	Regiones no traducidas
Uv	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen

* Convenio de nomenclatura para genes de plantas y los productos génicos correspondientes: los genes en cursiva, en mayúsculas las variantes salvajes y en minúscula las variantes mutante; las proteínas en mayúsculas.

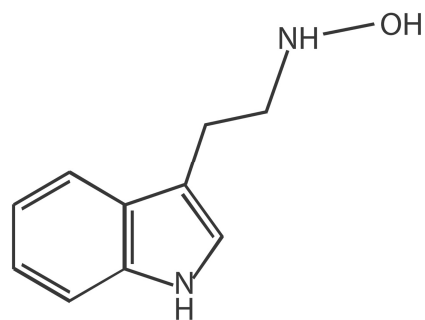
II. Formulas químicas



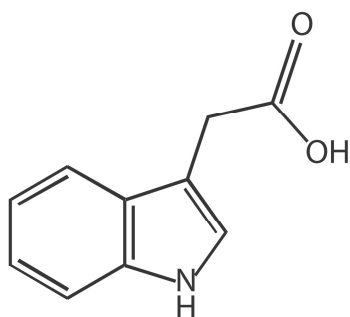
Triptófano (Trp)



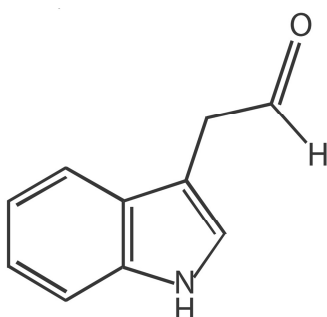
Triptamina (TAM)



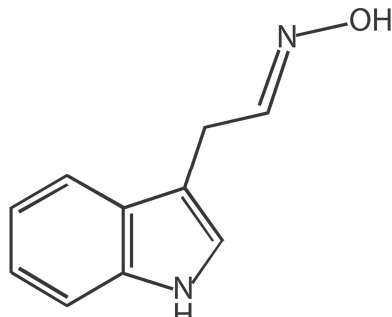
N-hidroxil-triptamina (NHT)



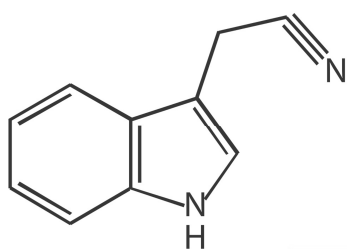
Ácido Indolacético (IAA)



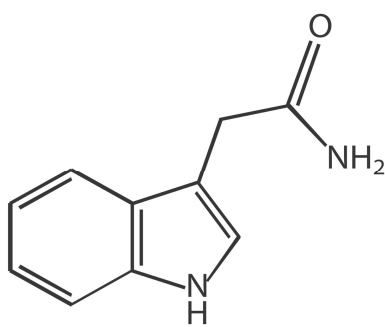
Indolacetaldehído (IAAlD)



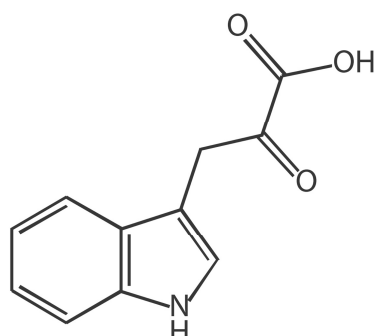
Indolacetaldoxima (IAOx)



Indolacetonitrilo (IAN)



Indolacetamida (IAM)



Indolpirúvico (IPA)

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Interacciones funcionales entre hormonas vegetales

Las hormonas vegetales o fitohormonas juegan un papel esencial en el desarrollo de las plantas y en la integración de la información que éstas reciben del ambiente. Esta información interacciona de alguna manera con una complicada red de señales que influyen en la arquitectura final de la planta, o la preparan para la respuesta a posibles situaciones de estrés. Numerosas evidencias indican que existe una íntima interconexión entre las hormonas que típicamente han sido implicadas en la defensa frente al estrés y aquellas que han sido caracterizadas como reguladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas (Agnew *et al.*, 2000; Korves and Bergelson, 2003; Potters *et al.*, 2007). En este sentido, ha sido bien constado el papel de ciertas hormonas vegetales en procesos de defensa de las plantas frente al estrés biótico o abiótico, como son el ácido salicílico, ácido jasmónico o el etileno. Éstas, aunque denominadas “hormonas de defensa”, también afectan a múltiples procesos del desarrollo: el ácido jasmónico reprime procesos como el crecimiento, el desarrollo y la fertilidad de la flor (Wasternack, 2007); el ácido salicílico está implicado en la regulación temporal de la floración (Martínez *et al.*, 2004); y el etileno influye en procesos como la senescencia y maduración del fruto, el crecimiento de los pelos radicales y la germinación (Abeles *et al.*, 1992).

La situación reversa la encontramos en otras fitohormonas como las giberelinas, las auxinas y los brasinosteroides, que aunque consideradas “reguladoras del crecimiento vegetal”, también han sido relacionadas con los procesos de interacción de las plantas con sus patógenos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Grant and Jones, 2009). Por ejemplo, se han observado efectos en el desarrollo vegetal inducidos por la infección que son provocados, al menos en parte, por la manipulación de los niveles de auxina de la planta por los patógenos (Yamada, 1993; Navarro *et al.*, 2006).

1.2. Las auxinas

Bajo la denominación de auxinas se engloba un grupo de hormonas vegetales implicadas en procesos tan diversos como los tropismos durante la respuesta a la gravedad y la luz, la arquitectura general de la parte aérea y de la raíz, el patrón de desarrollo de ciertos órganos o el desarrollo vascular. Para entender completamente la regulación de la síntesis auxinas, su acción y la interacción con otras hormonas es necesario entender diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Woodward and Bartel, 2005).

Los estudios centrados en este grupo de hormonas representan uno de los campos de investigación experimentales más antiguos en biología. Charles Darwin llevó a cabo uno de los primeros experimentos relacionados con las auxinas interesándose por la capacidad que poseen las plantas de realizar ciertos movimientos, siendo determinantes sus estudios sobre el fototropismo en coleóptilos de gramíneas. En este trabajo, Darwin concluyó que la plántula percibe el estímulo luminoso en el ápice del coleóptilo, pero es una sustancia la que modula la elongación de las plantas, transmitiéndose una señal desde el ápice hasta las zonas inferiores, donde se produce la curvatura que permite los movimientos hacia la luz (Darwin and Darwin, 1880).

Los esfuerzos para aislar e identificar químicamente el compuesto responsable de dicha curvatura se vieron dificultados por la poca cantidad que podía obtenerse a partir de los ápices de los coleóptilos y la escasa sensibilidad de las técnicas analíticas de la época. Por este motivo, se buscaron materiales alternativos con el fin de reunir una cantidad importante de la sustancia. Tras varios intentos y partiendo de la orina humana consiguieron obtener un compuesto al que denominaron auxina (del griego: hacer crecer, incrementar) y cuya estructura química correspondía a la del ácido indolacético o IAA (Kögl *et al.*, 1933). Pasados los años se ha comprobado que el IAA es la principal auxina presente en plantas (Woodward and Bartel, 2005).

1.3. Lugares de síntesis del ácido indolacético (IAA)

La hipótesis clásica sobre la producción de auxinas postula que la síntesis de estas fitohormonas ocurre en las regiones apicales, y que su posterior transporte genera un gradiente a través de la planta. Estas hipótesis han sido objeto de revisión como resultado del advenimiento de técnicas más resolutivas para detectar y cuantificar la síntesis de IAA en tejidos específicos. Una de estas técnicas es la monitorización de la biosíntesis de IAA mediante marcaje con un isótopo estable. La incorporación de deuterio en el anillo indólico del IAA permite una estima de la síntesis *de novo* de IAA más exacta que la cuantificación de IAA no marcado, el cual puede proceder de la hidrólisis de los conjugados de IAA preexistentes. Trabajos de investigación realizados durante la última década han puesto de manifiesto que, en general, todas las partes de una planta joven (plántula) son capaces de sintetizar IAA. En particular, los embriones recién fertilizados, las hojas jóvenes, las raíces y diferentes etapas del desarrollo de la flor, poseen una elevada actividad de síntesis de IAA (Ljung *et al.*, 2001a; Ljung *et al.*, 2001b; Bhalerao *et al.*, 2002; Ribnicky *et al.*, 2002).

1.4. Síntesis de IAA a través de múltiples rutas

Las vías de síntesis del IAA (Figura 1) son clasificadas en dependientes o independiente del triptófano (Trp) en función de si el IAA es sintetizado a partir del Trp o a partir de un precursor indólico de este aminoácido (Normanly *et al.*, 2004; Woodward and Bartel, 2005). Diversos estudios en diferentes especies de plantas y usando marcaje con isótopos estables, han demostrado de forma consistente que las vía dependiente e independiente de Trp son utilizadas de manera diferencial por la planta, produciéndose cambios de la ruta predominante en momentos críticos del desarrollo de las plantas (Ljung *et al.*, 2002), como por ejemplo la embriogénesis (Michalczyk *et al.*, 1992; Ribnicky *et al.*, 2002), la maduración del fruto (Epstein *et al.*, 2002), la germinación y el crecimiento temprano de plántulas (Ljung *et al.*, 2001b), o bien el relevo de ruta es inducido por factores externos como por ejemplo infección por un patógeno bacteriano (Hull *et al.*, 2000), heridas (Sztein *et al.*, 2002) o cambios de temperatura (Rapparini *et al.*, 2002). En general, parece que la vía independiente de Trp da cuenta del nivel basal de IAA durante el crecimiento normal de la planta, pero ocurre un cambio hacia las vías dependientes de

Trp cuando se requiere niveles altos de IAA, dado que el abundante pool de Trp es capaz de sustentar mayores tasas de síntesis de IAA.

Por último, cabe destacar que aunque las plantas comparten mecanismos básicos para la biosíntesis de auxina que se han conservado evolutivamente, también existen variantes o modificaciones particulares que caracterizan a determinados grupos taxonómicos (Bak *et al.*, 1998), situación que justifica diversificar los modelos vegetales con los que realizar estudios detallados (Sugawara *et al.*, 2009).

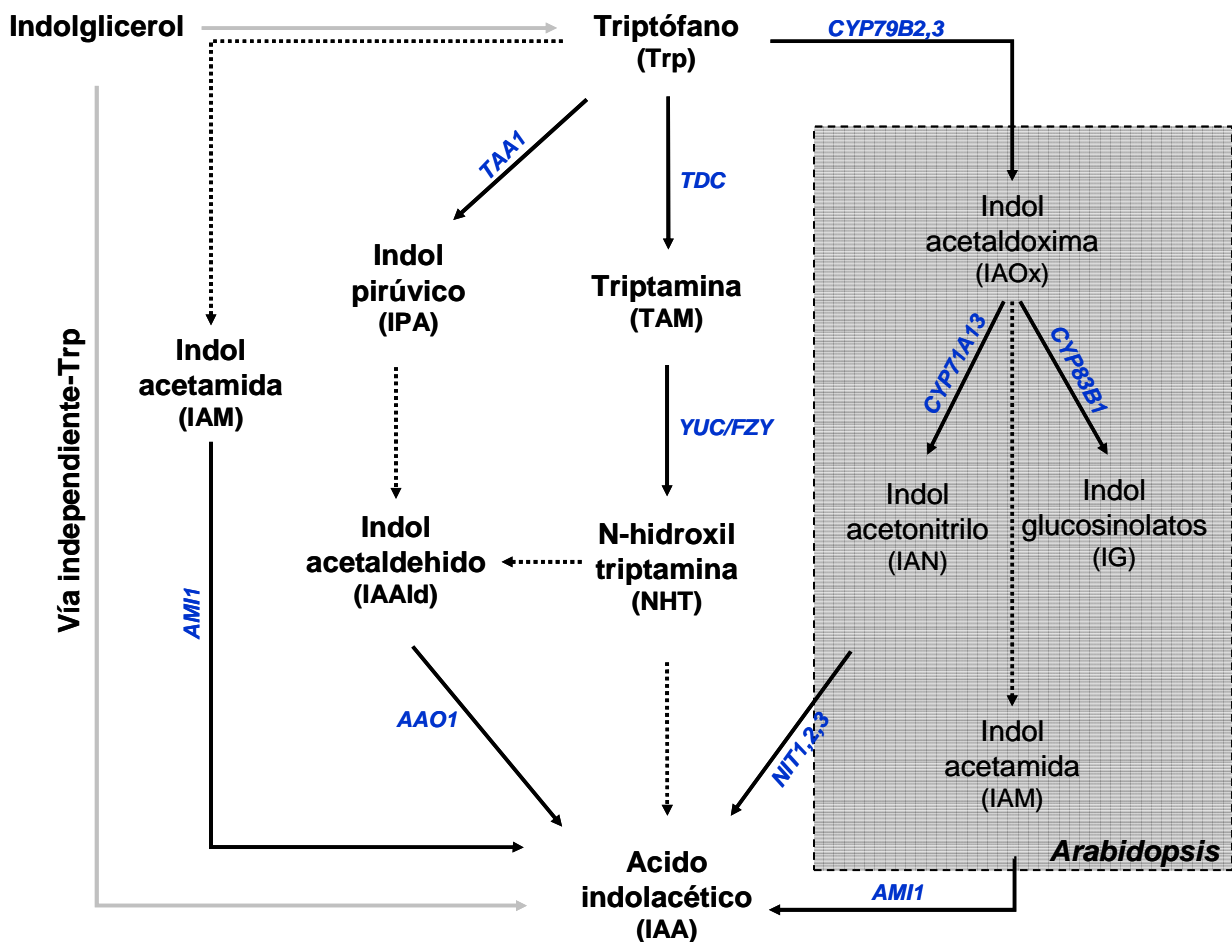


Figura 1. Rutas de biosíntesis de IAA propuestas en plantas. Las flechas sólidas indican que las actividades enzimáticas correspondientes y los genes implicados han sido identificados. Las flechas punteadas indican que bien la actividad enzimática o bien el gen no ha sido identificado. Se muestran en azul los nombres de los genes caracterizados (tomado y modificado de Sugawara *et al.*, 2009).

1.5. Síntesis de IAA independiente de triptófano

La existencia de una vía de síntesis de IAA independiente de Trp, es decir, en la que el Trp no actúa como un intermediario, fue puesta en evidencia mediante el análisis de mutantes de maíz (Wright *et al.*, 1991) y de *Arabidopsis* (Normanly *et al.*, 1993) auxótrofos para el Trp. En estos mutantes, a pesar de su incapacidad para sintetizar Trp, se siguen acumulando conjugados del IAA. Aunque se desconocen los pasos intermedios en la síntesis de IAA independiente de Trp (IT), los resultados de aproximaciones experimentales de genética reversa sugieren que el indolglicerol, un intermediario en la ruta de biosíntesis del Trp (Figura 1), sirve como punto de ramificación para la vía IT (Ouyang *et al.*, 2000).

1.6. Síntesis de IAA dependiente de triptófano

Los resultados de décadas de investigación han permitido identificar o postular múltiples rutas de síntesis de IAA dependientes de Trp (Woodward and Bartel, 2005; Zhao, 2010; Normanly, 2010). Sin embargo, la disponibilidad de pocos mutantes en los que haya sido afectado algún gen implicado en la síntesis *de novo* de IAA, unido a la alta redundancia funcional que existe, tanto a nivel de rutas alternativas como a nivel de familias multigénicas (Cohen *et al.*, 2003), ha dificultado en gran medida la dilucidación completa de la mayoría de estas rutas biosintéticas, así como la determinación de la importancia relativa de ellas en diferentes condiciones.

1.6.1. Vía del indolacetamida (IAM)

El IAM ha sido descrito como un intermediario en la síntesis de IAA dependiente de Trp en plantas y en bacterias, incluyendo a *Pseudomonas syringae*. El primer paso de esta vía consiste en la conversión del Trp en IAM (Figura 1), mediante una actividad Trp-monooxigenasa. El gen correspondiente sólo ha sido identificado en bacterias (gen *IaaM*; Patten and Glick, 1996). El siguiente paso de la ruta del IAM es la transformación del IAM en IAA catalizada por la enzima indolacetamida hidrolasa. El gen codificador de esta

actividad ha sido identificado en bacterias (*laaH*) y en plantas (*AMI1*), concretamente en *Arabidopsis* (Pollmann *et al.*, 2003) y en tabaco (Nemoto *et al.*, 2009).

1.6.2. Vía del ácido indolpirúvico (IPA)

La síntesis IAA mediada por el metabolito IPA ha sido identificada en plantas y en microorganismos productores de IAA (Cooney and Nonhebel, 1991; Koga *et al.*, 1994). Aunque la actividad enzimática implicada en el primer paso de esta vía, es decir, la conversión de Trp en IPA (Figura 1), es conocida desde hace casi 20 años, sólo recientemente ha sido identificado el gen responsable de la actividad Trp-aminotransferasa (*TAA1*) en *Arabidopsis* (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008). La conversión del IPA en indolacetaldehído (IAAld) sólo ha sido caracterizada, bioquímicamente y genéticamente, en bacterias. Este segundo paso de la ruta IPA es catalizado por la IPA-descarboxilasa y ha sido descrito como el paso limitante de la misma (Koga *et al.*, 1994). La vía del IPA es culminada por la enzima aldehído oxidasa que cataliza la transformación del IAAld en IAA, y el gen implicado (*AAO1*) ha sido identificado en varias especies vegetales incluido *Arabidopsis* y tomate (Sekimoto *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2009).

1.6.3. Vía del indolacetaldoxima (IAOx)

Esta ruta biosintética de IAA se inicia con la oxidación del Trp hasta IAOx (Figura 1) catalizada por los citocromos tipo P450 denominados CYP79B2 y CYP79B3 (Hull *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002). La ruta continúa con la conversión del IAOx en indolacetonitrilo (IAN) catalizada por el citocromo CYP71A13, y termina con la transformación del IAN en IAA por acción de nitrilasas (Normanly, 2010). Recientemente se ha propuesto que el IAOx también puede ser convertido en IAM (Figura 1) con lo que la vía del IAOx quedaría interconectada con la vía del IAM comentada en el apartado 1.6.1. (Sugawara *et al.*, 2009).

La vía del IAOx para la síntesis de IAA, aunque ha sido objeto de estudio en muchos artículos científicos, parece estar restringida a especies del orden *Capparales* como son *Carica papaya*, *Arabidopsis* o *Brassica napus* (Bak *et al.*, 1998), y está íntimamente ligada

a la síntesis de un tipo de metabolitos secundarios relacionados con la defensa antimicrobiana, los indolglucosinolatos (IG) (Grubb and Abel, 2006; Clay *et al.*, 2009). De hecho, la sobreexpresión del gen *CYP79B2* en *Arabidopsis* provoca la acumulación de IG (Mikkelsen *et al.*, 2009), mientras que en los dobles mutantes con pérdida de función *cyp79b2/cyp79b3* los niveles de IG son muy reducidos (Zhao *et al.*, 2002).

1.6.5. Vía de la triptamina (TAM)

El primer paso de esta ruta de síntesis de IAA (Figura 1) es la transformación del Trp en triptamina (TAM), reacción catalizada por la enzima triptófano-d Descarboxilasa (TDC). La presencia de TAM ha sido confirmada en cebada (Schneider *et al.*, 1972), tomate (Cooney and Nonhebel, 1991), arroz (Ishihara *et al.*, 2008) y *Arabidopsis* (Sugawara *et al.*, 2009). A pesar de la temprana identificación del gen *TDC* en *Catharanthus roseus* (de Luca *et al.*, 1989), aún no se han caracterizado genes ortólogos en otras especies vegetales, incluso en aquellas cuyos genomas han sido secuenciados. La sobreexpresión del gen *TDC* de *C. roseus* en hojas de tabaco provoca la acumulación de TAM, pero no aumenta los niveles de IAA ni conduce a fenotipos típicos de altos niveles de auxinas (Songstad *et al.*, 1990), lo que sugiere que la ruta de la TAM no es regulada a este nivel.

El siguiente paso de la vía es la transformación de la TAM en N-hidroxil-triptamina (NHT), actividad de N-hidroxilación que fue detectada por primera vez en extractos celulares de tabaco (Phelps and Sequeira, 1967), y más tarde en brotes de tomate o de cebada (Gibson *et al.*, 1972). Los estudios pioneros sobre los mutantes *yucca* de *Arabidopsis* realizados por Zhao y colaboradores (2001) llevaron a la identificación de la familia de genes *YUC*, los cuales codifican proteínas de tipo flavin-monooxigenasas (FMOs). Estos autores han demostrado, mediante ensayos de actividad enzimática *in vitro* con una proteína recombinante, que la FMO codificada en el gen *YUC1* es capaz de convertir TAM en NHT. Los autores también sugieren que dicha conversión es un punto de control o paso limitante de la vía de la TAM. Otra evidencia que redonda en el papel de las FMOs de tipo YUCCA en la vía de la TAM, es la observación de que en el mutante *cow1* de arroz (inactivación del gen *OsYUC8*) la concentración de TAM en brotes y raíces al menos dos veces mayor que en el arroz salvaje (Woo *et al.*, 2007).

Los siguientes pasos de la vía de la TAM, y que implican la transformación de NHT en IAA, aún no han sido esclarecidos genética ni bioquímicamente, aunque la IAOx, el IAN y el IAAld han sido propuestos como intermediarios (Woodward and Bartel 2005; Benjamins and Scheres, 2008; Delker *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios recientes que abordan el análisis de la vía de la TAM en *Arabidopsis*, indican que la vía donde participan los genes *YUC* probablemente no contribuye a la síntesis de IAOx o IAN (Sugawara *et al.*, 2009) y, por tanto, el intermediario más probable es el IAAld (Quittenden *et al.*, 2009). En las bacterias en las que la vía de la TAM ha sido identificada, como por ejemplo ciertas especies de *Azospirillum*, la TAM es convertida directamente en IAAld por acción de una actividad amino-oxidasa (Hartmann *et al.*, 1983).

El descubrimiento de los genes *YUC* en *Arabidopsis*, y su caracterización funcional como reguladores de una ruta de síntesis de IAA a través de la conversión de TAM en NHT (Zhao *et al.*, 2001), despertó un gran interés que ha generado un cuerpo importante de literatura científica en los últimos diez años. Las proteínas YUCCA son FMOs dependientes de los dinucleótidos NADP y FAD que transfieren grupos hidroxilo a una gran variedad de sustratos de bajo peso molecular, aumentando de esta forma la polaridad de la molécula (Ziegler, 2002). Las FMO descubiertas en plantas se reparten en tres grupos filogenéticos o familias principales (Figura 2), presentes tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas (Schlaich, 2007). Están implicadas en procesos tan diversos como la defensa frente a patógenos, el metabolismo de los IG o la biosíntesis del IAA. En la última década, los análisis genéticos y caracterización bioquímica de las FMOs de la familia YUCCA de FMO (clado II en la Figura 2), han revelado que estas proteínas son necesarias en procesos claves del desarrollo de la planta (Zhao, 2010). Estudios realizados en *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006 y 2007; Kim *et al.*, 2007; Cecchetti *et al.*, 2008), petunia (Tobeña-Santamaria *et al.*, 2002), arroz (Woo *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007; Fujino *et al.*, 2008) y maíz (Gallavotti *et al.*, 2008), indican que la síntesis localizada de IAA controlada por las FMOs de tipo YUCCA es necesaria en procesos tan diversos como la embriogénesis, el desarrollo de la plántula, el inicio del desarrollo de hojas y flores, maduración de las flores o la formación del sistema vascular (Zhao, 2008; Chandler, 2009).

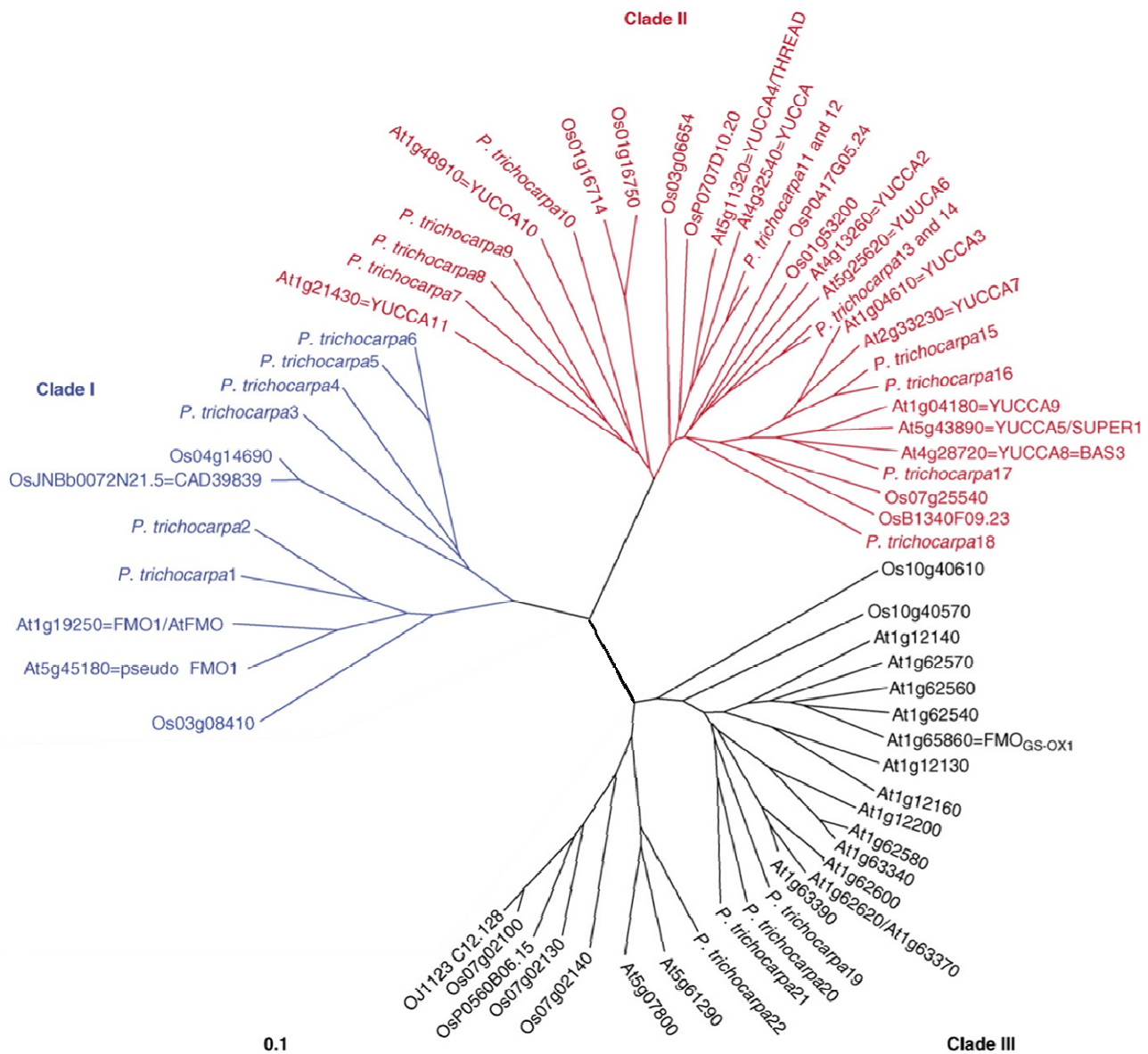


Figura 2. Relaciones filogenéticas entre las FMO de *Arabidopsis*, arroz y álamo. Clado I (azul): incluye una FMO que está implicada en la defensa frente a patógenos (FMO1). Clado II (rojo): FMOs del tipo YUCCA. Clado III (negro): incluye FMOs que participan en el metabolismo de Indolglucosinolatos. At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; P. trichocarpa: *Populus trichocarpa*. Modificada de Schlaich, 2007

El papel que desempeña las FMOs del tipo YUCCA ha sido estudiado con mayor profundidad en *Arabidopsis*, donde se han descubierto al menos 11 genes parálogos pertenecientes a esta familia (de *YUC1* a *YUC11*; Cheng *et al.*, 2006). Se ha comprobado que la sobreexpresión de algunos miembros de la familia *YUC*, concretamente de *YUC1* a *YUC6*, *YUC10* o *YUC11*, conlleva un fenotipo característico de plantas con un nivel elevado de auxinas (Zhao *et al.*, 2001; Marsch-Martínez *et al.*, 2002; Woodward *et al.*,

2005; Cheng *et al.*, 2006 y 2007; Kim *et al.*, 2007). En la figura 3 se muestran ejemplos de fenotipos alterados que resultan de la sobreexpresión del gen *YUC1* en *Arabidopsis*. Este mutante, además de unos niveles de IAA significativamente superiores a los niveles de los controles, presenta un aumento de la dominancia apical, abundantes raíces laterales, elongación de hipocotilos y cotiledones epinásticos. En la misma línea, se observan fenotipos similares a los descritos en *Arabidopsis* en otras especies de plantas como resultado de la sobreexpresión de genes homólogos a los genes *YUC*, como por ejemplo *FLOOZY (FZY)* en petunia (Tobeña-Santamaría *et al.*, 2002) o los genes *OsYUC1* y *OsYUC8 (NAL7/COW1)* en arroz (Yamamoto *et al.*, 2007; Fujino *et al.*, 2008).

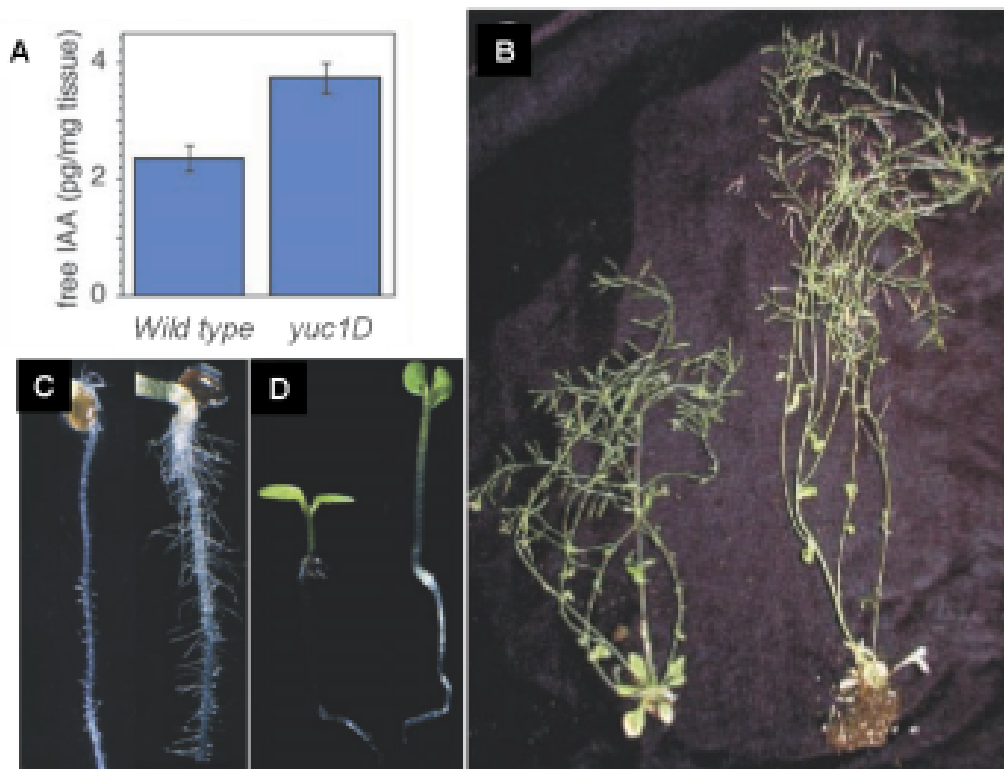


Figura 3. Efecto de la sobreexpresión del gen *YUC1* en *Arabidopsis*. (A) Análisis de los niveles de IAA libre en un mutante que sobreexpresa el gen *YUC1*. En B-D el individuo mutante es el de la derecha. Los fenotipos mutantes mostrados son: (B) Aumento de la dominancia apical; (C) Mayor número de raíces laterales. (D) Cotiledones epinásticos y una mayor elongación del hipocotilo. Tomado de Zhao *et al.*, 2001

Los mutantes de *Arabidopsis* en los que se han sido inactivados ciertas combinaciones de genes *YUC* muestran alteraciones en el sistema vascular y morfología de las hojas (Figura 4 y 5A), malformaciones y pérdida de la dominancia apical (Figura 5B), o aberraciones en la arquitectura floral (Figura 6). La relación que existe entre las alteraciones observadas y la producción local de IAA dirigida por los genes *YUC* está fuertemente apoyada por los experimentos de complementación con el gen bacteriano *iaaM*, cuya expresión en plantas promueve la síntesis de IAA mediante la conversión de Trp en IAM (Romano *et al.*, 1995). Concretamente, Cheng y colaboradores (2007) demuestran que los fenotipos mutantes mencionados pueden ser revertidos por la expresión específica de tejido del gen *iaaM*, siempre y cuando tenga lugar bajo el control de los promotores de los genes *YUC* afectados por las mutaciones (Figura 7). En cambio, las aplicaciones exógenas de IAA o los experimentos de complementación usando los promotores de genes *YUC* no afectados en los mutantes, no son capaces de recuperar el fenotipo salvaje. Estos resultados resaltan el importante papel de los genes *YUC* en el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante el control temporal y espacial de la producción IAA.

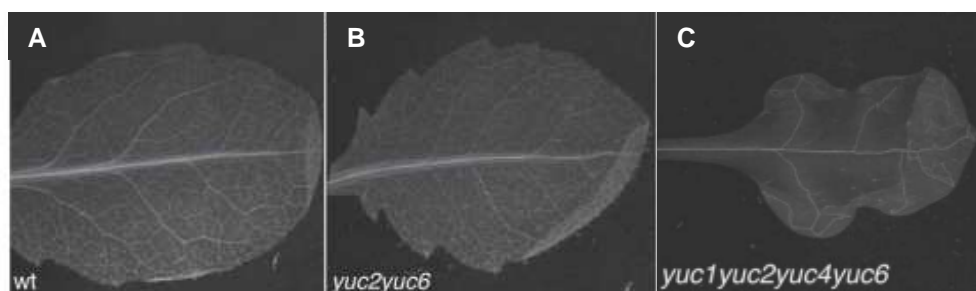


Figura 4. Patrón de venas alterado en las hojas de mutantes *yuc* en *Arabidopsis*. (A) Tipo silvestre. (B) doble mutante *yuc2yuc6*. (C) Cuádruple mutante *yuc1yuc2yuc4yuc6*. Tomado de Cheng *et al.*, 2006.

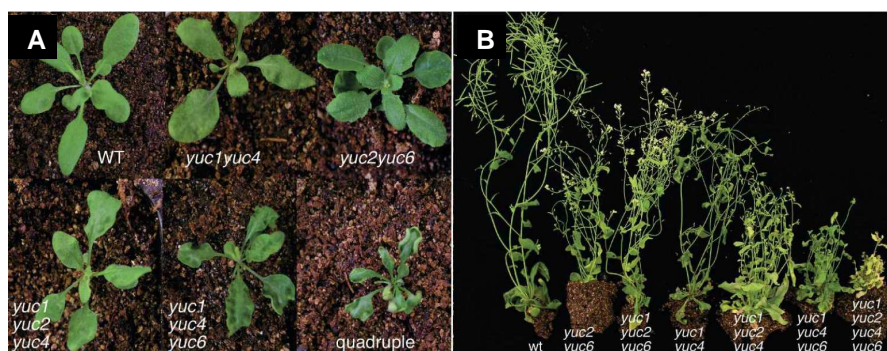


Figura 5. Fenotipos alterados en mutantes *yuc* múltiples de *Arabidopsis*. (A) Alteraciones en la morfología de las hojas. (B) Defectos en la estructura de la planta y en la dominancia apical. Tomado de Cheng *et al.*, 2006.

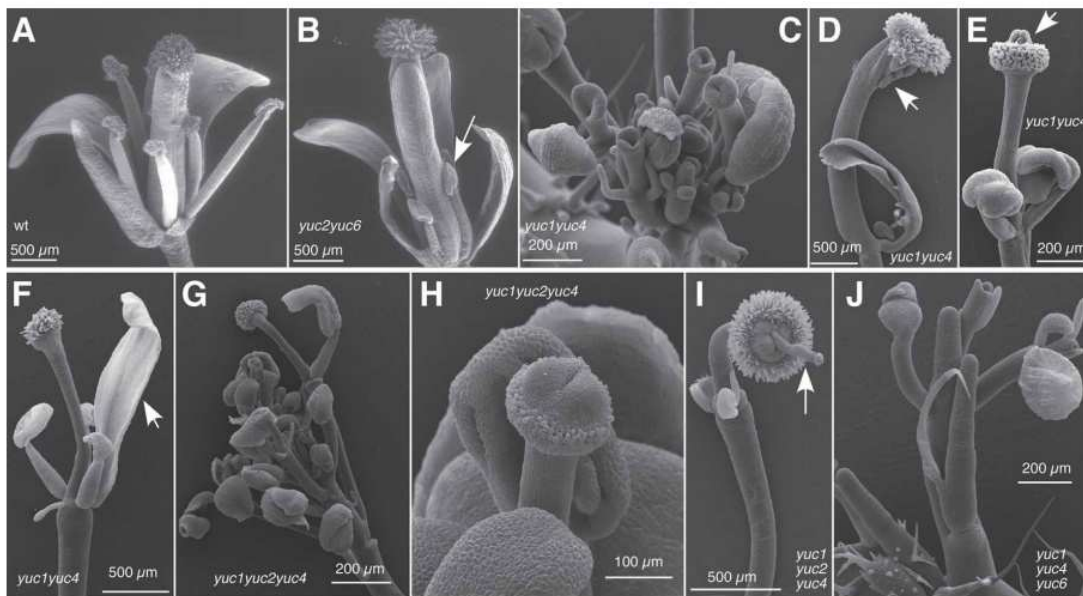


Figura 6. Efectos de las mutaciones *yuc* en el desarrollo floral en *Arabidopsis*. (A) Flor de tipo silvestre sin algunos pétalos y sépalos para visualizar los verticilos internos. (B-J) Flores con desarrollo aberrante en ciertos mutantes *yuc* múltiples. Las flechas señalan diferentes malformaciones: en (B) estambres más cortos; en (D) una estructura tipo óvulo; en (E) una protuberancia en el gineceo; en (F) un órgano parecido a un pétalo; en (I), una estructura similar a un gineceo creciendo por fuera de otro gineceo. Tomado de Cheng *et al.*, 2006.

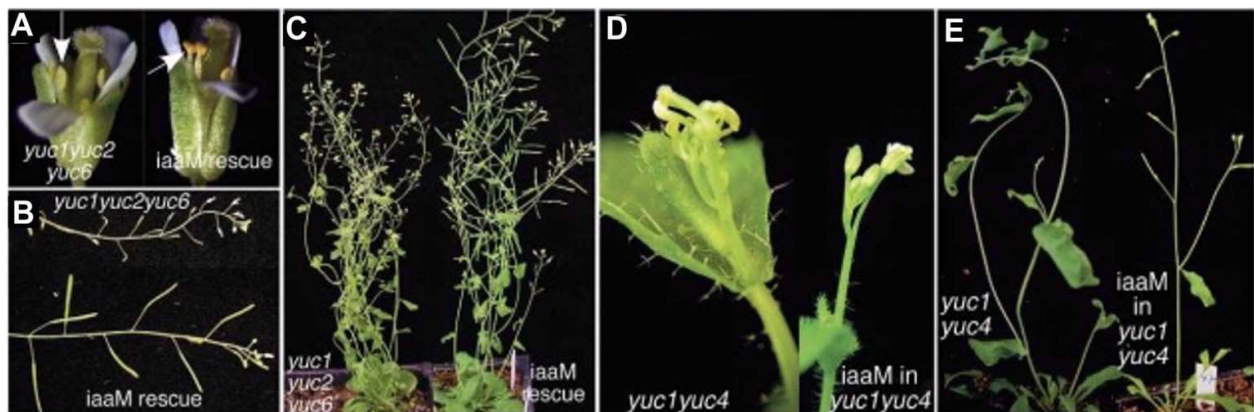


Figura 7. Recuperación del fenotipo salvaje en mutantes *yuc* de *Arabidopsis*. (A-C) Fenotipos recuperados en mutantes *yuc1yuc2yuc6* mediante expresión del gen *iaaM* bajo el control del promotor del gen *YUC6*. Las flechas en (A) resaltan la diferencia de desarrollo de los estambres. En (B) se recupera la fertilidad y en (C) la dominancia apical. (D-E) Fenotipos rescatados en mutantes *yuc1yuc4* mediante expresión del gen *iaaM* bajo el control del promotor del gen *YUC1*. En (D) se muestra la recuperación del desarrollo floral normal y en (E) de la fertilidad. Tomado de Cheng *et al.*, 2006.

Al año siguiente de la descripción del primer mutante *yuc*, se publica la caracterización del gen *FLOOZY* (*FZY*) en *Petunia hybrida*, ortólogo del gen *YUC1* de *Arabidopsis* (Tobeña-Santamaría *et al.*, 2002). La pérdida de función del gen *FZY* provoca alteraciones en la formación de venas secundarias, tanto en hojas como en brácteas, así como la pérdida de la dominancia apical y aberraciones en la arquitectura floral (Figura 8). Los mutantes *fzy* muestran alteraciones similares a las observadas en los mutantes *yuc* múltiples, lo que confirma claramente que la síntesis de IAA vía TAM está implicada en diversos procesos del desarrollo en diferentes especies. Por otro lado, el hecho de que la pérdida de función de *FZY* no afecte al nivel basal de IAA, sugiere de nuevo que la vía de la TAM responde a necesidades de IAA locales y que posiblemente existe una notable regulación espacio-temporal de la vía.

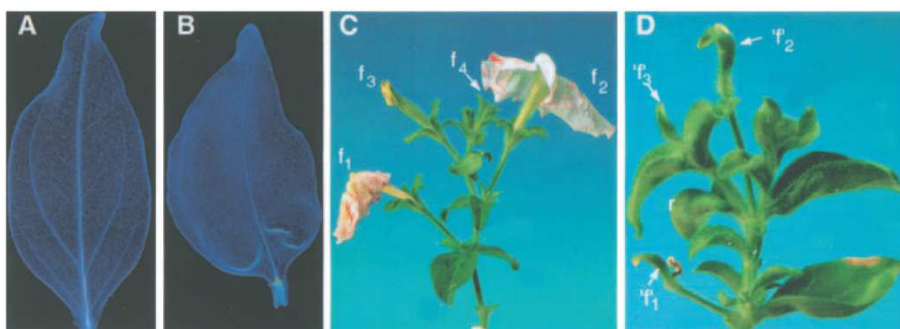


Figura 8. Fenotipos aberrantes en el mutante *floozy* (*fzy*) de *petunia*. (A) Hoja de una planta del tipo silvestre. (B) Hoja de un mutante *fzy* donde se aprecia la pérdida de venas secundarias. (C) Inflorescencia de una planta del tipo silvestre (f1–f4 diferentes estados de desarrollo floral). (D) Inflorescencia de una planta mutante *fzy*; las flechas señalan las estructuras florales aberrantes ('f'). Tomada y modificada de Tobeña-Santamaría *et al.*, 2002.

Los datos aportados por el análisis del gen *FZY* en *P. hybrida* también revelaron que la familia de FMOs de tipo *YUCCA* ha sufrido una importante diversificación en el transcurso de la evolución. Por ejemplo, parece que la tarea desempeñada por el gen *FZY* en la vascularización de las hojas y en el desarrollo de la flor en *petunia* está encomendada a 4 genes en *Arabidopsis* (*YUC1*, *YUC2*, *YUC4* y *YUC6*). En general, los estudios comentados en los párrafos de este apartado, además de resaltar el gran impacto de la síntesis de IAA vía TAM sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, indican que existe un escenario complejo de divergencia y redundancia funcional que depende de la especie vegetal y del miembro particular de la familia de genes *YUCCA* que está siendo examinado (Gallavotti *et al.*, 2008).

El trabajo experimental descrito en la presente memoria está centrado en la familia multigénica de tomate (*Solanum lycopersicum*) que codifica FMOs de tipo YUCCA. En parte, esta elección se ha hecho teniendo en mente que este tipo de genes representa un mecanismo de control temporal y espacial de la producción de IAA (Zhao, 2008; Chandler, 2009), hormona que está involucrada en la mayoría de los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, nuestra contribución al conocimiento de la vía de la TAM en *Solanum lycopersicum* podría aportar luz sobre la enorme diversidad que exhiben los diferentes cultivares de tomate, tanto en la arquitectura de la planta y como en la morfología de los frutos (Paran and van der Knaap, 2007; Xiao *et al.*, 2008), así como permitir el desarrollo de nuevas estrategias para la producción de frutos sin semillas dentro de un rango más amplio de temperaturas ambientales y mediante procesos de partenocarpia inducidos por el IAA (Gorguet *et al.*, 2005).

1.7. Papel de las auxinas en la interacción entre las plantas y sus patógenos bacterianos.

Además de su función como reguladores del crecimiento vegetal, las auxinas también desempeñan algún papel durante la interacción de las plantas con ciertos patógenos bacterianos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Bari and Jones, 2009; Grant and Jones, 2009). Una evidencia clara de que las auxinas promueven la susceptibilidad a la infección bacteriana en plantas, proviene de experimentos en los que se aplica auxina o análogos sintéticos de manera exógena (Yamada, 1993; Navarro *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007). Un ejemplo se muestra en la figura 9, donde se aprecia como la coinoculación de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* con el ácido naftalenacético promueve los síntomas de la enfermedad y el crecimiento del patógeno en *Arabidopsis*.

Algunas especies bacterianas fitopatógenas poseen rutas metabólicas que les capacitan para producir IAA (Spaepen *et al.*, 2007), mientras que en otros casos las bacterias inducen la producción de IAA activando las rutas de síntesis propias del hospedador vegetal (Kazan and Manners, 2009). En cualquier caso las bacterias patógenas utilizan este IAA como parte de su estrategia de colonización, la cual incluye estimular el crecimiento vegetal y eludir o atenuar los mecanismos de defensa basal de las plantas beneficiándose de la señalización mediada por auxinas (Bari and Jones, 2009;

Kazan and Manners, 2009). En este sentido, las plantas y sus patógenos bacterianos han desarrollado una carrera armamentística en el transcurso de su coevolución. Por ejemplo, *Pseudomonas syringae* usa el sistema de secreción de tipo III para inyectar en la célula vegetal más de 40 proteínas efectoras de la virulencia (Chang *et al.*, 2005) incluyendo el factor de virulencia *avrRpt2*, el cual modula la fisiología de auxina en el hospedador (Chen *et al.*, 2007). Se ha encontrado que *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000) induce en *Arabidopsis* un aumento en los niveles de IAA (O'Donnell *et al.*, 2003), así como cambios en la expresión génica que pueden activar la producción de IAA, alterar el transporte de auxina y desreprimir la señalización de auxinas (Thilmony *et al.*, 2006).

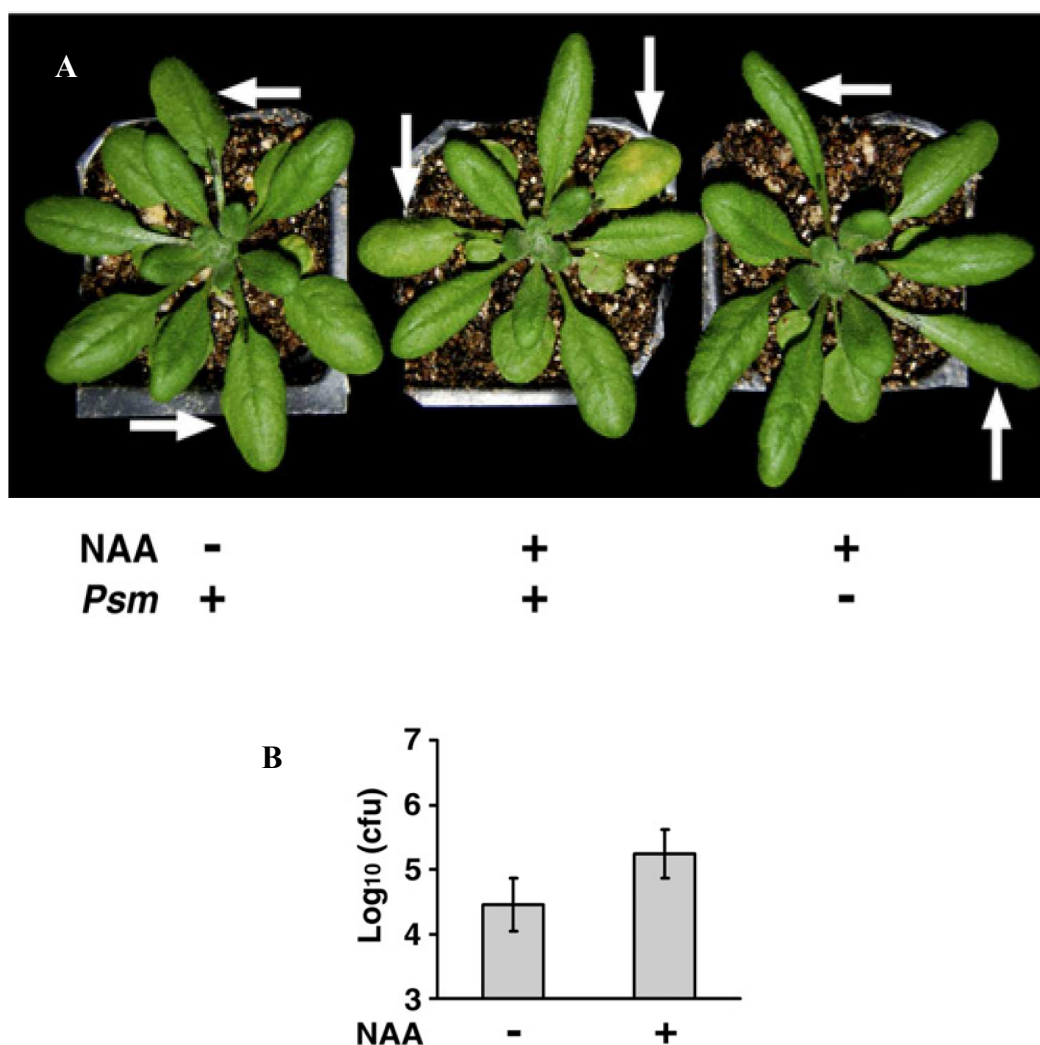


Figura 9. Efecto del tratamiento con un análogo de auxinas sobre el desarrollo de la infección bacteriana. (A) Coinoculación de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) y ácido naftalenacético (*NAA*) en plantas de *Arabidopsis*, y los controles correspondientes. Las fotografías fueron tomadas 3 días después de la infección (dpi). Las flechas indican las hojas infiltradas. (B) Medida del crecimiento de las bacterias a 3 dpi; cfu: unidades formadoras de colonias. Tomado de Wang *et al.*, 2007.

En contraposición, el bloqueo de la respuesta a auxinas aumentaría la resistencia de la planta frente a la infección bacteriana. En concordancia con esta posible estrategia defensiva de la planta, Navarro y colaboradores (2006) han encontrado que una disminución de los niveles del receptor de auxinas TIR1, provocada por la sobreexpresión de un micro-RNA (miR393) dirigido contra el ARNm del gen *TIR1* o inducida por aplicaciones de ácido salicílico, incrementa la resistencia frente a *PstDC3000* en *Arabidopsis*. Estos resultados sugieren que la atenuación de la señalización de auxinas es parte de la respuesta inmune inducida en plantas, y a su vez delatan la interconexión que existe entre las “hormonas del desarrollo” como las auxinas y las “hormonas de defensa” como el ácido salicílico (Kazan and Manners, 2009).

En relación con la capacidad de ciertas bacterias fitopatógenas para incrementar los niveles de auxina en las plantas hospedadoras, varias publicaciones científicas describen situaciones en los que procesos de infección provocan un aumento de la expresión de genes que participan en rutas de biosíntesis de IAA o en su liberación a partir de conjugados. Quizás, el primer caso publicado sea la inducción del gen *CYP79B2* en *Arabidopsis* por una cepa virulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Hull *et al.*, 2000). Más recientemente, se ha descrito la activación de genes que codifican nitrilasas o enzimas que hidrolizan conjugados de IAA tras la infección de *Arabidopsis* por *PstDC3000* (Thilmony *et al.*, 2006), o la inducción de genes de nitrilasa y de aldehído-oxidasa en arroz por la infección con *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ding *et al.*, 2008). Ya que estas bacterias también son capaces de sintetizar su propio IAA, aún no está del todo claro cuál es la contribución relativa de la bacteria y del hospedador en el aumento de los niveles de auxina observados. Con todo, es necesario seguir indagando en la regulación de la síntesis *de novo* de IAA durante la respuesta a la infecciones por bacterias fitopatógenas (Grant and Jones, 2009).

1.8. Antecedentes que relacionan la síntesis de IAA vía triptamina (TAM) con las interacciones planta-patógeno bacteriano

Los primeros trabajos experimentales que relacionan la vía de la TAM para la síntesis de IAA con la interacción entre una planta y una bacteria fitopatógena, se remontan a los años 60 del siglo pasado. En primer lugar, Sequeira y Kelman (1962)

describieron que ocurría un aumento de los niveles de IAA en las plantas de tabaco durante la etapa inicial de la infección por *Pseudomonas solanacearum*, un periodo crítico en el desenlace de esta interacción. Posteriormente, utilizando técnicas de marcaje radiactivo, Sequeira demostró que la TAM estaba involucrada en el incremento de IAA asociado a la mencionada infección bacteriana (Sequeira, 1965). Se trataba, por tanto, de síntesis *de novo* de IAA. Además, este autor encontró que los extractos de la planta podían convertir la TAM en IAA, pero no ocurría así con los extractos de la bacteria, a pesar de que era conocida la capacidad de *Pseudomonas solanacearum* para sintetizar IAA y excretarlo al medio (Sequeira and Williams, 1964). Más recientemente, se han identificado los genes *laaM* e *laaH* en diferentes especies fitopatógenas de *Pseudomonas*, los cuales están involucrados en la síntesis de IAA por la vía de la IAM, pero no se han encontrado en las mismas especies actividades que permitan la síntesis de IAA por la vía de la TAM (Spaepen *et al.*, 2007).

Como se expone en el apartado 1.6.5 de esta introducción, las FMOs de tipo YUCCA catalizan la conversión de TAM en NHT, un paso limitante en la síntesis del IAA por la vía de la TAM (Zhao *et al.*, 2001). El descubrimiento de los genes que codifican FMOs de tipo YUCCA en *Arabidopsis*, ha representado una oportunidad para ampliar nuestro conocimiento sobre el papel de la vía de la TAM en el progreso de ciertos procesos de infección por bacterias fitopatógenas. Sin embargo, casi cincuenta años después de los trabajos pioneros encabezados por Sequeira, no se han comunicado avances en este sentido. No obstante, los resultados de un estudio publicado recientemente en la revista *Science* (Römer *et al.*, 2007) podrían ser entendidos, según nuestro parecer, como un indicio de que ciertas bacterias fitopatógenas pueden activar la síntesis de FMOs de tipo YUCCA con la intención de aumentar los niveles de IAA en la planta hospedadora. Römer y colaboradores han demostrado que, durante la interacción del patógeno bacteriano *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* con una variedad resistente de *Capsicum annuum* (pimiento), una proteína bacteriana promotora de la virulencia llamada AvrBs3 activa la transcripción del gen de resistencia *Bs3* en la planta. Esta activación promueve una respuesta defensiva de muerte celular programada conocida como respuesta hipersensible (Lam *et al.*, 2001). La proteína codificada en el gen *Bs3* es una FMO que los análisis filogenéticos relacionan con las FMOs de tipo YUCCA, aunque carece de un tramo de unos 70 aminoácidos propios de esta familia de FMOs (Römer *et al.*, 2007). Este conjunto de observaciones nos sugieren la siguiente

interpretación: parece que durante la coevolución de esta pareja específica hospedador-patógeno se ha aprovechado, por parte de la planta, la activación transcripcional ejercida por el factor bacteriano AvrBs3 sobre algunos genes de la familia YUCCA en pimiento, para desarrollar un mecanismo de detección del patógeno que se ha vinculado de alguna manera a una respuesta defensiva. En este contexto hipotético, la divergencia experimentado por un miembro de la familia YUCCA en pimiento ha conducido a una FMO modificada que dispara la respuesta hipersensible.

Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis es caracterizar genética y bioquímicamente genes homólogos a Flavin monooxigenasa (*FMO*) del tipo *YUC* de *Solanum lycopersicum*. Este trabajo desarrollará los puntos que a continuación se describen:

1. Búsqueda bioinformática de secuencias de proteínas tipo flavin-monooxigenasa (*FMO*) de plantas, y su análisis para la caracterización de motivos conservados, que permitan la Identificación y caracterización estructural de genes homólogos en *Solanum lycopersicum*.

2. Subclonaje de la región codificadora de un gen candidato *FMO* del tipo *YUC* de *S. lycopersicum* en un vector expresión apropiado, con la finalidad de confirmar su actividad *FMO* utilizando triptamina como sustrato.

3. Secuenciar y describir la estructura exón/intrón de los posibles homólogos a *FMO* del tipo *YUC* detectados en *S. lycopersicum*, con la finalidad de establecer relaciones filogenéticas entre los miembros de la familia multigénica *ToFZY*.

4. Analizar el patrón de expresión de los genes *ToFZY* durante el proceso desarrollo de *Solanum lycopersicum* con la presencia de IAA en muestras de tomate, basada en tinciones histoquímicas de la actividad beta-glucuronidasa.

5. Relacionar del IAA y la expresión de los genes *ToFZY* con procesos de interacción planta-bacteria.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Cultivares de tomate y condiciones de crecimiento

El trabajo experimental que se describe en la presente tesis se ha centrado en un modelo de estudio agronómico, la especie *Solanum lycopersicum* (tomate). Para la caracterización molecular de la familia multigénica *ToFZY* se utilizó la variedad *ciliigia* o *cerasiforme* de *S. lycopersicum*, también conocida comercialmente como tomate *cherry*. En el caso de los estudios de localización de IAA en plantas de tomate, se analizó una línea transgénica amablemente cedida por el Dr. Mazzucato. Dicha línea, basada en el cultivar Chico III de *Solanum lycopersicum*, porta el gen reportero *GUS* (Beta-glucuronidasa) bajo el control de un promotor de la transcripción inducible por IAA, que procede del gen *p5* de *Agrobacterium tumefaciens*. Para los estudios de la interacción planta-bacteria, se emplearon dos líneas de tomate cuasi-isogénicas de la variedad Rio Grande (RG): la línea RG-*PtoS* y la línea RG-*PtoR*. La línea RG-*PtoR* se caracteriza por la presencia del gen *Pto*, el cual le confiere resistencia frente a la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000). Las semillas de la variedad RG fueron proporcionadas por el *Tomato Genetics Resource Center* de la Universidad de California (<http://tgrc.ucdavis.edu>), concretamente los accesos LA3343 (RG-*PtoS*) y LA3342 (RG-*PtoR*).

Las semillas de tomate fueron sembradas en propagadores usando un sustrato formado por una mezcla de turbas (*LEADER*). Durante la germinación y el crecimiento de las plántulas, la cámara de crecimiento se mantuvo a una temperatura de 25°C durante el ciclo de día y de 21°C durante el ciclo de noche, respectivamente, una humedad relativa media del 60% (± 10), y un fotoperiodo de 16 h de luz con una intensidad lumínica de 80 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las plantas de la variedad *ciliigia*, una vez que alcanzaron el estado de 4-5 hojas, fueron trasplantadas individualmente a macetas de 20 cm de diámetro y trasladadas al invernadero donde desarrollaron un ciclo reproductivo completo. Durante este periodo las

plantas fueron regadas según las necesidades, y la nutrición se realizó con una solución comercial de abono NPK 7-5-6 con micronutrientes (COMPO).

Las plantas de las variedades RG fueron trasplantadas a macetas individuales de 5 cm una vez que alcanzaron el estado de 2 hojas, y fueron mantenidas en la cámara de crecimiento hasta la finalización de los experimentos. Durante el paso de trasplante se realizó una selección de las plantas, prestando especial atención en mantener una alta homogeneidad en el estado de crecimiento y fortaleza de las mismas.

3.1.2. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo de bacterias

Cepas bacterianas

La cepa XL-1 Blue de *Escherichia coli* (*Stratagene*) fue empleada en la construcción de una molécula de ADN recombinante. La cepa M15 de *E. coli* (*QIAGEN*) se empleó en la expresión heteróloga de la proteína ToFZY1 debido a su menor contenido en proteasas. La cepa bacteriana fitopatógena *PstDC3000*, fue amablemente cedida por el Dr. Tornero (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia).

Plásmidos

El vector de expresión pQE-60 (*Qiagen*) fue elegido para la producción de la proteína ToFZY1 recombinante. En dicho vector, un promotor de la transcripción procedente del fago T5 y dos secuencias operadoras tomadas del operón lactosa de *E. coli* permiten la expresión regulada de la secuencia de ADN insertada en el sitio de clonaje múltiple (MCS). La síntesis de la proteína de interés tiene lugar usando el codón de inicio del propio ADNc clonado en el vector, y la proteína recombinante resultante presenta 6 aminoácidos de histidina (6xHis) fusionados a su extremo carboxilo terminal (Figura 10).

El plásmido pREP4 contenido en *E. coli* M15 confiere resistencia a la kanamicina. Regula en *trans* la expresión del sistema pQE-60 mediante la producción constitutiva de la proteína represora del operón *Lac* (LacI).

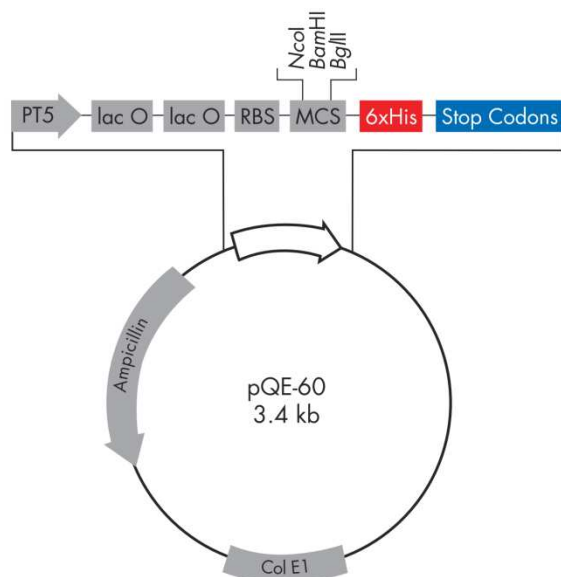


Figura 10. Vector pQE-60 empleado en la construcción de una proteína recombinante. **PT5:** promotor de la transcripción del fago T5; **lacO:** Operador del operón *Lac*; **RBS:** sitio de unión del ribosoma; **MCS:** sitio de clonaje múltiple donde se indican tres dianas para enzimas de restricción; **6xHis:** secuencia que codifica los 6 residuos de histidina; **Stop Codons:** tres codones de parada en las tres pautas de lectura posibles; **Col E1:** origen de replicación del plásmido; **Ampicillin:** gen que confiere resistencia a antibióticos beta-lactámicos como la ampicilina.

Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* se sembraron en medio nutritivo de Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37°C. El medio de cultivo consistió en extracto de levadura (0,5%, p/v), peptona de caseína (1%, p/v) y NaCl (1%, p/v), ajustando el pH a un valor de 7 con NaOH. Para solidificar el medio de cultivo se añadió agar (1,5%, p/v). El medio se suplementó con diferentes antibióticos dependiendo del contexto: con tetraciclina (20 µg/ml) para seleccionar a la cepa XL1-blue en virtud del factor F' que porta esta cepa; con ampicilina (100 µg/ml) y/o kanamicina (25 µg/ml) para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos pQE-60 y/o pREP4, respectivamente. Los antibióticos se añadieron al medio de cultivo después de que éste fuera esterilizado en autoclave y de que su temperatura alcanzase 50°C. Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se sometieron a agitación orbital (200 rpm).

La cepa *PstDC3000* se sembró en medio King B sólido suplementado con el antibiótico rifampicina y se incubó a 28°C. La composición del medio fue: tripteína (1%, p/v), peptona de carne (1%, p/v), fosfato dipotásico (0,15%, p/v), sulfato de magnesio (0,15%, p/v) y agar (1,5%, p/v). El pH fue ajustado a un valor de 7 empleando NaOH. Una vez autoclavado el medio de cultivo y enfriado a 50°C, se le añadió rifampicina (50 µg/ml) y glicerol estéril (1%, v/v).

3.2. Infección de plantas de tomate con bacterias

3.2.1. Infiltración de bacterias *PstDC3000* en plantas de tomate

Tras 48 h de crecimiento, las bacterias *PstDC3000* fueron recolectadas de la superficie del medio de cultivo sólido arrastrándolas con 1 ml de una solución estéril de MgCl_2 10 mM. A continuación, las células bacterianas fueron sedimentadas mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min, y luego resuspendidas en 1 ml de la misma solución. La concentración final de bacterias se determinó midiendo la A_{600} de la suspensión bacteriana, la cual fue diluida usando MgCl_2 10 mM hasta obtener una preparación para infiltrar con una A_{600} de 0,015 ($\approx 7 \times 10^6$ ufc/ml).

Durante dos horas previas a la infiltración de bacterias, y también durante la misma, las plantas se mantuvieron en un ambiente con una humedad relativa del 80-90 %, lo cual facilitó la entrada de las suspensiones bacterianas a través de los estomas. La infiltración de 500 μl de la suspensión bacteriana se realizó en el envés de la segunda hoja, en plantas con un desarrollo foliar de 3 hojas, usando una jeringuilla de 1 ml sin aguja. Los controles negativos se infiltraron del mismo modo, pero usando una solución estéril de MgCl_2 10 mM.

3.2.2. Co-infiltración de bacterias y ácido indolacético

La preparación de las mezclas de bacterias *PstDC3000* y ácido indolacético (IAA) para los experimentos de co-infiltración se iniciaron obteniendo una solución madre de IAA 5 mM. Esta solución se preparó disolviendo primero 43,8 mg de IAA ($\text{pm} = 175,19$) en 2 ml de etanol absoluto. A continuación se añadió agua destilada, lentamente y sin dejar de agitar, hasta completar un volumen final de 50 ml. Esta solución de IAA 5 mM se esterilizó utilizando un filtro con un diámetro de poro de 0,22 μm , y luego se diluyó empleando una suspensión de *PstDC3000* ($A_{600}=0,015$; apartado 3.2.1) hasta alcanzar diferentes concentraciones finales de IAA: 25, 50, 75 y 100 μM .

3.3. Recolección de muestras vegetales

3.3.1. Análisis espacio-temporal de la expresión génica

El estudio del patrón de transcripción de los genes *ToFZY* a lo largo del ciclo de vida completo de la plantas de tomate se centro en la variedad *ciliogia* de *Solanum lycopersicum*. La toma de muestras para estos análisis se prolongó durante 5 meses, abarcando un total de 33 muestras que comprendieron raíz, cotiledón, hoja, flor y fruto. Cada muestra consistió en una mezcla de material vegetal procedente de 5 a 20 individuos, y en el caso de las muestras más pequeñas (por ejemplo los primordios de hojas) la obtención de la cantidad de material necesario implicó hasta 200 órganos independientes. Una vez recolectadas, las muestras vegetales fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento. En la figura 11 se muestran fotografías de algunos de las muestras analizadas.

Las muestras de **raíz** incluyeron fases tempranas de la formación de la radícula y raíces de plantas adultas. Las muestras de **radícula** se tomaron a las **72, 78 y 96 h** posteriores a la imbibición de las semillas (muestras **RD1-RD3**). Las porciones **proximal, media y distal** de la **raíz madura** (muestras **RM1-RM3**) fueron tomadas de plantas en un estado de desarrollo de 7 hojas.

Las muestras de **cotiledón** fueron tomadas tanto en etapas del desarrollo temprano como en etapas más avanzadas. Las primeras fueron recogidas a las **76, 80 y 96 h** (muestras **C1-C3**) después de la imbibición de las semillas, mientras que las segundas lo fueron tras **6 y 18 días** (muestras **C4 y C5**).

Las muestras de **hoja** comprendieron, por un lado, una fase temprana del desarrollo representada por **primordios foliares** con un tamaño $\leq 1 \text{ mm}$ (muestras **HP**) y, por otro lado, 6 muestras de **hojas en estado de expansión**, concretamente los 6 folíolos apicales de plantas con 6 hojas (muestras **HE1-HE6**, de la más joven a la más vieja).

Las muestras de **flor** abarcaron un total de 9 etapas del desarrollo floral. En este caso se atendió al tamaño de la **yema floral** (muestras **F1-F8**: de **1 a 8 mm** en intervalos

de 1 mm), y a la apertura de la flor o **antesis** (muestra **F9**), siguiendo el esquema propuesto por Brukhin y colaboradores (2003).

Los **frutos** de tomate fueron recolectados en tres estados de desarrollo acordes a la nomenclatura propuesta por Gillaspay y colaboradores (1993): **verde inmaduro** de **1,3 cm** de diámetro, **en fase de maduración** ("*breaker*") y **rojo maduro**. De estos frutos se tomaron muestras de **semillas** (muestras **S1-S3**) y **pericarpo externo** (muestras **PE1-PE3**).

3.3.2. Análisis de la interacción planta-bacteria

Para este tipo de análisis se recogieron muestras de las dos líneas de la variedad Río Grande (RG-*PtoS* y RG-*PtoR*), tanto de hojas infectadas con las bacterias *PstDC3000* como de hojas infiltradas con la solución control de MgCl₂. El análisis temporal del proceso de infección incluyó muestras tomadas a las 3, 6, 12, 24 y 48 horas después de la infiltración. Cada muestra consistió en una mezcla de 15 discos foliares de 7 mm de diámetro procedentes de tres plantas independientes, tomados de aquellas zonas de la hoja saturadas de solución tras el proceso de infiltración. El tratamiento foliar y recogida de muestras se repitió tres veces.

Una vez recolectadas, las muestras vegetales fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Antes de la purificación de ácidos nucleicos, las muestras fueron tratadas con nitrógeno líquido en el interior de tubos de 2 ml y pulverizadas con varillas de acero inoxidable. El polvo obtenido fue pesado y subdividido rápidamente en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido, para seguidamente proceder a la extracción por separado de ADN genómico (ADNg) y ARN total.

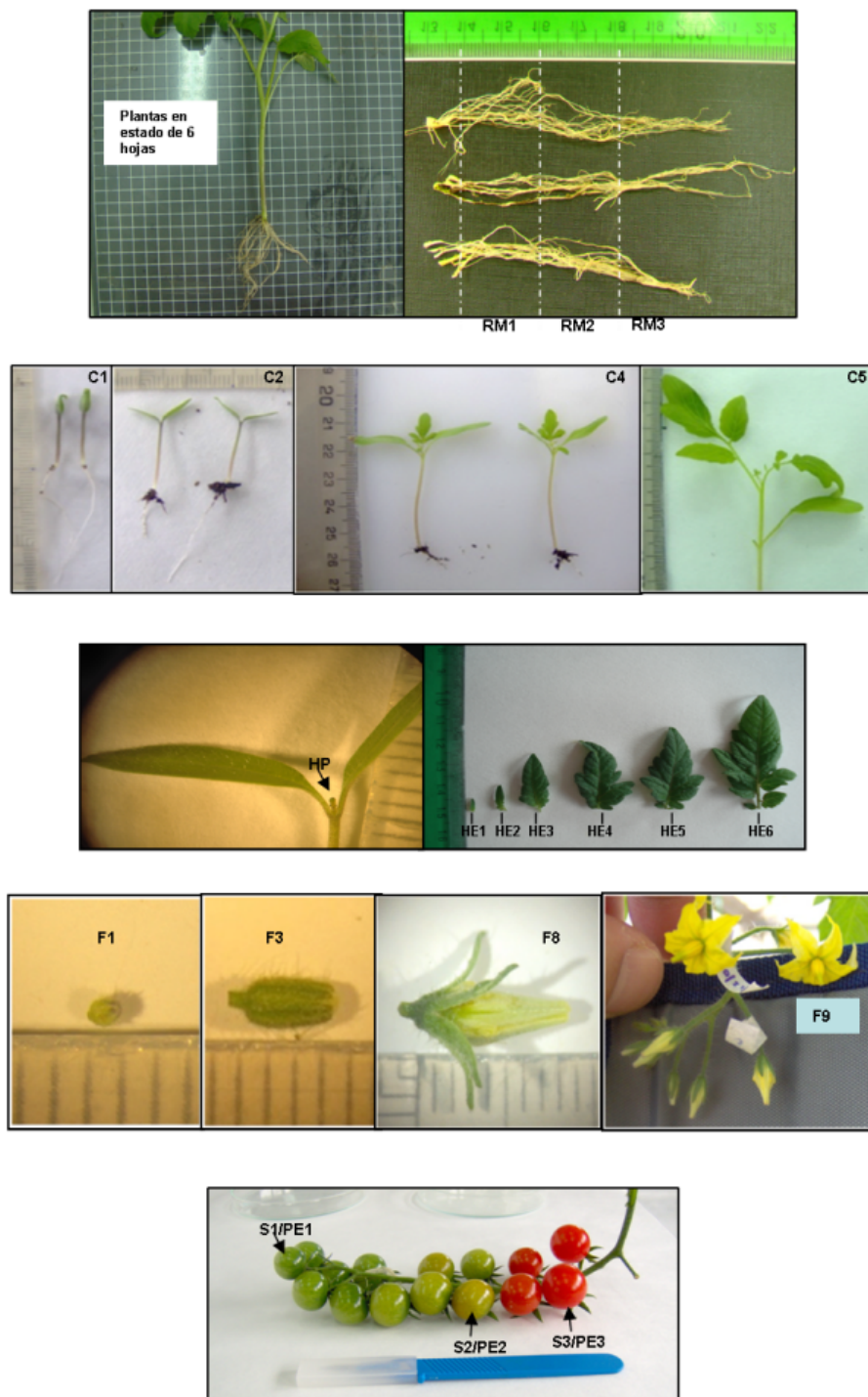


Figure 11. Algunas de las muestras usadas para el análisis espacio-temporal de la expresión de los genes *ToFZY*. RM1-RM3: secciones proximal, media y distal de la raíz madura. C1, C2, C4 y C5: cotiledones en diferentes etapas del desarrollo. HP: primordio de hoja ≤ 1 mm. HE1-HE6: hojas en expansión. F1, F3, F8 y F9: yemas florales de 1, 3 y 8 mm, y flor abierta (antes). S1/PE1, S2/PE2 y S3/PE3: frutos en fase verde inmaduro, en fase de maduración (“*breaker*”) y rojo maduro.

3.4. Purificación de ácidos nucleicos

Se purificaron diferentes tipos de ácidos nucleicos utilizando kits comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante (*Sigma-Aldrich*): el *GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep kit* para la purificación de ADNg a partir de 100 mg de hojas; el *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* para la purificación de ADN plasmídico a partir de 1,5 ml de cultivo bacteriano; el *GenElute™ PCR Clean-Up kit* para la purificación de productos de PCR y fragmentos de restricción; y el *Spectrum™ Plant Total RNA kit* para la purificación de ARN total a partir de 50 mg de material vegetal. El ARN aislado se trató con DNasa I (“*amplification grade*”; *Sigma-Aldrich*) para reducir las contaminaciones por ADNg.

En todos los casos se estimó la pureza de las preparaciones midiendo la relación A_{260}/A_{280} , considerando adecuado valores comprendidos entre 1,7-1,9 y 1,8–2,2 para el ADN y ARN, respectivamente.

3.5. Cuantificación espectrofotométrica y análisis de la integridad de ácidos nucleicos

La cuantificación espectrofotométrica de los ácidos nucleicos purificados se realizó con el sistema *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)*. Para ello, se midieron las absorbancias de las muestras a 260 nm y se aplicaron como coeficiente de extinción 50 y 40 ($\mu\text{g/ml}$)⁻¹cm⁻¹ para el ADN de cadena doble y ARN, respectivamente.

La integridad de ácidos nucleicos se evaluó tras electroforesis en geles de agarosa. En el caso del ADNg y plasmídico, las muestras se compararon con un marcador de peso molecular (*Lambda-Hind III; Sigma-Aldrich*), examinando el tamaño y la definición de las bandas observadas, y controlando la ausencia de ARN contaminante. En el caso de las muestras de ARN, se vigiló la definición y la intensidad relativa de las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 25 S y 18 S.

3.6. Electroforesis de ácido nucleicos

Los fragmentos de ácidos nucleicos, tanto los purificados a partir de muestras biológicas como los productos de las reacciones de amplificación, fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa utilizando cubetas horizontales y empleando tampón TBE 1X (tris-base 40 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA-Na₂ 1mM, pH 9). La concentración de agarosa empleada rutinariamente fue de 1,5% (p/v), variando entre 0,7 y 4%, dependiendo de los tamaños de los fragmentos de ADN a resolver.

Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml en tampón agua bidestilada) durante 15 min. Posteriormente, y tras lavar 30 min con agua bidestilada, los ácidos nucleicos se visualizaron exponiéndolos a luz UV (254-300 nm) en un transiluminador acoplado a un sistema de documentación de imágenes (Kodak EDAS 290).

3.7. Síntesis de ADN complementario

Las muestras de ADNc fueron obtenidas utilizando diferentes sistemas comerciales. Durante el análisis que permitió seleccionar genes de referencias adecuados para la normalización de las medidas de expresión génica, se empleó el *First-Strand Synthesis System* de Sigma-Aldrich siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso la reacción de retrotranscripción a partir de 1 µg de ARN total fue cebada con oligonucleótidos nonámeros de secuencia aleatoria, y la preparación de cDNA obtenida fue diluida con TE 0,5X (Tris-base 5 mM, EDTA-Na₂ 0,5 mM) hasta un volumen final de 200 µl.

En los demás contextos experimentales, el ADNc se sintetizó usando el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche)* con ciertas modificaciones del protocolo propuesto por el fabricante. Tras reunir el ARN total (5 µg) y el oligo cebador [oligo(dT₁₈)VN], la mezcla se incubó a 65°C durante 10 min, luego la temperatura se disminuyó hasta 42°C a una tasa de 0,2°C/s y finalmente se mantuvo a dicha temperatura durante 2 min. Tras añadir el resto de los componentes de la mezcla de reacción, ésta fue sometida al siguiente perfil térmico en un termociclador: 50°C 40 min, 55°C 20 min y 65°C

5 min. Finalmente la transcriptasa reversa fue inactivada a 85°C durante 5 min. La preparación de ADNc se diluyó a un volumen final de 400 µl en una solución de TE 0,5X.

En paralelo se realizaron controles sin transcriptasa reversa (controles RT-) usando la misma cantidad de ARN total y sustituyendo la enzima por agua estéril. Estos controles RT- permitieron reconocer posibles interferencias de contaminaciones por ADNg en los ensayos de cuantificación de ARNm mediante RT-qPCR a tiempo real.

3.8. Diseño de oligonucleótidos

El diseño adecuado de los oligonucleótidos cebadores para la PCR es un aspecto crítico para el éxito de esta técnica, pues de ello dependerá en gran medida la especificidad y la eficiencia de la amplificación de ADN *in vitro*. Para ello, se aplicaron las reglas generales concernientes al diseño de oligonucleótidos cebadores, apoyándonos en programas informáticos como *PRIMER3* (Rozen y Skaletsky, 2006) o *GenRunner 3.05* (*Hasting Software*).

Para la cuantificación de los niveles de ARNm, dentro de cada pareja de cebadores, los oligonucleótidos fueron diseñados sobre diferentes exones del gen en cuestión. De esta manera se consigue detectar posibles contaminaciones de ADNg en las preparaciones de ADNc, debido a que el primero rinde amplicones de mayor tamaño como resultado de la amplificación de intrones. Si estos intrones son lo suficientemente grandes impiden la amplificación de dichas contaminaciones. Cuando las secuencias de nucleótidos lo permitieron, algunos cebadores fueron diseñados en la frontera entre exones adyacentes, lo cual permite discriminar contaminaciones de ADNg, siempre y cuando no existan en el genoma de las plantas de tomate pseudogenes procesados relacionados. Además de las precauciones mencionadas, para el análisis de la expresión de los miembros de la familia multigénica *ToFZY*, el extremo 3' de al menos uno de los miembros de cada pareja de cebadores, fue diseñado en una secuencia divergente. La finalidad de esta estrategia es poder discriminar los diferentes ARN mensajeros de genes que sean parálogos del gen que está siendo analizado.

Los cebadores que se emplearon para la monitorización del crecimiento bacteriano mediante qPCR a tiempo real reconocen secuencias específicas del gen *hrpZ* de *Pst*DC3000. El cebador reverso o antisentido utilizado fue el descrito por Zaccardelli y colaboradores en 2005 (5'-GACCTGGGTCAACTGCTGAG-3'), mientras que el cebador directo fue diseñado para el presente trabajo (5'-TGGTTAGTCTGGTTATTGGTGC-3') con la intención de obtener un amplicón de menor tamaño, más acorde con lo recomendado para la PCR a tiempo real (Nolan *et al.*, 2006).

3.9. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.9.1. PCR y RT-PCR en condiciones estándar

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ l que contenía: 50 ng de ADNg (PCR) o 5 μ l de una dilución de cDNA (RT-PCR); 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (*EcoTaq*; *Ecogen*); tampón de reacción 1X (*Ecogen*); 200 μ M de cada uno de los dNTP; 1 μ M de cada uno de los cebadores; y $MgCl_2$ a una concentración de 3 mM. Las reacciones se incubaron en el termociclador *Applied Biosystem 2700* usando el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 35 ciclos de amplificación consistentes en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 10 s, una etapa de anillado de 20 s a temperatura variable según los cebadores empleados y una etapa de extensión a 72°C durante un tiempo acorde al tamaño del amplicón (1 min/Kb); por último se realizó un paso de extensión a 72°C durante 5 min.

3.9.2. PCR cebada con oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR)

Los oligonucleótidos degenerados empleados en esta variante de PCR se diseñaron sobre secuencias de aminoácidos identificadas como conservadas en un conjunto de flavin-monooxigenasas de tipo YUCCA, y teniendo en cuenta la degeneración del código genético. La técnica de DOP-PCR fue usada en el presente trabajo para clonar fragmentos homólogos del genoma de *Solanum lycopersicum*.

La DOP-PCR se realizó utilizando ADNg como molde y la misma concentración de reactivos que en la PCR estándar, excepto para el cebador más degenerado que se usó a concentración 10 μM , compensando de esta forma la diferencia en el nivel de degeneración entre los miembros de la pareja de cebadores. El perfil térmico de la reacción de amplificación incluyó un decremento progresivo de temperatura de anillado en ciclos sucesivos (estrategia de tocar fondo o “*touch-down*”). Dicho perfil incluyó los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 40 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización a 94°C durante 10 s, anillado durante 30 s y extensión a 72°C durante 5 s; y una etapa de extensión final a 72°C durante 1 min. Durante los primeros 15 ciclos de amplificación la temperatura de anillado sufrió un descenso desde 65°C a 50°C a una tasa de 1°C por ciclo, manteniéndose a 50°C durante los 25 ciclos restantes.

3.9.3. PCR inversa

Esta estrategia permite clonar secuencias no caracterizadas que flanquean, en su posición cromosómica, a una secuencia de ADN conocida. Implica el uso de cebadores divergentes que se unen en la región conocida, preferentemente cerca de los bordes de ésta. El protocolo se inicia con un paso de digestión del ADNg con una endonucleasa de restricción, cuya diana no debe estar presente en la secuencia de nucleótidos que separa a los dos cebadores. Es fundamental conseguir una digestión de la muestra de ADNg con la restrictasa lo más completa posible.

Las muestras de ADN genómico (500 ng) fueron digeridas, en reacciones separadas, con un conjunto de enzimas de restricción que presentan dianas de reconocimiento de 4 y 6 nucleótidos. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen de 20 μl empleando 10 unidades de enzima, y se incubaron a la temperatura óptima durante más de 20 horas. Para evitar la evaporación del agua de la reacción, éstas se incubaron en un termociclador provisto de tapa calefactora. El nivel de digestión de las muestras se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos de restricción con un tamaño entre 10 Kb y 100 pb fueron purificados haciendo uso del kit comercial *GenEluteTM PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich).

El segundo paso del protocolo consiste en generar moléculas de ADN circular a partir de los productos de la digestión. El ligado intramolecular de los fragmentos de restricción se favoreció estableciendo una concentración de ADN menor o igual a 3 ng/μl en las reacciones de ligado, las cuales se realizaron empleando un kit comercial (*DNA ligation* ver. 2.1; *Takara-Bio*), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En las reacciones de PCR subsiguientes con cebadores divergentes se empleó como molde 4 μl de la reacción de ligado. Las condiciones empleadas fueron las definidas para la PCR estándar, pero usando en esta ocasión una ADN polimerasa termoestable que permite comenzar la reacción en caliente (*Phire*; *Finnzymes*).

3.9.4. PCR a tiempo real

Estas reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 μl que contenía: 6 μl de ADN molde (ADNc diluido o ADNg a 1 ng/μl); 2 μl de cada cebador a una concentración final optimizada para cada amplicón atendiendo a la eficiencia de la amplificación; y 10 μl de 2X *iQ SYBR Green Supermix* (*Bio-Rad*). Las PCRs se incubaron en el termociclador *iCycler* (*Bio-Rad*) acoplado al *IQ5 Multicolor Detection System* (*Bio-Rad*) para el seguimiento a tiempo real del proceso de amplificación, basado en este caso en la emisión de fluorescencia por parte del agente intercalante *SYBR Green*. Se empleó un formato de placas de 96 micropocillos, incorporando 3 replicas técnicas de cada muestra analizada, así como controles RT- (apartado 3.7) y controles negativos (agua como molde).

El perfil térmico empleado durante las reacciones de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min para la activación de la *Taq* ADN polimerasa; 45 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 10 s, una etapa de anillado de 20 s a temperatura variable según los cebadores empleados y un etapa de extensión a 72°C durante 30 s. Los datos sobre la intensidad de fluorescencia en la reacción fueron adquiridos al final de cada paso de extensión. Una vez terminado el proceso de amplificación se realizó un análisis de fusión de los productos de amplificación en un rango de temperaturas de 60°C a 90°C, con un incremento de 0,2°C cada 10 s y 5 adquisiciones de fluorescencia por grado centígrado. La determinación de la línea base

sobre el ruido de fondo y del umbral de fluorescencia para el cálculo del ciclo de cuantificación (Cq) se realizó automáticamente con el programa *iQ5 Optical system* versión 2.0 (*Bio-Rad*).

3.10. Secuenciación del ADN

La secuenciación de amplicones o de fragmentos de ADN clonados en plásmidos se realizó empleando los cebadores de amplificación o cebadores universales M13, respectivamente. También se diseñaron cebadores de secuenciación internos cuando lo exigió la longitud total de la secuencia a determinar. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo empleando el *BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit v3.1* (*Applied Biosystems*) siguiendo las instrucciones del fabricante, exceptuando las reacciones de secuenciación con cebadores degenerados los cuales fueron usados a una concentración 7 veces superior a lo habitual. Los productos de extensión de las reacciones de secuenciación fueron separados, después de una precipitación con etanol, en un secuenciador automático *ABI PRISM 3700* (*Applied Biosystems*).

3.11. Herramientas bioinformáticas

Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos liberadas por otros grupos de investigación fueron tomadas del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), y de las bases de datos del Proyecto de Secuenciación del Genoma de *Solanum lycopersicum* (*Tomato EST Distribution Center*, <http://www.sgn.cornell.edu>). La información sobre el patrón de expresión de los genes *YUC* de *Arabidopsis* se obtuvo de las bases de datos usando la herramienta web *Genevestigator* (Zimmermann *et al.*, 2004), la cual permite analizar resultados obtenidos con micromatrices de ADN.

Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos, el cálculo del porcentaje de identidad entre secuencias y el análisis filogenético se realizaron con el programa informático *MEGA* versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). El porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos fue calculado aplicando la siguiente fórmula: *Identidad* = $1-(p\text{-distancia})$, siendo $p\text{-distancia} = n_d/n$; donde n_d es el número de aminoácidos

diferentes y n es el total de aminoácidos comparados. La hipótesis de partida para la construcción de un árbol filogenético consistió en un alineamiento múltiple de secuencias codificadoras, basado en un alineamiento previo de las secuencias de aminoácidos correspondientes. La matriz de distancia derivada del alineamiento múltiple fue sometida a una corrección según un modelo de *Poisson*, antes de aplicar la aproximación de reconstrucción filogenética conocida como “*neighbor-joining*”. La robustez del cladograma resultante fue estimada por remuestreo aleatorio (*bootstrapping*) con un total de 5.000 replicas.

Las aplicaciones informáticas empleadas para el análisis de idoneidad de los genes candidatos a referencias internas, o para la cuantificación de ácidos nucleicos mediante PCR a tiempo real, serán descritas en el siguiente apartado.

3.12. Cuantificación de ADN mediante PCR a tiempo real

La técnica de PCR a tiempo real se empleó en el presente trabajo para la cuantificación de ácidos nucleicos (PCR cuantitativa o qPCR). Por un lado, permitió inferir los niveles de ARNm de genes *ToFZY* específicos en diferentes muestras biológicas, indirectamente a través de la cuantificación de los ADNc correspondientes, es decir, acoplando la qPCR a una reacción previa de retrotranscripción (RT-qPCR). Por otro lado, la qPCR a tiempo real se utilizó para realizar un seguimiento del transcurso de un proceso patológico, concretamente de la infección de hojas de tomate por *PstDC3000*, mediante la cuantificación del genoma de la bacteria.

En general se han seguido estrategias de cuantificación relativa y absoluta, atendiendo a la eficiencia de amplificación de las reacciones individuales y prestando especial atención a la correcta normalización de las medidas de expresión. Los aspectos relacionados con la eficiencia de amplificación y la normalización de datos son esenciales para la exactitud y precisión de los ensayos de qPCR.

3.12.1. Normalización de los datos de cuantificación

En este contexto de investigación biológica, la normalización es el proceder o la corrección que asegura que las cantidades de ácido nucleico estimadas para dos muestras biológicas sean comparadas en igualdad de condiciones, es decir, la normalización permite compensar diferencias en la cantidad y la calidad de las muestras biológicas objeto de cuantificación (Huggett *et al.*, 2006).

3.12.1.1 Normalización en la cuantificación de la expresión génica

Entre las diferentes aproximaciones que han sido propuestas para la normalización de la cuantificación de ARNm mediante RT-qPCR a tiempo real, el uso de genes con expresión constitutiva (*Housekeeping genes*) como controles o referencias internas se ha convertido en el método preferido por permitir una normalización más rigurosa (Huggett *et al.*, 2006; VanGuilder *et al.*, 2008). Esto se debe a que las referencias internas, al estar presentes de manera natural en la muestra, sufren el mismo tipo de variación no específica que los genes objeto de estudio. Las referencias internas permiten corregir variaciones a lo largo del procedimiento experimental tales como diferencias en la cantidad inicial de muestra, en la recuperación de ARN, en la integridad y pureza del ARN o en la eficiencia de la síntesis de ADNc, así como permitir compensar diferencias en la actividad transcripcional global de los tejidos o células analizadas.

En el presente trabajo, una vez elegidos los controles internos adecuados (apartado 3.12.3), el factor de normalización (NF) de cada muestra se calculó como la media geométrica del nivel de expresión, absoluto o relativo, de al menos dos genes de referencia (Vandesompele *et al.*, 2002).

3.12.1.2 Monitorización del crecimiento bacteriano

En los análisis en los que se hizo un seguimiento de la proliferación bacteriana mediante cuantificación del gen *hrpZ* de *PstDC3000*, los datos se normalizaron atendiendo a la cantidad de ADNg usado como molde en las reacciones de amplificación.

Sólo se aceptaron para este análisis muestras de ADNg con una relación A_{260}/A_{280} , dentro del intervalo 1,7-1,9. Con la finalidad de minimizar las variaciones técnicas, la concentración de ADN presente en cada muestra fue calculada como el promedio de tres medidas independientes. Tras esto, cada preparación de ADNg fue diluida hasta una concentración final de 1 ng/ μ l antes de ser usada en la qPCR a tiempo real.

3.12.2. Selección de genes candidatos a referencias internas

Actualmente existen dos tendencias en cuanto a la selección de genes de expresión constitutiva como referencias internas. Por un lado, un gran número de trabajos de investigación emplean genes a los que denominamos “clásicos” porque han sido usados durante muchos años como controles internos en el análisis de la expresión génica. Por otro lado, una tendencia más reciente es el uso de genes a los que denominamos “no convencionales”, los cuales exhiben un patrón de expresión relativamente estable según estudios de hibridación de ADNc a micromatrices de ADN o análisis de secuenciación masiva de genotecas de ADNc.

Mientras que el acceso a la secuencia de nucleótidos de genes de referencia clásicos en tomate sólo necesito una búsqueda simple basada en el nombre del gen, la identificación de genes de tomate homólogos a los genes de referencias no convencionales en la base de datos *UniGenes SOL Genomics Network* (Cornell University; <http://www.sgn.cornell.edu>), requirió la búsqueda de similitudes de secuencias de aminoácidos empleando la aplicación *BLASTX*.

3.12.3. Análisis estadístico de la estabilidad de expresión

La idoneidad de los genes candidatos a referencias internas se evaluó aplicando a los datos de expresión (Cq) tres enfoques estadísticos diferentes pero complementarios, que se encuentran implementados en los programas informáticos *geNorm*, *NormFinder* y *qBase*. Los resultados de estas tres aproximaciones se integraron en una única clasificación, encabezada por los genes que muestran una mayor estabilidad de expresión en el panel de muestras biológicas objeto de análisis.

3.12.3.1. geNorm

El programa *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) estima para un gen candidato un valor M que es inversamente proporcional a su estabilidad de expresión. En primer lugar, dicho gen es emparejado con cada uno de los demás candidatos evaluados. Luego, para cada una de esas parejas y cada muestra de ADNc se calcula un ratio de expresión relativa. Una baja variación promedio de dicho ratio (M), para el conjunto de parejas de genes y de muestras, refleja una alta estabilidad de expresión del gen evaluado. El principio que subyace en esta aproximación es que la variación en los ratios de expresión de dos genes delata la falta de constancia en la expresión de al menos uno de ellos. Su principal ventaja radica en que trabajar con ratios de expresión permite un control fino de las variaciones en la cantidad y calidad del ADNc de las muestras, dado que estas oscilaciones asociadas a la variabilidad técnica afectan por igual a los genes emparejados. La principal debilidad de esta aproximación es su aparente sensibilidad a la existencia de correulación transcripcional entre los genes examinados.

Para introducir los datos en el programa *geNorm* los valores de C_q , para un gen dado y en el conjunto de muestras de cDNA evaluadas, se transformaron en cantidades relativas (RQ) teniendo en cuenta la eficiencia (E) promedio de las PCR correspondientes y usando como muestra de calibrado aquella con menor C_q . La fórmula 1 muestra el cálculo de la RQ para un gen i y una muestra j :

$$RQ_{ij} = (1 + E)^{\Delta Cq}; \Delta Cq = Cq_{calibrador} - Cq_j$$

Fórmula 1

Se ha sugerido que son aceptables, para el conjunto de genes de referencia finalmente seleccionados, valores promedio de M de hasta 1 o 0,5, para paneles de muestras heterogéneos (por ejemplo diferentes tipos de tejidos) u homogéneos, respectivamente (Hellemans *et al.*, 2007).

3.12.3.2. NormFinder

La aproximación estadística implementada en el programa *NormFinder* examina la variación en los niveles de expresión de un gen candidato dentro y entre grupos de

muestras, basándose en un modelo estadístico para el cálculo de la varianza (Andersen *et al.*, 2004). Las ventajas principales de este modelo son el balance que hace de dos fuentes de variación y la insensibilidad a la correulación de los genes evaluados. Sin embargo, no da cuenta de los errores sistemáticos durante la preparación de las muestras de ADNc y los autores no sugieren valores de referencia para el parámetro que define la estabilidad de expresión.

La importación de datos en el programa *NormFinder* requiere de una transformación logarítmica de los valores de Cq, y la subdivisión del conjunto de muestras de ADNc en al menos dos grupos coherentes. Se recomienda además que cada grupo esté integrado por un mínimo de ocho muestras.

3.12.3.3. Coeficiente de variación (CV) de las cantidades relativas normalizadas (NRQ)

Esta estrategia de evaluación de la estabilidad de expresión de los genes candidatos fue propuesta por Hellemans y colaboradores (2007), y se encuentra implementada en el programa *qBase*. Un bajo CV de las NRQs estimadas para un gen candidato en un conjunto de muestras de ADNc, indica una alta estabilidad de expresión de dicho gen. Como ventajas de esta aproximación se citan el no ser afectada por la posible correulación de los candidatos, ni tampoco por variaciones en la calidad o cantidad de la muestra ya que se trabaja con medidas de expresión normalizadas. Además, parece ser una buena alternativa cuando el conjunto de muestras no puede ser subdividido de manera apropiada.

El programa *qBase* sólo permite el análisis simultáneo de 5 genes, mientras que nuestro estudio incluyó 11 candidatos. Esta limitación se solventó realizando los cálculos pertinentes en una hoja Excel personalizada. Para ello, primero los valores de Cq para cada gen y cada muestra se convirtieron en RQs tal y como se indica en la fórmula 1. A continuación, se calculó para cada una de las muestra un NF como la media geométrica de las RQs estimadas para el conjunto de genes evaluados. En tercer lugar, se calculó la NRQ para cada gen en cada muestra dividiendo la RQ de un gen en una muestra por el NF de dicha muestra. Por último, se calculó el CV del conjunto de NRQs estimados para

un gen en el conjunto de muestras analizadas. En el trabajo de Hellemans y colaboradores (2007) se sugiere que son aceptables, para el conjunto de genes de referencia finalmente seleccionados, valores promedio de CV de hasta 50% o 25%, referido a paneles de muestras heterogéneos (por ejemplo diferentes tipos de tejidos) u homogéneos, respectivamente.

3.12.3.3. Clasificación consenso de los genes candidatos

Los resultados de la evaluación siguiendo las tres aproximaciones estadísticas complementarias se integraron en una única clasificación consenso. Para ello, primero se asignó a cada gen un valor comprendido entre 1 y 11 (de más a menos estable), basándose en su posición relativa en cada una de las clasificaciones particulares. Si dos genes ocuparon la misma posición en alguna de estas clasificaciones les fue asignado el valor medio de la posición que ocupaban y la inmediatamente posterior, por ejemplo, si dos genes co-localizan en la tercera posición, se le asigna el valor 3,5 a cada uno de ellos. Por último, la clasificación consenso de los genes candidatos se estableció en función del valor promedio obtenido en las tres clasificaciones particulares.

3.12.4. Determinación del número óptimo de genes de referencia

Ha sido demostrado en varios estudios que la normalización con un solo gen de referencia es más propensa al error que cuando se usan simultáneamente varios de ellos (Vandesompele *et al.*, 2002; Szabo *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2006). A la hora de elegir el número de genes de referencia a incluir en el factor de normalización se debe buscar un equilibrio entre la exactitud de la cuantificación y consideraciones de tipo práctico. En este sentido se siguió el proceder propuesto por Vandesompele y colaboradores (2002). Siguiendo este criterio, se determina la variación que experimentan el conjunto de NFs del panel de muestras a medida que aumenta el número de genes de referencia empleados para su cálculo. La incorporación de genes finaliza cuando ello no supone un cambio significativo en los valores que adquieren los NFs.

La mencionada aproximación se encuentra implementada en el programa geNorm, pero éste sólo puede trabajar con la clasificación de genes candidatos generada por el propio programa, en función de la estabilidad de expresión según el valor M . Por ello, se personalizó una hoja Excel para realizar los cálculos pertinentes a partir de la clasificación consenso de los genes candidatos. Primero se calculó el NF para cada muestra con los 2 genes (NF_2) más estables según la clasificación consenso. A continuación se volvieron a calcular los NFs incluyendo el siguiente gen de la clasificación, y así sucesivamente hasta completar la lista de genes (NF_n). Seguidamente, se estimó la variación de dos NF consecutivos ($V_{n/n+1}$) transformando logarítmicamente los ratios NF_n/NF_{n+1} para cada muestra, y calculando la desviación estándar del conjunto de valores generados. Una vez calculados todos las desviaciones estándar se estableció como umbral un valor de 0,15, por debajo del cual la adición de más genes referencia es innecesaria y por tanto un derroche de recursos (Vandesompele *et al.*, 2002).

3.12.5. Cálculo de la eficiencia de las reacciones de amplificación

La aplicación informática *DART-PCR* (Peirson *et al.*, 2003) fue utilizada para calcular la eficiencia de cada PCR a tiempo real. Este programa calcula la pendiente (k) de las curvas $\text{Log}_{10}(\text{fluorescencia})$ versus ciclo de amplificación en la región definida por el usuario, y luego estima la eficiencia de la reacción ($E = 10^k$). La eficiencia de amplificación se define como $1+E$. La mencionada pendiente se calculó entorno al umbral de fluorescencia que fue aplicado durante el cálculo de los valores de C_q correspondientes.

3.12.6. Cuantificación absoluta

En esta variante de cuantificación de ADN mediante PCR a tiempo real los valores de C_q obtenidos con cada muestra se interpolan en una recta patrón o curva estándar, la cual se construye a partir de una serie de soluciones de concentración conocida. La exactitud de esta cuantificación depende en gran medida de que la eficiencia de amplificación de las muestras problemas y de los estándares sea equivalente. Para equiparar dichas eficiencias se aplicó la corrección descrita por Øvstebø y colaboradores (2003).

Las rectas patrón necesarias para la cuantificación absoluta se construyeron a partir de amplicones purificados, una vez confirmada su secuencia. La concentración de la solución stock de amplicón, expresado como número de copias de amplicón por unidad de volumen, se calculó usando la A_{260} de la preparación de amplicón purificado (para el ADN de doble cadena, $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$), el peso molecular promedio del amplicón ($1\text{pb} = 660 \text{ Da}$) y la constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol). A partir de la solución stock de amplicón se obtuvo una serie de diluciones, que abarcaron desde 10^6 hasta 10 copias de moléculas de amplicón por cada $6 \mu\text{l}$ de solución, con un factor de dilución 1/10. Las diluciones seriadas se realizaron con una solución de TE 0,5X que contiene un amplicón no relacionado (350 pb del genoma del ratón) a una concentración constante de 10^6 moléculas por cada $6 \mu\text{l}$. La presencia de este fondo constante de moléculas no relacionadas a una concentración relativamente alta reduce los factores aleatorios de muestreo en las diluciones con menor concentración de estándar, aumentando de esta manera el rango lineal de la cuantificación.

Debido a que las rectas patrón se construyeron usando estándares de ADN de doble cadena y las muestras problema consistieron en ADNc de cadena simple, el valor de C_q de las muestras fue reducido en 1 ciclo antes de ser interpolado en las rectas. Esta corrección se realiza debido a que durante el primer ciclo de la reacción se genera la segunda cadena de ADNc y no se produce una amplificación en sentido estricto (Kubista *et al.*, 2006).

El error asociado a la cuantificación absoluta se calculó como la desviación estándar de una población de valores absolutos normalizados estimados para cada gen problema y cada muestra. Dicha población se obtuvo a partir de las réplicas técnicas de RT-qPCR, normalizando los tres valores absolutos estimados para el gen problema con los tres valores absolutos estimados para cada uno de los genes de referencia, en todas las combinaciones posibles.

3.12.7. Cuantificación relativa

En esta variante de cuantificación de ADN mediante PCR a tiempo real se comparan las cantidades detectadas en dos muestras, la muestra problema y la muestra de

calibrado. El resultado de la comparación se expresa como el número de veces que la cantidad de un ADN específico es mayor o menor en la muestra problema que en la muestra de calibrado. En el presente estudio se siguieron dos estrategias diferentes de relativización de las cantidades de ADN.

Durante el análisis de la expresión de genes *ToFZY* particulares a lo largo del desarrollo del tomate, las cantidades absolutas normalizadas, estimadas previamente para cada muestra, fueron relativizadas usando como calibrador la muestra con mayor nivel de expresión (100%). El error estimado para la cuantificación absoluta de cada muestra fue propagado durante la conversión de las cantidades absolutas en relativas. En este sentido, se calculó la desviación estándar de una población de valores relativos normalizados estimados para cada muestra. Dicha población se generó dividiendo, en todas las combinaciones posibles, los diferentes valores absolutos normalizados estimados para la muestra problema por los correspondientes valores de la muestra de calibrado. Estos conjuntos de valores fueron obtenidos como se indica en el apartado 3.12.6.

Durante los estudios de la interacción planta-bacteria, la cuantificación relativa del ADN_g de la bacteria se realizó directamente a partir de los valores de C_q y de eficiencia de cada reacción de amplificación, empleando el programa informático *Relative Expression Software Tool V 2.0.13* (REST 2009; Pfaffl *et al.*, 2002). Este mismo programa permitió calcular la significación estadística de las diferencias relativas detectadas, siguiendo un test no paramétrico basado en la redistribución aleatoria de datos entre el grupo de muestras problema y el grupo de muestras de calibrado.

3.13. Análisis histoquímico de la actividad beta-glucuronidasa

La detección de la actividad enzimática codificada en el gen reportero *GUS* en plantas de tomate transgénicas, como una estrategia para detectar la presencia de IAA, se realizó de la siguiente manera. Las muestras de hojas y flores se sumergieron en una solución de fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, K₃FeCN 0,5 mM, K₄FeCN 0,5 mM, Triton X-100 al 0,1% (w/v). A esta solución se le añadió un sustrato cromogénico de la enzima beta-glucuronidasa, el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucurónico (*Sigma-Aldrich*) a

concentración 2 mM, y se incubó a 37°C durante 24 horas. A continuación las muestras se incubaron en una solución de fijación (acético:etanol; 6:1, v/v) durante 12 horas a temperatura ambiente. Por último, las muestras se lavaron dos veces con etanol al 96% (v/v) y se conservaron en etanol al 70% (v/v) hasta su análisis. Las muestras fueron fotografiadas con una cámara Leica DC500 acoplada a una lupa Leica Wild 420 M (35X) o a un microscopio Leica DMLB.

3.14. Expresión de una proteína recombinante en *E. coli*

3.14.1. Clonación *in vitro* de la secuencia codificadora del gen *ToFZY1*

La secuencia codificadora del gen *ToFZY1* fue amplificada mediante PCR utilizando como molde el plásmido cTOF-1-I23, el cual contiene el ADNc de dicho gen. El clon plasmídico fue amablemente cedido por el *Tomato EST Distribution Center (USDA Plant, Soil, and Nutrition Laboratory)*. Se usaron en la PCR cebadores con nucleótidos extras en sus extremos 5', los cuales permitieron la incorporación de dianas de restricción *BglII* y *NcoI* en los extremos del amplicón. Se tuvieron en cuenta varias precauciones para minimizar la generación de mutaciones durante el proceso de amplificación de ADN. Por un lado, se empleó una ADN polimerasa termoestable de alta fidelidad (*Phusion; Finnzymes*), que presenta una tasa de error 50 veces inferior a la de la Taq ADN polimerasa. Por otro lado, se añadió una cantidad elevada de ADN molde (20 ng de plásmido) con la intención de obtener suficiente amplicón con sólo 10 ciclos de amplificación. Se aplicó el perfil térmico de la PCR estándar modificando la etapa de desnaturalización inicial de la reacción (98°C, 30 s) para inducir la activación de la ADN polimerasa y comenzar así la reacción en caliente.

Con la finalidad de evitar que el plásmido usado como molde en la PCR interfiriera en las etapas posteriores del proceso de clonación, la reacción de amplificación se sometió a electroforesis en un gel de agarosa, y la banda de interés se extrajo del gel usando el *QIAquick gel Extraction kit (Qiagen)*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.14.2. Digestión con restrictasas y ligado de fragmentos de restricción

El producto de PCR conteniendo la región codificadora del gen *ToFZY1*, una vez purificado, y el vector de expresión pQE-60 (*Qiagen*) se sometieron a digestión doble con las endonucleasas de restricción *NcoI* y *BglII*. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 50 μ l que contenían 500 ng de ADN, 5 unidades de cada una de las restrictasas (*Roche-Applied-Science*) y 5 μ l del tampón de digestión 10X compatible con ambas enzimas (tampón H de *Roche-Applied-Science*). Las reacciones se incubaron a 37°C durante toda la noche en un termociclador con tapa calefactora para evitar la evaporación del agua. Una vez confirmada la digestión completa del vector y la integridad del inserto mediante electroforesis en geles de agarosa, los productos de la digestión se purificaron y se cuantificaron.

La reacción de ligado del vector (0,03 pmol) y el inserto (0,08 pmol) se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, empleando los componentes de un kit comercial (*DNA ligation ver. 2.1, Takara-Bio*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se incubaron a 16°C durante toda la noche. Trascurrido este tiempo, la mezcla de ligado se empleó en la transformación de las bacterias tal y como se describe en el siguiente apartado.

3.14.3. Transformación de bacterias

La preparación de las células competentes para la transformación se inició con la inoculación de una colonia de *E. coli* M15 [pREP4] en 2 ml de medio líquido LB, suplementado con 25 μ g/ml de kanamicina para la selección del plásmido pREP4. El cultivo se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche. A continuación, se inocularon 200 μ l del cultivo saturado en 20 ml de medio líquido LB precalentado a 37°C, y el nuevo cultivo se mantuvo a dicha temperatura con agitación hasta que alcanzó una A_{600} comprendida entre 0,5-0,6. El cultivo se mantuvo en hielo durante 10 min y seguidamente se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación a 4000 x g durante 10 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron suavemente en 1 ml de CaCl₂ 50 mM y se incubaron en hielo durante 1 h.

Para proceder a la transformación bacteriana, se mezclaron suavemente 100 μ l de células competentes con 10 μ l de reacción de ligado, y se mantuvieron en hielo durante 20 min. A continuación, la mezcla se sometió a un choque térmico de 42°C durante 50 s, pasándola luego rápidamente a hielo e incubando en frío durante 2 min. Pasado este tiempo, se añadió 100 μ l de medio LB líquido a la mezcla de transformación y se incubó durante 1 h a 37°C, con la finalidad de que las células se recuperen del estrés al que han sido sometidas y se expresen los genes presentes en el plásmido que confieren resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Después del periodo de recuperación, las células se recolectaron mediante centrifugación (12.000 x g; 2 min), se resuspendieron en 25 μ l de medio LB y se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con 25 μ g/ml de kanamicina y 100 μ g/ml de ampicilina para la selección del plásmido pREP4 y pQE-60, respectivamente. Las placas de Petri se mantuvieron en una estufa a 37°C y se examinó el resultado tras unas 20 horas de incubación.

Durante el proceso de transformación de la cepa *E. coli* M15 [pREP4], se procesó en paralelo un control donde el ADN transformante consistió en 1 ng del plásmido pQE-60 sin inserto. Estas células transformadas con el vector de expresión sirvieron como control negativo en los experimentos de inducción de la proteína recombinante y en los ensayos de la actividad enzimática N-hidroxilante.

3.14.4. Inducción de la proteína recombinante

El protocolo empleado en la producción de la proteína recombinante se inició a partir una colonia de la cepa de *E. coli* transformadas con los plásmidos correspondiente, que se sembró en 2 ml de medio LB suplementado con los antibióticos de selección. De esta manera, y tras incubación a 37°C con agitación durante unas 12 h, se obtuvo un precultivo. Este precultivo se utilizó para inocular 250 ml de medio LB suplementado con los antibióticos, que fue incubado a 30°C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una A_{600} comprendida entre 0,5-0,7. A continuación, se añadió al medio FAD a concentración final 50 μ M y se indujo la producción de la proteína de interés probando diferentes concentraciones del inductor IPTG (0,4, 0,6, 0,8 y 1 mM). Paralelamente se incluyó un cultivo control sin adición de inductor. Después de 4 horas de inducción, las células fueron

recogidas mediante centrifugación a 4000 x g durante 30 min a 4°C. La inducción de la proteína recombinante se verificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante (SDS-PAGE).

3.14.5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970) y utilizando el sistema *Mini-Protean II Cell* (Bio-Rad). Se empleó un sistema discontinuo, formado por un gel de compactación (3% acrilamida) con un recorrido para la muestra de 4 mm y un gel de separación (0,15 x 8,5 x 6 cm) de reticulación continua (15% acrilamida). La solución stock de acrilamida/bisacrilamida empleada contenía acrilamida al 30% (p/v) y N,N'-metilenbisacrilamida al 0,8 % (p/v). La polimerización de la acrilamida se inició añadiendo TEMED al 0,1 % (v/v) y persulfato amónico al 0,05 % (p/v).

Las muestras se prepararon a partir de 1 ml de cultivo bacteriano, procedentes de los experimentos de producción de una proteína recombinante. Las bacterianas se recogieron mediante centrifugaron a 12.000 x g durante 2 min. El sedimento de células se resuspendió en 100 µl de tampón de la muestra 1X [Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS al 2% (p/v), Glicerol al 10% (v/v), β-mercaptoetanol al 1% (v/v), azul de bromofenol al 0,002% (p/v)]. Tras hervir las muestras durante 10 min, se cargó una alícuota de 30 µl de lisado directamente en el gel de poliacrilamida.

La electroforesis se desarrolló en tampón 1X [Tris-HCl 25 mM, pH 8,8, glicina 0,2 M, SDS al 1% (w/v)], manteniendo una intensidad eléctrica constante de 15 mA. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 20 min en la solución de tinción [azul de Coomassie R-250 al 0,2% (p/v), metanol al 50 % (v/v)]. Por último, para una mejor visualización de las bandas de proteínas, los geles se destiñeron lavándolos con una solución decolorante (metanol al 20%, etanol al 10% y ácido acético al 5%).

3.14.6. Extracción de proteínas en condiciones nativas

Este proceso de extracción se inició a partir de 250 ml de cultivo de bacterias transformadas, en las que había sido inducida la producción de la proteína recombinante en las condiciones previamente optimizadas. Las células de este cultivo se sedimentaron a 12.000 x g durante 10 min y se resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 8,5, al que se le añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/ml. Tras una incubación en hielo durante 30 min, las células fueron lisadas empleando un sonicador (*Ultrasonic Processor GEX500*). Dado que las flavin-monooxigenasas muestran una alta sensibilidad térmica (Cashman, 2002), se aplicaron pulsos de sonicación cortos (10 s), al 30% de la potencia máxima del sistema, separados por intervalos de descanso de 1 min y manteniendo el lisado en hielo durante todo el proceso. El resultado de la sonicación se centrifugó a una velocidad de 15.000 x g durante 30 min a 4°C. La presencia de la proteína recombinante en el sobrenadante, y por tanto la eficacia de la rotura celular, se confirmó mediante SDS-PAGE.

Los extractos de proteínas solubles se sometieron a diálisis empleando una membrana con un coeficiente de exclusión de 12 KDa. Los sacos de diálisis se sumergieron durante 1 hora con agitación y a 4°C en 1 litro de tampón fosfato 50 mM, pH 8,5, conteniendo FAD 50 µM. El tampón de diálisis se cambió 2 veces. Finalizado el proceso de diálisis, los extractos proteicos se conservaron en glicerol al 50 % (v/v) y a una temperatura de -20°C.

3.14.7. Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad

El ensayo de purificación de la proteína recombinante se realizó empleando el kit *QIAexpress® Type ATG (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso la purificación se basa en una cromatografía de afinidad por el ión níquel, interacción que permite retener proteínas que poseen una sucesión de 6 residuos de histidina en alguno de sus extremos. Para ello, 4 ml de extracto de proteínas solubles, al que se le había añadido previamente NaCl hasta una concentración final de 300 mM, se mezclaron con 1 ml de la resina Ni-nitrilotriacético (Ni-NTA), y la mezcla se incubó a 4°C durante 1 hora

con agitación suave. A continuación, la mezcla se paso a través de una mini-columna de cromatografía que retuvo la resina. Las proteínas unidas inespecíficamente a la resina Ni-NTA se eliminaron haciendo pasar dos veces por la mini-columna 4 ml de solución de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, pH 8,0). La proteína de interés se intentó recuperar en cuatro fracciones separadas (0,5 ml) empleando una solución de elución con alta concentración de imidazol (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 250 mM, pH 8,0). El imidazol compite con el tramo de 6 histidinas por la unión con el níquel de la resina, permitiendo así la elución de la proteína recombinante de la columna de cromatografía. Se guardaron las fracciones recuperadas en cada uno de los pasos del protocolo de purificación, para evaluar mediante SDS-PAGE la presencia de la proteína de interés.

3.15. Síntesis química de un estándar de N-hidroxi-triptamina

Para el análisis de la actividad FMO de la proteína ToFZY1 se consideró de gran utilidad disponer de un estándar de N-hidroxi-triptamina (NHT), que pudiera ser usado como patrón durante la detección de los productos del ensayo enzimático. Debido a la inexistencia de un preparado comercial de NHT, se optó por su síntesis química en los laboratorios del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA-CSIC). Dicha síntesis se realizó en 2 pasos. Primero, se sintetizó el 3-(2-nitroetil)-indol como describe Hermkens y colaboradores (1990). Se añadió metóxido sódico (54 mg, 1 mmol) a 5 ml de una solución de gramina (174 mg, 1 mmol) y dimetil sulfato (0,1 ml, 1 mmol) en nitrometano/metanol (2/1). La reacción se completó en 24 horas, monitorizándose mediante cromatografía en capa fina usando como fase móvil cloroformo/metanol (99/1, v/v). Los solventes de la reacción fueron evaporados mediante vacío a temperatura ambiente. El residuo resultante de esta primera reacción se disolvió en diclorometano y a continuación fue lavado usando NH_4OH (5%), HCl (1 N) y salmuera. La fase orgánica se llevó a sequedad con Na_2SO_4 y los solventes fueron evaporados al vacío. El residuo resultante fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice, usando como fase móvil cloroformo/metanol (99/1, v/v). La estructura molecular del producto, 3-(2-nitroetil)-indol, se confirmó mediante resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN).

La reducción del grupo nitro del 3-(2-nitroetil)-indol para obtener N-hidroxil-triptamina, se llevó a cabo según describen Yamada y colaboradores (1998). Se añadió al 3-(2-nitroetil)-indol (25 mg, 0,13 mmol) polvo de zinc (50 mg, 0,75 mmol), en pequeñas porciones y agitación continua, y NH₄Cl (14 mg, 0,26 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml) y H₂O (0,5 ml), a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla se filtró a través de Celite y la fase orgánica fue separada, lavada con salmuera y secada sobre Na₂SO₄. Una vez evaporado el solvente, se obtuvo un residuo con un color amarillo característico del producto final deseado. La estructura molecular del producto resultante se confirmó mediante ¹H RMN y espectrometría de masas.

3.16. Análisis de la actividad de la proteína ToFZY1 recombinante

3.16.1. Ensayo enzimático

La actividad N-hidroxilante de la proteína ToFZY1 producida en *E. coli* se ensayó, por un lado, en los extractos proteicos obtenidos a partir de las células que expresaron la proteína recombinante y, por otro lado, en los extractos proteicos de células que portaba el vector de expresión sin inserto (control negativo). Dicho ensayo de actividad se realizó en tampón NaH₂PO₄ 100 mM, pH 8,2, en un volumen final de 1 ml que contenía: 50 µl del extracto de proteínas en condiciones nativas, 10 mM de triptamina, 1 mM de NADP⁺, 1 mM de glucosa-6-fosfato, 2 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 50 µM de FAD. La reacción se incubó a una temperatura de 37°C durante 3 horas.

3.16.2. Detección mediante HPLC de los productos de la reacción enzimática

Los productos orgánicos resultantes de la reacción enzimática *in vitro* fueron extraídos cuatro veces con 4 ml de éter dietílico. Las fases orgánicas se reunieron, se deshidrató sobre Na₂SO₄, se llevó a sequedad en un rotavapor y se disolvió el residuo resultante en 3,5 ml de metanol. Se analizaron alícuotas de 20 µl de la solución mediante HPLC, usando un equipo *Beckman-Coulter (125P HPLC system)* acoplado a un sistema de detección de UV (fotodiodo modelo 168) y empleando una columna de fase reversa de 5 µm de espesor y unas dimensiones de 4,6 x 150 mm (*Beckman Ultrasphere ODS*). La fase móvil empleada durante la cromatografía fue acetonitrilo/H₂O (8/2, v/v).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Identificación y caracterización estructural de genes de *S. lycopersicum* que codifican FMOs de tipo YUCCA

4.1.1. Identificación y análisis de la secuencia del gen *ToFZY1*

La secuencia de nucleótidos del primer gen *ToFZY* caracterizado (*ToFZY1*) se dedujo ensamblando secuencias parciales de amplicones que fueron obtenidos mediante diferentes variantes de PCR. En primer lugar se recurrió a la estrategia de DOP-PCR, utilizando los cebadores degenerados p1L (5'-GGNGCNGGNCCNWSNGGNYTNGC-3') y p1R (5'-CATNCCNSWRTTNCCRCANCC-3'). Estos cebadores se diseñaron a partir de la secuencia de aminoácidos consenso de los motivos de unión de los dinucleótidos FAD y NADPH (Figura 12A), que son característicos de muchas enzimas que contienen FAD (Dym and Eisenberg, 2001). Las secuencias de aminoácidos que caracterizan a estos motivos conservados en FMOs del tipo YUCCA fueron definidas a partir de un alineamiento múltiple de secuencias. Este alineamiento incluyó la proteína FZY (AAK74069) de *Petunia hybrida*, las proteínas YUC1 (NP_194980) y YUC4 (NP_196693) de *Arabidopsis thaliana*, así como otras dos secuencias relacionadas que identificamos en las bases de datos y que procedían de las especies *Medicago truncatula* (ABE92660) y *Oryza sativa* (NP_917203).

La amplificación de ADN mediante DOP-PCR con los cebadores p1L y p1R, usando como molde ADN genómico de *S. lycopersicum* cv. *ciliogia*, rindió un producto de amplificación mayoritario con un tamaño acorde a los 501-508 pb previstos a partir del alineamiento múltiple de partida (Figura 12B). Este amplicón predominante se purificó a partir de un gel de electroforesis y se secuenció empleando los cebadores de amplificación. Aunque la DOP-PCR fue empleada con la intención de identificar diferentes genes de tomate, tras una clonación del amplicón correspondiente en células, el electroforegrama obtenido durante la secuenciación automática mostró una secuencia perfectamente legible, indicando que el amplicón purificado correspondía a un producto de ADN homogéneo y, por tanto, originado probablemente a partir de un único *locus* genético. Como se detalla en el siguiente apartado, el gen *ToFZY1* pertenece a una familia multigénica. El hecho de que la DOP-PCR no pusiera de manifiesto tal

circunstancia pudo ser debido a un efecto competitivo, quizás resultado de unas condiciones muy restrictivas durante el paso de anillado de la amplificación que favoreció a un único amplicón.

La secuencia de 507 pb deducida mostró una identidad del 99,8 % con una porción del exón I del gen *FZY* de petunia, indicando que se había obtenido una secuencia parcial de un gen homólogo en tomate, al que se decidió denominar *ToFZY1*. A partir de esta secuencia parcial se diseñaron los cebadores divergentes I3a y I3b (Figura 12D), que permitieron seguir avanzando en la secuenciación del gen *ToFZY1* aprovechando la técnica de PCR inversa. En la figura 12C se muestra el resultado de aplicar esta técnica combinando la pareja de cebadores I3a/I3b, con ADNc de la variedad ciliegia de tomate y las endonucleasas de restricción *TaqI* y *NdeI*. Los productos de amplificación mayoritarios que resultaron de la PCR inversa fueron secuenciados con cebadores internos. El ensamblado de estas nuevas secuencias con la que resultó de la DOP-PCR, permitió formar un contiguo de 1.302 pb que comprendía un segmento de 580 pb corriente arriba del codón de inicio, el exon I completo y 95 pb del intrón I del gen *ToFZY1* (Figura 12D).

Con la intención de completar la secuenciación del gen *ToFZY1* se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias similares a la deducida por nosotros, lo que permitió identificar en la base de datos de los proyectos genoma de solanáceas (*SOL Genomics*; <http://www.sgn.cornell.edu>) una secuencia de tipo EST (*Expressed Sequence Tag*; EST4688332) que mostraba un 100% de identidad con parte del exón I de *ToFZY1*. Dicho EST había sido obtenido a partir de un clon plasmídico (cTOF-1-I23) que formaba parte de una librería de ADNc obtenida a partir de brotes de hojas tomate. Este clon nos fue cedido por el Centro de distribución de EST de Tomate (*USDA Plant, Soil and Nutrition Laboratory*). La disponibilidad del clon cTOF-1-I23 nos permitió determinar la secuencia de nucleótidos del ADNc del gen *ToFZY1*. La información aportada por el ADNc se aprovechó para diseñar cebadores anclados en el exón III (III1a y III1b2) y en la región transcrita no traducida del extremo 3' (3'-UTR, cebador U3-1b), que permitieron completar la totalidad de la secuencia de gen *ToFZY1* mediante PCR convencional (Figura 12D). Las secuencias del gen *ToFZY1* y de su ADNc fueron depositadas en la base de datos *GenBank* bajo los números de acceso AM177498 y AM177499, respectivamente.

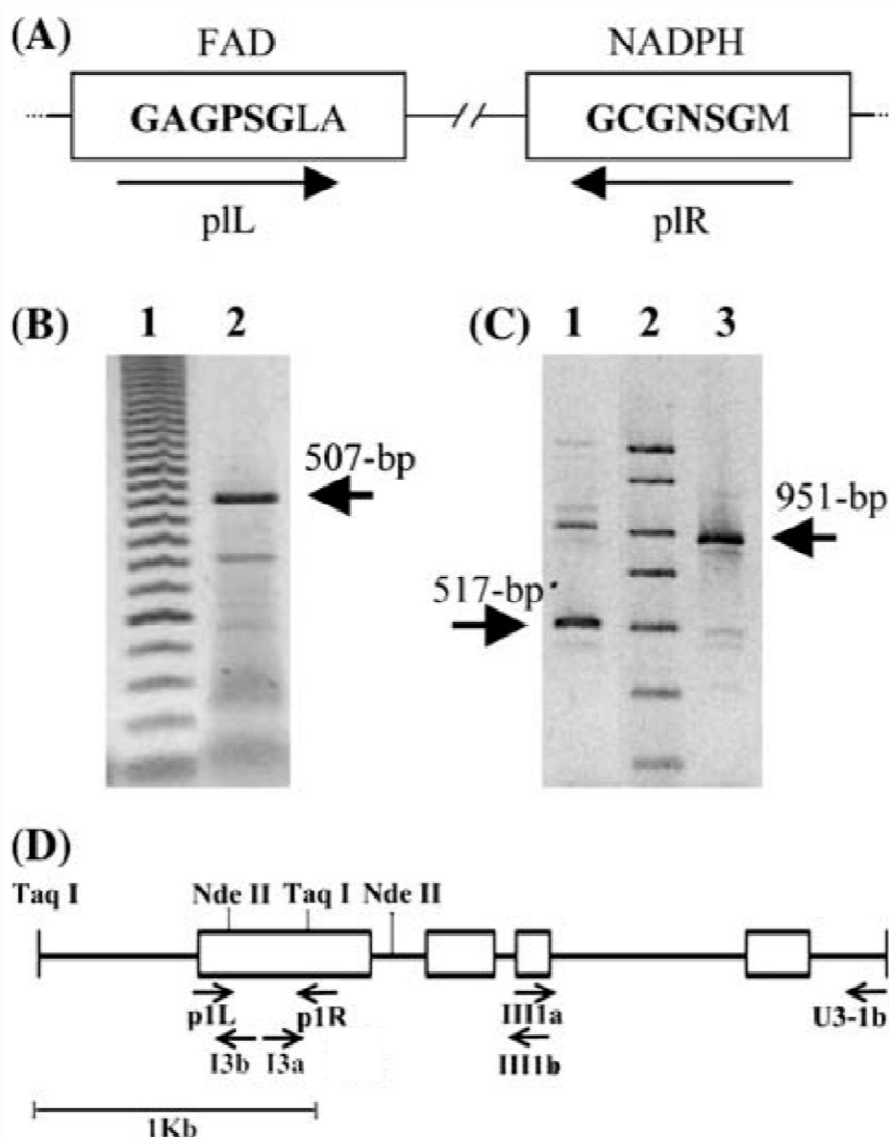


Figura 12. Caracterización estructural del gen *ToFZY1* basado en diferentes técnicas de PCR. (A) Secuencias de aminoácidos consenso usadas para diseñar los cebadores degenerados p1L y p1R. En negrita se resaltan los motivos de unión a FAD y NADPH. (B) Resultado de la DOP-PCR con los cebadores p1L/p1R. (C) resultado de la PCR inversa con los cebadores I3a/ I3b, en combinación con la restrictasas *Nde*II (carril 1) o *Taq*I (carril 3). (D) Estructura exón-intrón de *ToFZY1* donde se indica la posición relativa de los sitios de anclaje de los cebadores y las dianas de las restrictasas empleadas en la PCR inversa.

La comparación entre las secuencias de ADNc y ADNg de *ToFZY1* reveló que la secuencia codificadora está interrumpida por tres intrones (Figura 13), exactamente en la misma posición que en los genes *YUC1* y *YUC4*. Esta comparación no pudo realizarse con el gen *FZY* debido a que no existe la información necesaria. El gen *ToFZY1* codifica una proteína de 410 aminoácidos (número de acceso al *GenBank* CAJ46041), con un peso molecular aproximado de 46,5 kDa, cuya secuencia muestra una identidad del 87%, 70% y 69% con las proteínas FZY, YUC4 y YUC1, respectivamente.

TCGATTGACCTATTTGACAAATCCATAACGTTAACATTTGAGGGTGAAACTCTAATCACTAATACTCAATAATCAAATTTAAATTTTAA [90]
AAATACTGAATCAAATATCAAACGTTAATAGTTAGTCATTAACACGACCTAAACTCATTATACACCTCCATAACACCACCACCAAAACT [180]
CTGCAGCAGAGAGAGAGAGCCTTGAGAAGGAGAACCAAACTCCTTTCCTTAACTTCACGCCTCCATTAACACACTTCCTCATTAAATAACC [270]
CCTCTGTTTTTTCCCTGTTTTTCTCTTCACTTATGCAACTTCGTAGAAGAAAAAAATAAAAATAGCCTTAAAGAGGAAACTCAACC [360]
CCACCCCTAATCCCCCCTACCCCAACCTTCACTCTTCTTAAATCCCCTTGTCTTACTCTACACTTTCACAGAGCTAAAAAGAA [450]
GAATAAGAAGAAGAAAAAGTAGAGCTACTTAACCAAAAAAAGCAGAGCAACTCTGAGTGTGTTGAAACTTTTTACTCTTTTCAAAG [540]
TTTAAAGTGAGAAAAGAAGAAAAAGCTTTAACCTTTTAGATGGGTTGTTGTAAGAGGAAGAACC AAAATGGTTGTGGGTTAATGGACC [630]
TATAATAGTAGGTCAGGTCCTTCTGGTTTAGCAGTATCAGCTTGTCTTAAAGAAAATGGAGTCCCTTCACTCATTCTTGAGAGAAGTGA [720]
I I V **G A G P S G** L A V S A C L K E N G V P S L I L E R S D
M G C C K E E E P K W L W V N G P
TTGTATTGCTTCTTATGGCAACATAAACTTATGATCGCTTAAACTTCATCTTCCTAAACAATCTGTCAACTCCCCTGTTTGTATT [810]
C I A S L W Q H K T Y D R L K L H L P K Q F C Q L P L F D F
CCCAGAAAATTTCCAAAATACCCACAAAACCCAGTTTCACTTCTTACCTTGAGTCTTATGCCAAACACTTTTCTATCACCCCAAGTT [900]
P E N F P K Y P T K H Q F I S Y L E S Y A K H F S I T P K F
CAAACAGAGTGTAAAGTTCAGAAATTTGATGGAGTCTGTGGGTTTTGGAAAGTACAAACTCAAGATTTTCAGTATTTGTCGAAATGGTT [990]
K Q S V K V A E F D G V C G F W K V Q T Q D F Q Y L S K W L
GATTGTTGCAACAGGGGAAAATGCAGAGGCAAGTTATACCAGAAAATCCAGGGATTGATAAGTTTAAAGGAAGATTAATGCATACAGTGT [1080]
I **V A T G E N A** E A V I P E I P G I D K F K G R L M H T S V
TTATAAATCTGGTACTGAGTTTTAATCAAAGGGTTTTGGTAAATGGTTGTGGAAATTTCTGGTATGGAAGTTAGCTTAGACCTCTGTAG [1170]
Y K S G T E F I N Q R V L V I **G C G N S G** M E V S L D L C R
ACATAACGCCATCTCTCATATGGTGGTCTGAGAAATTTCTGTAAGTACATTTCACTTCTTTTTTTTTTTCGATAAGAGAAAGTTATTTCAGAGC [1260]
H N A I P H M V V R N S
ATAATAGTGAGTTTAAAGTCATGAAAAGTATGTATTTGATCTATTTATCGTTATTTTAAAAAGAAATTAATCGAGAACAAAAGAAATAT [1350]
TTATGATTTTGTGTAATTAACATTATTAATTTATTTTATTTTATTTTATTTTATGACAGGTGCATATTTTACCTAGGGAAATGTTAGGA [1440]
V H I L P R E M L G
ATATCAACATTTTCAATAGCTATGGCCCTTCTAAAATGGATGCCTTAAAGAATAGTTGATAAGTTGTTATTAAGTACTAGTTGCTAACTTTCC [1530]
I S T F S I A M A L L K W M P L R I V D K L L L V A N F S
TTAGGTAGCACTGATAAATAGTGTCTCCGGCAGCCGAAAACCGCCGCTTGAACCTTAAAAAATGCCACCGGAAAACACCGGTACTCGAC [1620]
L G S T D K L G L R R P K T G P L E L K N A T G K T P V L D
GTTGGAGCATTATCACAAATAAAAACCGGAAAATTTAGGTAAATTTTCAAAAATACTTACATTTAGCCAAAATATTTAATTTTGTCTAA [1710]
V G A L S Q I K T G K I Q
TGGATGATTTTTTTTATTCTTTTTGAAATAGATAATGCCAGGTGTGAAGGAAATTAATAAATAGGAGCAAAAATTTTATGATGGCAAAGAA [1800]
I M P G V K E I T K I G A K F L D G K E
GGAGAATTTGATTAATAATCTTAGCAACAGGATACAAAAGCAATGTGCCTTCTTGGTTAAGGTATAACAAATGATAATATTGCTCTT [1890]
G E F **D S I I L A T G Y K S N V P** S W F K
TGTATTGTTCTGTTCTGATCAAGTTAAATACGTTACGTAATTTCTTTTTTTTTTGTGGGCAATTTGGTAAATGACAAAAGGATAATAAG [1980]
GCAATGAGTATTTTGTGTTACTCTTATAAAGTTTCTAGTTTTATCTTACTCTCAATCTCACATCACTTTCATTCTTACACATGCAGAAG [2070]
CCTACAAAACGTTTCTTAAATCAAAAAGAGAATTTCTGATCTCATTGTCTGGACTTTTCCCTATTTTTTTTTTCCCAAAAATAAATTA [2160]
AGTTAAATTAATTAATGTGTACTTCTAGTTCTATAGCTTGGGAATACAATAATGATATAATTCATGTTACAATTAATTTTCAT [2250]
ATTTATTGAATTCCTATACACTATAATGATTAGTAATAATACATATAGACTAAGTACAATTAATATTATGAAAATATTTTATTAAAAT [2340]
AAATAATTTTGTGGCCAAATTTGACCAAAGATATGCACCTACTAGACCATGCATAGTGGCATATGTCTATGGTTTATTTATATGTAGT [2430]
GAAAGGGTACCCAATTTTAGTCAATTTAGGTCTATCACATGCAAGATTTTTTCTATTTTTCCAAAATTAATGATGAAATATTTAAATTT [2520]
TCAAAATTTTAAATTTAGTACTAATTTTTTTTTAATTTAATTTTGTAGGGAAGTATTTCTTACAGAGCAAGGGATGCCAAAACACCA [2610]
G S D F F T E Q G M P K T P
TTTCCAAATGGTTGAAAGGGGAAAATGGATTATATACAGTGGGATTTACAAGAAGAGGAATATTAGGGACTGCAAATGATGCAAAAAC [2700]
F P N G W K G E N G L Y T V G F T R R G Y R G T A N D A K N
ATTGCCAGGACATAAGTGAACAATGGAGAGAATCAAGGGCTTCTGTA AAACTTTTGTACTACGAAAATCTATCAGATAACCAAGGC [2790]
Y A R D I S E Q W R E F K G F C K N F C T T K N L S D N Q G
ATAAGTTTTTAGCCTTTTTAGTTACAGAGTTAGATGATGTTAAATTTTCCAAAAGGGTCTCAAGTTTTTGGAAAAGTATTAGAGGG [2880]
I C F *
TTCATAAAATGTAATTTTAGTTCTTCAATATTTTCAACAAGAGGAAAGTTATCCTTCTATCTTGTGTTTTTCCCATTCTTTTGTAAA [2970]
TTAATCAAATTTTTTCTATGTAATTTTCTGATTTTTTAAAAATATTTTTTACATAATACCTTTTCATTTTCCAAATGATCAAATATT [3060]
GGTGGCTCTGCTACTACA [3078]

Figura 13. Secuencia completa del gen *ToFZY1*. Las regiones transcritas no traducidas y los intrones se muestran en cursiva. Los exones se resaltan en negrita. Los recuadros muestran aminoácidos conservados característicos de las FMOs; en el primer exón se localizan los motivos de unión a FAD y NADPH, y entre ambos el motivo VATGENA identificado en esta tesis y exclusivo de la familia YUCCA de FMOs.

Además de los motivos de unión a FAD y NADPH, otras dos secuencias de aminoácidos presentes en ToFZY1 (Figura 13) refuerzan la inclusión de esta proteína en la familia FMO del tipo YUCCA. Por un lado, el motivo $DX_3(L/F)ATGY(X)_4P$ que se encuentra localizado próximo al extremo carboxilo de las FMOs con actividad *N*-hidroxilante de mamíferos, hongos y bacterias (Stehr *et al.*, 1998). Este motivo conservado puede definirse con mayor precisión como $DX(I/V)(I/V)(L/F)ATGY(K/R)SNVP$ para la mayoría de las proteínas que pertenecen a la familia YUCCA (Figura 14). Por otro lado, se identificó la secuencia de aminoácidos conservados $WL(I/V)VATGENAE$, localizado entre los motivos de unión a FAD y NADPH, y descrito por primera vez en este estudio. Este motivo puede ser considerado un rasgo característico de las FMOs de plantas, ya que no está presente en las FMOs de mamíferos, y está particularmente conservado en la familia de proteínas YUCCA, con la excepción de las proteínas YUC10/YUC11 y afines donde se observa cierta divergencia (Figura 14). Esta observación nos llevo a considerar que el motivo $WL(I/V)VATGENAE$ puede ser de especial utilidad para la identificación de nuevas proteínas FMOs de la familia YUCCA.

4.1.2. Identificación y caracterización de nuevos genes *ToFZY*

Una vez caracterizado estructuralmente el gen *ToFZY1* realizamos una búsqueda exhaustiva de secuencias similares en la base de datos de *SOL Genomics*, empleando el motivo $WL(I/V)VATGENAE$ como el criterio principal de selección. Como resultado de esta búsqueda se identificaron una serie de secuencias parciales de ADNc y ADNg, las cuales sirvieron como punto de partida para el diseño de cebadores de amplificación. Combinando las estrategias de PCR inversa, PCR convencional y RT-PCR con la secuenciación de amplicones solapantes, se consiguió determinar la secuencia de nucleótidos de 5 nuevos genes *ToFZY* y de los ADNc correspondientes. Estos nuevos parálogos de *ToFZY1* se denominaron *ToFZY2*, *ToFZY3*, *ToFZY4*, *ToFZY5* y *ToFZY6*, y sus secuencias se depositaron en el *GenBank* bajo los números de acceso GQ240886, GQ240887, GQ240888, GQ240889 y GQ240890, respectivamente.

La comparación de las secuencias de ADNg y de ADNc permitió dilucidar la estructura exón-intrón de los nuevos genes *ToFZY* (Figura 15B). Al igual que en el caso de *ToFZY1*, la región codificante de *ToFZY2* y 6 es interrumpida por 3 intrones, mientras

que en *ToFZY3*, 4 y 5 lo es por 2 intrones. Una observación interesante es que el punto de inserción del primer intrón en todos los genes *ToFZY*, al igual que en todos los genes *YUC* de *Arabidopsis*, es exactamente el mismo, delimitando un primer exón que codifica los motivos altamente conservados de unión a FAD y NADPH, y el motivo WL(I/V)VATGENAE (Figura 15 B).

CONSENSO →	WL (I/V) VATGENAE	DX (I/V) (I/V) (L/F) ATGY (K/R) SNVP
Sl CAJ46041 (ToFZY)	WLIVATGENAE	DSIILATGYKSNVP
At NP194980 (YUC1)DF.....
Ph AAK74609 (FZY)
Mt ABE92660A.....
At NP196693 (YUC4)	..V.....
Os NP917203	..V.....	.T.....R....
Os NP912652	..V..S.....	.AV.F....R....
Os NP471144	..V.....	.AVV.....R....
Os XP477812	..V.....	.AV.....Q....
At NP171955 (YUC3)	.IV.....	..V.....R....
At NP180881 (YUC7)	..V.....	..V.....R....
At NP194601 (YUC8)	..V.....	..VV.....R....
Mt ABE89940	..V.....	.AVV.....R....
At NP171914 (YUC9)	..V.....	.AVV.....R....
At NP199202 (YUC5)	..V.....	.AVV.....R....
Os BAD87432	..V.....	.V.V.....
Os NP916435	..V.....	.V.V.....
Os AAU43964	..V.....S.	.A.V.....
At NP197944 (YUC6)	..VA.....	.A.....
Mt ABE83417A.....
At NP193062 (YUC2)	..V.....	.A.....
Os ABA99096	..V.....V	.AV.F.....
Os NP913428	..V.....	.VV.....
At NP173564 (YUC11)	FMVA.....G.	...VF.....S.S
At NP175321 (YUC10)	F.V.....GD	.A.VF.....S.C
Zm BT016604	F.V.....C.	..LVF....R.TAN
Os ABA96025	F.V..S...SA	.A.VF....T.TAN
Os BAD28283	F..M...KSA	.A.VF.....T.N
Os ABA92044	F.V.....SA	.A.VF.....T.N
Os XP493785	H.VA.A...D.	.A.VF....R.TTK
Os XP493782	H.VA.A...D.	.AVVF....R.TTK
Os BAD88343	AVV....QYSQ	.AV.YGGEGHRRRQ
Os BAD89476	AVV....HYSQ	.AV.YC...NYSF.
Os BAD54210	AVV..V.SYTQ	.TVVYC...SYSY.
At NP176448	AVV.CN.HYI.	.V.MHC....YHF.
At AAM61259	AVV.CN.HYI.	.V.MHC....YHF.
At NP172684	AVV.CN.HYT.	.T.MHC....YYF.
At NP172678	AVV.CN.HYT.	.T.VHC....YHF.
At NP564797	AVVMCC.HF..	.T.VHC....YYF.
At NP176444	AVV.CN.HYT.	..VYC....Y.F.
At NP176761	AVV.CS.HFT.	.T.VHC....YYF.
At NP564796	AVV.CS.HYT.	..VYC....YRFT
At AAD43611	AVV.CS.HYT.	..VYC....YRFT

Figura 14. Alineamiento múltiple de dos motivos conservados en FMOs de tipo YUCCA. Se muestran datos de 43 FMOs de plantas mono- y dicotiledóneas. En la parte superior se indica las secuencias consenso en la familia YUCCA. El recuadro delimita a las FMOs de tipo YUCCA. At: *Arabidopsis thaliana*; Sl: *S. lycopersicum*; Mt: *Medicago truncatula*; Os: *Oryza sativa*; Ph: *Petunia hybrida*; Zm: *Zea mays*

4.2. Análisis filogenético de la familia de genes *ToFZY*

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas *ToFZY*, deducidas a partir de los ADNc, presentan un nivel de identidad que varía entre el 42-83%, rango muy similar al exhibido por las 11 proteínas *YUC* de *Arabidopsis* (46-84%). Las relaciones filogenéticas entre los genes *ToFZY* y *YUC* se infirieron primero en base al nivel de divergencia de sus secuencias de ADN codificantes, y luego se incorporó al análisis información referente a la estructura génica, la secuencia de aminoácidos y el patrón de expresión. Para la construcción de un árbol filogenético que incluyera a los 6 genes *ToFZY* y a los 11 genes *YUC* se partió de un alineamiento de secuencias de nucleótidos codificadoras, basado en un alineamiento previo de secuencias de aminoácidos. Como se muestra en la figura 15A, los genes *ToFZY* agrupan con prácticamente todos los clados filogenético delimitados para la de genes *YUC*. La presencia de la mayoría de los clados en tomate y en *Arabidopsis* indica que su formación tuvo que ser anterior a la divergencia de estas dos especies, y su conservación en el transcurso de la evolución sugiere que los genes implicados deben desempeñar papeles fundamentales en el desarrollo o en respuestas frente al medio.

Los clados *ToFZY1-YUC1/4* y *ToFZY2-YUC2/6* muestran ambos una consistencia o robustez del 100% (valor de “*bootstrap*” en la figura 15A), y sus miembros presentan una estructura génica similar en la que la región codificadora se encuentra interrumpida por 3 intrones (Figura 15B). La similitud en la secuencia de aminoácidos, en el tamaño de los intrones y en el patrón de expresión que se describirá más adelante, indican que posiblemente *ToFZY1* es el autentico ortólogo de *YUC4* (y de *FZY* de petunia), y *ToFZY2* el ortólogo de *YUC6*.

El clado integrado por los gene *ToFZY3/4/5-YUC3/7* también es altamente robusto, presentando un valor de *bootstrap* del 95%. Todos los miembros de este subgrupo tienen la región codificadora subdividida por 2 intrones, y representan los sucesos más recientes de duplicación génica dentro de la familia en ambas especies. La única evidencia añadida de ortología que se encontró dentro de este clado fue la alta identidad que comparten las proteínas *ToFZY3* y *YUC3*.

El subgrupo más antiguo es el compuesto por los genes *ToFZY6-YUC10/11*.

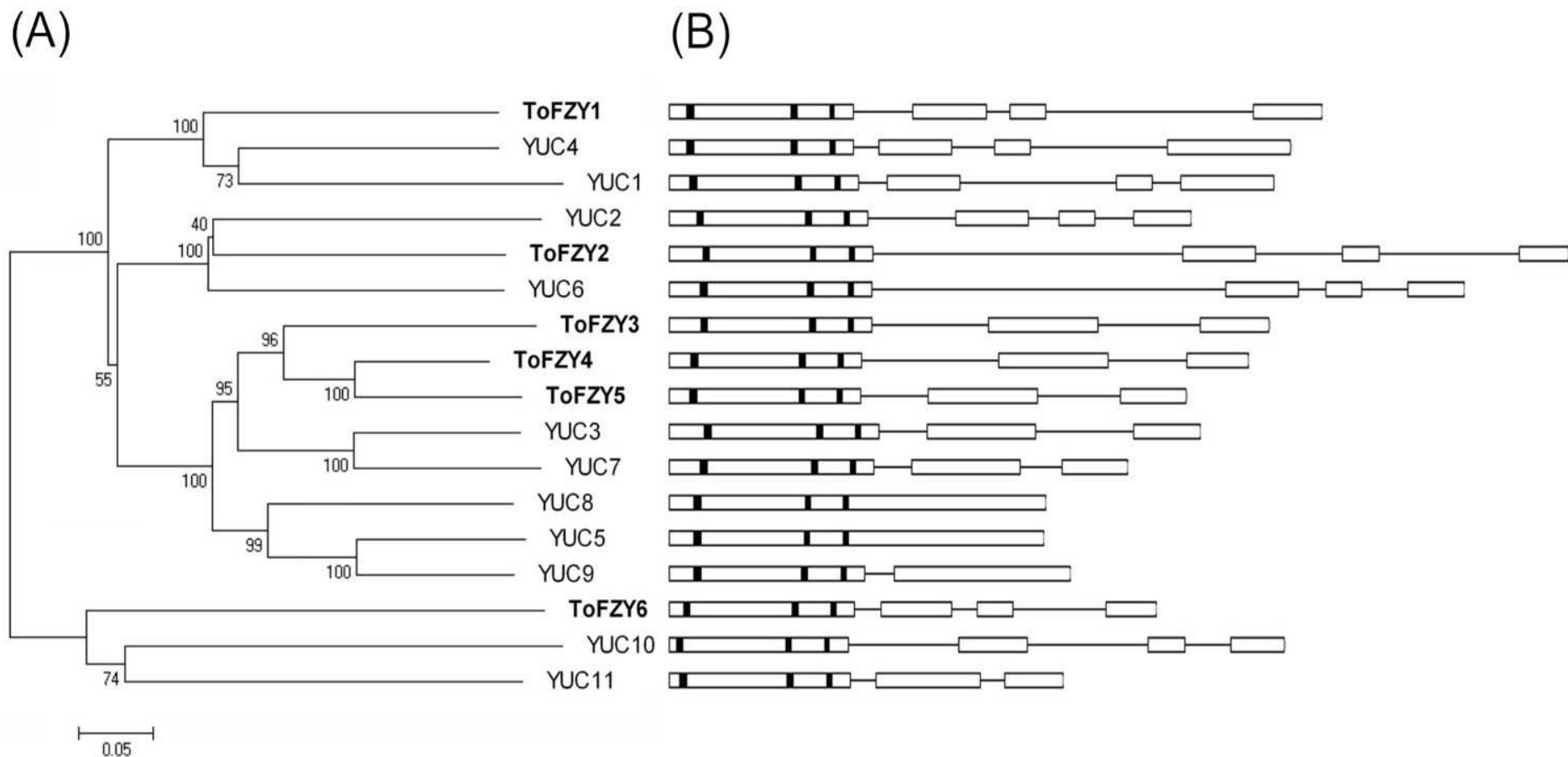


Figura 15. Relaciones filogenéticas y estructura exón-intrón de la familia de genes *YUCCA* en tomate y *Arabidopsis*. (A) Árbol filogenético resultado de aplicar el modelo *Neighbour-Joining* sobre un alineamiento de las secuencias codificadoras. El valor en cada nodo indica la robustez de los diferentes clados, estimada mediante remuestreo aleatorio (*bootstrapping*) con un total de 5.000 replicas. Las secuencias de tomate se resaltan en negrita y la escala indica el número de sustituciones por sitio. (B) Los exones se representan como cajas blancas (solo se muestra la región codificadora) y los intrones se representan como líneas. Las cajas negras representan los motivos de unión a FAD (izquierda), motivo WL(I/V)VATGENAE (centro) y motivo de unión a NADPH (derecha).

Dentro de este clado las pruebas de ortología son más confusas y en él se da el mayor nivel de divergencia en el motivo WL(I/V)VATGENAE. Aunque los genes *ToFZY6* y *YUC11* son las menos divergentes a nivel de nucleótidos, *ToFZY6* y *YUC10* son más similares a nivel de estructura génica y de secuencia de aminoácidos.

Por último, no hemos detectado en tomate genes ortólogos del subgrupo *YUC5/8/9*, el cual se caracteriza por tener algunos miembros sin intrones. El fenómeno de pérdida de intrones es característico de clados evolutivamente más recientes, sugiriendo que este subgrupo de genes representa una expansión reciente de la familia de genes *YUCCA* en *Arabidopsis*. En apoyo a esta idea está el hecho de que no se hayan detectado potenciales ortólogos de este subgrupo de genes en otras especies de plantas, ni siquiera en aquellas en las que la secuenciación del genoma ha sido completado, como por ejemplo en una dicotiledónea leñosa como el álamo (Schlaich, 2007) o en una monocotiledónea como el arroz (Gallavotti *et al.*, 2008).

4.3. Caracterización bioquímica de la proteína ToFZY1

La actividad enzimática de una proteína no se puede establecer de manera inequívoca mediante el análisis comparativo de su secuencia de aminoácidos. Zhao y colaboradores (2001) han demostrado que la FMO codificada en el gen *YUC1* es capaz de catalizar *in vitro* la oxigenación de la amina primaria de la triptamina (TAM) para dar el compuesto *N*-hidroxil-triptamina (NHT). También estos autores han sugerido que esta reacción es un paso limitante en la síntesis de IAA por la vía de la TAM. En el presente estudio se estableció como un objetivo comprobar si la proteína ToFZY1 exhibe la misma actividad enzimática que la proteína YUC1. En concreto, nos centramos en la producción de ToFZY1 en *E. coli* como una proteína recombinante, para luego comprobar *in vitro* su posible actividad *N*-hidroxilante.

4.3.1. Producción de ToFZY1 como una proteína recombinante en *E. coli*

Como primer paso dentro de este objetivo de experimentación, se construyó una molécula de ADN recombinante en la que la región codificadora del gen *ToFZY1* se insertó

en el vector de expresión pQE-60. De esta manera se pretendía expresar la proteína ToFZY1 en *E. coli* bajo el control del operador del operón *Lac*, y como una proteína recombinante con 6 residuos de histidina adicionales en su extremo carboxilo. Tras la introducción de la molécula de ADN recombinante en una cepa apropiada de *E. coli*, se realizó un ensayo de inducción de la proteína recombinante probando diferentes concentraciones de IPTG. La figura 16 muestra el resultado de dicho ensayo. En los extractos proteicos de las bacterias que contienen el ADNc de *ToFZY1*, y en todas las concentraciones de IPTG ensayadas, se detectó la producción abundante de una nueva proteína. Dicha proteína no se observó en los extractos proteicos de las mismas bacterias no tratados con IPTG, ni en el control de bacterias transformadas con el vector de expresión vacío.

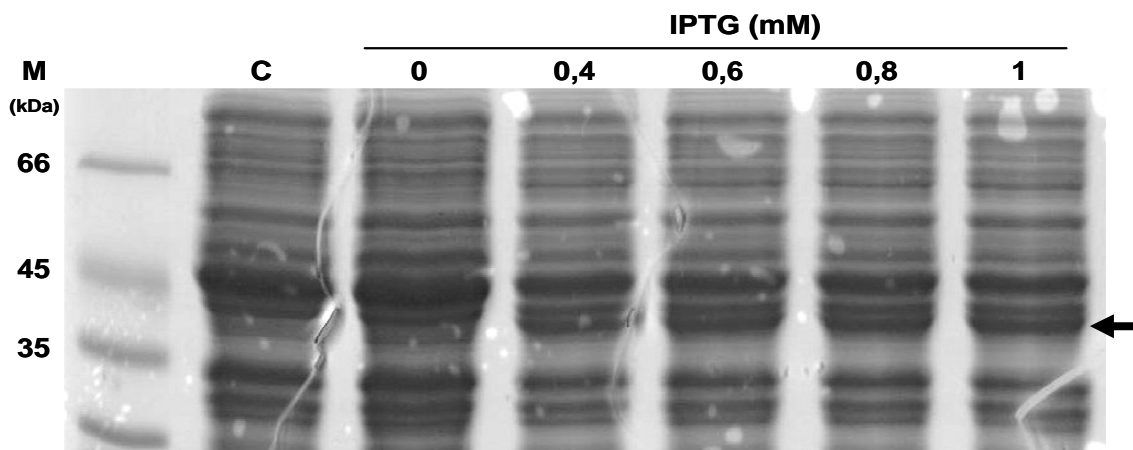


Figura 16. SDS-PAGE de extractos proteicos de bacterias transformadas. Se muestra el resultado tras 2 h de inducción con diferentes concentraciones de IPTG. La flecha indica la banda proteica que aparece tras el tratamiento con IPTG. C: control de bacterias transformadas con el vector de expresión vacío. M: marcador de peso molecular.

Sin embargo, la proteína ToFZY1 producida en este sistema presentó un peso molecular inferior a los 46,6 kDa estimados a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión completa. Esta diferencia de tamaño puede ser explicada por la pérdida de 45 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína, provocado por la presencia de dos codones de arginina AGA adyacentes en la secuencia codificante del gen *ToFZY1*, lo cual daría lugar a una forma truncada de la proteína con una masa de 40,6 kDa. Los codones AGA son usados con muy baja frecuencia en *E. coli*, y la presencia de dos o más codones de este tipo contiguos pueden provocar el aborto de la síntesis proteica debido a la escasez del ARNt que lo reconoce. La hipótesis de la forma truncada de la proteína quedó reforzada por la imposibilidad de purificar la proteína recombinante mediante

cromatografía de afinidad con una matriz de níquel-nitrilotriacético, sugiriendo la ausencia de los 6 residuos de histidina en el extremo carboxilo de la proteína.

4.3.2. Síntesis de un patrón de N-hidroxil-triptamina

Ante la ausencia de un preparado comercial de la NHT, se optó por obtenerla a través del departamento de síntesis orgánica del IPNA-CSIC. La estructura molecular del producto final del proceso de síntesis fue verificada por $^1\text{H-NMR}$ [(CDCl₃, 400 MHz) d H 8.11 (1H, bs, NH), 7.60 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.33 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.18 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.11 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, Ar-H), 6.98 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 2-H), 4.45 (2H, bs), 3.23 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, N-CH₂), 3.01 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂)], y por espectrometría de masas [(EI) m/z (intensidad relativa) 174 (M⁺, 27), 158 (11), 144 (23), 130 (M⁺-CH₂NHOH, 100), 117 (11)]. Ambos resultados fueron acordes a lo descrito en la bibliografía científica para la NHT (Yamada *et al.*, 1998).

4.3.3 Ensayo de la actividad flavin-monooxigenasa de la proteína ToFZY1

En la bibliografía científica se describe el caso de una FMO de levadura que aún perdiendo 38 aminoácidos de su extremo carboxilo seguía manteniendo su actividad enzimática y constantes cinéticas, aunque se reducía su capacidad de retención del FAD (Suh *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002). Alentados por dicha información, decidimos intentar la detección de la actividad FMO en la forma truncada de la proteína ToFZY1, directamente en los extractos proteicos de bacterias transformadas con el ADNc del gen *ToFZY1* e inducidas con IPTG. Por precaución se incorporó FAD durante la inducción, la diálisis del extracto proteico y durante el ensayo de actividad. La intención del proceso de diálisis fue eliminar solutos de bajo peso molecular del extracto proteico, especialmente aquellos que tuviesen grupos indólicos, para prevenir posibles interferencias en el ensayo enzimático.

Los extractos proteicos fueron ensayados usando TAM como sustrato e identificando mediante HPLC los productos de la reacción. Se utilizó un patrón de TAM y otro de NHT para determinar el tiempo de retención de estas moléculas en la columna de cromatografía empleada. Como se muestra en la figura 17, tras el proceso de incubación

del extracto proteico con la TAM, la NHT sólo se detectó cuando se usó el extracto proteico de bacterias transformadas con pQE-60-*ToFZY1* e inducidas con IPTG (Figura 17-4), mientras que en la reacción control con el extracto obtenido a partir de bacterias transformadas con el vector de expresión vacío sólo se pudo recuperar la TAM (Figura 17-3). De esta manera, quedó demostrado que la proteína *ToZFY1*, aun truncada en su extremo carboxilo, es capaz de catalizar la reacción de N-hidroxilación de la triptamina para rendir NHT.

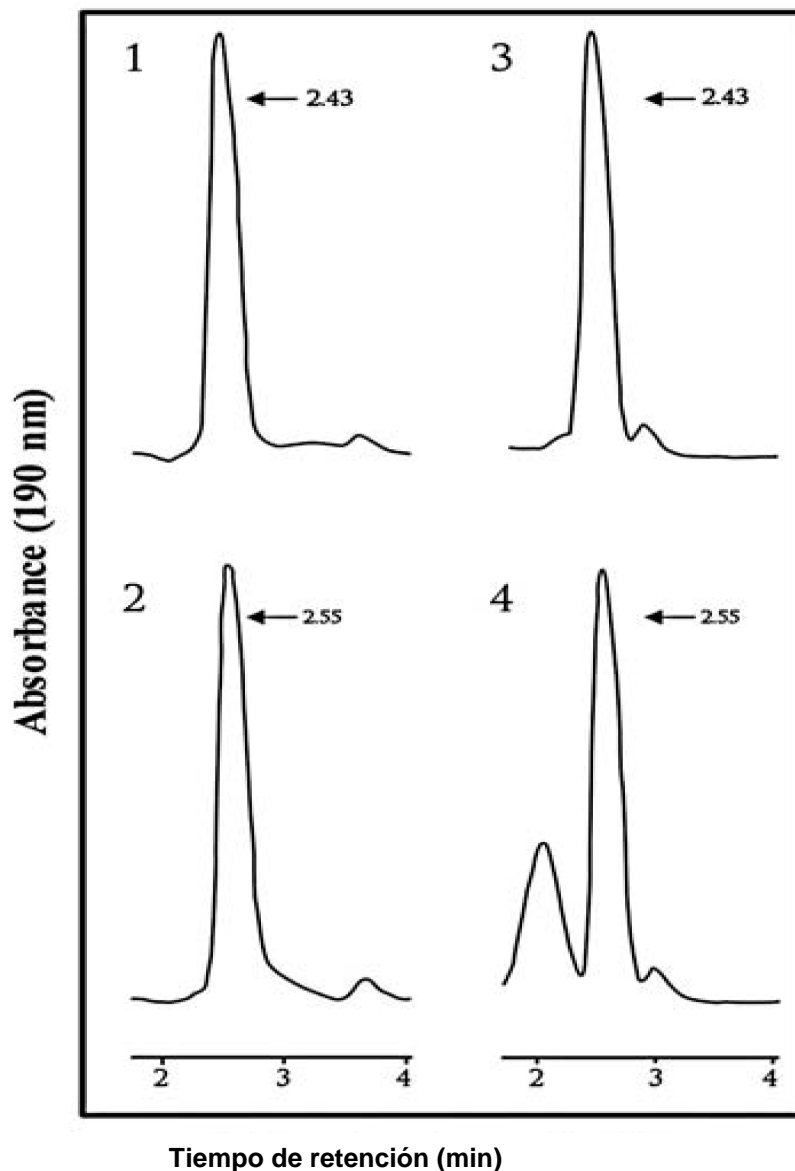


Figura 17. Análisis mediante HPLC del ensayo de actividad FMO de la proteína *ToFZY1*. (1) Patrón de triptamina. (2) Patrón de *N*-hidroxil-triptamina. (3) Reacción con extracto proteico control. (4) Reacción con extracto que contiene a *ToFZY1* truncada. Las flechas indican el tiempo de retención en minutos del pico señalado.

4.4. Patrón de expresión de los genes *ToFZY* durante el proceso de desarrollo de *Solanum lycopersicum*

En el presente estudio se ha hecho uso de la RT-PCR a tiempo real como aproximación para la cuantificación de los niveles de mRNA de los diferentes genes *ToFZY*. Esta técnica, cuando es aplicada con rigor, proporciona una alta exactitud de las medidas, un rango dinámico de al menos 7 órdenes de magnitud y la más alta sensibilidad (Nolan *et al.*, 2006), además de permitir el análisis diferenciado de miembros estrechamente relacionados de una familia multigénica (Gachon *et al.*, 2004).

4.4.1. Normalización de la cuantificación de ARNm

La fiabilidad de una cuantificación de los niveles de un ARNm específico, depende en gran medida de una normalización rigurosa de las cantidades estimadas. Sólo de esta manera se podrá identificar la auténtica variación en la expresión de genes específicos. El éxito de la normalización basada en el uso de genes de expresión constitutiva (*Housekeeping genes*) radica en la elección de los genes de control apropiados, es decir, su nivel de expresión debe ser relativamente constante en el panel de muestras biológicas que están siendo examinado, y no debe ser alterado significativamente por las variables experimentales (Guénin *et al.*, 2009). Si la expresión de un gen de referencia varía en exceso resulta inviable la detección de pequeños cambios en la expresión de los genes de interés y, en el peor de los casos, se podrían inferir patrones de expresión erróneos (Dheda *et al.*, 2005).

4.4.1.1. Selección de genes candidatos a referencias internas

Se seleccionaron 11 candidatos a genes de referencia (Tabla 1). En un intento de reducir la posibilidad de corregulación se seleccionaron genes que pertenecen a diferentes clases funcionales, con la única excepción de los genes *RPL8* y *E α 1* que participan ambos en el proceso de traducción de proteínas. De entre los 11 candidatos, 7 genes fueron de tipo "clásico", es decir, son genes que se emplean frecuentemente como referencias internas durante los estudios de expresión génica (Czechowski *et al.*, 2004;

Tabla 1. Descripción de los genes candidatos a genes de referencia en *Solanum lycopersicum*

Símbolo gen	Número de acceso *	Arabidopsis		
		Gen Homólogo	Descripción del Gen/Función	Identidad **
<i>GAPDH</i>	U97257	AT1G13440	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa/Glucólisis-gluconeogénesis	91.9
<i>EFa1</i>	X53043	AT1G07940	Factor de elongación 1-alfa/Elongación y traslación	67.5
<i>TBP</i>	SGN-U329249	AT1G55520	Unión a la caja TATA/Factor de transcripción de la ARN polimerasa II	94.8
<i>RPL8</i>	X64562	AT4G36130	Proteína del ribosoma L8/Constituyente estructural del ribosoma	92.3
<i>APT</i>	BT012816	AT1G27450	Adenina fosforibosil-transferasa/Metabolismo de las purinas	84.4
<i>DNAJ</i>	AF124139	AT3G44110	Proteína del tipo DnaJ/Unión y plegamiento de proteínas	81.3
<i>TUA</i>	AC122540	AT5G19770	Tubulina alfa/Constituyente estructural del citoesqueleto	92.0
<i>TIP41</i>	SGN-U321250	AT4G34270	Proteína del tipo TIP	67.5
<i>SAND</i>	SGN-U316474	AT2G28390	Proteína de la familia SAND	61.4
<i>CAC</i>	SGN-U314153	AT5G46630	Subunidad media del complejo de Clatrina/Endocitosis	95.0
<i>Expressed</i>	SGN-U346908	AT4G33380	Secuencia expresada	66.4

* Número de acceso en las bases de datos GenBank o Sol Genomics Network (SGN). ** Entre las secuencias de aminoácidos de tomate y *Arabidopsis*

Dheda *et al.*, 2004; Radonić *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2006), e incluyeron a *GAPDH* (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa), *E α 1* (factor de elongación α 1), *TBP* (proteína de unión a la caja TATA), *RPL8* (proteína ribosomal L8), *APT* (adenina fosforibosil-transferasa), *DNAJ* (proteína del tipo DnaJ) y *TUA* (α -tubulina). Los genes *GAPDH*, *DNAJ* y *TUA* han sido propuestos por Coker and Davies (2003) como genes de referencia adecuados en tomate, tras un análisis de la expresión de 127 transcritos basado en su abundancia relativa en 27 librerías de ADNc.

El conjunto de 11 genes que se evaluaron en el presente estudio también incluyeron 4 candidatos “no convencionales”, concretamente los genes *TIP41*, *SAND*, *CAC* y al gen de tomate homólogo al gen de *Arabidopsis At4g33380* (de aquí en adelante denominado “*Expressed*”). La selección de estos genes estuvo inspirada en un trabajo publicado por Czechowski y colaboradores (2005). Estos autores, aprovechando los datos sobre expresión génica en *Arabidopsis* aportados por los análisis con micromatrices de ADN, identificaron cientos de potenciales genes de referencia, que mostraban una estabilidad excepcional en diferentes etapas del desarrollo o en diferentes condiciones ambientales. Los posibles homólogos en tomate de estos genes de referencia no convencionales fueron identificados en la base de datos *SOL Genomics* y *GenBank* mediante la búsqueda de similitudes de secuencias (Tabla 1).

4.4.1.2. Prestaciones de los cebadores de amplificación

Para controlar posibles interferencias de la contaminación por ADNg de las muestras de ADNc, los cebadores de amplificación deben ser diseñados sobre diferentes exones. La posición de los intrones en cinco de los genes candidatos (entradas *SGN* en tabla 1) tuvo que ser pronosticada mediante la comparación de las secuencias de ADNc de tomate con las secuencias de ADNg de los genes homólogos en *Arabidopsis*. Una vez diseñados los cebadores (tabla 2) su idoneidad fue comprobada mediante PCR a tiempo real, utilizando como molde una muestra de ADNc de tomate. Tras la electroforesis del resultado de la amplificación, se observó en cada caso un único amplicón con el tamaño esperado (Tabla 2) y la ausencia de dímeros de cebadores (Figura 18, carriles impares), tal y como sugería el análisis previo de fusión de los productos de la reacción. Cuando los mismos cebadores se ensayaron usando como molde ADNg de tomate,

Tabla 2. Detalles de los cebadores y amplicones para los 11 genes candidatos evaluados

Símbolo	Secuencia de los cebadores		Exones reconocidos en Arabidopsis		[óptima] [μM]	Amplicón pb/Tm		Eficiencia amplificación	
	Directo (D)	Reverso (R)	D	R		ADNc*	ADNg**	Media***	SD
<i>GAPDH</i>	GGCTGCAATCAAGGAGGAA	AAATCAATCACACGGGAAGCTG	9-10	11	0,2	207/78,1	N/A	0,913	0,027
<i>EFα1</i>	TACTGGTGGTTTTGAAGCTG	AACTTCCTTCACGATTTTCATCATA	2	3	0,2	166/79,2	246/79,2	0,953	0,106
<i>TBP</i>	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	4	6	0,6	184/76,1	N/A	0,959	0,044
<i>RPL8</i>	CCGAAGGAGCTGTTGTTTGTA	ACCTGACCAATCATAGCACGA	1	2	0,2	184/79,3	N/A	0,902	0,026
<i>APT</i>	CCATGAGGAAACCCAAGAAGT	CTCCAGTCGCAATTAGATCAT	4	5	0,2	143/78,5	1150/75,2	0,887	0,024
<i>DNAJ</i>	GAGCACACATTGAGCCTTGAC	CTTTGGTACATCGGCATTCC	5	6	0,2	158/79,6	570/76,80	0,880	0,028
<i>TUA</i>	AGCTCATTAGCGGCAAAGAA	AGTACCCCCACCAACAGCA	2	3	0,2	163/77,0	254/78,60	0,973	0,106
<i>TIP41</i>	ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC	GCTGCGTTTTCTGGCTTAGG	6-7	8	0,4	235/78,3	1157/80,2	0,941	0,053
<i>SAND</i>	TTGCTTGGAGGAACAGACG	GCAAACAGAACCCCTGAATC	6	7	0,4	164/78,2	N/A	0,944	0,053
<i>CAC</i>	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG	7	8	0,6	173/76,4	610/78,0	0,931	0,047
<i>Expressed</i>	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	6	7	0,2	183/76,0	285/76,80	0,874	0,037

* Tamaño predicho a partir de la secuencia de ADNc. ** Tamaño estimado tras electroforesis en agarosa. *** Eficiencia media de 3 replicas técnicas. SD = desviación estándar. N/A= No amplifica.

siete de las parejas de cebadores rindieron productos de amplificación con mayor tamaño que los obtenidos con cDNA (Figura 18, carriles pares). Este resultado confirma que, al menos en estos casos, la predicción de la posición de los intrones en los genes candidatos de tomate fue correcta. Por otro lado, los cebadores para los genes *GAPDH*, *TBP*, *RPL8* y *SAND* no fueron capaces de amplificar usando ADNg como molde, lo que sugiere que los intrones implicados tienen un tamaño excesivo para ser amplificados o, en el caso del locus *GAPDH*, que el cebador directo que abarca una frontera entre dos exones adyacentes discriminó eficientemente la secuencia genómica.

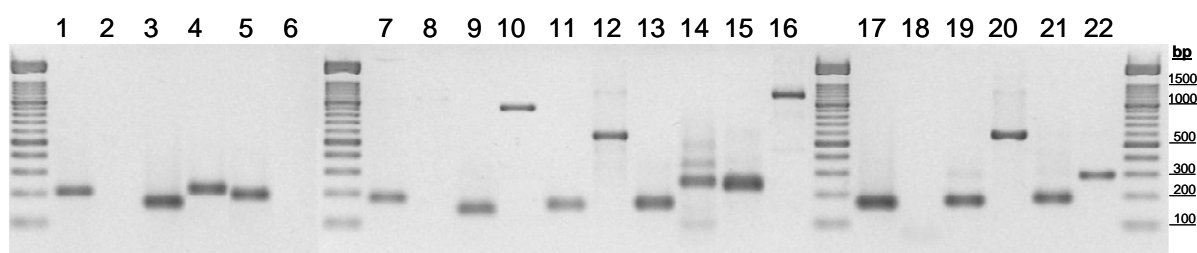


Figura 18. Análisis de los cebadores de amplificación. Se muestran los productos de amplificación obtenidos empleando como molde ADNc (números impares) o ADNg (números pares), separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: (1-2) *GAPDH*, (3-4) *EFα1*, (5-6) *TBP*, (7-8) *RPL8*, (9-10) *APT*, (11-12) *DNAJ*, (13-14) *TUA*, (15-16) *TIP41*, (17-18) *SAND*, (19-20) *CAC* y (21-22) *Expressed*.

Como se muestra en la tabla 2, seis de los siete productos de amplificación obtenidos empleando ADNg como molde se pueden identificar mediante el cálculo de la temperatura de fusión (T_m) de los amplicones, lo cual facilitó la detección de interferencias de contaminaciones de ADNg durante la cuantificación de ADNc. En el caso de las reacciones con cebadores *EFα1*, las posibles contaminaciones de ADNg tuvieron que ser controladas después de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa. Los valores de T_m de los productos de amplificación deben ser considerados con cautela por futuros usuarios de los cebadores propuestos, debido a que estos valores dependen de la concentración y del tipo iones en la mezcla de reacción, así como de la precisión y exactitud de la plataforma de PCR a tiempo real que se esté empleando.

Por último, con la finalidad de optimizar las condiciones de amplificación, se probaron diferentes concentraciones de cebadores empleando una muestra ADNc como

molde. En la tabla 2 se indican las concentraciones de cebadores que rindieron un menor ciclo de cuantificación (Cq) y, por lo tanto, una mayor eficiencia de amplificación.

4.4.1.3. Adquisición de los datos de Cq

Los valores de Cq necesarios para valorar la idoneidad de los genes candidatos a referencias internas, se obtuvieron con cada una de las 11 parejas de cebadores y con 27 muestras de ADNc que representaban diferentes órganos y etapas del ciclo de vida completo de la planta de tomate. Las muestras biológicas incluidas en este análisis se tomaron de entre las 33 descritas en el apartado 3.3.1 de Materiales y Métodos, exceptuando las muestras RM2, C1, C2, C4, C5 y HP. Además de las reacciones de RT-PCR, se incorporaron al análisis controles RT negativo (RT-) de las muestras de raíz madura y de pericarpio de fruto verde inmaduro. Estas muestras fueron las que exhibieron un mayor nivel de contaminación de ADNg en un ensayo previo con los cebadores *TUA*.

Los valores de Cq registrados para las 11 parejas de cebadores y las 27 muestras de ADNc oscilaron entre 21,1 (*GAPDH*) y 30,9 (*EF α 1*). Los controles RT- alcanzaron el umbral de fluorescencia sólo para los cebadores *APT*, *CAC* y "*Expressed*", con valores de Cq que superaban en más de 10 ciclos a los obtenidos con las correspondientes muestras de ADNc. Esta diferencia excede el mínimo de 5 ciclos recomendado para los análisis de RT-qPCR a tiempo real (Nolan *et al.*, 2006). La especificidad de cada reacción de amplificación se confirmó mediante análisis de fusión de los amplicones o, en el caso de los cebadores *EF α 1*, mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.4.1.4. Estabilidad de expresión de los genes candidatos en la serie completa del desarrollo

La evaluación de la estabilidad de expresión de los genes candidatos a referencias internas se realizó a partir los valores de Cq para cada amplicón y cada muestra, aplicando tres estrategias estadísticas diferentes pero complementarias. En dos de estas aproximaciones (geNorm y CV) se tiene en cuenta la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores. En el caso de la evaluación estadística soportada por el programa

NormFinder se realizaron dos análisis sobre diferentes agrupamientos de muestras. Por un lado, se establecieron cuatro grupos en función de la naturaleza del tejido: raíces (n=5), hojas (n=7; incluye la muestra de cotiledones), flores (n=9) y frutos (n=6). Por otro lado, y debido a que los autores del *NormFinder* recomiendan un mínimo de 8 muestras por grupo, se combinaron muestras de diferentes órganos para formar dos grupos, uno que incluye raíces y hojas (n=12) y otro que incluye a flores y frutos (n=15), diferenciando de esta manera la parte vegetativa de la parte reproductiva de la planta.

Tabla 3. Clasificación de los genes candidatos a referencias internas en función de su estabilidad de expresión en la serie completa del desarrollo.

geNorm	NormFinder		Coeficiente de variación	Consenso	
	2 grupos	4 grupos			
CAC/TIP41	TIP41	TIP41	CAC	CAC/TIP41	1
	CAC	CAC	TIP41		2
TBP	SAND	Expressed	Expressed	Expressed	3
SAND	Expressed	TBP	TBP	TBP	4
Expressed	RPL8/TBP	SAND	SAND/RPL8	SAND	5
DNAJ		RPL8		RPL8	6
APT	APT	APT	APT	APT	7
RPL8	DNAJ	GAPDH/DNAJ	GAPDH	DNAJ	8
GAPDH	EF α 1		DNAJ	GAPDH	9
EF α 1	GAPDH	EF α 1	EF α 1	EF α 1	10
TUA	TUA	TUA	TUA	TUA	11

Los resultados parciales se integraron en una clasificación consenso. La clasificación se ordena desde la parte superior a la inferior en orden de mayor a menor estabilidad en la expresión.

Cabe destacar ciertos aspectos de los resultados recogidos en la tabla 3 sobre la evaluación de los genes candidatos. El programa *NormFinder* entregó clasificaciones diferentes con cada tipo de agrupamiento de muestras. La clasificación propuesta por el *NormFinder* a partir de los cuatros grupos de muestras fue muy similar a la evaluación basada en el CV, diferenciándose solamente por la posición relativa de los genes CAC y TIP41. Los tres modelos estadísticos muestran varias coincidencias en sus resultados: I) CAC y TIP41 siempre son los genes con la expresión más estables; II) los genes “Expressed”, TBP y SAND siempre están incluidos entre los 5 mejores genes de referencia; III) los genes GAPDH, EF α 1 y TUA muestran un patrón de expresión inestable y son clasificados entre los peores genes candidatos por los tres análisis empleados.

Los dos resultados obtenidas con el programa *NormFinder* fueron resumidas en una única clasificación antes de elaborar un consenso con las otras dos aproximaciones estadísticas. La clasificación consenso resultante (Tabla 3) indica que los tres mejores candidatos para la normalización de la cuantificación de la expresión génica, en la serie completa del desarrollo del tomate, son los genes *CAC*, *TIP41* y “*Expressed*”. El análisis de la variación de factores de normalización (NF) consecutivos ($V_{n/n+1}$) reveló que los tres genes mencionados son suficientes para calcular un NF robusto. En otras palabras, añadir el gen *TBP* a la combinación *CAC/TIP41/Expressed* no produce cambios significativos en los valores que adquieren los NFs de las diferentes muestras, es decir, la variación NF_3 versus NF_4 ($V_{3/4} = 0,118$) es menor que el valor de corte de 0,15 sugerido por los autores de este análisis (Vandesompele *et al.*, 2002).

La media de los valores M y CV para el triplete de genes de referencia *CAC/TIP41/Expressed* en el conjunto de 27 muestras analizadas, fue $M=0,537$ y $CV=0,338$. Estos valores se encuentran dentro del rango propuesto como aceptable ($M \leq 1$ y $CV \leq 0,5$) para paneles de muestras biológicas heterogéneas (Hellemans *et al.*, 2007). En resumen, el triplete de genes *CAC/TIP41/Expressed* parece adecuado para una normalización rigurosa de la cuantificación de la expresión génica en un conjunto de muestras heterogénea de tomate, como el que abarca el desarrollo completo de esta planta.

4.4.1.5. Estabilidad de expresión de los genes candidatos durante el desarrollo de órganos particulares

La valoración de los genes de referencias dentro de diferentes subconjuntos de muestras, que representaban el proceso de desarrollo de órganos particulares, se realizó de la misma manera que con la serie completa del desarrollo, excepto cuando se analizó un único tipo de órgano. En estos cuatro casos la aplicación *NormFinder* no fue incluida en la elaboración de las clasificaciones consenso puesto que la estima de la variación entre grupos de muestras no es posible. Las muestras de cotiledones se agruparon con las muestras de hojas debido a que se obtenían las mismas clasificaciones de los genes candidatos. Los resultados que se muestran en la tabla 4 pueden ser usados como una guía para la elección de genes de referencias apropiados en diferentes contextos de

investigación centrados en el desarrollo de las plantas de tomate. Los genes de referencias recomendados para los diferentes subconjuntos de muestras son, en esencia, diferentes combinaciones de los cinco mejores clasificados en el análisis de la serie completa del desarrollo (Tabla 3), con la excepción del gen *TBP* que en este nuevo análisis ocupó una posición inferior en la mayoría de las clasificaciones consensos.

Tabla 4. Combinaciones de genes de referencias recomendados para subconjuntos de muestras.

Subconjunto de muestras	Genes de referencia recomendados	Valores medios de estabilidad		
		M	CV	$V_{n/n+1}^*$
R	<i>TIP41/SAND (CAC)</i>	0,299 (0,422)	0,210 (0,277)	0,149
H/C	<i>Expressed/TIP41 (CAC)</i>	0,399 (0,430)	0,246 (0,262)	0,135
F	<i>SAND/CAC (DNAJ)</i>	0,374 (0,416)	0,220 (0,236)	0,133
S/PE	<i>CAC/SAND (Expressed)</i>	0,362 (0,306)	0,230 (0,256)	0,075
R + H/C	<i>TIP41/Expressed/CAC</i>	0,580	0,294	0,140
H/C + F	<i>CAC/Expressed/TIP41</i>	0,519	0,317	0,113
F + S/PE	<i>CAC/SAND/RPL8</i>	0,507	0,307	0,123
H/C + F + S/PE	<i>CAC/TIP41/Expressed</i>	0,481	0,343	0,109

* Variación NF_n/NF_{n+1} , donde n es el número de genes de referencia recomendado.
R: raíces; H: hojas; C: cotiledones; F: flores; S/PE: frutos (semillas/pericarpo externo).

A partir de los resultados obtenidos se deduce que los requerimientos para la normalización de las medidas de expresión génica con muestras procedentes de un mismo tipo de órgano, son diferentes a las necesidades de las comparaciones entre órganos. Por un lado, son suficientes dos genes de referencia para una normalización precisa en los análisis dentro de un órgano, como indican los valores $V_{2/3}$ menores de 0,15 (Tabla 4). Las parejas de genes recomendados para el cálculo de los NFs, tienen un valor medio de estabilidad aceptables ($M \leq 0,5$ y $CV \leq 0,25$) para un conjunto de muestras relativamente homogéneas (Hellemans *et al.*, 2007). En estos casos se ha incluido un tercer gen de referencia (entre paréntesis en la tabla 4), pensando en aquellos investigadores que prefieran usar un mínimo de 3 genes de referencias, tal y como sugiere Vandesomepele y colaboradores (2002). Por otro lado, cuando los subconjuntos de muestras comprenden 2 o 3 órganos diferentes, es necesario el uso de 3 genes de referencia para una normalización fiable (ver valores $V_{3/4}$ en la tabla 4). También cabe mencionar que el gen *SAND*, siendo apropiado para la normalización en estudios dentro

de órganos, no es tan aconsejable en experimentos que incluyan diferentes órganos vegetales.

El conjunto de genes de referencias recomendados para la normalización durante la cuantificación de la expresión génica en la serie completa del desarrollo (*CAC/TIP41/Expressed*), son también útiles para las comparaciones dentro de órgano y en tres de las cuatro combinaciones de órganos analizadas (Tabla 4). La única excepción es la combinación integrada por las muestras de flores y frutos donde los genes de referencias más adecuados son *CAC/SAND/RPL8*. Si en este caso se sustituye a *RPL8* por *TIP41*, que es el siguiente gen de referencia más estable en la clasificación correspondiente, los valores medios de los parámetros de estabilidad siguen siendo aceptables ($M=0,433$ y $CV=0,341$). Esto último nos permite proponer a 4 genes de expresión constitutiva y excepcionalmente estable, concretamente *CAC*, *TIP41*, *Expressed* y *SAND*, como un conjunto de herramientas de normalización valiosas para los análisis de la expresión génica centrados en el proceso de desarrollo de *Solanum lycopersicum* y basados en la técnica de RT-qPCR.

4.4.2. Niveles de ARNm de los genes *ToFZY* durante el desarrollo

En los siguientes apartados se realiza una descripción del patrón de expresión de los genes *ToFZY* a nivel transcripcional, en el sentido de que se cuantifican los niveles de los ARNm correspondientes. Esto no implica necesariamente la existencia de un mecanismo de regulación de la expresión génica a nivel transcripcional, sino que debe ser entendido como una descripción del estado en que se encuentran dichos niveles como resultado de los procesos de síntesis y degradación de las moléculas de ARNm analizadas.

4.4.2.1. Controles de calidad de RT-qPCR a tiempo real

Durante el diseño de los cebadores de amplificación empleados para la cuantificación del nivel de ARNm de genes *ToFZY* específicos, además de dirigirlos hacia diferente exones para detectar posibles contaminaciones de ADNg, se dedicó especial

atención en evitar las posibles amplificaciones cruzadas de otros miembros de la familia multigénica. En la tabla 5 se muestran los cebadores utilizados para este análisis y algunas características asociadas.

Tabla 5. Oligonucleótidos cebadores usados en la cuantificación del ARNm de genes *ToFZY* específicos.

Gen	Cebadores* Directo/reverso	Exón	[óptima] μM	Amplicón pb/Tm		Eficiencia**	R ² ***
				ADNc	ADNg		
<i>ToFZY1</i>	GTACTCGACGTTGGAGCATTATC/ TGAAGAAATCACTTCCCTTAAACC	2 3/4	0,2	187/77,7	976/78,04	1,68 (0,03)	0,9937
<i>ToFZY2</i>	AGGAATGGAGGTGTGTTTGG/ GGGACGTGTCACCGAGTAA	1 2	0,4	203/79,2	1256/78,7	1,70 (0,03)	0,9978
<i>ToFZY3</i>	TGGAGAAATACAAGAAATTGATTG/ AATCCAACCTGCATATAAACCAGC	2 3	0,6	162/78,3	511/77,4	1,68 (0,04)	0,9995
<i>ToFZY4</i>	TCGATTCTGTTCTTCTTGCTACT/ CTGATAGTCCTTCTTGTGAAA	2 3	0,2	165/78,6	435/80,00	1,61 (0,04)	0,9990
<i>ToFZY5</i>	GGCACCGTTGAACTTGTAC/ CCTTCCAATTATTTGGGATTI	2 3	0,6	155/79,7	437/80,4	1,71 (0,03)	0,9976
<i>ToFZY6</i>	CCAGAAGAAGGACCATTIGC/ TACCATTCCACCACACACATC	2 3	0,2	151/78,9	237/79,6	1,84 (0,02)	0,9992

* Se subrayan los nucleótidos dentro de los primeros 7 posiciones del extremo 3' que discriminan a un mínimo de tres genes parálogos. ** Media de las eficiencias de amplificación calculadas con 33 muestras de ADNc; en paréntesis se muestra la desviación estándar. *** Coeficiente R² de la recta patrón obtenida en las representaciones de las variables cantidad de amplicón *versus* Cq, dentro de un rango de 10 a 10⁶ moléculas de ADN.

Como se muestra en la tabla 5, en todos los casos los amplicones obtenidos usando ADNg o ADNc se diferencian con facilidad por sus tamaños. La distinción por valores de Tm resulta comprometida en el caso de los cebadores *ToFZY2* donde la diferencia es de tan sólo 0,5°C, por lo que en este caso las reacciones de RT-qPCR a tiempo real fueron seguidas del análisis mediante electroforesis de un conjunto de muestras aleatorias.

La efectividad de cada pareja de cebadores para discriminar las secuencias parálogas de la familia multigénica *ToFZY* fue verificada mediante RT-PCR a tiempo real, usando como molde una mezcla de las 33 muestras de ADNc obtenidas a partir de las muestras biológicas descritas en el apartado 3.3.1 de la sección de Materiales y Métodos. El perfil de fusión del resultado de la amplificación presentó un único pico, y el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos mostró una única banda (Figura 19) con el tamaño esperado para cada pareja de cebadores cuando el molde es ADNc (Tabla 5). La secuenciación de los productos de la amplificación reveló en

cada caso la presencia de un único amplicón, que correspondía al miembro de la familia *ToFZY* en el que se había basado el diseño de los cebadores. Otra prueba contundente de la capacidad de los cebadores diseñados para discriminar correctamente a los diferentes miembros de la familia, es el patrón diferencial de expresión que se infirió para cada uno de los genes *ToFZY* usando los mencionados cebadores, y que será descrito en los próximos apartados.

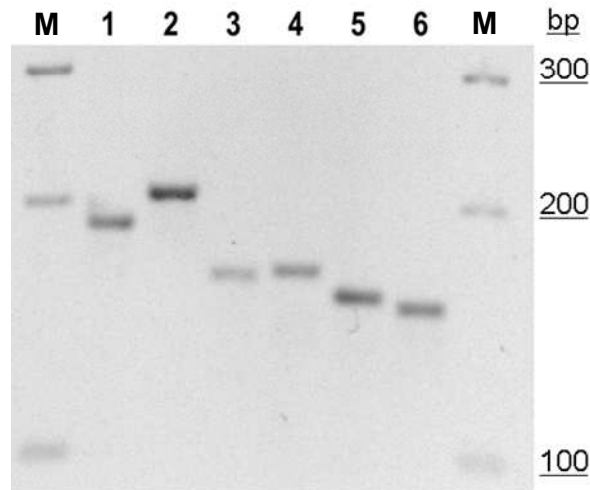


Figura. 19. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones *ToFZY*. M: marcador de 100-bp. Carriles del 1 al 6: resultados obtenidos con los cebadores de amplificación específicos para los genes de *ToFZY1* a *ToFZY6*, respectivamente, usando ADNc como molde.

La determinación de la cantidad absoluta de ARNm, de cada gen *ToFZY* y cada gen de referencia en todas las muestras biológicas, se basó en el empleo de rectas patrón para transformar los valores de Cq registrados en número de moléculas. La cuantificación absoluta permite realizar comparaciones del nivel de ARNm de diferentes genes *ToFZY*, lo cual no es posible con datos de cuantificación relativa. El límite inferior de la cuantificación absoluta fue de 10 copias por cada 6 μ l de ADNc, a juzgar por la linealidad de las diferentes rectas patrón (ver coeficiente de regresión R^2 en la tabla 5). El amplio rango dinámico de los ensayos (de 10 a 10^6 copias por reacción) permitió la comparación directa de muestras con grandes diferencias en el nivel de expresión de los genes *ToFZY*. Aunque la eficiencia de amplificación promedio de los estándares fue sólo ligeramente superior en comparación con las muestra de ADNc, se aplicó un factor de corrección a los valores de Cq de la recta patrón (Øvstebø *et al.*, 2003) antes de realizar el cálculo de las cantidades absolutas.

La normalización de los datos de cuantificación de la expresión génica ha sido un aspecto al que se ha dedicado especial atención en la presente tesis doctoral, debido a la gran heterogeneidad de las muestras biológicas analizadas. El conjunto de 4 genes que previamente se validaron como referencias internas para estudios de expresión génica a lo largo del desarrollo, es decir, los genes *CAC*, *TIP41*, *Expressed* y *SAND* (apartados 4.4.1.4 y 4.4.1.5), fueron nuevamente evaluados durante el análisis de la expresión de los genes *ToFZY*. Según los análisis previos con un conjunto de 27 muestras de ADNc se necesitaban al menos 3 genes de referencias para calcular los factores de normalización de las diferentes muestras. Sin embargo, en el siguiente análisis con 33 nuevas muestras de ADNc los 4 genes de referencia mostraron un mayor nivel de estabilidad, siendo suficientes los genes *SAND* y *TIP41* para la normalización de los datos de expresión en la serie completa del desarrollo ($M=0,31$; $CV=10,7$). Este cambio se debió probablemente a que la síntesis de ADNc en el estudio de la expresión de los genes *ToFZY* a lo largo del desarrollo fue cebada con oligo(dT), en lugar de cebadores de 9 nucleótidos de secuencia aleatoria que se emplearon en los experimentos anteriores sobre normalización (Nolan *et al.*, 2006). Una lección que se extrae de estos resultados es que la idoneidad de los genes de referencia debe ser evaluada en cada contexto experimental.

Los genes de referencia que finalmente se seleccionaron para la normalización de los niveles de expresión génica medidos en órganos particulares fueron: la pareja *SAND/TIP41* en las muestras de raíces ($M = 0,15$; $CV = 5,3\%$), cotiledones ($M = 0,16$; $CV = 5,2\%$) y hojas ($M = 0,25$; $CV = 8,5\%$); y los genes *CAC/SAND* para las muestras de flores ($M = 0,32$; $CV = 10,9\%$) y frutos ($M = 0,43$; $CV = 14,9\%$). En todos los casos, los valores resultantes están dentro del rango propuesto por Hellemans y colaboradores (2007) como aceptables para paneles de muestras heterogéneas ($M \leq 1$; $CV \leq 0,5$) o relativamente homogéneas ($M \leq 0,5$ and $CV \leq 0,25$).

4.4.2.2. Patrón de expresión de genes *ToFZY* individuales en la serie completa del desarrollo

Se eligió la cuantificación relativa para proporcionar una visión global de la expresión de genes *ToFZY* individuales durante todo el proceso de desarrollo del tomate. Para ello, primero se calcularon las cantidades absolutas de los transcritos de los diferentes genes

ToFZY, luego estas cantidades se normalizaron con los valores absolutos obtenidos para los genes de referencias seleccionados y, por último, los resultados se convirtieron en cantidades relativas usando como calibrador la muestra con mayor nivel de expresión (100%). Como se muestra a continuación, los genes *ToFZY* son diferencialmente expresados durante el crecimiento y desarrollo del tomate, exhibiendo una alta especialización tanto espacial como temporal, aunque se observa una superposición parcial de los patrones de expresión.

El gen *ToFZY1* muestra el patrón de expresión más restringido, transcribiéndose preferentemente durante las fases más tempranas del desarrollo de las hojas y las flores (Figura 20). El nivel más alto de ARNm de este gen se detectó en el primordio de la hoja (muestra HP), disminuyendo drásticamente en el primer estadio de la hoja en expansión (muestra HE1) y presentando unos niveles inferiores al límite de detección en los últimos estadios del desarrollo de la hoja. También se detectó un nivel considerable del ARNm de *ToFZY1* en la muestra de flor más joven analizada. En el primordio floral de 1 mm de longitud (muestra F1) la cantidad de dicho ARNm es aproximadamente el 40% del nivel máximo registrado, disminuyendo de manera gradual en las etapas posteriores y manteniéndose bastante constante a lo largo de las últimas etapas del desarrollo de las flores (<6% de F3 a F9).

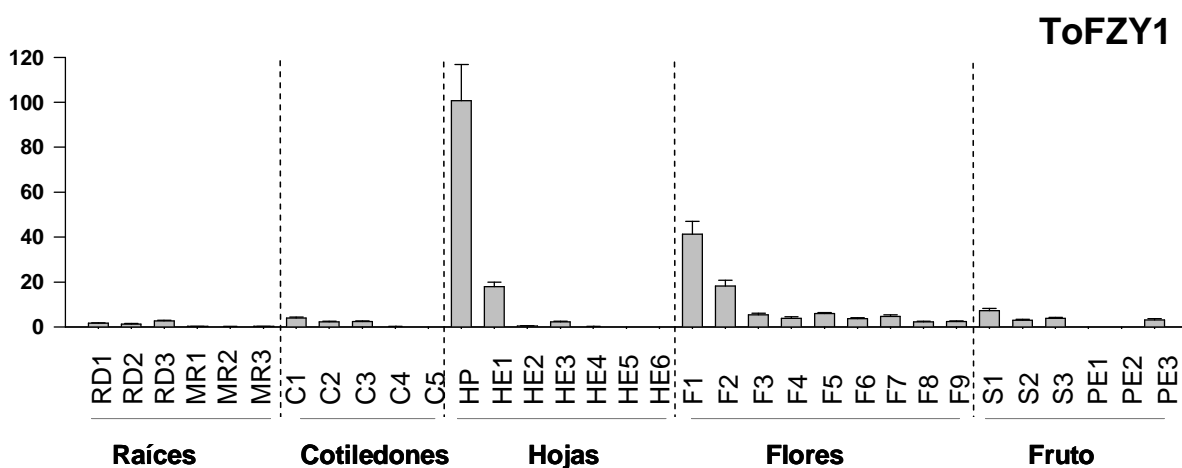


Figura 20. Nivel de expresión relativa del gen *ToFZY1* durante el desarrollo completo de *S. lycopersicum*. Los genes *SAND* y *TIP41* se emplearon para el cálculo de los factores de normalización. La muestra con mayor nivel de expresión se usó como calibrador (100 %). Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas técnicas

El pico de expresión del gen *ToFZY2* se detectó en las muestras de flores (Figura 21). Durante el desarrollo floral el ARNm de *ToFZY2* comenzó a acumularse en las yemas de 4 mm de longitud (muestra F4), alcanzando el nivel máximo justo antes de la antesis (muestra F8) y disminuyendo hasta el 40% del nivel máximo en la flor madura (muestra F9). Los siguientes órganos preferentes para la expresión de *ToFZY2* fueron las raíces y los cotiledones. La expresión relativa de *ToFZY2* en la radícula estuvo entre el 20-27%, cambiando poco durante el periodo de 24 h cubierto por las muestras RD1-RD3, mientras que las raíces maduras mostraron un gradiente de expresión con un mayor nivel relativo de transcrito *ToFZY2* en la porción proximal (\cong 10%) que en la distal (\cong 1%). En las muestras de cotiledones C1-C3, las cuales comprenden el periodo de 76-96 h tras la imbibición de las semillas, la expresión de *ToFZY2* descendió aproximadamente 2,5 veces (\cong desde 18% hasta 7%). Sin embargo, su ARNm aumenta otra vez hasta niveles notables en los cotiledones de plántulas de 6 días (muestra C4; \cong 39%), para 12 días más tarde caer por debajo del límite de detección. En las muestras de hojas la máxima expresión de *ToFZY2* se alcanzó en la etapa de primordio foliar, mostrando un valor relativo de aproximadamente el 16%. En las muestras de frutos la máxima expresión de *ToFZY2* se alcanzó en la etapa de primordio foliar, mostrando un valor relativo de aproximadamente el 16%.

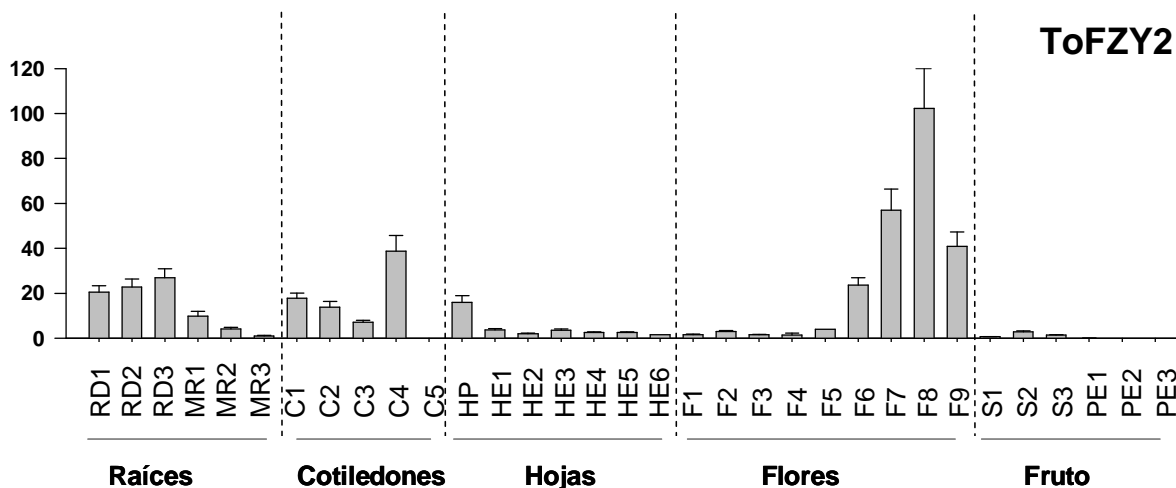


Figura 21. Nivel de expresión relativa del gen *ToFZY2* durante el desarrollo completo de *S. lycopersicum*. Los genes *SAND* y *TIP41* se emplearon para el cálculo de los factores de normalización. La muestra con mayor nivel de expresión se usó como calibrador (100 %). Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas técnicas

Los genes *ToFZY3* y *ToFZY5* presentaron el perfil de expresión más similar de la familia de genes analizada (Figura 22). Ambos genes alcanzaron su nivel más alto de expresión en los cotiledones pero en momentos ligeramente diferentes durante el desarrollo: *ToFZY3* a 96 h (muestra C3) y *ToFZY5* a 80 h (muestra C2) tras la imbibición de las semillas. En relación a las muestras de radícula los dos genes presentaron un patrón de expresión muy similar pero a niveles relativos diferentes. En la radícula temprana, tras 72 h de imbibición de las semillas (muestra RD1), los ARNm de los genes *ToFZY3* y *ToFZY5* representan aproximadamente el 60% y 40% del nivel máximo detectado, respectivamente, y ambos experimentan a continuación un rápido descenso. Sin embargo, en las raíces maduras el gen *ToFZY3* mostró un nivel de expresión significativo (> 9%) y bastante constante a lo largo del eje de la raíz, mientras que la expresión *ToFZY5* fue apenas cuantificables (<1%). Por otro lado, la actividad de estos dos genes durante el desarrollo de la flor fue claramente diferente. La expresión del gen *ToFZY3* fue notable en todas las muestras de flor, alcanzando un nivel relativo de aproximadamente el 54% en la mitad de la serie de desarrollo floral (muestra F5), mientras que el gen *ToFZY5* alcanzó su punto máximo en la muestra de flor más joven con un nivel relativo próximo al 35%, para luego disminuir progresivamente hasta niveles no cuantificables. Por último, en las muestras de hojas el gen *ToFZY3* se expresó a niveles muy bajos (<4%), mientras que las cantidades de ARNm del gen *ToFZY5*, aunque oscilantes, mantuvieron cierta relevancia con un nivel de expresión relativo de aproximadamente el 25% en la última muestras de la serie de hojas.

Los genes *ToFZY4* y *ToFZY5*, a pesar de ser los miembros de la familia de genes *ToFZY* filogenéticamente más cercanos (Figura 15), mostraron unos perfiles de expresión altamente diferenciados (Figura 22). Resulta interesante el hecho de que el ARNm del gen *ToFZY5* fuese indetectable en los frutos de tomate mientras que el gen *ToFZY4* presentó su mayor nivel de expresión en este órgano. La cantidad de ARNm del gen *ToFZY4* aumentó a lo largo de las 3 etapas analizadas del desarrollo del fruto, tanto en semillas como en el pericarpio externo, abarcando un periodo de aproximadamente 30 días. El máximo nivel de expresión de *ToFZY4* se detectó en el pericarpio externo en la etapa de desarrollo en la que el fruto alcanza el color rojo (muestra PE3). El segundo valor más alto de expresión del gen *ToFZY4* fue detectado durante el desarrollo de las flores, concretamente en la yema floral de 2 mm (muestra F2), alcanzando valores relativos del 48%, pero disminuyendo drásticamente en las etapas posteriores. Por último,

los niveles de ARNm de *ToFZY4* se mantuvieron relativamente bajos y constantes (media del 9%) en las muestras de radícula, de cotiledones y en las cinco últimas muestras de hojas en expansión (de EL2 a EL6).

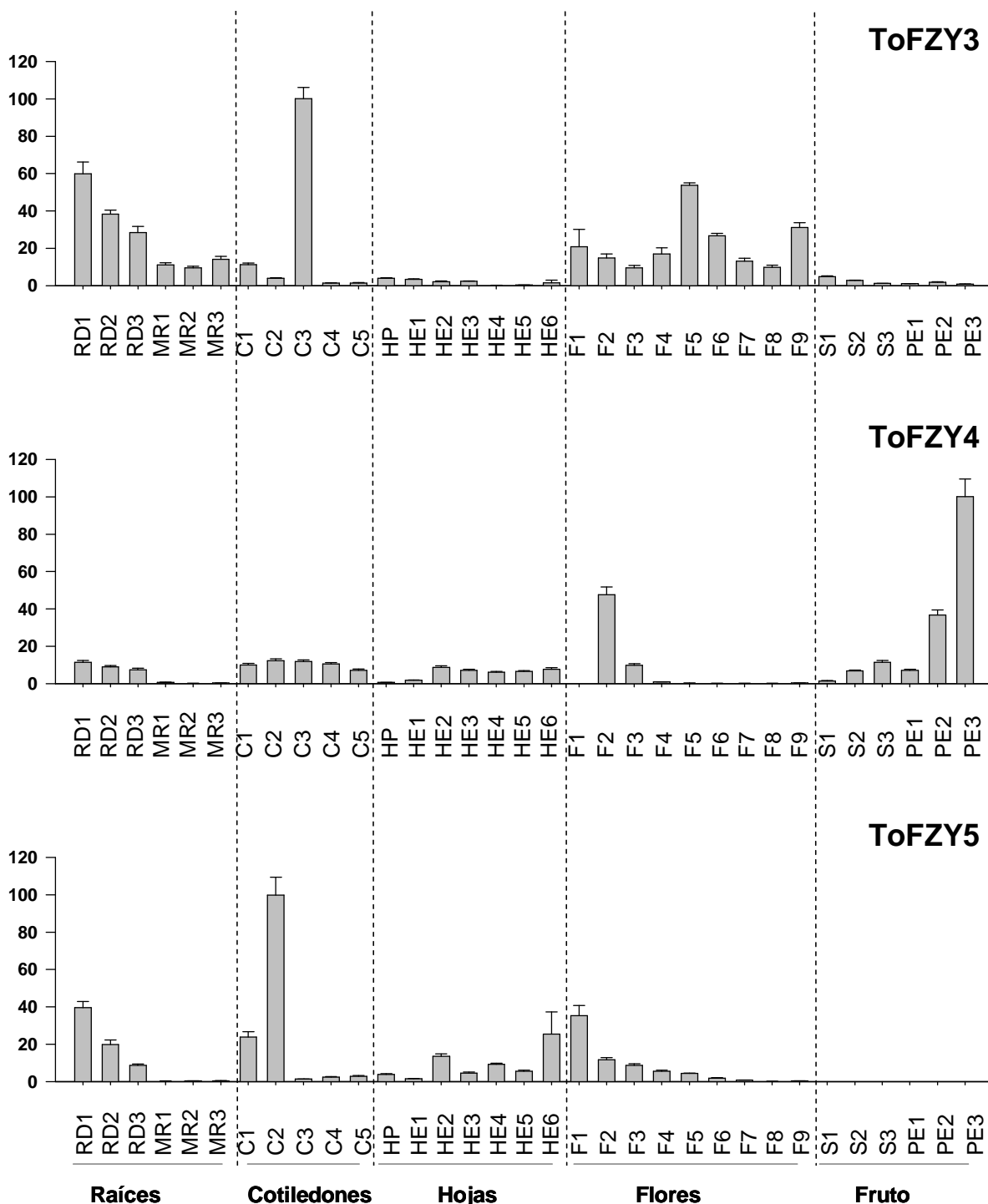


Figura 22. Nivel de expresión relativa de los genes *ToFZY3*, *ToFZY4* y *ToFZY5* durante el desarrollo completo de *S. lycopersicum*. Los genes *SAND* y *TIP41* se emplearon para el cálculo de los factores de normalización. La muestra con mayor nivel de expresión se usó como calibrador (100 %). Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas técnicas

En concordancia con un origen relativamente antiguo (Figura 15), el gen *ToFZY6* mostró el perfil de expresión más generalista durante el desarrollo, en el sentido de que fue detectado en todas las muestras analizadas y siempre por encima del nivel de cuantificación (Figura 23). El mayor nivel de expresión se detectó en las raíces maduras, donde la cantidad relativa de ARNm de *ToFZY6* fue significativamente mayor en la porción distal y proximal (100% y 84%, respectivamente) que en la porción media (56%). Los siguientes órganos preferentes de expresión de *ToFZY6* fueron las semillas y la radícula, alcanzando valores relativos máximos próximos al 57% en semillas de frutos en fase de maduración (muestra S2), y cercanos al 39% en radículas tras 78 horas de imbibición de las semillas (muestra RD2). Por último, destacar que la expresión de *ToFZY6* fue notable durante el desarrollo de las flores, especialmente en los extremos de la serie de muestras donde se registraron valores relativos cercanos al 18% (muestra HP)

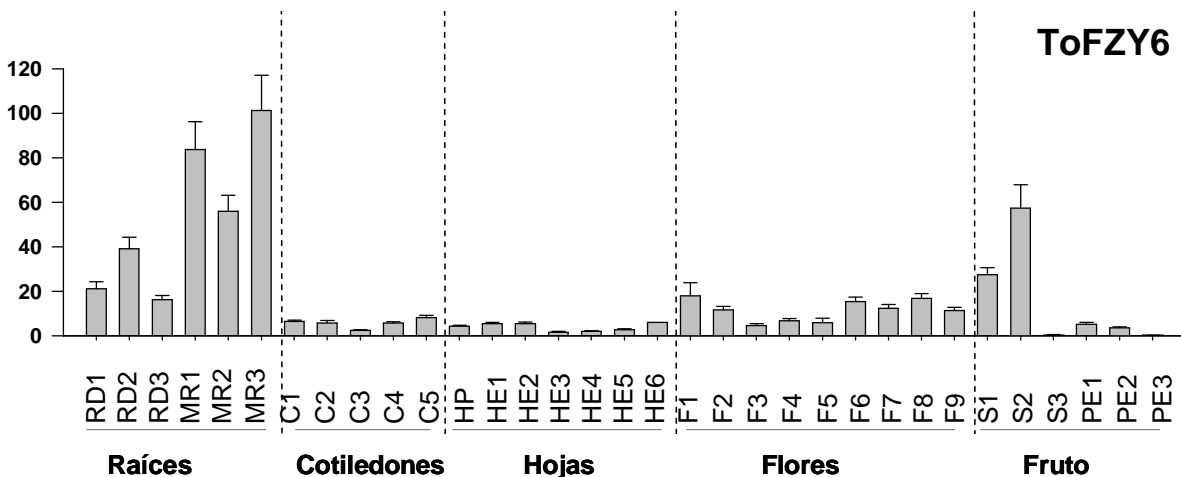


Figura 23. Nivel de expresión relativa del gene *ToFZY6* durante el desarrollo completo de *S. lycopersicum*. Los genes *SAND* y *TIP41* se emplearon para el cálculo de los factores de normalización. La muestra con mayor nivel de expresión se usó como calibrador (100 %). Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas técnicas

4.4.2.3. Patrón de expresión de la familia de genes *ToFZY* durante el desarrollo de órganos particulares

La determinación del número absoluto de moléculas de ARNm permite una comparación directa de los niveles de expresión de diferentes genes *ToFZY*, lo cual facilita la identificación de los miembros de la familia multigénica que se expresan predominantemente en una determinada coordenada espacio-temporal del desarrollo.

Además, estas cantidades absolutas pueden ser sumadas para proporcionar una medida de la cantidad global de transcritos *ToFZY* y una imagen de su evolución durante el proceso del desarrollo. Esta aproximación asume que cada gen *ToFZY* particular contribuye de manera aditiva a un carácter cuantitativo, a saber, los niveles de IAA libre sintetizados a través de la vía de la TAM y sus consecuencias en el desarrollo de las plantas de tomate.

RAÍCES

El número total de copias de ARNm de los genes *ToFZY* en la radícula se mantuvo prácticamente sin cambios durante el período de 24 h abarcado por las muestras RD1-RD3 (Figura 24). Dicha cantidad fue 2 o 4 veces superior a la que fue medida en la región proximal (RM1) o en las regiones media/distal (RM2/RM3) de raíces maduras, respectivamente.

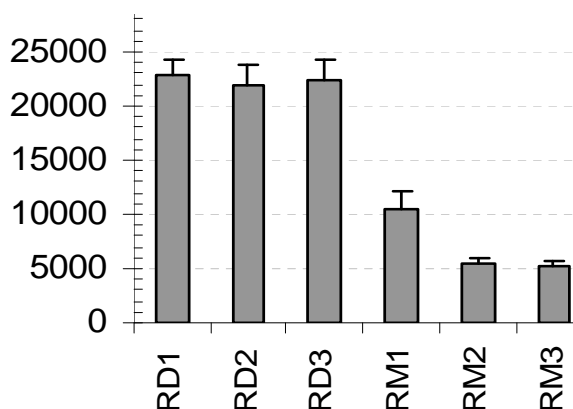


Figura 24. Nivel de expresión absoluta de los genes *ToFZY* en raíces. Se representa el sumatorio de la cantidad absoluta de ARNm de los seis genes *ToFZY*. Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *SAND* y *TIP41*).

En las muestras de radícula, el nivel de ARNm de *ToFZY2* superó ampliamente al de cualquier otro gene *ToFZY*, representando entre el 60-80% del conjunto de transcritos *ToFZY* (Figura 25A). En la región proximal de las raíces maduras el gen *ToFZY2* continuó siendo el gen expresado con mayor intensidad (Figura 25B), llegando a representar aproximadamente el 64% de los transcritos *ToFZY*, seguido por el gen *ToFZY6* (\cong 29%). La importancia cuantitativa del ARNm de *ToFZY6* fue aumentando progresivamente en dirección a la porción distal de la raíz madura, donde alcanzó un nivel equivalente al 72% de las transcritos totales de los genes de esta familia (Figura 25B).

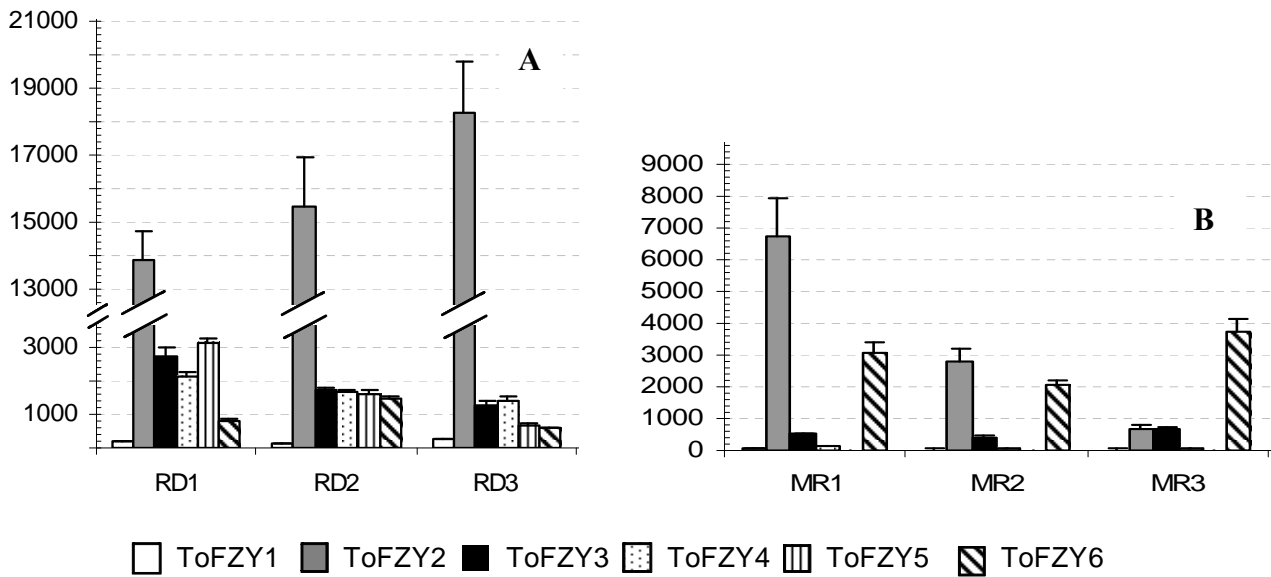


Figura 25. Nivel de expresión absoluta de los genes *ToFZY* en raíces. Se representa la cantidad absoluta de ARNm de cada gen *ToFZY* en muestras de radícula (A) y de raíces maduras (B). Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *SAND* y *TIP41*).

COTILEDONES Y HOJAS

El número total de moléculas de ARNm de los genes *ToFZY* en los cotiledones fue relativamente alto, comparable al medido en las muestras de radícula, al menos durante los primeros 6 días posteriores a la germinación (muestras C1-C4; Figura 26A). La acumulación de transcritos *ToFZY* en los cotiledones en crecimiento siguió una distribución bimodal, más comprimida que la observada en flores debido a la menor regularidad en los tiempos de muestreo. El gen *ToFZY2* fue el que contribuyó principalmente al conjunto de ARNm *ToFZY* en cotiledones, seguido por *ToFZY5* y *ToFZY4*, aunque el gen *ToFZY3* destacó en la muestra C3 con una participación que alcanzó el 38% (Figura 26B).

Durante el desarrollo de la hoja, el conjunto de transcritos de *ToFZY* mostró una distribución de tipo hipérbole (Figura 26A). La magnitud del máximo detectado en los primordios foliares (muestra HP) fue muy similar al nivel detectado en la radícula en crecimiento, y dicho pico se sustentó por cantidades similares de transcritos de los genes *ToFZY1* y *ToFZY2* (Figura 26C). Durante la etapa de expansión de la hoja (muestras HE), el conjunto de transcritos *ToFZY* se mantuvo en un nivel 4-5 veces inferior al detectado en primordios foliares (Figura 26A) y en gran medida constante a pesar de la contribución variable de diferentes genes, principalmente *ToFZY2*, 4 y 5 (Figura 23C).

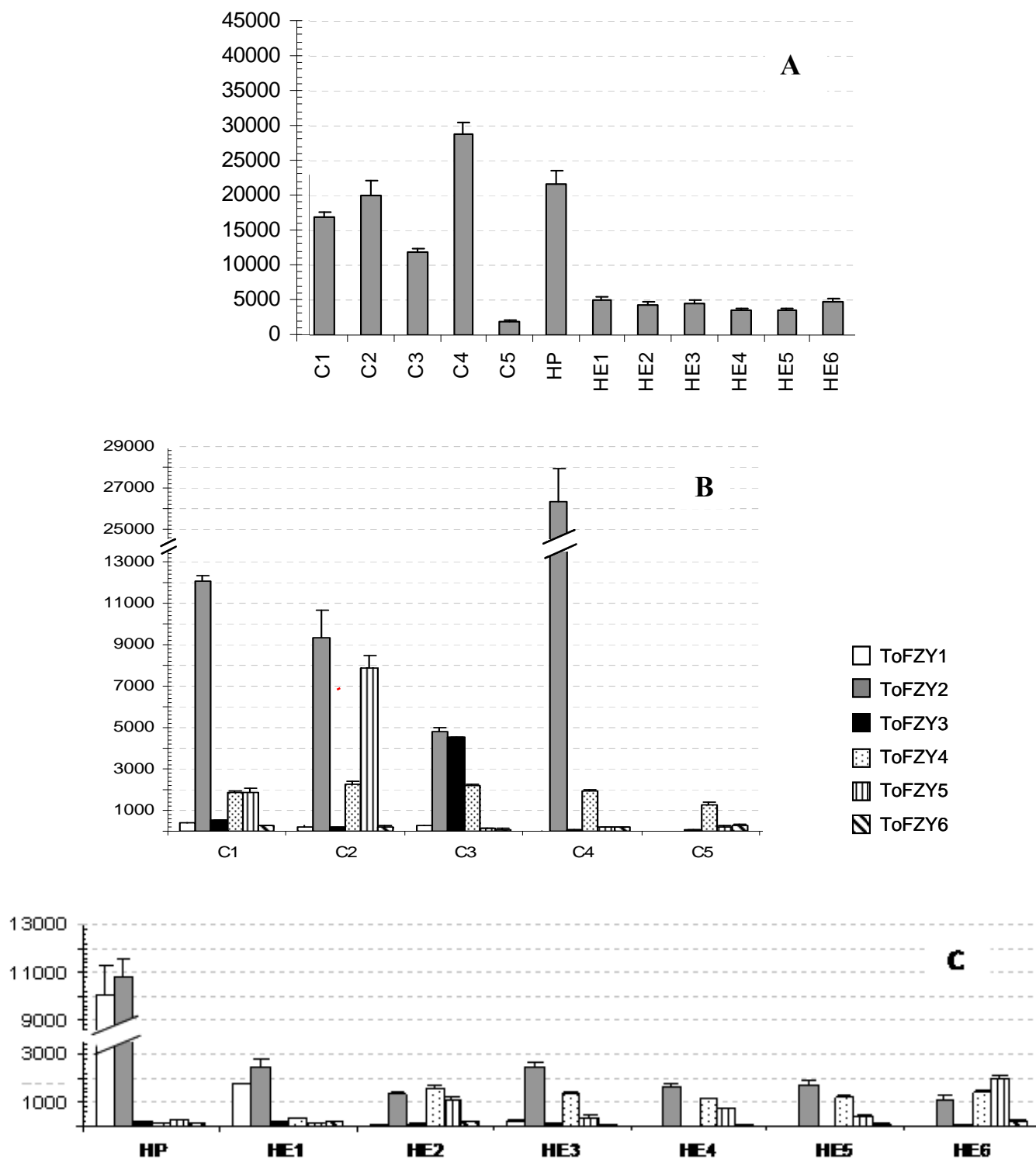


Figura 26. Nivel de expresión absoluta de los genes *ToFZY* en hojas y cotiledones. (A) Sumatorio de la cantidad absoluta de ARNm de los seis genes *ToFZY*. (B) y (C) Cantidad absoluta de ARNm de cada gene *ToFZY* en muestras de cotiledones y de hojas, respectivamente. Las cantidades representadas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *SAND* y *TIP41*).

FLORES

La progresión del nivel total de ARNm de genes *ToFZY* durante la ontogenia de las flores incluyó dos máximos (Figura 27), uno en la yema floral de 2 mm (muestra F2) y el siguiente en la yema de 8 mm (muestra F8). En el primer pico la expresión del gen *ToFZY4* fue el principal contribuyente al conjunto de transcritos *ToFZY*, precedido por una activación transitoria de los genes *ToFZY1* y *ToFZY5* (Figura 28). El segundo pico se inicia en la yema floral de 5 mm (muestra F5 en la figura 27), como consecuencia de la activación de los genes *ToFZY2* y *ToFZY3* (Figura 28). Poco después el gen *ToFZY2* toma el protagonismo en cuanto a la contribución al número total de ARNm *ToFZY* en las muestras de flor, que alcanza su máximo justo antes de la antesis o apertura de la flor, representando el nivel más alto de expresión detectado en el presente estudio. En la flor madura (muestra F9) el conjunto de ARNm *ToFZY* se mantuvo en un nivel relativamente alto y esencialmente derivado de la transcripción del gen *ToFZY2* ($\cong 92,8\%$), tal y como sucedió en las tres etapas anteriores de muestras de flor analizadas (Figura 28).

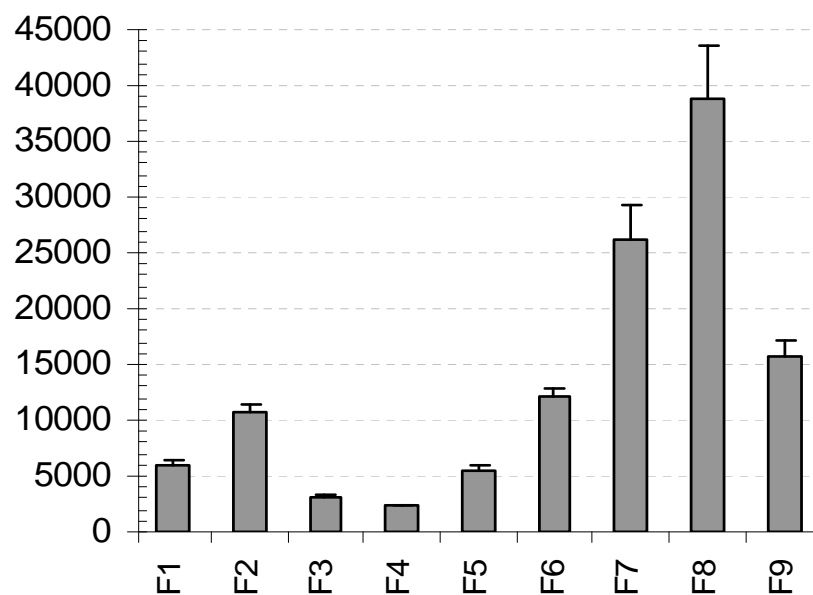


Figura 27. Nivel de expresión absoluta del conjunto de genes *ToFZY* en flores. Se representa el sumatorio de la cantidad absoluta de ARNm de los seis genes *ToFZY*. Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *CAC* y *SAND*).

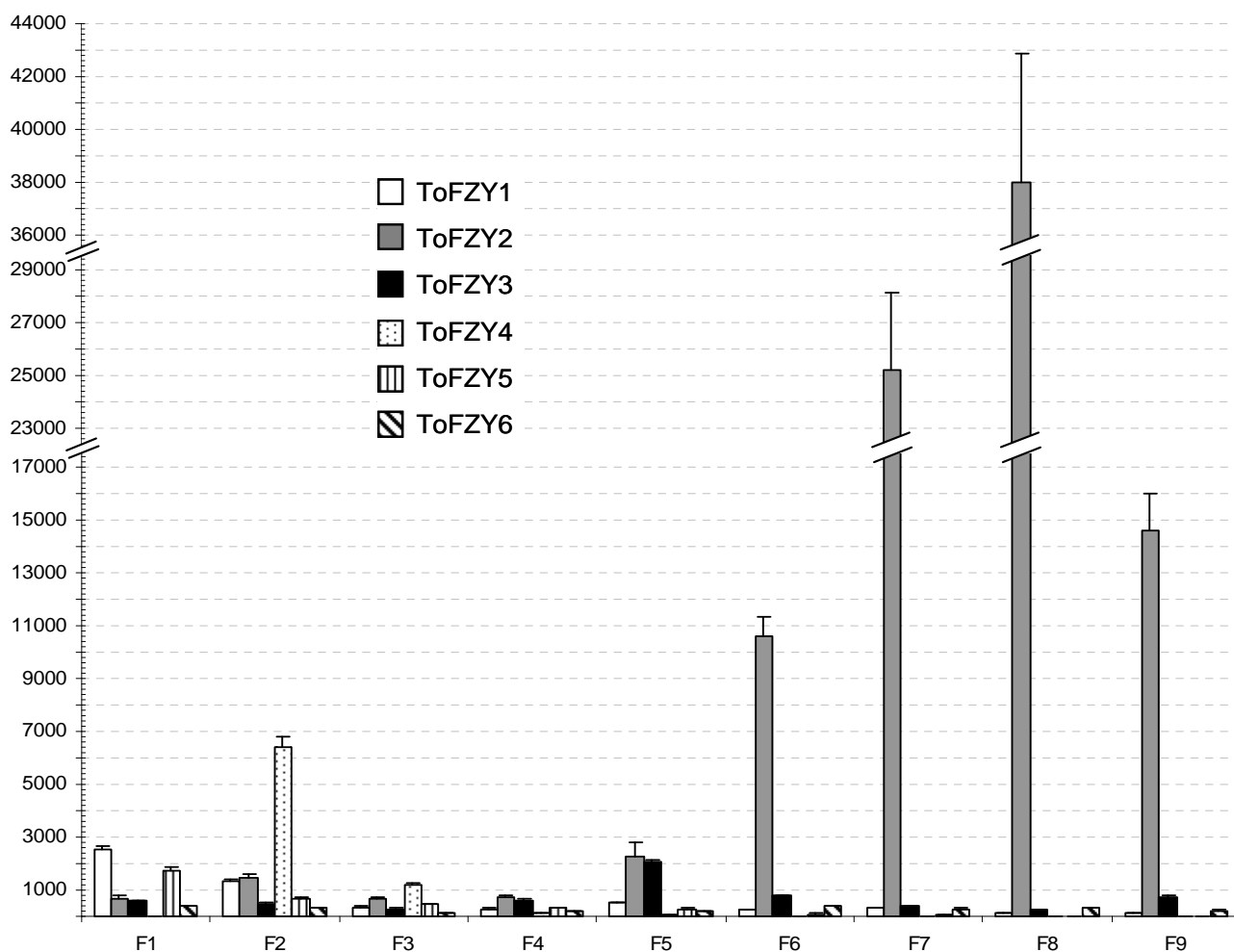
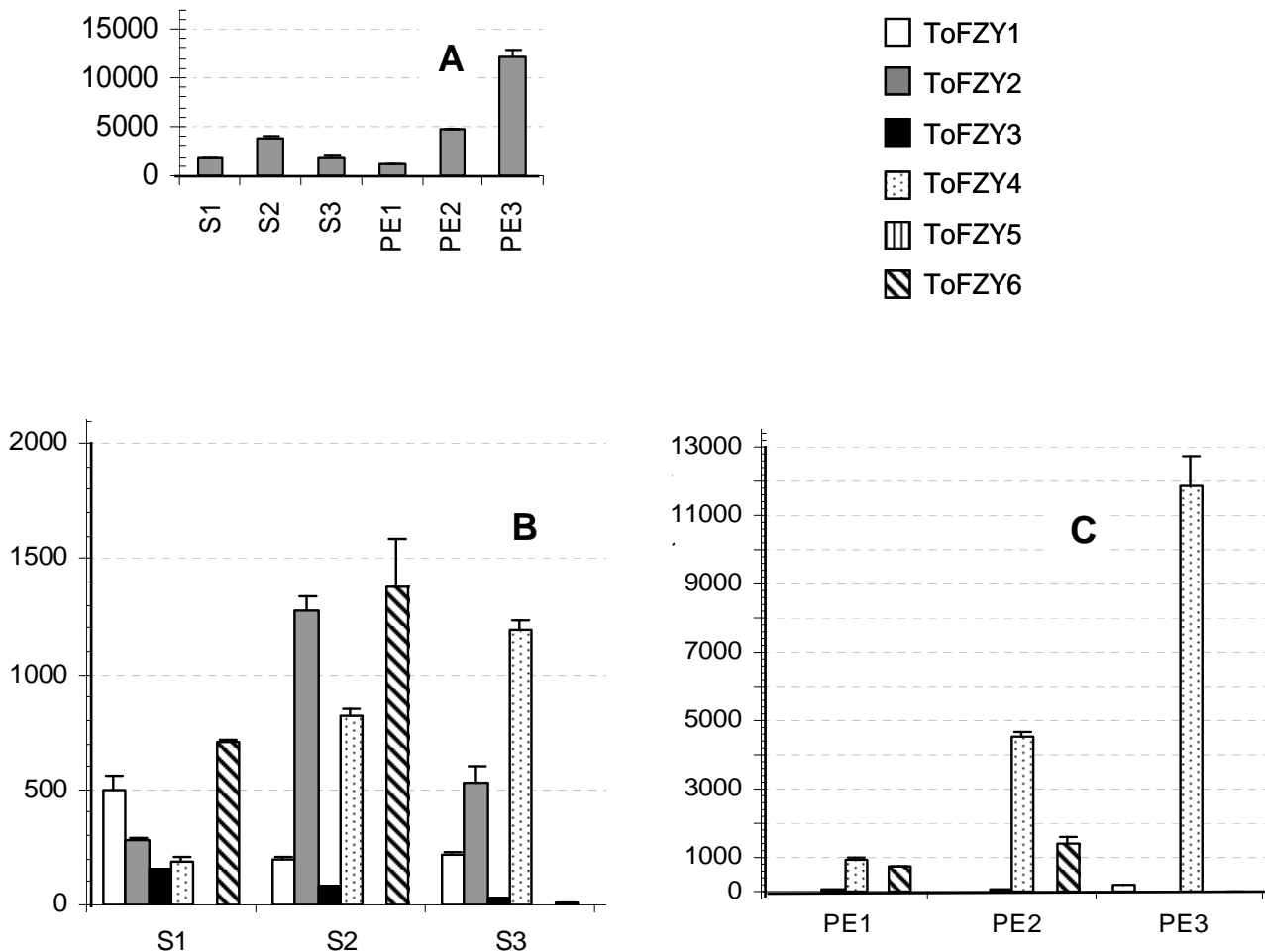


Figura 28. Nivel de expresión absoluta de los diferentes genes *ToFZY* en flores. Se representa la cantidad absoluta de ARNm de cada gen *ToFZY* por separado. Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *CAC* y *SAND*).

FRUTOS

En relación con el desarrollo del fruto, las muestras de semillas y de pericarpio externo mostraron tendencias diferentes en cuanto al nivel global de expresión de los genes *ToFZY* (Figura 29A). Por un lado, en las muestras de semillas los niveles de ARNm *ToFZY* fueron los más bajos observados en este estudio, mientras que en el pericarpio externo alcanzan un valor moderado, concretamente en frutos en la fase rojo maduro (muestra PE3). Por otro lado, en las semillas el conjunto de ARNm *ToFZY* aumentó

durante la transición de fruto verde inmaduro de 1,3 cm de diámetro (muestra S1) a la fase de maduración (“*breaker*”; muestra S2), volviendo luego a su nivel inicial en la fase de fruto rojo maduro. Sin embargo, en las muestras de pericarpo externo el número total de transcritos *ToFZY* aumentó gradualmente durante el período de 30 días que comprendió las muestras PE1-PE3 (Figura 29A). Todos los genes *ToFZY*, con la excepción de *ToFZY5*, contribuyeron al conjunto de transcritos *ToFZY* en las semillas, especialmente los genes *ToFZY2*, 4 y 6 (Figura 29B). Sin embargo, en el pericarpo externo la mayoría de los ARNm *ToFZY* detectados (entre el 84-98%) se originaron de la actividad transcripcional del gen *ToFZY4* (Figura 29C).



4.5. Niveles de ARNm de los genes *YUC* en *Arabidopsis thaliana*

La comparación del patrón de expresión de los genes *ToFZY* a lo largo del desarrollo de tomate, inferidos en el presente estudio, con la información disponible acerca de la expresión de los genes homólogos en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, podría suministrar pistas valiosas sobre la importancia de estos genes en tomate, dada la gran cantidad de análisis funcionales que han sido realizados en *Arabidopsis*. Sin embargo, los datos sobre la expresión de los genes *YUC* se encuentran dispersos en la literatura científica, lo que dificulta su unificación para obtener una visión integrada. En algunos casos, dichos datos se han obtenido con técnicas que son en gran medida de tipo cualitativo como la detección de ARNm mediante hibridación *in situ*, o el análisis histoquímico de plantas transgénicas en las que un gen reportero ha sido fusionado a la región promotora de un determinado gen *YUC* (Cheng *et al.*, 2006 y 2007; Cecchetti *et al.*, 2008). En otros casos, los datos sobre la expresión de los genes *YUC* descritos en la bibliografía comprenden un número reducido de muestra y son el resultado de análisis semi-cuantitativos mediante RT-PCR, que muestran una inadecuada normalización dando lugar a resultados poco fiables y en ocasiones contradictorios (Woodward *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007).

Por los motivos expuestos, se decidió utilizar la herramienta informática *GENEVESTIGATOR* (Zimmermann *et al.*, 2004) para extraer de las bases de datos información sobre la expresión de los genes *YUC* en diferentes órganos y estados de desarrollo, basada en el análisis con micromatrices de ADN de la marca comercial *Affymetrix*. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 30, y serán comparados con los resultados obtenidos en esta tesis sobre los genes *ToFZY* en la sección de discusión. Se debe tener en cuenta que los datos de expresión en la figura 30, para cada tipo de muestra biológica y para cada gen *YUC*, son el promedio de un conjunto de análisis independientes realizados por diferentes grupos de investigación. Antes de calcular el valor promedio, la señal de fluorescencia medida para cada sonda *YUC* ha sido normalizada con la señal promedio del conjunto de sondas de la micromatriz.

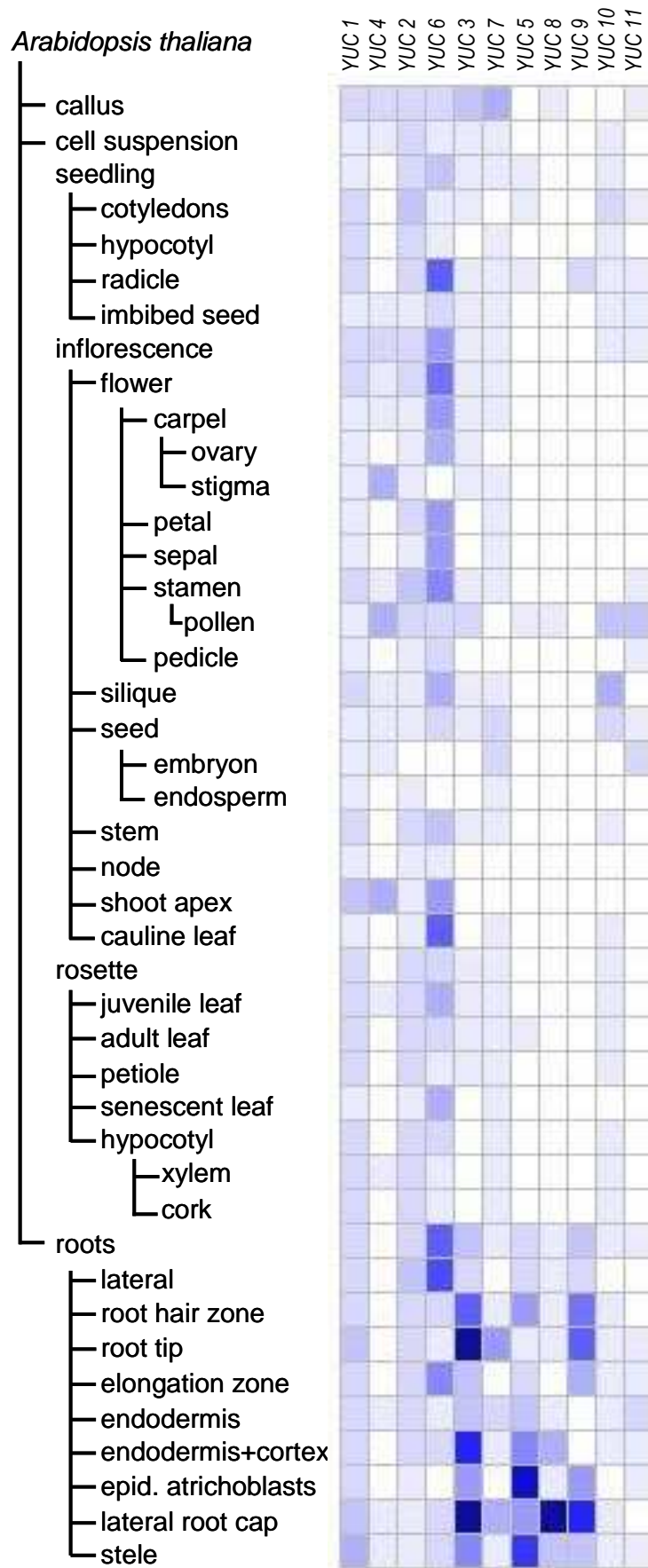


Figura 30. Patrón de expresión de los genes *YUC* según el análisis con micromatrices de ADN. Los genes se han ordenado según las relaciones filogenéticas mostradas en la figura 15.

4.6. Detección de IAA en muestras de tomate basada en tinciones histoquímicas de la actividad beta-glucuronidasa

Los niveles endógenos de auxina libre son muy bajos, lo que dificulta su medida directa. Para poder cuantificar las auxinas es necesario reunir cantidades considerables de tejido, lo cual resulta complicado para órganos específicos de tamaño reducido. Una alternativa muy recurrida para identificar los patrones de distribución de auxinas es la utilización de herramientas genéticas. En este sentido, y centrado en la especie vegetal de interés en este estudio, Mazzucato y colaboradores (2006) han descrito la obtención de una planta de tomate transgénica que porta el gen reportero *GUS* fusionado a un promotor inducible por IAA, con la intención de monitorizar cambios en los niveles de esta hormona. Aunque la correspondiente publicación incluye algunas fotografías interesantes desde la perspectiva de la presente tesis, no se aporta información precisa sobre el estado de desarrollo de la estructura vegetal sometida a revelado de la actividad beta-glucuronidasa, y se omiten ciertos órganos como es el caso de los cotiledones. Por esta razón, y tras conseguir semillas de la mencionada planta transgénica, se procedió a realizar ensayos de tinción de ciertas muestras de cotiledones, hojas y flores (Figura 31).

En la zona apical de las plántulas de tomate se detectó una alta actividad del gen reportero, concretamente en la base del primer brote foliar en un estado de desarrollo correspondiente a la muestra de hoja que se ha denominado HP (≤ 1 mm; Figura 31A), y que coincide con la región donde se están generando los primordios foliares más jóvenes. Además, se observa una alta actividad beta-glucuronidasa en la vena media y en la zona axilar de los cotiledones, en un estado de crecimiento equivalente a las muestras C2 (Figura 31A). La intensa tinción que se observa en la zona de confluencia de cotiledones y primordios foliares podría ser resultado del transporte de IAA desde dichas estructuras en dirección basipétala. Observado con más detalle (Figura 31B), el primordio foliar correspondiente a la muestra HP exhibe una tinción notable en la región más apical y en la vena media. Por el contrario, no se detectó actividad glucuronidasa en las muestras de hojas en expansión (HE), aunque Mazzucato y colaboradores (2006) describen cierta acumulación de señal en el tejido vascular de muestras equivalentes.

Durante la serie completa del desarrollo floral sólo se detectó actividad beta-glucuronidasa en las últimas fases del desarrollo de la flor. En la muestra F8, es decir, en

el estado de pre-antesis, se detectó una fuerte tinción en el estigma, mientras que en los sacos polínicos fue considerablemente más tenue (Figura 31C). Esta situación se invirtió en las muestra de flor madura (muestra F9; figura 31D).

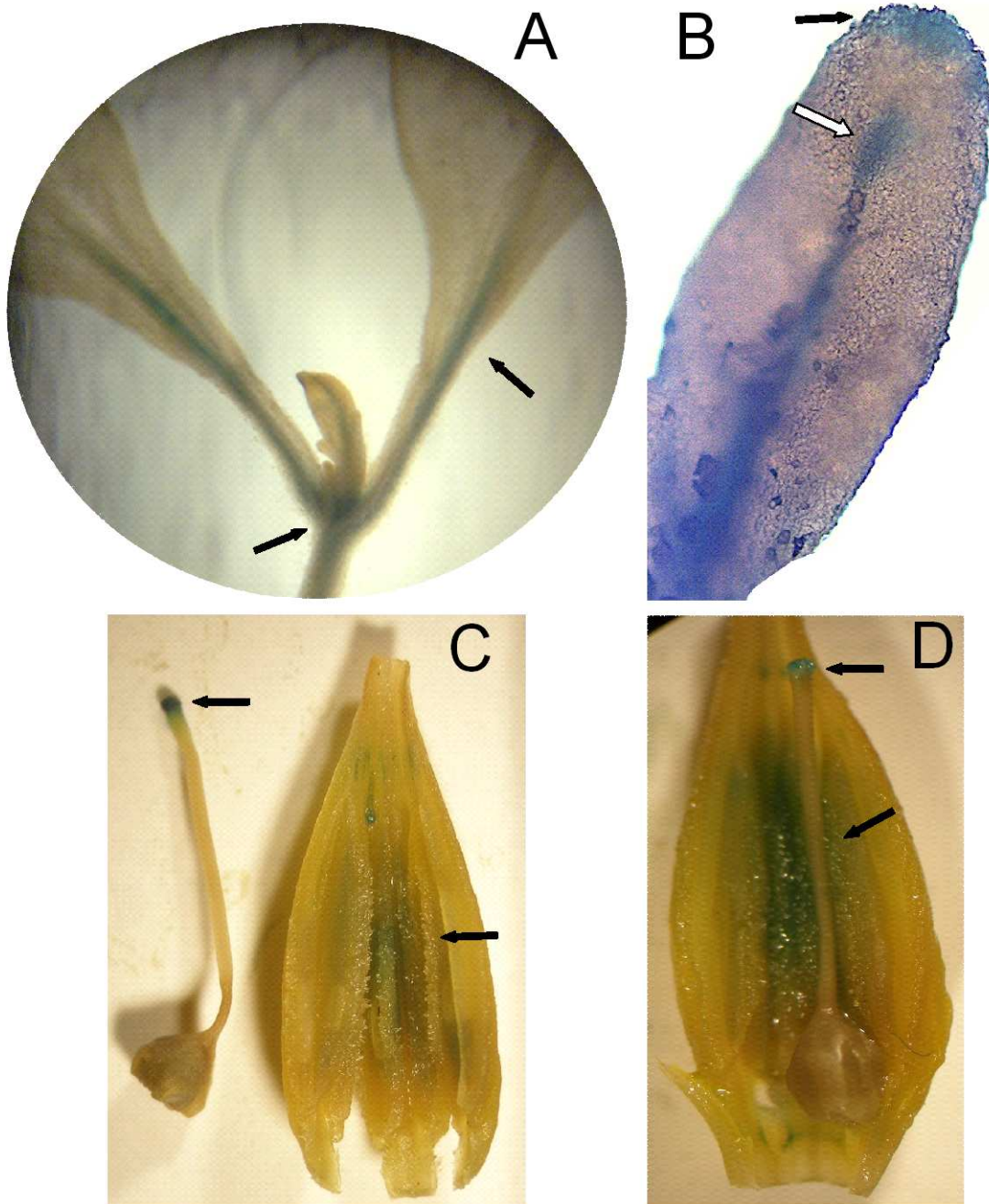


Figura 31. Localización de la actividad glucuronidasa en el brote apical, cotiledones y en los últimos estadios del desarrollo de la flor, en líneas transgénicas de tomate p5::GUS. (A) Brote apical y cotiledones donde se observa una fuerte tinción en la base de brote (flecha inferior) y en la vena media del cotiledón (flecha superior). (B) El primer primordio foliar donde se observa una importante actividad del gen reportero tanto en el ápice (flecha superior) como a lo largo de la vena media (flecha inferior). (C y D) Últimas fases del desarrollo de la flor (muestras F8 y F9, respectivamente) donde se detecta tinción en el estigma (flecha superior) y en el cono de estambres (flecha inferior).

4.7. Relación del IAA y la expresión de los genes *ToFZY* con procesos de interacción planta-bacteria

4.7.1. Estímulo de la infección bacteriana ejercida por IAA exógeno en el sistema tomate-*Pseudomonas*

El efecto de la co-infiltración de IAA y de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000) se evaluó en dos líneas de la variedad Río Grande (RG) de tomate, la línea RG-*Pto*S y la línea RG-*Pto*R, caracterizadas por un fenotipo sensible a la infección de la bacteria y un fenotipo resistente, respectivamente (Figura 32; primera columna). El examen de los resultados mostrados en la figura 32 revela claramente que la presencia de IAA exógeno incrementa los síntomas de la infección por *Pst*DC3000 en la línea de tomate RG-*Pto*S. Sin embargo, el progreso de la infección bacteriana en la variedad de tomate resistente no fue afectado, aparentemente, por ninguna de las concentraciones de IAA ensayadas.

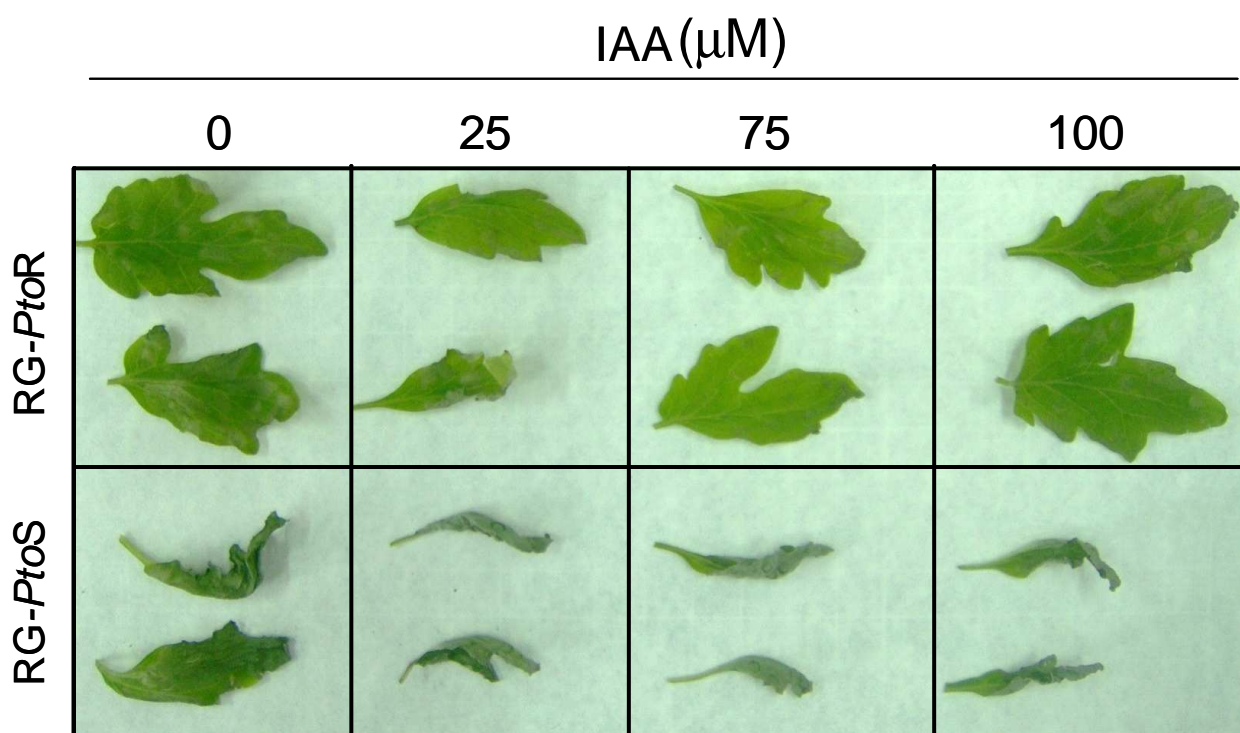


Figura 32. Efecto de la aplicación de IAA a diferentes concentraciones sobre el éxito de la infección bacteriana. Se co-infiltró *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000) y IAA en dos líneas de tomate de la variedad Río Grande. En la fila superior se muestran los resultados obtenidos con la línea resistente (RG-*Pto*R) y en la fila inferior con la línea sensible (RG-*Pto*S). Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de la infección.

4.7.2. Monitorización del proceso de infección bacteriana

Con la finalidad de tener una medida del progreso de la infección bacteriana en plantas de tomate, que pudiese ser relacionado con la síntesis de IAA por la vía de la TAM, se cuantificó la presencia del gen bacteriano *hrpZ* exactamente en las mismas muestras biológicas que fueron empleadas en el análisis de la expresión de los genes *ToFZY*. En la figura 33 se muestra el seguimiento del proceso de infección por *PstDC3000* en las líneas RG-*PtoS* y RG-*PtoR*, en forma de cuantificación relativa del genoma bacteriano. Aunque las bacterias consiguen multiplicarse en las dos líneas de tomate, la cinética del proceso fue claramente diferente. En la línea RG-*PtoS* la cantidad de bacterias se multiplicó unas 1.800 veces en el intervalo de tiempo comprendido entre las 3 y 48 horas posteriores a la infección (hpi). Por el contrario, en la línea RG-*PtoR* y en el mismo intervalo de tiempo la cantidad de bacterias que se detectó en las muestras de hojas infectadas aumentó unas 30 veces. En todos los tiempos examinados, con la única excepción de las muestras tomadas a 3 hpi, las diferencias entre la variedad sensible y la resistente, en lo que se refiere al número de bacterias detectadas, fueron altamente significativas (valor $p < 0,001$), llegando a alcanzar un valor de 60 veces en los tiempos 24 y 48 hpi. Curiosamente, a 6 hpi la cantidad de bacterias en la variedad sensible fue unas dos veces inferior a las cuantificadas en la variedad resistente.

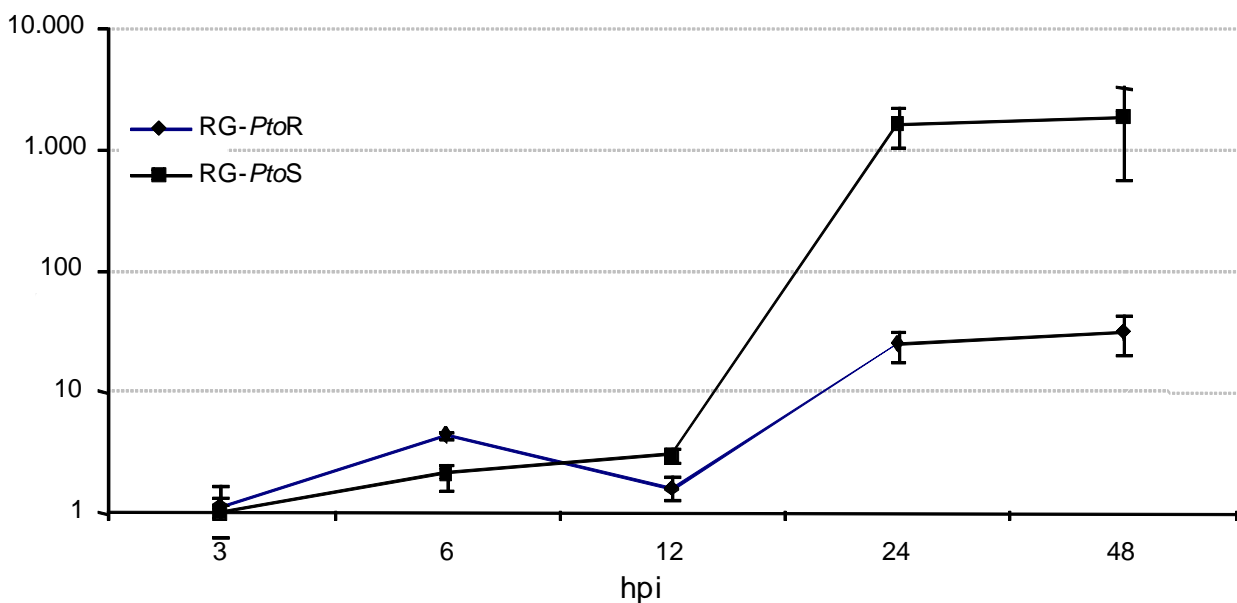


Figura 33. Cuantificación relativa del genoma bacteriano en muestras de hojas de tomate infectadas con *PstDC3000*. Se muestra la evolución de la cantidad relativa del gen bacteriano *HrpZ*, en escala logarítmica, en función de las horas transcurridas tras la infección. La muestra tomada a 3 horas post-infección (hpi) se usó como calibrador (valor 1). Las barras de error indican la desviación estándar de los valores obtenidos con tres repeticiones del experimento.

4.7.3. Cambios en el patrón de expresión de genes *ToFZY* inducidos por *Pseudomonas*

4.7.3.1. Normalización de la cuantificación de ARNm

Se seleccionaron 5 genes candidatos a referencias internas para normalizar la cuantificación de los ARNm *ToFZY* durante los estudios de la interacción tomate-*Pseudomonas*. Dicho conjunto de genes incluyó a *TBP* y a los cuatro genes integrantes de la “caja de herramientas de normalización” para estudios centrados en el desarrollo definida en el apartado 4.4.1.5, es decir, los genes *CAC*, *TIP41*, “*Expressed*” y *SAND*. Las tres aproximaciones estadísticas para evaluar la estabilidad de expresión de los candidatos se aplicaron sobre los valores de Cq registrados para cada uno de los 5 genes, a partir de un panel de 60 muestras de ADNc que se comentan en el siguiente apartado. Tras el proceso de evaluación, los genes *CAC*, “*Expressed*” y *TIP41* fueron los que mostraron un mayor nivel de estabilidad ($M=0,545$; $CV=0,212$). Los valores de estabilidad obtenidos se encuentran dentro del rango propuesto por Hellemans y colaboradores (2007) como aceptable para paneles de muestras heterogéneas ($M \leq 1$; $CV \leq 0,5$). El análisis de la variación de factores de normalización consecutivos ($V_{n/n+1}$) reveló que los tres genes mencionados son suficientes para calcular un NF robusto ($V_{3/4}=0,139$).

4.7.3.2. Niveles de ARNm de los genes *ToFZY* durante el proceso de infección bacteriana

El número absoluto de moléculas de ARNm de cada uno de los 6 genes *ToFZY* fue calculado para un panel de 60 muestras de ADNc, que incluyeron las siguientes variables: 2 líneas de tomate (RG-*PtoS* y RG-*PtoR*), presencia y ausencia de bacterias (*PstDC3000*), 5 tiempos tras la infección (3, 6, 12, 24 y 48 hpi) y tres réplicas biológicas. Estos valores de expresión absoluta se normalizaron con la media geométrica de las cantidades absolutas de ARNm de los genes de referencia *CAC*, “*Expressed*” y *Tip41*. El análisis de la significación estadística pertinente se basó en las tres réplicas biológicas de cada experimento. El estado de desarrollo de las hojas infectadas equivale al de las muestras de hojas en expansión HE4-HE5 analizadas en la variedad ciliegia de *Solanum lycopersicum* (Figura 11).

El primer análisis que se realizó fue la comparación de los niveles de ARNm de los genes *ToFZY* entre las líneas RG-*PtoS* y RG-*PtoR*, en ausencia de bacterias y en cada uno de los tiempos del experimento. En este sentido, los genes *ToFZY3* y *ToFZY5* fueron descartados para posteriores análisis, debido a las importantes variaciones observadas (datos no mostrados), tanto dentro de cada línea como entre líneas de un tiempo experimental al siguiente, lo que restaba coherencia al estudio. Una posible explicación en el caso del gen *ToFZY3* es el bajo nivel de expresión detectado, que estuvo muy próximo al límite de cuantificación del ensayo, tal y como ocurrió con las muestras equivalentes de hojas en expansión de la variedad ciliegia (muestras HE4-HE5 en la figura 26C). En el caso del gen *ToFZY5*, la magnitud y la dirección de los cambios sufrió importantes oscilaciones de una manera similar a lo que se observó en las hojas en desarrollo de la variedad ciliegia (Figura 26C). En cuanto a los genes *ToFZY1*, *ToFZY2*, *ToFZY4* y *ToFZY6*, en presencia de solamente el vehículo y en cada uno de los tiempos experimentales, no se detectaron diferencias significativas entre las líneas sensible y resistente en lo que respecta a la cantidad absoluta de los ARNm correspondientes (Figuras 34 a 37). Por lo tanto, en lo que se refiere a la expresión de estos genes, se puede afirmar que cualquier diferencia detectada entre las líneas sensible y resistente durante el proceso de infección, puede ser imputada a la presencia de las bacterias y a diferencias de genotipo entre dichas líneas cuasi-isogénicas de la variedad RG de tomate. Tentativamente, esas diferencias podrán estar relacionadas con el fenotipo de sensibilidad/resistencia a la infección bacteriana.

ToFZY1

Los niveles de transcritos de *ToFZY1* cuantificados en las muestras infectadas con bacterias mostraron una clara diferencia entre la línea resistente y sensible de la variedad Rio Grande (Figura 29). La mayor cantidad de ARNm de *ToFZY1* se cuantificó en las muestras de tomate sensibles e inoculadas con la bacteria a 6 y 12 hpi (Figura 29, RG-*PtoS* bacterias) con cantidades de transcritos de *ToFZY1* detectado en la línea RG-*PtoS* a 6 y 12 hpi de 1000 y 400 moléculas, respectivamente mientras que los controles los se alcanzaron valores inferiores al límite de cuantificación, por lo que las comparaciones entre no fueron posibles (Figura 29, RG-*PtoS* vehiculo). El aumento de los niveles de ARNm de *ToFZY1* fueron detectados dentro del tiempo que hemos definido como fase estacionaria del crecimiento bacteriano, esto nos hace pensar que la señal que provoca la

expresión de *ToFZY1* en la línea RG-*PtoS* aún siendo dependiente de la presencia de bacteria, es independiente de la cantidad de la misma. Los niveles de ARNm en las muestras resistentes (RG-*PtoR*) fueron similares, tanto en plantas inoculados con bacterias con el vehículo, en todos los tiempos analizados, con la única excepción del tiempo 12 hpi, donde se cuantificó un ligero aumento de la cantidad de ARNm de *ToFZY1* (40 moleculas) en la línea resistente (Figura 29, RG-*PtoR* bacterias). En el resto de las muestra y en los diferentes tiempos, los niveles de ARNm de *ToFZY1* fueron detectados aunque por debajo del límite de cuantificación de la técnica. La única comparación estadística se pudo realizar en el tiempo 12 hpi y con una diferencia significativa entre ambas línea de 10 veces ($p=0,001$) más cantidad en la línea sensible. Cabe señalar el bajo nivel de expresión observado en las muestras controles en la variedad Rio Grande, y que son similares a los niveles detectados en las muestras de hoja en expansión en la variedad *ciliogia* o *ceraciforme*, como se observa en la figura 26 del apartado 4.4.2.3.

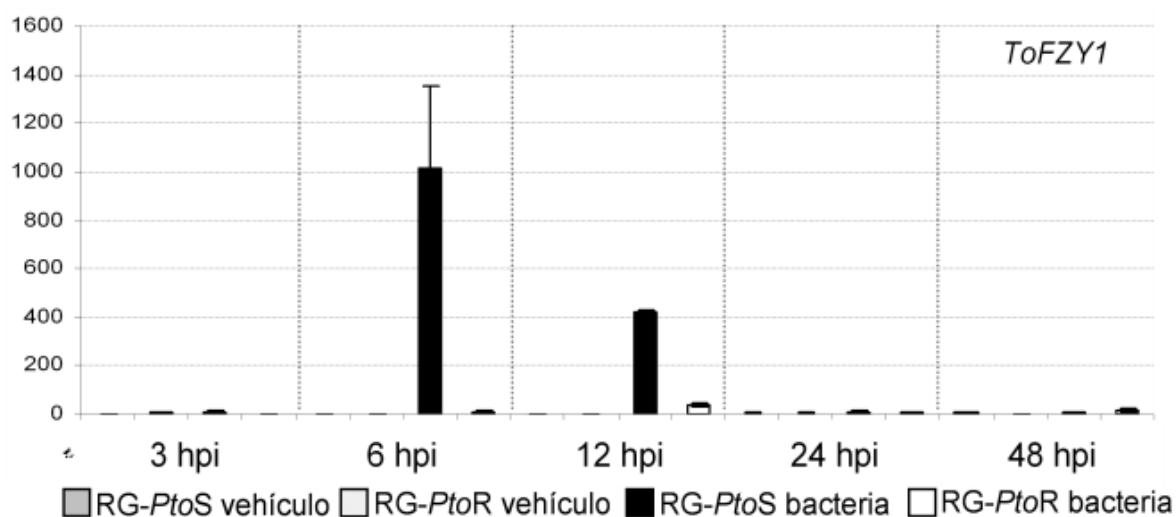


Figura 29. Nivel de expresión absoluta del gene *ToFZY1* durante la interacción entre la bacteria y la variedad Rio Grande de *Solanum lycopersicum*. Se representa la cantidad absoluta de ARNm del gen *ToFZY1* en las muestras inoculadas con las bacterias y con el vehículo en las líneas RG-*PtoR* y RG-*PtoS*. Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *CAC*, *Expressed* y *TIP41*).

ToFZY2

El ARNm del gen *ToFZY2* fue detectado en todas las muestras analizadas, y se observó una disminución en el número de transcritos, en todos los grupos de plantas inoculadas con la bacteria. Como se puede apreciar en la gráfica 30, los niveles de ARNm de este gen fueron similares entre los controles de las dos líneas, no detectándose

diferencias significativas en ninguno de los tiempos. Durante la comparación entre las líneas RG-*PtoS* que fueron inoculadas con la bacterias y con el vehiculo, se detectaron cambios significativos provocados por una disminución en los niveles de ARNm de *ToFZY2* de 4,3 veces a las 12 hpi ($p > 0,001$), 8,7 veces a las 24 hpi ($p = 0,024$) y 20 veces a las 48 hpi ($p = 0,018$). En cuanto a la línea resistente, la única diferencia significativa encontrada en comparación con las plantas controles fue a las 3hpi, mostrando una disminución de casi 3 veces en la cantidad de moléculas de ARNm (2,7 veces, $p = 0,008$). En la figura 30 (los asteriscos indican la significación) se recogen la significación de las diferencias encontradas, con valores de 5,16 veces a las 12 hpi, 7,5 veces a las 24 hpi y 21 veces a las 48 hpi, mostrando en todo los caso una disminución en la cantidad de ARNm de *ToFZY2* en la línea sensible con respecto a la variedad resistente. Cabe señalar que los niveles de ARNm de *ToFZY2* alcanzados en las muestras controles en la variedad Rio Grande son similares a los niveles detectados en las muestras de hoja en expansión en la variedad *ciliogia* o *ceraciforme*, como se observa en la figura 26 del apartado 4.4.2.3.

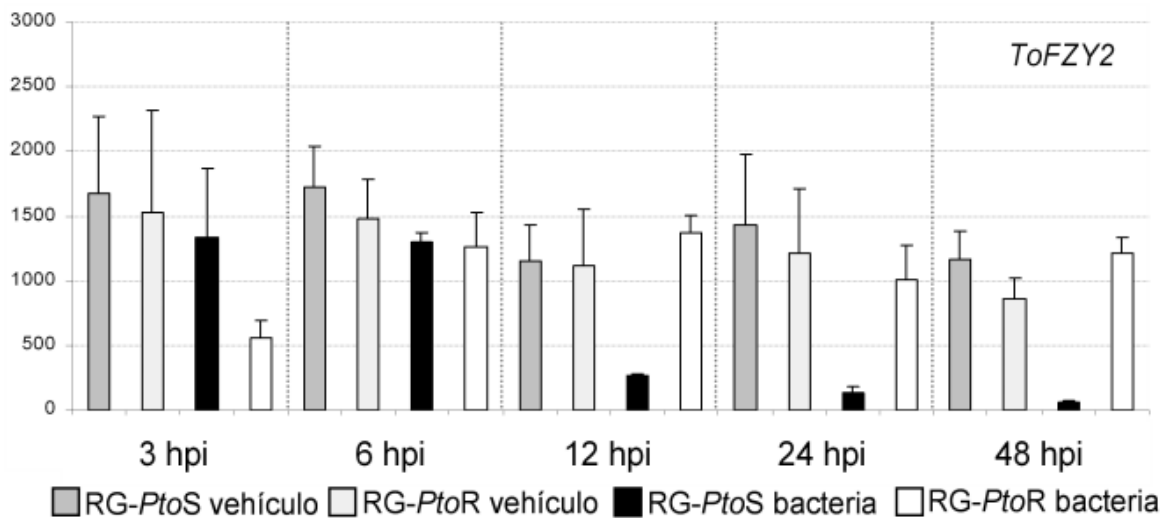


Figura 30. Nivel de expresión absoluta del gen *ToFZY2* durante la interacción entre la bacteria y la variedad Rio Grande de *Solanum lycopersicum*. Se representa la cantidad absoluta de ARNm del gen *ToFZY2* en las muestras inoculadas con las bacterias y con el vehiculo, en las líneas RG-*PtoR* y RG-*PtoS*. Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10⁴ moléculas de ARNm de referencia (genes *CAC*, *Expressed* y *TIP41*). Los asteriscos representan * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) e indican las diferencias significativas entre la comparación RG-*PtoR* versus RG-*PtoS* inoculados con bacterias.

ToFZY4

La línea sensible RG-*PtoS* mostró en el tiempo 3 hpi un aumento significativo en la cantidad de transcritos de 3,6 veces ($p=0,013$). Posteriormente la tendencia fue a disminuir, cuantificando a tiempo 12 hpi una cantidad de 10,3 veces menos ($p>0,001$) que la detectada en las plantas control y alcanzando niveles inferiores al límite de cuantificación en los tiempos 24 y 48 hpi (Figura 31, RG-*PtoS* bacterias). En la línea RG-*PtoR* inoculada con bacterias cuantificamos un aumento en la cantidad de ARNm detectado, en comparación con el control, a tiempo 6 hpi ($p=0,014$) y de magnitud similar al detectado en la línea sensible a 3 hpi. El análisis de los tiempos 12, 24 y 48 hpi la cantidad de ARNm de *ToFZY4* en la línea resistente no mostró diferencias significativas con las plantas inoculadas con el vehículo. La comparación entre la variedad resistente y sensible, ambas inoculadas con la bacteria, muestra diferencias significativas en todos los tiempos (Figura 31, los asteriscos indican la significación) con un aumento de 6,5 veces en la línea sensible a 3 hpi, y en el resto de los tiempo analizados esta línea muestra una disminución, con valores de 6,7 veces a las 6 hpi, 29,4 veces menos, a las 12 hpi, en comparación con los niveles cuantificados en la línea resistente. A 24 y 48 hpi, no es posible la comparación entre RG-*PtoR* y RG-*PtoS* debido a que los niveles son inferiores al límite de cuantificación de la técnica, imposibilitando el análisis estadístico.

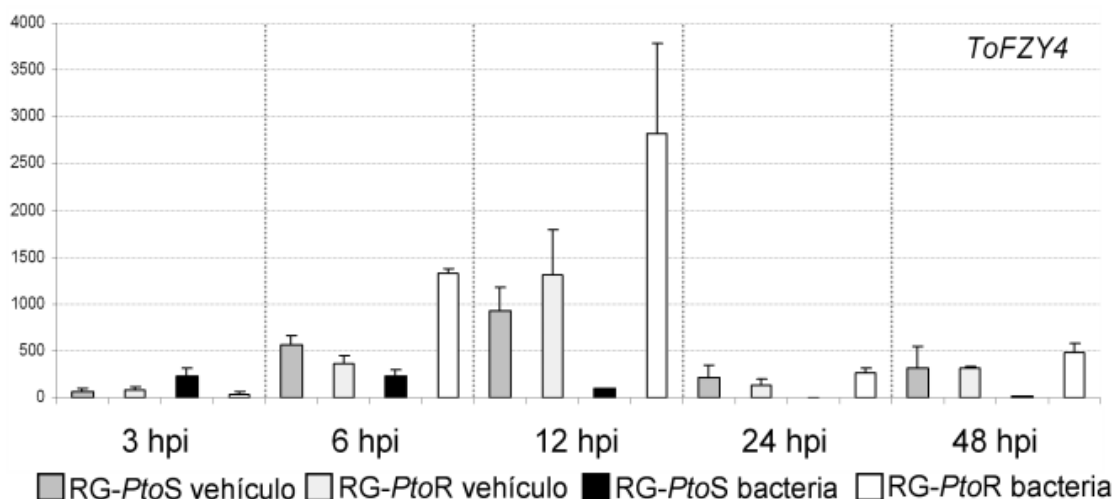


Figura 31. Nivel de expresión absoluta del gen *ToFZY4* durante la interacción entre la bacteria y la variedad Rio Grande de *Solanum lycopersicum*. Se representa la cantidad absoluta de ARNm del gen *ToFZY4* en las muestras inoculadas con las bacterias y con el vehículo, en las líneas RG-*PtoR* y RG-*PtoS*. Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *CAC*, *Expressed* y *TIP41*). Los asteriscos representan * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) e indican las diferencias significativas entre la comparación RG-*PtoR* versus RG-*PtoS* inoculados con bacterias

ToFZY6

Los niveles de transcritos de *ToFZY6* cuantificados en las muestras infectadas con bacterias mostraron una clara diferencia entre la línea resistente y sensible de la variedad Rio Grande (Figura 32). La línea sensible inoculada con bacterias (RG-*PtoS* bacterias), mostró niveles inferiores y significativos en comparación con los controles con una disminución de 14 veces tanto a los 6 hpi ($p=0,03$) como a los 12 hpi ($p>0,001$). Esta tendencia se invirtió, aumentando la cantidad de ARNm de *ToFZY6* a 24 y 48 hpi (Figura 32, RG-*PtoS* bacterias), coincidiendo con la fase de crecimiento log y fase estacionaria de la bacterias (Figura 28). Las diferencias encontradas en estos tiempos fueron significativas con valores de 10 veces ($p=0,021$) y 15 veces ($p=0,029$) en comparación con sus controles. La cantidad de transcritos de *ToFZY6* detectado en la línea RG-*PtoR*, solo fueron significativos a tiempo 12 hpi, con una disminución de 7 veces ($p=0,016$) en comparación con el control. De la comparación entre la línea RG-*PtoR* y RG-*PtoS* inoculadas con bacterias, resultaron diferencias significativas que comprenden dos tendencias, en los tiempos 6, 12 hpi se observa un aumento en la variedad resistente en al cantidad de ARNm de *ToFZY6* con respecto a la variedad sensible de 7,5 veces ($p=0,042$) y 3 veces ($p=0,020$). En cambio, a partir a las 24 y 48 hpi la comparación resultante mostró un aumento en la línea sensible, respecto a la variedad resistente, de 19 veces ($p=0,018$) y 5,3 veces ($p=0,016$), respectivamente. A excepción del tiempo 6 y 12 horas, en general el nivel de expresión observado en las muestras controles en la variedad Rio Grande, son similares a los niveles detectados en las muestras de hoja en expansión en la variedad *ciliogia* o *ceraciforme*, como se observa en la figura 26 del apartado 4.4.2.3. Al igual que sucede en con el gen *ToFZY4*, el aumento en la cantidad de ARNm en los controles puede ser debido a un efecto que desaparece a partir de las 12 horas posteriores a la inoculación. Esto pone de manifiesto la necesidad de añadir controles en todos los tiempos analizados, para poder controlar las variables independientes al efecto de las bacterias, en cualquier tiempo.

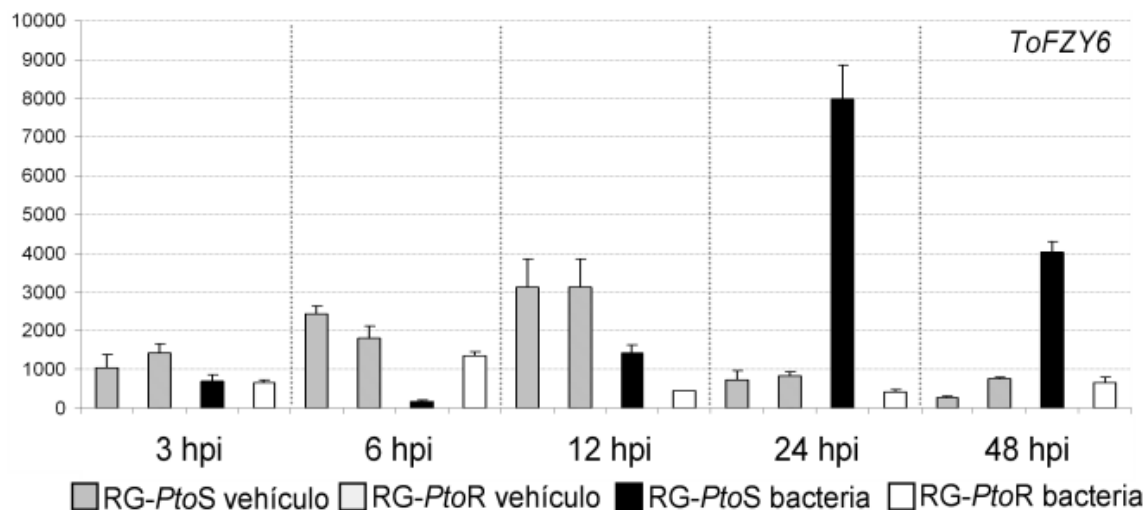


Figura 32. Nivel de expresión absoluta del gen *ToFZY6* durante la interacción entre la bacteria y la variedad Rio Grande de *Solanum lycopersicum*. Se representa la cantidad absoluta de ARNm del gen *ToFZY6* en las muestras inoculadas con las bacterias y con el vehículo, en las líneas RG-*PtoR* y RG-*PtoS*. Las cantidades mostradas han sido normalizadas por 10^4 moléculas de ARNm de referencia (genes *CAC*, *Expressed* y *TIP41*). Los asteriscos representan * ($p \leq 0,05$) ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) e indican las diferencias significativas entre la comparación RG-*PtoR* versus RG-*PtoS* inoculados con bacterias

Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la familia multigénica *ToFZY* de *Solanum lycopersicum*

El ácido indolacético (IAA), la forma más abundante de auxina, es una hormona implicada directa o indirectamente en casi todos los aspectos del desarrollo vegetal, incluyendo la división y elongación celular, la dominancia apical, la arquitectura de la raíz y de la parte aérea, el patrón de formación órganos, la diferenciación vascular y los tropismos (Woodward and Bartel, 2005; Benjamins and Scheres, 2008; Delker *et al.*, 2008). La regulación correcta de los procesos del desarrollo por el IAA requiere el establecimiento de gradientes de concentración, sin embargo, mientras se conocen muchos detalles del transporte polar de auxina (Vieten *et al.*, 2007), las vías de síntesis de IAA así como los lugares donde se produce no están completamente definidos. Durante los últimos años, los análisis genéticos centrados en la vía de la triptamina (TAM) para la biosíntesis de IAA, han revelado que el control espacial y temporal de la activación de los genes *YUCCA* desempeña un papel esencial en la formación y crecimiento de los órganos (Zhao, 2008; Chandler, 2009). El concepto emergente propone que muchos procesos del desarrollo en plantas dependen de un aporte localizado de IAA, que se consigue a través de la vía de la triptamina, y mediante el aumento de la expresión de determinados genes *YUCCA* en pequeños grupos de células. A modo de ejemplo, la activación del gen *YUC4* define los lugares donde se inicia la formación de hojas nuevas en *Arabidopsis* (Cheng *et al.*, 2006; Zhao, 2008). Por otro lado, los análisis filogenéticos y funcionales indican que los genes *YUCCA* han sufrido una rápida y extensa divergencia funcional, con el potencial para generar nueva morfologías en las plantas, tal y como ha ocurrido con los ortólogos *OsYUC1* de arroz y *SPI1* de maíz, (Yamamoto *et al.*, 2007; Gallavotti *et al.*, 2008). Este último aspecto tiene una especial relevancia en las especies de cultivo como el tomate, ya que estos genes podrían jugar un papel fundamental en la formación de caracteres morfológicos atractivos desde la perspectiva agronómica, como los relacionados con el número, la forma o el tamaño de los frutos.

Cuando se iniciaron los primeros trabajos experimentales que dieron forma a esta tesis, no se habían identificado aún genes de tomate homólogos a los genes *YUC* de *Arabidopsis*. La clonación y caracterización bioquímica del gen *ToFZY1*, ha sido la primera descripción de un gen de *Solanum lycopersicum* que codifica una flavin-

monooxigenasa (FMO) implicada en la síntesis de auxinas dependiente de triptófano (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2007). Tal y como se demuestra en el apartado 4.3.3 de la sección de resultados, la FMO codificada en el gen *ToFZY1* es capaz de catalizar la conversión de la triptamina (TAM) en *N*-hidroxil-triptamina (NHT), tal como ha sido descrito para el gen *YUC1* de *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2001). En relación a tales ensayos, cabe destacar la presencia de un segundo pico con menor tiempo de retención en el cromatograma mostrado en la figura 17-4. Dicho resultado corresponde a la separación mediante HPLC de los productos que se originan tras la incubación de la TAM con la proteína ToFZY1. Aunque cabe la posibilidad de que el segundo pico mencionado, pudiera ser resultado de una actividad enzimática aberrante asociada a la forma truncada de la proteína ToFZY1, exista otra hipótesis más atractiva relacionada con la gran inestabilidad química de la NHT. Durante la obtención de la NHT en el departamento de síntesis orgánica del IPNA-CSIC, se constató que esta molécula se oxida con gran facilidad cuando el medio se acidifica ligeramente. Quizás tras la conversión de la TAM en NHT por acción de la proteína ToFZY1, y debido a la mencionada inestabilidad, el grupo *N*-hidroxilo de la NHT se oxide espontáneamente hasta un aldehído, originando así el indolacetaldehído (IAAd). La comprobación de lo que aquí se sugiere permitiría dar una visión completa de la vía de la triptamina para la síntesis de IAA. En favor de esta hipótesis cabe mencionar que aunque la TAM y el IAAd han sido identificados, el compuesto NHT no se ha detectado hasta el momento en plantas (Quittenden *et al.*, 2009).

La búsqueda en el genoma del tomate de parálogos del gen *ToFZY1* dio como resultado la identificación de otros 5 miembros pertenecientes a la familia *YUCCA* en esta especie. Algunos de estos parálogos, como *ToFZY1*, 2, 3 y 6, parecen representar formas anteriores a la divergencia entre solanáceas y brasicáceas (Figura 15, y apartado 4.2), que se han conservado por algún tipo de importancia funcional. Por otro lado, los genes *ToFZY4* y 5, parecen haber surgido por fenómenos de duplicación génica más recientes, quizás exclusivos de las solanáceas o del género *Solanum*. Existen varios ejemplos de expansión dentro de la familia de genes *YUCCA* específica de determinados grupos taxonómicos, uno de ellos evidenciado en el presente estudio. Nos referimos al clado *YUC5/8/9* en *Arabidopsis* (figura 15), caracterizado por tener algunos miembros sin intrones. Otro ejemplo lo constituye los genes *OsYUC4*, y *OsYUC5* de arroz y *SPI1* de maíz, que representan una expansión de la familia *YUCCA* propia de plantas

monocotiledóneas y relacionada con la formación de la inflorescencia (Gallavotti *et al.*, 2008). Centrándonos en el caso del tomate, el gen *ToFZY4* constituye un caso especialmente interesante, puesto que parece tener algún protagonismo en la creación del fruto carnoso que caracteriza a las solanáceas. Esta propuesta surge de la observación del patrón de expresión de *ToFZY4* (Figura 22), el cual toma protagonismo en etapas claves para el desarrollo del fruto, y que serán discutidas más adelante. En junio de 2010, durante la redacción de esta memoria, fue puesto a disposición de la comunidad científica sin restricciones el resultado de la culminación del proyecto genoma de tomate (enero de 2010). Con esta nueva información identificamos un séptimo miembro de la familia *ToFZY*. En los análisis filogenéticos, el gen *ToFZY7* es el parálogo más cercano a *ToFZY5* (dato no mostrado), engrosando de esta manera el mencionado clado específico de grupo taxonómico.

En general, la elucidación de los patrones de expresión génica conduce a un mejor entendimiento de los procesos biológicos, tanto los relacionados con el desarrollo del organismo como los implicados en su interacción con el medio que le rodea. En el seno de familias multigénicas, el estudio del patrón espacio-temporal de expresión aporta valiosas pruebas sobre la repartición de tareas o la redundancia funcional entre los diferentes miembros de la familia. En el campo del análisis de la expresión génica, la PCR a tiempo real acoplada a la retrotranscripción del ARN en ADNc (RT-qPCR), se ha convertido en el método de elección para medir con gran exactitud la cantidad de un ARNm específico presente en diferentes muestras biológicas (Gachon *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2006; VanGuilder *et al.*, 2008). La correcta normalización de las muestras de ADNc es un requisito ineludible para proporcionar una medida exacta y fiable de la expresión génica, especialmente cuando se estudia la relevancia biológica de pequeños cambios o cuando la naturaleza de las muestras es heterogénea, por ejemplo en el análisis de diferentes tejidos u órganos (Derveaux *et al.*, 2010). En la actualidad la forma preferida de controlar la variación no específica de gen, tanto en la cantidad como en la calidad de las muestras de ADNc, es mediante el uso de genes de referencias (Huggett *et al.*, 2006; Nolan *et al.*, 2006). Sin embargo, dado que no existen genes de referencias universales, es necesario seleccionar una serie de genes candidatos que deben ser validados previamente en cada sistema experimental (Dheda *et al.*, 2005; Huggett *et al.*, 2006; Guénin *et al.*, 2009).

Recientemente, aprovechando los datos sobre expresión génica en *Arabidopsis* aportados por los análisis con micromatrices de ADN, Czechowski y colaboradores (2005) identificaron cientos de potenciales genes de referencia, que mostraban una estabilidad excepcional en diferentes etapas del desarrollo o en diferentes condiciones ambientales. A pesar de su importancia como organismo modelo, ciertos procesos biológicos no pueden ser estudiados en *Arabidopsis*, como por ejemplo la maduración de frutos carnosos, el crecimiento simpodial de los brotes o la formación de hojas compuestas, en cambio *Solanum lycopersicum* se ha convertido en una planta modelo para el estudio de estos procesos (Kimura and Sinha, 2008). Además, las conclusiones derivadas de los análisis sobre la idoneidad de genes de referencia en *Arabidopsis* no pueden extrapolarse directamente a cualquier especie de planta vascular. Por ejemplo, el gen *UBQ10* mostró unos niveles de expresión muy estables en muestras de *Arabidopsis* que comprendían distintos tejidos en diferentes etapas de desarrollo (Czechowski *et al.*, 2005), en cambio este mismo gen mostró poca estabilidad en muestras similares de arroz y de soja, resultando por tanto inadecuado para la normalización en estas especies (Jain *et al.*, 2006; Jian *et al.*, 2008). Esto pone de relieve la importancia de los estudios preliminares donde se evalúan la idoneidad de los genes candidatos a referencias internas, aún cuando ya hayan sido validados en otros organismos. Motivados por esas consideraciones hemos llevado a cabo un análisis en este sentido, que constituye el primer trabajo en profundidad destinado a identificar genes de referencia óptimos para ensayos de cuantificación de los niveles de ARNm durante el desarrollo de las plantas de tomate, basados en la tecnología de RT-qPCR a tiempo real (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008).

Como resultado del análisis sistemático del comportamiento de 11 candidatos a genes de referencias en *Solanum lycopersicum*, en un panel de 27 muestras que representan diferentes tejidos y órganos en diferentes fases del desarrollo, y empleando tres aproximaciones estadísticas complementarias, ha surgido “una caja de herramientas” de normalización integrada por los genes *CAC*, *TIP41*, *SAND* y “*Expressed*”. Estos genes han mostrado una estabilidad de expresión excepcional, muy superior a la de los genes de referencias clásicos, siendo altamente recomendables en diferentes contextos experimentales centrados en el desarrollo de las plantas de tomate (tablas 3 y 4). Entre los genes de expresión constitutiva que hemos evaluado, los genes *DNAJ*, *GAPDH* y *TUA* ya habían sido previamente descritos por Coker and Davis (2003) como posibles

candidatos a genes de referencias en plantas de tomate. Estos genes fueron seleccionados por dichos autores después del análisis de frecuencia de 127 transcritos, en 27 librerías de ADNc procedente de hojas, raíces, flores y frutos, pero ninguno de ellos fue clasificado como un gen de referencia adecuado para el conjunto de tejidos. Nuestros resultados, basados en datos obtenidos con una técnica más exacta y precisa, permiten concluir que el gen *DNAJ* puede ser útil para la normalización de muestras de flores (Tabla 4) y, en menor medida, en hojas, frutos o en la combinación de hojas y flores (datos no mostrados). Esto resultados coinciden con los obtenidos por Coker y Davis (2003). Sin embargo, nosotros advertimos que el gen *GAPDH* y, especialmente, el gen *TUA* no deberían ser empleados como genes de referencia, ya que su estabilidad de expresión, a juzgar por los resultados de tres análisis estadísticos diferentes, está lejos de ser aceptable. Por ejemplo, las cantidades relativas normalizadas del ARNm *TUA* mostraron coeficientes de variación superiores al 180% en las muestras de hojas y de frutos. Por último, destacar que la caja de herramientas de normalización propuesta en esta tesis, también ha mostrado ser adecuada en contextos experimentales de infección bacteriana y con diferentes cultivares de tomate.

A pesar de que ha sido sugerido que el patrón espacial y temporal de biosíntesis de IAA puede ser inferido a partir del patrón de expresión de los genes *YUCCA* (Cheng *et al.*, 2006; Zhao, 2008), aún no ha sido publicado un estudio cuantitativo sistemático realizado en una especie vegetal modelo, que permita el análisis comparativo de los niveles de expresión de diferentes miembros de una familia de genes *YUCCA* a lo largo del desarrollo. En la presente tesis doctoral se ha aprovechado la alta sensibilidad, precisión y especificidad de la RT-qPCR a tiempo real, para perfilar el patrón de expresión de seis genes que codifican FMOs del tipo *YUCCA*, en un conjunto de 33 muestras que abarcan el ciclo de vida completo de *Solanum lycopersicum*. Nos hemos ceñido a las recomendaciones más recientes sobre la normalización de datos (Guénin *et al.*, 2009; Derveaux *et al.*, 2010), y hemos seguido una aproximación de cuantificación absoluta que hace posible cualquier comparación entre los niveles de expresión de los genes *ToFZY*. Los resultados que mostramos proporcionan pistas importantes sobre el papel de estos genes durante los procesos del desarrollo en tomate, y constituyen una valiosa base de datos para futuros estudios dirigidos a desentrañar la especialización funcional y la redundancia que pudiera existir en la familia multigénica *ToFZY*. Mientras tanto, sería interesante saber si los cambios en los niveles de ARNm de los genes *ToFZY* son

concordantes con los datos aportados en otros trabajos sobre la dinámica de la síntesis de IAA, así como buscar paralelismos entre los genes *ToFZY* y sus homólogos en otra especie de plantas. Estas comparaciones deben realizarse con precaución, porque la cantidad de los transcritos *ToFZY* no refleja directamente la tasa de síntesis de IAA a través de la vía de la triptamina, sino que más bien dicha tasa dependerá de la contribución de cada gen particular al conjunto de ARNm *ToFZY*, en conjunción con variables post-transcripcionales tales como la velocidad de traducción de cada ARNm particular, las características bioquímicas de cada proteína ToFZY o la disponibilidad de triptamina como sustrato.

EXPRESIÓN EN RAÍCES

Aunque el desarrollo de las raíces depende en gran medida de la auxina producida en los brotes de la parte aérea de la planta, especialmente en las etapas más temprana del desarrollo (Bhalerao *et al.*, 2002; Grieneisen *et al.*, 2007), todas las partes del sistema radical de *Arabidopsis* tienen capacidad para sintetizar IAA, siendo la tasa de síntesis particularmente alta en el ápice de la raíz primaria y en las raíces laterales emergentes (Ljung *et al.*, 2005). También se ha demostrado en esta especie que la producción local de IAA está involucrada en la especificación de los lugares de formación de los primordios de las raíces laterales (Dubrovsky *et al.*, 2008). En concordancia con lo descrito en *Arabidopsis*, una línea transgénica de tomate que porta un gen reportero bajo el control de un promotor inducible por IAA (línea *p5::GUS* Chico III), muestra una señal muy fuerte de actividad glucuronidasa en torno al ápice de las raíces y en los sitios de iniciación de las raíces laterales (Mazzucato *et al.*, 2006). Nuestros análisis en tomate sugieren que la vía de la triptamina puede representar una importante fuente de IAA en las raíces, contribuyendo al aporte adicional de auxinas requerido para un alargamiento rápido de la radícula, o participando en el mantenimiento del nivel basal de esta hormona en las raíces maduras (Figura 24). En apoyo de esta hipótesis está la observación de que el gen *AAO1* de *Arabidopsis*, el cual codifica una aldehído oxidasa que usa el indol-3-acetaldeído como sustrato, se expresa predominantemente en las raíces (Sekimoto *et al.*, 1998), lo que permitiría completar en este órgano la vía de la triptamina para la síntesis de IAA.

Los niveles relativamente altos del conjunto de ARNm *ToFZY* detectados en la radícula durante su elongación, o los niveles moderados medidos en las porciones

proximal y media de la raíz madura (Figura 24), se sustentan principalmente por la actividad transcripcional del gen *ToFZY2* (Figura 25). Los datos de expresión de los genes *YUC* de *Arabidopsis*, basados en el uso de micromatrices de ADN, indican que el gen *YUC6*, el ortólogo del gen *ToFZY2* (Figura 15), también alcanza unos niveles de expresión relativamente altos en la radícula y en la raíz madura, siendo el gen *YUC* que se expresa predominantemente en radícula (Figura 30). Sin embargo, no se han descrito defectos en el desarrollo de las raíces en los dobles mutantes por pérdida de la función *yuc2/yuc6* (Cheng *et al.*, 2006), lo que sugiere que la deficiencia en la expresión de estos genes en el sistema radical de *Arabidopsis* podría estar compensada por otras fuentes locales de auxina, o por el transporte de esta hormona desde la parte aérea de la planta. No obstante, esta circunstancia no debería ser extrapolada directamente a cualquier especie de planta vascular, sino que más bien debería ser demostrada, por ejemplo, siguiendo una aproximación de genética reversa.

Para finalizar la discusión sobre la expresión de los genes *ToFZY* en las raíces de tomate, cabe destacar que el nivel total de ARNm *ToFZY* en la porción proximal de la raíz madura es aproximadamente el doble que en la porción distal (Figura 24), mientras que la tasa de síntesis de auxina en las raíces de *Arabidopsis* es mayor en los meristemos apicales (Ljung *et al.*, 2005). Se pueden proponer varias explicaciones para esta aparente discrepancia, siendo la más simple de todas que una ruta de síntesis diferente actúa en el extremo de la raíz madura. Sin embargo, en ambas especies los genes *YUCCA* predominantemente expresados en el ápice de las raíces son diferentes a los transcritos en posiciones anteriores: *ToFZY2 versus ToFZY6* en tomate (Figura 25B), y *YUC6 versus YUC3, 7 y 9* en *Arabidopsis* (Figura 30). Quizás, estas modificaciones en la expresión génica incrementen la síntesis de IAA por la vía de la TAM en las puntas de las raíces. Por último, también debería ser considerada la diferente arquitectura del sistema de raíces de las dos especies comparadas: las plantas de tomate, como planta de hábito rastrero, posee abundantes raíces secundarias que emergen cerca de la corona (Figura 11), en lugar de tener una raíz primaria completamente desarrollada como ocurre en *Arabidopsis*.

EXPRESIÓN EN COTILEDONES Y HOJAS

En relación con los órganos vegetativos aéreos, los niveles del conjunto de ARNm *ToFZY* medidos en los cotiledones y en las hojas, concuerdan en gran medida con las descripciones de los niveles de biosíntesis de IAA. Durante las primeras etapas del desarrollo, los cotiledones de *Arabidopsis* muestran una elevada capacidad de síntesis de IAA, actuando como una fuente de esta hormona para el desarrollo temprano de la raíz (Ljung *et al.*, 2001a). Los cotiledones también podrían suministrar IAA necesario para el desarrollo de los primeros primordios foliares, ya que en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con inhibidores del transporte polar de IAA, los niveles de esta hormona aumenta en los cotiledones y disminuye en los mencionados primordios (Avsian-Kretchmer *et al.*, 2002). De hecho, nuestro análisis de la línea transgénica de tomate *p5::GUS* Chico III revela una acumulación importante de IAA en la vena media de los cotiledones jóvenes y, sobre todo, en la región donde confluyen los cotiledones y los primeros primordios foliares (Figura 31A). En concordancia con esta observación, los ARNm de los genes *ToFZY* fueron detectados en los cotiledones a niveles de altos a moderados (Figura 26A), al menos durante 6 días tras la germinación (muestras C1-C4), siendo *ToFZY2*, 3 y 5 los principales implicados (figura 26B). En el caso de *Arabidopsis*, la expresión de los genes *YUC* es heterogénea, y es el gen *YUC2* el que da una señal promedio más alta en el análisis con micromatrices de ADN (Figura 30).

En el caso de las hojas, se encuentra bien documentada la correlación que existe entre las síntesis local de IAA, el patrón de desarrollo vascular y la expresión de los genes *YUCCA*. En las hojas de *Arabidopsis* y tabaco, la máxima capacidad de síntesis de IAA se observa en las etapas de desarrollo más tempranas, cuando la tasa de división celular es la más alta y coincidiendo con el inicio de la diferenciación vascular (Ljung *et al.*, 2001a). De hecho, el IAA producido en las hojas jóvenes es la señal más importante en el control de la formación de la red vascular (Aloni *et al.*, 2003). El patrón de distribución de IAA en los primordios foliares de *Arabidopsis*, inferido mediante tinción histoquímica en plantas transgénicas *DR5::GUS* (Aloni *et al.*, 2003), es muy similar al que nosotros observamos en la línea *p5::GUS* de tomate (Figura 31B), es decir, se da una acumulación importante de IAA en la región apical y a lo largo de la vena media en primordios foliares de menos de 1 mm de longitud, una etapa caracterizada por la diferenciación vascular. En ese

mismo tipo de material vegetal hemos detectado un nivel alto de ARNm de los genes *ToFZY* (muestras HP en la figura 26A).

En *Arabidopsis*, el cuádruple mutante por pérdida de función *yuc1/yuc2/yuc4/yuc6* presenta graves defectos en el desarrollo del sistema vascular de las hojas (Cheng *et al.*, 2006). Por otro lado, los mutantes *yuc2/yuc6* exhiben daños más severos que los mutantes *yuc1/yuc4*, en términos del número de venas y en el nivel de ramificación del sistema vascular, como es de esperar atendiendo a los respectivos niveles de expresión de estos genes (véase "*juvenile leaf*" en la figura 30). Nosotros detectamos en los primordios foliares de tomate un nivel alto de transcritos de los genes *ToFZY1* y *ToFZY2*, los correspondientes ortólogos de los genes *YUC1/4* y *YUC2/6* (Figura 15), aunque con una contribución muy similar de los dos genes al total de ARNm *ToFZY* (muestra HP en la figura 26C). En este sentido, cabe esperar que la inactivación del gen *ToFZY1*, en oposición a su ortólogo en *Arabidopsis* (*YUC4*), daría lugar a una importante alteración del patrón de venación de las hojas, tal y como se describe para el gen *FZY* (Tobeña-Santamaría *et al.*, 2002), el ortólogo del gen *ToFZY1* en petunia.

Se ha encontrado que tanto en *Arabidopsis* como en tabaco, una vez superada la etapa juvenil de las hojas, los niveles de IAA disminuyen drásticamente, manteniéndose bajos y bastante constantes durante la fase de crecimiento y expansión de la hoja. Cualquier alteración de esos niveles provoca una reducción de la tasa de expansión de la hoja (Ljung *et al.*, 2001a). Este estricto control homeostático parece que afecta a los genes *ToFZY*, ya que el nivel total de transcritos *ToFZY* en las hojas de tomate en expansión disminuyó aproximadamente 5 veces en comparación con las primordios foliares (muestras HE *versus* HP en la figura 26A), y cambiaron muy poco durante el período de aproximadamente 45 días abarcado por las muestras HE, a pesar de las importantes oscilaciones en la contribución de los diferentes genes *ToFZY* (Figura 26C).

Por último, es obligatorio advertir que a la hora de interpretar los datos presentados, se debe tener en cuenta que en los brotes de tomate la síntesis de IAA vía ácido indolpirúvico, otra ruta dependiente de triptófano, parece ser cuantitativamente más importante que la vía de la triptamina (Cooney and Nonhebel, 1991). Más aún, ha sido descrito que la ruta independiente de triptófano es la principal contribuyente a los niveles de IAA durante el crecimiento vegetativo en tomate (Sitbon *et al.*, 2000).

EXPRESIÓN EN FLORES

Las auxinas juegan un papel esencial en el desarrollo de las flores, tanto en la formación de los primordios como en la determinación del número y la identidad de órganos florales (Cheng and Zhao, 2007). Durante el desarrollo de la flor en *Arabidopsis* se produce un cambio gradual en los sitios principales de síntesis de auxinas, iniciándose en las puntas de los sépalos, a continuación en los estambres y por último en el gineceo (Aloni *et al.*, 2006). Una vez que la meiosis ha concluido en las células madres del polen, las anteras se convierten en el principal sitio de síntesis de IAA en las flores en desarrollo. El IAA que se produce en los estambres jóvenes coordina el desarrollo de las flores y también se acumula en los granos de polen, donde controla la entrada en mitosis (Aloni *et al.*, 2006, Feng *et al.*, 2006, Cecchetti *et al.*, 2008).

A nivel genético, se ha demostrado que el gen *FZY* de petunia y los genes *YUC1*, *2*, *4* y *6* de *Arabidopsis* juegan un papel importante durante el desarrollo de la flor. Por un lado, los genes *FZY*, *YUC1* y *YUC4* se expresan principalmente en las primeras etapas, concretamente en el domo meristemático, y afectan tanto al número como a la identidad de los órganos florales. Los mutantes por pérdida de la función *fzy* o *yuc1/yuc4*, generan flores infértiles, con defectos graves y variables en los cuatro verticilos de órganos florales (Tobeña-Santamaría *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2006;). Por otro lado, la expresión de los genes *YUC2* y *YUC6* aumenta gradualmente durante el desarrollo de la flor, alcanzando niveles notables en los estambres y en los granos de polen (Cheng *et al.*, 2006, Cecchetti *et al.*, 2008). En consecuencia, las flores del doble mutante *yuc2/yuc6* muestran defectos principalmente en los estambre, que provocan una reducción drástica de su fertilidad (Chen *et al.*, 2006).

El gen *ToFZY1*, el ortólogo en tomate de los genes de *FZY* y *YUC4*, fue el gen *ToFZY* preferentemente expresado en la muestra de flor más joven analizada en el presente estudio (muestra F1), seguido por *ToFZY5*, aunque los niveles de transcritos detectados fueron más bien modestos (Figura 28). En las muestras F1 los primordios de todos los órganos florales ya se han formado (Brukhin *et al.*, 2003), por lo tanto, a tenor de lo observado en los mutantes afectados en la expresión de los genes *FZY* y *YUC4*, probablemente los niveles de ARNm de *ToFZY1* serán mayores en estados de desarrollo floral anteriores a las muestras F1. También nos parece remarcable el nivel importante de

expresión que alcanza el gen *ToFZY4* en la muestra F2 (figura 28), definiendo uno de los dos máximos de expresión de genes *ToFZY* que detectamos durante el desarrollo de la flor (Figura 27). El estado de desarrollo representado por la muestra F2 se caracteriza por la vascularización de las paredes de los carpelos (Brukhin *et al.*, 2003). A favor del interés por esta observación, Mazzucato y colaboradores (2006) analizando el gineceo en flores de la línea de tomate *p5::GUS*, sólo detectan una clara acumulación de IAA en los haces vasculares basales del ovario. Por último, tras un periodo de actividad meiótica (muestras F3-F5), los transcritos del gen *ToFZY2* comienzan a acumularse en la flor en desarrollo, alcanzando los niveles más altos observados en el presente estudio. Este máximo, registrados en la muestra F8 y protagonizado por el gen de tomate ortólogo del gen *YUC6* de *Arabidopsis*, coincide con la etapa de mitosis en los granos de polen (Brukhin *et al.*, 2003). En el momento de la antesis (muestra F9), el nivel de ARNm de *ToFZY2* se mantiene considerablemente alto. En concordancia con estos datos, detectamos una alta actividad glucuronidasa en los conos de estambres de la línea transgénicas *p5::GUS* de tomate en etapas del desarrollo correspondientes a las muestras F8 y F9 (Figura 31C y D).

EXPRESIÓN EN FRUTOS

La antesis o apertura de la flor suele ser considerado el primer punto de referencia en el desarrollo del fruto (Gillaspy *et al.*, 2003). En la etapa de antesis, los niveles de auxina en el ovario de las flores de tomate son indetectables, pero después de la polinización y la fertilización la concentración de esta hormona aumenta progresivamente, durante un período de entre 8-10 días que se caracteriza por una activa división celular (Figura 38). Esta auxina actúa como una señal temprana que pone en marcha el programa de desarrollo del fruto, probablemente antes de la señal mediada por giberelinas (de Jong *et al.*, 2009). Los niveles de auxinas aumentan por segunda vez durante el desarrollo del fruto, coincidiendo con la etapa final del desarrollo embrionario (Figura 38). Puesto que este aumento no se detecta en frutos partenocárpicos (Mapelli *et al.*, 1978), las semillas deben ser la fuente del segundo pico de la hormona, en concreto el embrión en desarrollo, en el cual también se han detectado dos fase en la acumulación de IAA (Hochoer *et al.*, 1992). El IAA implicado en el desarrollo del fruto se sintetiza probablemente a través de una vía dependiente de triptófano, ya que la mutación *sulfurea* en tomate provoca una deficiencia de IAA en la parte aérea de la planta sin afectar al

desarrollo del fruto, probablemente interfiriendo en la ruta de síntesis de IAA independiente de Trp (Ehlert *et al.*, 2008).

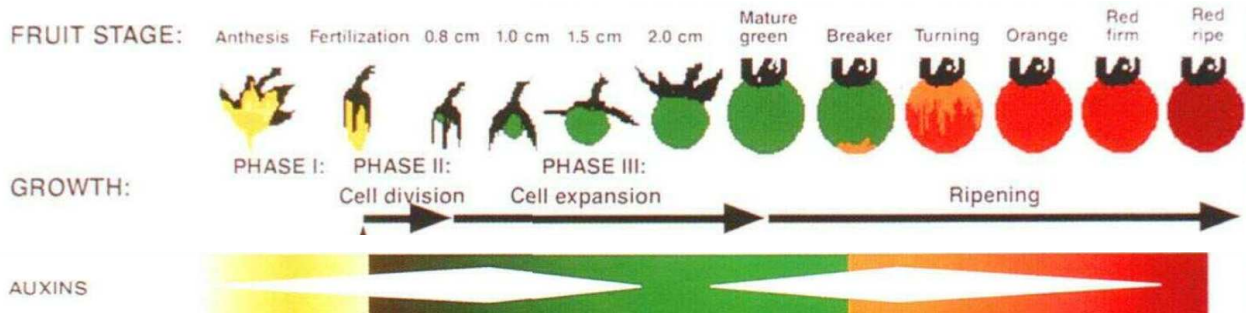


Figura 38. Cambio de los niveles de auxina durante el desarrollo del fruto de tomate. Imagen tomada y modificada de Gillaspay *et al.*, 1993)

En el presente estudio, se analizaron tres etapas del desarrollo del fruto de tomate que abarcan el segundo pico de auxina detectado en este órgano. Entre las muestras de semillas analizadas, el nivel máximo de ARNm de los genes *ToFZY* se observó en las semillas de frutos en fase de maduración (muestras S2 en la figura 29A), es decir, precediendo al segundo pico de auxina detectado durante el desarrollo del fruto del tomate (Gillaspay *et al.*, 2003; Figura 38). Con la única excepción de *ToFZY5*, todos los genes *ToFZY* se expresaron en las tres muestras de semillas analizadas, siendo el gen *ToFZY4* el que mostró la expresión promedio más alta, seguido por los genes *ToFZY2* y *ToFZY6* (Figura 29B). Aunque los niveles de ARNm *ToFZY* en las semillas se encuentran entre los más bajos registrados en este estudio, los análisis genéticos en *Arabidopsis* han revelado que la expresión de ciertos genes *YUC* es esencial para el proceso de embriogénesis. En concreto, las plántulas que surgen tras la germinación de semillas con la cuádruple mutación por pérdida de función *yuc1/yuc4/yuc10/yuc11*, carecen de hipocotilo y de meristemo radicular, y la mayoría de ellas poseen un solo cotiledón con escasa vascularización. Los genes *ToFZY1* y *ToFZY6*, ortólogos en tomate de esos genes *YUC* (Figura 15), fueron los que se expresaron preferentemente en la muestra de semillas de frutos verdes inmaduros (Figura 29B, la muestra S1), es decir, en semillas con embriones tempranos en fase de desarrollo entre “forma de corazón” y “torpedo joven” (Hoche *et al.*, 1992; Gillaspay *et al.*, 1993).

Un resultado interesante de nuestro análisis fue el importante nivel de ARNm del gen *ToFZY4* detectado en la muestra de pericarpo externo procedente de frutos en fase rojo maduro (muestra PE3 en la figura 29C). Esta muestra está compuesta por células de la epidermis y varias capas adicionales de células del exocarpo, las cuales sostienen la actividad mitótica durante un período más largo que en otros tejidos del fruto, pero no más allá de la fase de expansión celular (Gillaspy *et al.*, 2003; ver figura 38). Buta y Spaulding (1994) han comunicado que los niveles de IAA en el pericarpo difieren considerablemente dependiendo de la variedad de tomate analizada, aunque los niveles máximos que se alcanzan en este tejido coinciden temporalmente con los picos de auxina detectados en el fruto entero. Estos autores también describen un incremento muy modesto de las cantidades de IAA en el pericarpo durante la fase de maduración, el cual podría ser una consecuencia del aumento en la transcripción del gen *ToFZY4*. Sin embargo, se ha constatado que durante la transición desde el fruto en fase de maduración (“*breaker*”) hasta el fruto en fase rojo maduro, ocurre un cambio desde la vía dependiente a la independiente de Trp en la síntesis de IAA (Epstein *et al.*, 2002). En su conjunto, estos datos hacen plantearnos la especificidad de sustrato de la proteína codificada en el gen *ToFZY4*, y la posibilidad de que esta FMO tenga una función novedosa relacionada con el proceso de maduración. El hecho de que el gen *ToFZY4* parece representar una diversificación reciente de la familia de genes *YUCCA* específica del linaje de tomate (Figura 15), junto con su expresión tan destacada en etapas de desarrollo relacionados con la formación de un fruto carnoso, hacen de este gen un candidato atractivo para explorar el potencial de los genes *ToFZY*, como una herramienta para la obtención de nuevas propiedades morfológicas o para la inducción de frutos partenocárpicos (Gorguet *et al.*, 2005).

5.2. Relación de la familia multigénica *ToFZY* con el estrés biótico

Existe un gran número de evidencias de demuestran que las auxinas, además de su función como reguladores del crecimiento vegetal, desempeñan algún papel durante la interacción de las plantas con ciertos patógenos bacterianos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Bari and Jones, 2009; Grant and Jones, 2009). Los trabajos en este sentido muestra que la hormona promueve la susceptibilidad a la infección bacteriana cuando se aplica auxina o análogos sintéticos de manera exógena a las plantas (Yamada, 1993;

Navarro *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007). Los autores de estos trabajos se han centrado en el modelo patógeno-planta *Arabidopsis thaliana* y *Pseudomonas*, y todos ellos durante una interacción con plantas sensibles al patógeno, observando un aumento de los síntomas de la enfermedad. A nosotros nos pareció interesante determinar el efecto de la co-infiltración de IAA y de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000) evaluándola en las dos líneas de la variedad Río Grande (RG) de tomate, la línea RG-*Pto*S y la línea RG-*Pto*R, caracterizadas por un fenotipo sensible a la infección de la bacteria y un fenotipo resistente, respectivamente. Al igual que sucede en *Arabidopsis*, las auxinas aumentan susceptibilidad a la infección bacteriana en plantas de tomate RG-*Pto*S en concentraciones igual o superiores a 25 μ M de IAA, demostrando una vez más el papel de esta hormona como promotora de los síntomas y además en dos especies diferentes, *Arabidopsis* y *tomate*. En cambio, el progreso de la infección bacteriana en la línea de tomate resistente no fue afectado, aparentemente, por ninguna de las concentraciones de IAA ensayadas. Estos resultados indican la posible existencia de mecanismo presente en la variedad resistente que le permite ser insensible al IAA exógeno, como por ejemplo, el producido por las bacterias patógenas como parte de su estrategia de colonización (Bari and Jones, 2009; Kazan and Manners, 2009). Uno de los mecanismos por el cual la línea RG-*Pto*R pudiera mantener los niveles adecuados de auxinas, es mediante la formación de conjugados con azúcares, péptidos y aminoácido. Recientemente, el análisis del mutante de *Arabidopsis* por ganancia de la función del gen *WES1* (*wes1-D*), que codifica una proteína del tipo GH3, enzimas que han sido propuestos como reguladores del contenido endógenos de auxinas mediante la conjugación del IAA con aminoácidos, mostró un fenotipo típico de deficiencia de auxinas. Interesantemente, *WES1* fue inducido por el ácido salicílico y por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. De acuerdo con la hipótesis de que el IAA afecta positivamente a la infección con bacterias, el mutante *wes1-D*, en el que se detectaron bajos niveles de IAA y altos de conjugados de IAA, mostró mayor resistencia a la bacteria que el fenotipo salvaje, demostrando una vez más que el IAA libre favorece la colonización de las bacterias (Park *et al.*, 2007). La demostración que la sobreexpresión del gen *Pto*, en líneas transgénicas que portan el promotor 35S del virus de la coliflor fusionado a *Pto* (*35S::Pto*) provoca la acumulación de ácido salicílico, podría ser uno de los motivos de la diferencia en el comportamiento entre la línea RG-*Pto*S y RG-*Pto*R, durante el tratamiento con IAA exógeno (Tang *et al.*, 1999).

Conclusiones

Conclusiones:

1. En esta memoria se presenta la identificación de una Flavin monooxigenasa del tipo YUC en *Solanum lycopersicum*, al que denominamos *ToFZY1* y que presentan todas las características típicas de esta clase de enzimas. Además la caracterización enzimática de la proteína recombinante *ToFZY1* indica que esta proteína posee actividad *N*-hidroxilante, catalizando la conversión de Triptamina en *N*-hidroxil-triptamina.
2. La búsqueda en bases de datos de otras secuencias codificantes así como en secuencias BAC del proyecto genoma de tomate ha permitido la identificación de otros 5 miembros en esta especie. En tomate por lo tanto las FMO del tipo YUC pertenecen a una familia multigénica, así como ocurre en dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* y *Populus* y en monocotiledóneas como en arroz.
3. El análisis filogenético de *ToFZY* de tomate, revela que estos genes pertenecen a clado II de FMO en plantas y que se agrupan formando cuatro clados principales junto con miembros de genes *YUC* de *Arabidopsis*, indicando una conservación anterior de la divergencia entre ambas especies.
4. Los estudios de expresión espacial y temporal efectuados con la familia multigénica *ToFZY* indican que los miembros exhiben patrones de expresión distintos y están ampliamente expresados en todos los estadios de desarrollo y en todos los órganos de la planta. Esto sugiere que en tomate, estas proteínas participan en fenómenos morfogénicos con todo el ciclo vital de la planta.
5. Durante la infección en plantas de tomate existe un comportamiento diferencial en la expresión de los genes *ToFZY* según se trate de líneas resistentes y sensibles a la bacteria fitopatógena. El aumento de la cantidad de transcritos de los genes *ToFZY1* y 6 en la variedad sensible, hace pensar la posibilidad de una manipulación de los mecanismos de síntesis de IAA de la planta por parte de la bacteria en beneficio propio.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles FB**, Morgan PW and Saltveit ME (1992). Ethylene in Plant Biology. (2nd edn), Academic Press.
- Agnew P**, Koella JC and Michalakis Y (2000). Host life-history responses to parasitism. *Microbes and Infection* 2, 891–896.
- Aloni R**, Schwalm K, Langhans M and Ullrich CI (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* 216, 841–853.
- Aloni R**, Aloni E, Langhans M and Ullrich CI (2006). Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* 223, 315–328.
- Andersen CL**, Jensen JL and Orntoft TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64, 5245–5250.
- Avsian-Kretchmer O**, Cheng JC, Chen LJ, Moctezuma E and Sung ZR (2002). Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during *Arabidopsis* leaf ontogeny. *Plant Physiology* 130, 199–209.
- Bak S**, Nielsen HL and Halkier BA (1998). The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Molecular Biology* 38, 725–734.
- Bari R and Jones JDG** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69, 473–488.
- Bartel B**, LeClere S, Magidin M and Zolman BK (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation* 20, 198–216.
- Benjamins R and Scheres B** (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annual Reviews in Plant Biology* 59, 443–465.
- Bhalerao RP**, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M and Sandberg G (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal* 29, 325–332.

- Brukhin V**, Hernould M, González N, Chevalier C and Mouras A (2003). Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction* 15, 311-320.
- Buta JG and Spaulding DW (1994)**. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 13, 163–166.
- Cashman JR (2002)**. Human and plant flavin-containing monooxygenase *N*-oxygenation of amines: detoxification vs. bioactivation. *Drug Metabolism Reviews* 34, 513–521.
- Cecchetti V**, Altamura MM, Falasca G, Costantino P and Cardarellic M. (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20, 1760-1774.
- Chandler JW (2009)**. Local auxin production: a small contribution to a big field. *BioEssays* 31, 60-70.
- Chang JH**, Urbach JM, Law TF, Arnold LW, Hu A, Gombar S, Grant SR, Ausubel FM and Dangl JL (2005). A highthroughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 102, 2540–2554.
- Chen Z**, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J and Kunkel BN (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 20131–20136.
- Cheng Y**, Dai X and Zhao Y (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 20, 1790–1799.
- Cheng Y**, Dai X and Zhao Y (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2430–2439.
- Cheng Y and Zhao Y (2007)**. A role for auxin in flower development. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, 99-104.
- Clay NK**, Adio AM, Denoux C, Jander G and Ausubel FM (2009). Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323, 95–101.
- Coker JS and Davies E (2003)**. Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *BioTechniques* 35, 740-748.

- Cooney TP and Nonhebel HM (1991)**. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: Measurement, mass-spectral identification and incorporation of ^2H from $^2\text{H}_2\text{O}$ into indole-3-acetic acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* 184, 368–376.
- Czechowski T, Bari RP, Stitt M, Scheible WR and Udvardi MK (2004)**. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant Journal* 38, 366–379.
- Czechowsky T, Stitt M, Altmann T, Udvardi K and Scheible W-R (2005)**. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 5-17.
- Darwin F and Darwin C (1880)**. The power of movement in plants. Murray, J. (ed). London, UK.
- de Jong M, Mariani C, Vriezen WH. 2009**. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany* 60, 1523–1532.
- de Luca V, Marineau C and Brisson N (1989)**. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 86: 2582–2586.
- Delker C, Raschke and Quint M (2008)**. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* 227, 929–941.
- Derveaux S, Vandesompele J and Hellemans J (2010)**. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50, 227–230.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G and Zumla A (2004)**. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37, 112-119.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA and Zumla A (2005)**. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry* 344, 141-143.
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J and Benková E (2008)**. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105, 8790-8794.

- Dym O and Eisenberg D (2001)**. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science* 10, 1712–1728.
- Ehlert B, Schoöttler MA, Tischendorf G, Ludwig-Müller J and Bock R (2008)**. The paramutated *SULFUREA* locus of tomato is involved in auxin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59, 3635–3647.
- Epstein E, Cohen J and Slovin J (2002)**. The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development. *Plant Growth Regulation* 38, 15–20.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Hernández M and Pérez JA (2007)**. Cloning and biochemical characterization of *ToFZY*, a tomato gene encoding a flavin monooxygenase involved in a tryptophan-dependent auxin biosynthesis pathway. *Journal of Plant Growth Regulation* 26, 329-340.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A and Pérez JA (2008)**. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* 8, 131.
- Feng XL, Ni WM, Elge S, Mueller-Roeber B, Xu ZH and Xue HW (2006)**. Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant Molecular Biology* 61, 215–226.
- Fujino K, Matsuda Y, Ozawa K, Nishimura T, Koshiba T, Fraaije MW and Sekiguchi H (2008)**. *NARROW LEAF 7* controls leaf shape mediated by auxin in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 279, 499-507.
- Gachon C, Mingam A and Charrier B (2004)**. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 55, 1445–1454.
- Gallavotti A, Barazesh S, Malcomber S, Hall D, Jackson D, Schmidt RJ and McSteen P (2008)**. *sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific *YUCCA*-like gene required for vegetative and reproductive development in maize. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 105, 15196–15201.
- Gibson RA, Scheider EA and Wightman F (1972)**. Biosynthesis and metabolism of indol-3yl-acetic acid. II. In vivo experiments with ¹⁴C-labelled precursors of IAA, in tomato and barley shoots. *Journal of Experimental Botany* 23, 381-399.
- Gillaspy G, Ben-David H and Gruissem W (1993)**. Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell* 5, 1439-1451.
- Glickmann E, Gardan L, Jacquet S, Hussain S, Elasri M, Petit A and Dessaux Y (1998)**. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11, 156–162.

- Gorguet B**, van Heusden AW and Lindhout P (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology* 7, 131-139.
- Grant MR and Jones JDG** (2009). Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324, 750-752.
- Grieneisen VA**, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P and Scheres B (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449, 1008–1013.
- Grubb CD and Abel S** (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11, 89–100.
- Guénin S**, Mauriat M, Pelloux J, Wuytswinkel O, Bellini C and Gutierrez L (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany* 60, 487–493.
- Hellemans J**, Mortier G, De Paepe A, Speleman F and Vandesompele J (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8, 19.
- Hermkens PHH**, Van Maarseveen JH, Ottenheijm HCJ, Kruse CG and Scheeren HW (1990). Intramolecular Pictet-Spengler reaction of N-alkoxytryptamines. 3. Stereoselective synthesis of (-)-deb-romoeudistomin L and (-)-O-methyldebromoeudistomin E and their stereoisomers. *Journal of Organic Chemistry* 55, 3998–4006.
- Hocher V**, Sotta B, Maldiney R, Bonnet M and Miginiac E (1992). Changes in indole-3-acetic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed development. *Plant Cell Report* 11, 253–256.
- Huggett J**, Dheda K and Bustin SA (2006). Normalization. In: Real-Time PCR, pp 83-91. Edited by Dorak MT. BIOS Advanced Methods, Taylor & Francis, New York.
- Hull AK**, Vij R and Celenza JL (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 97, 2379–2384.
- Ishihara A**, Hashimoto Y, Tanaka C, Dubouzet JG, Nakao T, Matsuda F, Nishioka T, Miyagawa H and Wakasa K (2008). The tryptophan pathway is involved in the defence responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant Journal* 54, 481–495.

- Jain M**, Nijhawan A, Tyagi AK and Khurana JP (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345, 646-651.
- Jian B**, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C and Han T (2008). Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 9, 59.
- Kazan K and Manners JM** (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 14, 373-382.
- Kim JI**, Sharkhuu A, Jin JB, Li P, Jeong JC, Baek D, Lee SY, Blakeslee JJ, Murphy AS, Bohnert HJ, Hasegawa PM, Yun DJ and Bressan RA (2007). *yucca6*, a dominant mutation in *Arabidopsis*, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiology* 145, 722–735.
- Kimura S and Sinha N** (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. *Cold Spring Harbor Protocols* doi:10.1101/pdb.emo105
- Koga J**, Syono K, Ichikawa T and Adachi T (1994). Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 14, 241-247.
- Kögl F**, Haagen-Smit AJ and Erxleben H (1933). Über ein Phytohormon der Zellstreckung. Reindarstellung des Auxins aus menschlichen Harn. *Z. Physiology Chemistry* 214, 241–261.
- Korves TM** and Bergelson J (2003). A developmental response to pathogen infection in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 339–347.
- Kubista M**, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A and Zoric N (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 95–125.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 318, 78–80.
- Lam E**, Kato N and Lawton M (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 41, 1848-1853.
- Ljung K**, Bhalerao RP and Sandberg G (2001a). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* 28, 465-474.
- Ljung K**, Östin A, Lioussanne L and Sandberg G (2001b). Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in scots pine seedlings. *Plant Physiology* 125, 464–475.

- Ljung K**, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD and Sandberg G (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 49, 249–72.
- Ljung K**, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J and Sandberga G (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17, 1090–1104.
- Mapelli SC**, Frova G, Torti G and Soressi G (1978). Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiology* 19, 1281–1288.
- Marsch-Martínez N**, Greco R, Van Arkel G, Herrera-Estrella L and Pereira A (2002). Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129, 1544–1556.
- Martínez C**, Pons E, Prats G and León J (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant Journal* 37, 209–217.
- Mazzucato A**, Olimpieri I, Rossi M, Caccia R and Soressi GP (2006). A new reporter construct to monitor IAA dynamics during tomato development. *Tomato Genetics Cooperative Report* 56, 26-28.
- Michalczyk L**, Ribnicky DM, Cooke TJ and Cohen JD (1992). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiology* 100, 1346–1353.
- Mikkelsen MD**, Fuller VL, Hansen BG, Nafisi M, Olsen CE, Nielsen HL and Halkier BA (2009). Controlled indole-3-acetaldoxime production through ethanol-induced expression of CYP79B2. *Planta* 6, 1209-1217.
- Navarro L**, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O and Jones JD (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436–439.
- Nolan T**, Hands RE and Bustin SA (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1, 1559-1582.
- Normanly J**, Cohen J and Fink G (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 90, 10355–10359.
- Normanly J.** (2010). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001594

- O'Donnell PJ**, Schmelz EA, Moussatche P, Lund ST, Jones JB and Klee HJ (2003). Susceptible to intolerance, a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant Journal* 33, 245-257.
- Ouyang J**, Shao X and Li J (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 24, 327–333.
- Øvstebø R**, Haug KB, Lande K and Kierulf P (2003). PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation. *Clinical Chemistry* 49, 425-432.
- Paran I and van der Knaap E** (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany* 58, 3841–3852.
- Park JE**, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim SY, Kim J, Lee YH and Park CM (2007). GH3-mediated Auxin Homeostasis Links Growth Regulation with Stress Adaptation Response in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 10036–10046.
- Patten CL and Glick BR** (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 207–220.
- Peirson SN**, Butler JN and Foster RG (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research* 31, e73.
- Pfaffl MW**, Horgan GW and Dempfle L (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, e36.
- Phelps RH and Sequeira L** (1967). Synthesis of indoleacetic acid via tryptamine by a cell-free system from tobacco terminal buds. *Plant Physiology* 42, 1161-1163.
- Pollmann S**, Neu D and Weiler, EW (2003). Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 62, 293–300.
- Potters G**, Pasternak TP, Guisez Y, Palme JK and Jansen M (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12, 98–105.
- Quittenden LJ**, Davies NW, Smith JA, Molesworth PP, Tivendale ND and Ross JJ (2009). Auxin biosynthesis in *Pisum sativum*: Characterisation of the tryptamine pathway. *Plant Physiology* 151, 1130-1138.

- Radonić A**, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W and Nitsche A (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 856-862.
- Rapparini F**, Tam YY, Cohen JD and Slovin JP (2002). Indole-3-acetic acid metabolism in *Lemna gibba* undergoes dynamic changes in response to growth temperature. *Plant Physiology* 128, 1410–1416.
- Reid KE**, Olsson N, Schlosser J, Peng F and Lund ST (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6, 27-37.
- Ribnicky DM**, Cohen JD, Hu WS and Cooke TJ (2002). An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* 214, 505–509.
- Robert-Seilaniantz A**, Navarro L, Bari R and Jones JD (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 372–379.
- Romano CP**, Robson PRH, Smith H, Estelle M and Klee H (1995). Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyls elongation phenotype and interactions with the *hy6-1* hypocotyl elongation and *axr1* auxin-resistant mutants. *Plant Molecular Biology* 27, 1071–1083.
- Römer P**, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U and Lahaye T (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* 318, 645-648.
- Rozen S and Skaletsky HJ** (2006). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols*, pp 365-386. Edited by Krawetz S, Misener S and Totowa NJ. Humana Pres, Methods in Molecular Biology.
- Schlaich NL** (2007). Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends in Plant Science* 12, 412-418.
- Schneider EA**, Gibson RA and Wightman F (1972). Biosynthesis and metabolism of indol-3yl-acetic acid. I. The native indoles of barley and tomato shoots. *Journal of Experimental Botany* 23, 152–170.
- Sekimoto H**, Seo M, Kawakami N, Komano T, Desloire S, Liotenberg S, Marion-Poll A, Caboche M, Kamiya Y and Koshiba T (1998). Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 39, 433–442.
- Sequeira L** (1965). Origin of indoleacetic acid in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 55, 1232–1236.

- Sequeira L and Kelman A (1962)**. Accumulation of growth substances in plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 439–448.
- Sequeira L and Williams PH (1964)**. Synthesis of indoleacetic acid by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 54, 1240–1246.
- Sitbon F, Astot C, Edlund A, Crozier A and Sandberg G (2000)**. The relative importance of tryptophan-dependent and tryptophan-independent biosynthesis of indole-3-acetic acid in tobacco during vegetative growth. *Planta* 211, 715-721.
- Songstad DD, de Luca V, Brisson N, Kurz WGW and Neisser CL (1990)**. High levels of tryptamine accumulation in transgenic tobacco expressing tryptophan decarboxylase. *Plant Physiology* 94, 1410-1413.
- Spaepen S, Vanderleyden J and Remans R (2007)**. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 425-448.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, Schlereth A, Jürgens G and Alonso JM (2008)**. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177-191.
- Stehr M, Diekmann H, Smau L, Seth O, Ghisla S, Singh M and Macheroux P (1998)**. A hydrophobic sequence motif common to N-hydroxylating enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 56-57.
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y and Kasahara H (2009)**. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 106, 5430–5435.
- Suh JK, Poulsen LL, Ziegler DM and Robertus JD (1996)**. Molecular cloning and kinetic characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archive of Biochemical and Biophysics* 336, 268–274.
- Szabo A, Perou CM, Karaca M, Perreard L, Quackenbush JF and Bernard PS (2004)**. Statistical modelling for selecting housekeeper genes. *Genome Biology* 5, 59.
- Sztejn AE, Ilic N, Cohen JD and Cooke TJ (2002)**. Indole-3-acetic acid biosynthesis in isolated axes from germinating bean seeds: the effect of wounding on the biosynthetic pathway. *Plant Growth Regulation* 36, 201–207.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007)** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.

- Tang X**, Xie M, Kim YJ, Zhou J, Klessig DF and Martin GB (1999). Overexpression of Pto Activates Defense Responses and Confers Broad Resistance. *The Plant Cell* 11, 15–29.
- Tao Y**, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Gheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballare CI, Sandberg G, Noel JP and Chory J (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133,164–176.
- Thilmony R**, Underwood W and He SY (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant Journal* 46, 34–53.
- Tobeña-Santamaria R**, Bliet M, Ljung K, Sandberg G, Mol JN, Souer E and Koes R (2002). FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes and Development* 16, 753–763.
- Vandesompele J**, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 34.
- VanGuilder HD**, Vrana KE, Freeman WM (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44, 619-626.
- Vieten A**, Sauer M, Brewer PB and Friml J (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Sciences* 12,160-168.
- Wang D**, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH and Dong X (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* 17, 1784–1790.
- Wasternack C** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100, 681–697.
- Woo YM**, Park HJ, Suudi M, Yang JI, Park JJ, Back K, Park YM and An G (2007). *Constitutively wilted 1*, a member of the rice *YUCCA* gene family, is required for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. *Plant Molecular Biology* 65,125–136.
- Woodward AW and Bartel B** (2005). Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95, 707–735.

- Woodward C**, Bemis SM, Hill EJ, Sawa S, Koshiba T and Torii KU (2005). Interaction of auxin and *ERECTA* in elaborating *Arabidopsis* inflorescence architecture revealed by activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiology* 139, 192–203.
- Wright AD**, Sampson MB, NeuVer MG, Michalczyk L, Slovin JP and Cohen JD (1991). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* 254, 998–1000.
- Xiao H**, Jiang N, Schaffner E, Stockinger EJ and van der Knaap E (2008). A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* 319, 1527–1530.
- Xiao H**, Radovich C, Welty N, Hsu J, Li D, Meulia T and van der Knaap E (2009). Integration of tomato reproductive developmental landmarks and expression profiles, and the effect of SUN on fruit shape. *BMC Plant Biology* 9, 49.
- Yamada H**, Kawate T, Matsumizu M, Nishida A, Yamaguchi K and Nakagawa M (1998). Chiral Lewis acid-mediated enantioselective Pictet-Spengler reaction of N-hydroxyl-tryptamine with aldehydes. *Journal of Organic Chemistry* 63, 6348–6354.
- Yamada T** (1993). The role of auxin in plant-disease development. *Annual Review in Phytopathology* 31, 253–273.
- Yamamoto Y**, Kamiya N, Morinaka Y, Matsuoka M and Sazuka T (2007). Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. *Plant Physiology* 143, 1362–1371.
- Zaccardelli M**, Spasiano A, Bazzi C and Merighi M (2005). Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZpst*. *European Journal of Plant Pathology* 111, 85–90.
- Zhang M** and Robertus JD (2002) Molecular cloning and characterization of a full-length flavin-dependent monooxygenase from yeast. *Archive of Biochemical and Biophysics* 403, 277–283.
- Zhao Y** (2008). The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 16–22.
- Zhao Y** (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review in Plant Biology* 61, 49–64.
- Zhao Y**, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D and Chory J (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291, 306–309.

- Zhao Y**, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J and Celenza JL (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes and Development* 16, 3100–3112.
- Ziegler DM** (2002). An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs. *Drug Metabolism Reviews* 34, 503–511.
- Zimmermann P**, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L and Gruissem W (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136, 2621-2632.