

**MECANISMOS MOLECULARES DE
RESISTENCIA EN
Lycopersicon esculentum Mills**



**Tesis doctoral
Carmen Gayoso Babío
2007**

**MECANISMOS MOLECULARES DE
RESISTENCIA EN
Lycopersicon esculentum Mills**



**Tesis doctoral
Carmen Gayoso Babío
2007**

D. JOSÉ MIGUEL RUIZ DE LA ROSA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E ECOLOXÍA DE LA
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

CERTIFICA:

Que la presente memoria, titulada "Mecanismos moleculares de resistencia en *Lycopersicon esculentum*" y presentada por la licenciada CARMEN GAYOSO BABÍO para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en su totalidad en el Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal y Ecoloxía de la Universidade da Coruña.

Y para que conste firma la presente certificación en A Coruña a 21 de Mayo de 2007.



Fdo. José Miguel Ruiz de la Rosa

DÑA FUENCISLA MERINO DE CÁCERES CATEDRÁTICA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E ECOLOXÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA, D. FEDERICO POMAR BARBEITO INVESTIGADOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS DE MABEGONDO Y D. ÓSCAR MARTINEZ DE ILÁRDUYA RUIZ DE LARRAMENDI, INVESTIGADOR DE LA FUNDACIÓN AZTI-TECNALIA

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada "Mecanismos moleculares de resistencia en *Lycopersicon esculentum*" y presentada por la licenciada CARMEN GAYOSO BABÍO, ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía de la Universidade da Coruña bajo su dirección, y que cumple las condiciones exigidas para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas,

Y para que conste firman la presente certificación en A Coruña a 21 de Mayo de 2007.



Fdo. Fuencisla Merino de Cáceres



Fdo. Federico Pomar Barbeito

Fdo. Óscar Martínez de Ilárduya Ruiz de Larramendi



El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos: PGDIT99AGR-103601, PGIDIT03RAG10301PR y PGIDIT05RAG10301PR.

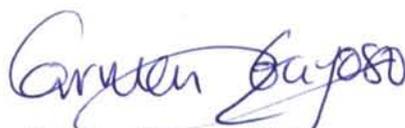
La firmante ha disfrutado de un contrato asociado a los proyectos: PGDIT99AGR-103601, PGIDIT03RAG10301PR y PGIDIT05RAG10301PR.

Una parte de los resultados han sido publicados:

Bernal MA, Collar J, Díaz J, Caramelo C, Gayoso CM, Pomar F, Prego C, Saavedra A, Silvar C y Merino F. 2001. A Survey of "Tristeza" of Pepper in Galicia and the Fungal Pathogens causing the Disease. Capsicum and Eggplant Newsletter. 20, pp: 90-93.

Gayoso C, Martínez de Ilárduya O, Pomar F, Merino F (2007) Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* Kleb. in different Solanaceae cultivars. EJPP

Gayoso CM, Pomar F, Merino F, Martínez de Ilárduya O (2007) The Ve-mediated resistance response of tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂ and peroxidase and specifically drives *PAL* gene expression Plant Physiol (En revision)



Carmen Gayoso Babio

Agradecimientos:

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que hicieron posible que este trabajo se llevara a cabo y en especial:

A la doctora Fuencisla Merino de Cáceres, al doctor Federico Pomar Barbeito y al doctor Óscar Martínez de Ilárduya Ruiz de Larramendi por llevar a cabo la difícil tarea de dirección con gran dedicación y entusiasmo.

A todos mis compañeros de laboratorio: Ángeles, Jose, Esther, Jorge, Javi, Javier, Chus, Carlos, Claudia, Raquel, Cris, Marta, José Manuel y Silvia por su constante apoyo.

A mi querida amiga Esther, por pasarme parte de su fuerza. Por sus consejos, nada gratuitos, por su apoyo, por su cariño y... por todo. La verdad, no sé que hubiera hecho sin ti.

A mi amiga Tamara, por todos los cables que me has echado, por esas frases cortas y contundentes, por ser una de las pinzas que me sostenían junto con Esther y Silvia.

A mi muy querida amiga Silvia. ¡Puff, cómo te echo de menos! No imaginas la cantidad de cosas que me has enseñado. Gracias por tener ese carácter pausado y sereno.

A Geli, gracias por tu apoyo incondicional, no imaginas lo mucho que te lo agradezco. Gracias por dejarme asomar la cabeza al mundo de la investigación.

A Jorge, por ser tal y como eres. Por estar ahí, por la risa y por demostrarme que es importante perseguir lo que uno quiere. No es imposible.

A Plif e a Plaf, al Lobo feroz y al Zorro, por ayudarme a mejorar. Sabéis que os quiero en cada una de vuestras formas, quizá sobraba alguna, pero así sois y así hay que quererlos. "Adiós, mua mua, que te vaya bien", espero y deseo no volver a decir esto. Las cosas van a ir bien ¿verdad?

A Alberto por ayudarme y escucharme atentamente en momentos complicados.

A Rafa y Ana, mis bioquímicos, gracias por vuestra ayuda.

A Merce. Te debo unas cuantas. Hay un árbol por ahí, que sin ti, no existiría.
Muchas gracias.

A Nani, por ayudarme, enseñarme y darme ánimo.

A Ana González Tizón y Andrés Martínez Lage, por introducirme en la biología molecular, por el cariño con que me tratasteis.

A José Antonio Vilar Fernández, por concederme una parte de su tiempo y ayudarme con un problema de análisis de datos. Muchísimas gracias.

A Alfonso Ros Barceló por su inestimable colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A todos aquellos que conciben la investigación de una manera similar a la mía. No desistáis, se puede.

A todos los que me lo han puesto difícil, gracias, esto no sería sin vosotros. Me habéis hecho crecer, y aunque seguro que no era esa vuestra intención, gracias, gracias, gracias. Dicen que lo que no nos mata, nos hace más fuertes.

A Kistina y Paco, por estar a mi lado, por la compañía y el respeto.

A mis bisabuelas, Flora y Teresa, dos tremendas mujeres. Está más que claro que heredé de vosotras más información genética de la que imaginaba. No está mal, nada mal.

A mi abuela, María Pazos Chas, por ser una pieza clave en mi vida.

A mi familia, pero por encima de todas las cosas de El Universo:

A MIS MADRES
GARMÍN
Y MARÍA

Carminha 25/3/2007

Introducción.....	1
I.- Introducción	3
I.1.- La Verticilosis	3
I.1.1.- El género <i>Verticillium</i>	3
I.1.2.- Supervivencia y dispersión de <i>V. dahliae</i>	3
I.1.3.- Ciclo de infección de <i>V. dahliae</i>	6
I.1.4.- Sintomatología	7
I.1.5.- Mecanismos de penetración del patógeno.....	8
I.2.- Solanáceas	8
I.2.1.- El pimiento	9
I.2.2.- El Tomate.....	10
I.2.2.1.- Genes de resistencia	11
I.2.2.2.- Cultivo de tomate <i>in vitro</i>	12
I.3.- Interacción planta patógeno	13
I.3.1.- Especies reactivas de oxígeno.....	14
I.3.1.1.- H ₂ O ₂	18
I.3.1.1.1.- Inducción de genes de defensa mediada por H ₂ O ₂	18
I.3.2.- Fenilalanina amonio liasa.....	19
I.3.2.1.- Fenilalanina amonio liasa y compuestos fenólicos	21
I.3.2.1.1.- Compuestos fenólicos	21
I.3.2.1.2.- Ligninas.....	22
I.3.2.1.3.- Compuestos fenólicos y su unión a la pared por la enzima peroxidasa	25
I.4.- PCR en tiempo real	27
I.4.1.- Aplicaciones.....	28
I.4.1.1.- Detección y cuantificación de patógenos.....	28
I.4.1.2.- Expresión génica	30
I.4.2.- Bases teóricas de la PCR en tiempo real	30
I.4.3.1.- Eficiencia de la amplificación	31
I.4.3.2.- Método $\Delta\Delta Ct$	31
I.5.- Genoteca substractiva.....	33
Objetivos	35
II.- Objetivos.....	37
Material y Métodos.....	39
III. Material.....	41
III.1.- Reactivos	41
III.2.- Material Instrumental	44
III.3.- Material biológico	45
III.3.1.- Material vegetal.....	45
III.3.2.- Material fúngico.....	45
III.4.- Métodos	46
III.4.1.- Mantenimiento del material fúngico.....	46
III.4.2.- Método de inoculación.....	46
III.4.3.- Seguimiento de la enfermedad en los distintos cultivares de solanáceas	47
III.4.4.-Recogida de muestras en invernadero: plantas, agua y suelo	47

III.4.5.- Extracción del DNA en los distintos cultivares de solanáceas inoculados y en las muestras recogidas en los invernaderos	48
III.4.5.1.- Extracción en tejido vegetal.....	48
III.4.5.2.- Extracción en agua de riego	49
III.4.5.3.- Extracción en suelo	49
III.4.6.- Cuantificación de <i>V. dahliae</i> en plantas de tomate y pimiento	49
III.4.6.1.-Diseño de cebadores	49
III.4.6.2.-Ensayo de PCR	50
III.4.6.3.- Análisis estadístico.....	50
III.4.7.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> en plantas de tomate	51
III.4.7.1.- Efecto de la inoculación para la determinación de los niveles de H ₂ O ₂	51
III.4.7.2.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre la actividad peroxidasa de <i>L. esculentum</i>	52
III.4.7.2.1.- Extracción de la peroxidasa total	52
III.4.7.2.2.- Determinación de la actividad peroxidasa	52
III.4.7.3.3.- Isoelectroenfoque analítico	52
III.4.7.2.3.1.- Preparación de los geles y de la cubeta	52
III.4.7.2.3.2.- Cargado de las muestras e isoelectroenfoque	53
III.4.7.2.3.3.-Revelado de los geles	53
III.4.7.3.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> en los fenoles presentes en <i>L. esculentum</i>	53
III.4.7.3.1.- Extracción de los compuestos fenólicos	53
III.4.7.3.2.- Medida de los compuestos fenólicos	54
III.4.7.3.3.- Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC.....	54
III.4.7.4.- Estudio de los cambios en la pared celular de plantas de tomate resistentes inoculadas con <i>V. dahliae</i>	56
III.4.7.4.1.- Obtención de paredes celulares.....	56
III.4.7.4.2.- Medida de ligninas de paredes celulares de plantas de <i>L. esculentum</i>	56
III.4.7.4.3.-Oxidación con nitrobenzeno de paredes celulares de plantas de <i>L. esculentum</i>	57
III.4.7.4.4.- Tioacidolisis de paredes celulares de raíces de <i>L. esculentum</i>	58
III.4.7.5.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre la medida de la actividad Fenilalanina amonio liasa	59
III.4.7.5.1.- Extracción de la enzima Fenilalanina amonio liasa.....	59
III.4.7.5.2.-Medida de la actividad de la enzima Fenilalanina amonio liasa	59
III.4.7.5.3.- Medida de la expresión génica de los distintos homólogos PAL	59
III.4.5.7.3.1.-Extracción de RNA	59
III.4.5.7.3.2.-Diseño de cebadores	60
III.4.5.7.3.3.- Ensayo de RT-PCR en tiempo real	61
III.4.5.7.3.4.-Análisis evolutivo	61
III.4.8.-Obtención y caracterización de líneas celulares de <i>L. esculentum</i> cultivar Gardener	62
III.4.8.1. Obtención de plantas <i>in vitro</i>	63

III.4.8.2.- Inducción, optimización y mantenimiento de callos de <i>L. esculentum</i>	63
III.4.8.3.- Obtención, optimización y mantenimiento de suspensiones celulares	64
III.4.8.4.- Caracterización del crecimiento de las suspensiones celulares	65
III.4.8.4.1.- Determinación del volumen de empaquetamiento celular (PCV)	65
III.4.8.4.2.- Determinación de la conductividad (Con) y pH.....	66
III.4.8.5.- Elicitación de suspensiones celulares de la línea de tomate resistente a <i>V.dahliae</i>	66
III.4.8.5.1.- Elicitación con un agente oxidante, H ₂ O ₂	66
III.4.8.5.2.-Elicitación con micelio liofilizado de <i>V. dahliae</i>	66
III.4.8.5.3.-Elicitación con micelio liofilizado de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	67
III.4.8.5.4.- Irradiación de suspensiones celulares con UV	67
III.4.9.- Hibridación sustractiva por supresión (SSH)	67
Resultados	69
IV.- Resultados	71
IV.1.- Detección y cuantificación de <i>V. dahliae</i> en distintos cultivares de Solanáceas.....	71
IV.1.1.- Diseño de cebadores.....	71
IV.1.2.- Ensayos de especificidad	71
IV.1.3.- Detección y cuantificación de <i>V. dahliae</i> en plantas de pimiento	73
IV.1.4.- Detección y cuantificación de <i>V. dahliae</i> en plantas susceptibles y resistentes de tomate	76
IV.1.5.- Detección y cuantificación de <i>V. dahliae</i> en muestras de invernadero	77
IV.2.- Caracterización de la interacción <i>V. dahliae</i> - <i>L. esculentum</i>	78
IV.2.1.- Contenido en H ₂ O ₂	79
IV.2.2.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre la actividad de la enzima Peroxidasa	80
IV.2.2.1.- Actividad de la enzima Peroxidasa	80
IV.2.2.2.- IEF de Peroxidasa en raíces, controles e inoculadas de las líneas de tomate, susceptible LA 3030 y resistente LA 3038 a <i>V. dahliae</i>	81
IV.2.2.3.- Estudio del metabolismo compuestos fenólicos: fenoles totales, fenoles ligados a pared y ligninas	82
IV.2.2.3.1.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre los fenoles totales y fenoles ligados a pared	82
IV.2.2.3.1.1.- Cuantificación de compuestos fenólicos totales en raíces	82
IV.2.2.3.1.2.- Identificación mediante HPLC-DAD de los compuestos fenólicos ligados a paredes celulares en raíces de las líneas LA 3030 y LA 3038 de <i>L. esculentum</i> cv Gardener, inoculadas con <i>V. dahliae</i>	83
IV.2.2.3.2.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre las ligninas de plantas de tomate	85

IV.2.2.3.2.1.- Cuantificación de las ligninas en paredes celulares de raíces de <i>L. esculentum</i> inoculadas con <i>V.dahliae</i>	85
IV.2.2.3.2.2.- Estudio de la composición monomérica y nivel de polimerización de las ligninas en paredes celulares de raíces de <i>L. esculentum</i> inoculadas con <i>V.dahliae</i>	86
IV.2.2.3.2.2.1.- Tioacidolisis	88
IV.2.2.3.2.2.2.- Oxidación con nitrobenzeno	91
IV.....	93
2.3.- Estudio de la Fenilalanina amonio liasa	93
IV.2.3.1.- Medida de la actividad Fenilalanina amonio liasa.....	93
IV.2.3.2.- Expresión génica de los distintos homólogos <i>PAL</i>	94
IV.2.3.2.1.- Búsqueda y diseño de cebadores de los distintos homólogos <i>PAL</i>	94
IV.2.3.2.2.- Especificidad de los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los distintos homólogos <i>PAL</i>	97
IV.2.3.2.3.- RT-PCR semicuantitativa en distintos órganos de ambas líneas de tomate, LA 3030 y LA 3038 controles.....	97
IV.2.3.2.4.- Análisis de expresión de los homólogos <i>PAL 2</i> , <i>PAL 3</i> , <i>PAL 4</i> y <i>PAL 6</i> mediante RT-PCR en raíces de plantas control.....	99
IV.2.3.2.5.- Análisis de los homólogos <i>PAL</i> de mayor expresión mediante RT-PCR en tiempo real durante la interacción de las líneas isogénicas de <i>L. esculentum</i> cv. Gardener, LA 3030 y LA 3038 con <i>V. dahliae</i>	100
IV.2.3.2.6.- Relaciones filogenéticas de los genes <i>PAL</i>	102
IV.3.- Inducción y mantenimiento de callos de <i>L. esculentum</i>	105
IV.3.1.- Caracterización del crecimiento de suspensiones celulares de <i>L. esculentum</i>	105
IV.3.2.- Inducción de suspensiones celulares de <i>L. esculentum</i> cv Gardener línea LA 3038	106
IV.3.2.1.- Cuantificación de H ₂ O ₂ en cultivos celulares elicitados con luz UV, H ₂ O ₂ , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>licopersici</i> y <i>V. dahliae</i>	107
IV.3.2.1.1.- Cuantificación en el fluido extracelular.....	107
IV.3.2.1.2.- Cuantificación de H ₂ O ₂ en células del cultivo.....	108
IV.3.2.2.- Actividad POD en el fluido extracelular de cultivos de tomate elicitados con luz UV, H ₂ O ₂ , ácido Ascórbico, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>licopersici</i> y <i>V. dahliae</i>	109
IV.3.2.3.- Actividad <i>PAL</i> en las células de cultivos de tomate elicitados con H ₂ O ₂ , luz UV, <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> y <i>V. dahliae</i>	111
IV.3.2.- Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de los genes <i>PAL</i> en cultivos celulares	112
IV.3.2.1.- Análisis de los homólogos <i>PAL</i> en cultivos elicitados con H ₂ O ₂	112
IV.3.2.2.- Análisis de los homólogos <i>PAL</i> en cultivos elicitados con H ₂ O ₂ +Ácido ascórbico	113
IV.3.2.3.- Análisis de los homólogos <i>PAL</i> en cultivos elicitados con luz UV	114
IV.3.2.4.- Análisis de los homólogos <i>PAL</i> en cultivos resistentes elicitados con <i>F. oxysporum</i>	115

IV.3.2.5.- Análisis de los homólogos <i>PAL</i> en cultivos resistentes elicitados con <i>V. dahliae</i>	116
IV.4.- Genoteca substractiva LA 3038 vs LA 3030	117
Discusión	119
V. Discusión.....	121
V.1.- Detección y cuantificación de <i>V. dahliae</i> mediante la técnica de qPCR en tiempo real	121
V.2.- La respuesta de Resistencia a <i>V. dahliae</i> mediada por el gen <i>Ve</i> de tomate implica al H ₂ O ₂ , la peroxidasa e induce la expresión específica de los genes <i>PAL</i>	126
V.2.1.- Contenido en H ₂ O ₂	127
V.2.2.- Estudio de la actividad Peroxidasa	127
V.2.2.1.- Implicación de la Peroxidasa en la unión a pared celular de compuestos fenólicos.....	128
V.2.2.1.1.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre los compuestos fenólicos ligados a pared celular de plantas de tomate	128
V.2.2.1.2.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre las ligninas de plantas de tomate	131
V.2.3.- Estudio de la actividad fenilalanina amonio liasa.....	136
V.2.3.1.- Estudio de la actividad fenilalanina amonio liasa	136
V.2.3.2.- Estudio de los distintos homólogos <i>PAL</i>	136
V.2.3.2.1.- Análisis de los distintos homólogos <i>PAL</i> mediante RT-PCR semicuantitativa	137
V.2.3.2.2.- Análisis de expresión de distintos homólogos <i>PAL</i> mediante RT-PCR en tiempo real.....	138
V.2.3.2.3.- Efecto de la inoculación de plantas de tomate con <i>V. dahliae</i> sobre los distintos homólogos <i>PAL</i> mediante RT-PCR en tiempo real	138
V.2.3.2.4.- Análisis evolutivo de los distintos homólogos <i>PAL</i>	140
V.3.- Estudio de la expresión de los distintos homólogos <i>PAL</i> en el tratamiento de suspensiones celulares de tomate con distintos elicitores bióticos y abióticos.....	142
V.4.- Análisis de expresión diferencial en la interacción compatible e incompatible <i>L. esculentum-V. dahliae</i> mediante la técnica de SSH	147
Conclusiones	149
VI.- Conclusiones	151
Bibliografía	153
VII.- Bibliografía	155

ABREVIATURAS

APX	Ascorbato peoxidasa
CAIc	Alcohol coniférico
CAId	Aldehído coniférico
CAT	Catalasa
DHCA	Dihidroconiferil alcohol
dpi	Días post inoculación
EDTA	Etilenediamina-ácido-tetracético
EtSH	Etanotiol
Fer	Ferúlico
G	Guayacilo
H	Hidroxifenilo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
hpi	Horas post inoculación
MeOH	Metamol
mpe	Minutos post inoculación
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH ⁻	Radical hidroxilo
PAL	Fenilalanina amonio liasa
pC	P-cumárico
PDA	Potato dextrosa agar
PDA-S	Potato dextrosa agar con estreptomina
POD	Peroxidasa
PVPP	Polivinilpoli-pirrolidona
S	Siringilo
SAIc	Alcohol sinapílico
SAId	Aldehído sinapílico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
V	Vanillina
WA	Agua agar

Introducción

I.- Introducción

I.1.- La Verticilosis

I.1.1.- El género *Verticillium*

El género *Verticillium* Nees se encuentra dentro del grupo Deuteromiceto y pertenece al orden Moniliales familia Molinaceae. Este género cuenta con los principales hongos patógenos del mundo, que afectan sobre todo a cultivos de zonas frías y templadas aunque también se han detectado en áreas tropicales y subtropicales. De estos patógenos podemos destacar *Verticillium dahliae* Kleb., *V. albo-atrum* Reinke y Berth., *V. nigrescens* Pethybr., *V. nubilum* Pethybr., *V. tricorpus* Isaac., *V. theobromae* (Turc) Mas. y Hughes y *V. fungicola* (Preuss) Hassebrauk (= *V. malthousei* Ware), hongos patógenos de árboles, plantas herbáceas y numerosos cultivos económicamente importantes como el tomate o el pimiento. *V. dahliae* y *V. albo-atrum* son los patógenos causantes de marchitez más importantes a nivel económico, mientras que las otras especies del género causan enfermedades de menos importancia, como es el caso de *V. fungicola*, que devasta los cultivos de champiñón (Pegg y Brady, 2002).

I.1.2.- Supervivencia y dispersión de *V. dahliae*

La fuente de la infección por *V. dahliae* está en el suelo, ya que es un hongo edáfico que puede encontrarse casi a cualquier profundidad. Ha sido detectado a profundidades de 50-80 cm, aunque es en los 30 primeros centímetros donde su presencia es más importante (Palazón y Palazón, 1989). Se puede considerar que la supervivencia de *Verticillium* spp. ocurre de cultivo a cultivo o de estación a estación (Pegg y Brady, 2002). Este patógeno frecuentemente está bien adaptado a la vida saprófita en su forma de resistencia, los microesclerocios, que le permiten vivir en el suelo en ausencia de huésped durante décadas. Los conidios y las hifas también pueden encontrarse en el suelo pero durante un corto período de tiempo (Palazón y col., 1978; Dobinson, 1995).

En las plantas infectadas pueden encontrarse todo tipo de estructuras: conidios, micelio o microesclerocios, mientras que en los restos vegetales únicamente se detectan microesclerocios (Powelson, 1970; Pegg, 1974, 1985; Schnathorst, 1981; DeVay y Pullman, 1984). *V. dahliae* puede, además, colonizar tejidos de plantas no-huésped, como cereales, que actúan como verdaderos reservorios del hongo (Wilhelm, 1950). El hongo se instala superficialmente en las raíces sin que la colonización progrese por el sistema vascular y forma microesclerocios inmediatamente después de penetrar (Palazón y Palazón, 1989).

La diseminación de esta especie puede producirse por el viento, el agua de riego, el laboreo, por el contacto entre raíces sanas y enfermas e incluso, en el caso de especies leñosas, por los instrumentos de poda. El hecho de que este hongo sea vascular y que la incubación de la enfermedad sea relativamente lenta puede permitir la difusión del hongo pasando desapercibido por el trasplante a partir de semilleros infectados (Palazón y Palazón, 1989). Isaac, (1953) consideraba que el contacto raíz-raíz debía de ser el mecanismo más común y rápido para la distribución de especies de *Verticillium*. Este hecho se ve corroborado por la propensión a la esporulación en el suelo y en raíces dañadas de forma natural (Pegg, 1985) y por la infección de raíces intactas (Bewley, 1922; Nelson, 1950).

La dispersión de conidios por el aire no está clara y en el caso de que se dispersen no siempre lleva a la contaminación de plantas (Davies e Isaac, 1958). La posibilidad de una exitosa infección aérea ha sido descartada por diversos autores (Bonifacio, 1974; Bonifacio y Parrini, 1975; Jimenez-Díaz y Millar, 1988;) debido a la falta de evidencias que demuestren este hecho.

En cuanto a la dispersión a través del agua, Easton y col. (1969) encontraron microesclerocios de *V. dahliae* en canales de irrigación de campos de patata a pesar de no estar presentes en las fuentes de los canales de riego. La importancia de este descubrimiento es debida a la posible distribución de la enfermedad por el reciclaje del agua de irrigación.

La producción de inóculo en órganos vegetales capaces de separarse del huésped puede ser un aspecto importante en la transmisión y dispersión

del hongo (Pegg y Brady, 2002). Así, se ha visto que las hojas de olivo contienen microesclerocios de *V. dahliae* (Tjamos y Tsongriani, 1990). También está muy bien documentada la transmisión del patógeno por semillas con restos de micelio o microesclerocios (Van der Spek, 1973) en espinaca (Snyder y Wilhelm, 1962), guisante (Maden, 1987) o cártamo (*Carthamus tinctoria*) (Klisiewicz, 1974, 1975). En *Capsicum*, la transmisión de *V. dahliae* por las semillas ha sido descrita en Corea (Park y Kim, 1986), en 22 cultivares en Albania (Ibrahimllari, 1987) y en España (Palazón y Palazón, 1989). Sackston (1980, 1983) consideró que las semillas de cultivares resistentes podrían transmitir el patógeno ya que pueden actuar como reservorios, pudiendo permanecer el hongo viable en las semillas durante 8 meses (Sheppard y Needham, 1980).

La transmisión también puede producirse por la intervención de animales, como insectos, nemátodos y anélidos. Se han descritos muchos casos de insectos causantes de la enfermedad en diversos cultivares. Popushoi y Kulik (1976) comprobaron que la infección del albaricoque en Moldavia por *V. dahliae* era transmitida por el escarabajo de la corteza del fruto (bark beetle) *Scolytus rugulosus*. Se ha demostrado también que las lombrices (*Lumbricus terrestris*), debido al contacto con tallos subterráneos y hojas de plantas de menta (*Mentha piperita*) infectadas por *V. dahliae*, acarrear microesclerocios de este patógeno (Melouk y Horner, 1976). Desde hace muchos años, simples observaciones de campo permitieron reconocer la relación sinérgica entre nemátodos y las enfermedades vasculares que provocan marchitez en un amplio rango de cultivos. Estudios pioneros de Mountain y McKein (1960) confirmaron un incremento en la incidencia de la verticilosis en berenjena en presencia del nemátodo *Pratylenchus penetrans*.

Las prácticas agrícolas también han contribuido a la distribución y dispersión del patógeno. Los restos de un cultivo favorecen el aumento de los microesclerocios o micelio y el transporte accidental de estos restos es la principal fuente de una nueva infección (Howard, 1985). También Baudin y Lepoivre (1984) demostraron la transferencia de microesclerocios de *V. dahliae* a tomates por medio de fangos residuales.

I.1.3.- Ciclo de infección de *V. dahliae*

La infección de la planta se inicia en la raíz directamente a través de la epidermis o bien por heridas (Figura I.1.). Se pueden distinguir dos fases: una fase epífita donde los microsclerocios germinan en respuesta a los exudados de la raíz (Huisman y Gerik 1989; Lucas, 1998) y se produce la colonización del córtex, fase que no está relacionada con la patogenicidad ni con la invasión vascular, y una fase de entrada al sistema vascular donde las hifas crecen atravesando los tejidos de la raíz, bien a través de la superficie intacta o bien a través de heridas, hasta llegar al xilema. En el xilema el micelio prolifera y produce conidios que son liberados y arrastrados por la corriente transpiratoria, de modo que se produce una rápida infección del sistema vascular (Blanco, 1996; Heinz y col., 1998). Las esporas quedan retenidas en las punteaduras o en las paredes terminales de los vasos, donde germinan, para penetrar posteriormente en los vasos adyacentes y comenzar un nuevo ciclo infeccioso. Una vez que el hongo se ha establecido en la planta empiezan a manifestarse los síntomas de la enfermedad.

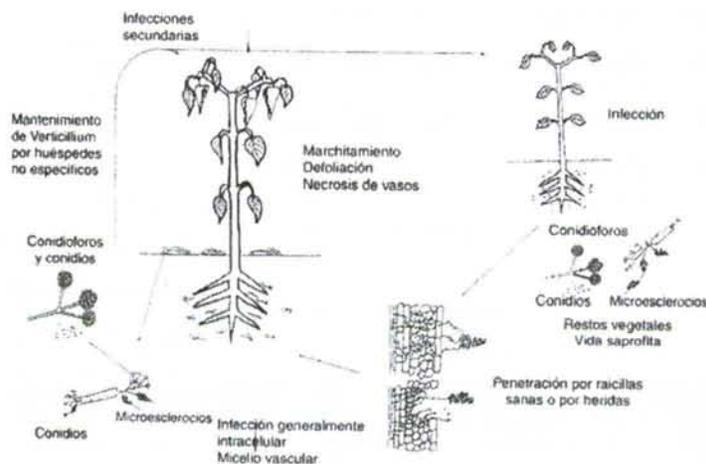


Figura I.1.- Ciclo de infección de *V. dahliae* en el pimiento (tomado de Nuez y col., 1996).

I.1.4.- Sintomatología

La verticilosis originada por *V. dahliae* es una micosis vascular cuyos síntomas en las plantas enfermas fundamentalmente son: marchitamientos parciales o totales debido a la pérdida de turgencia de los tejidos, enrollamientos de las hojas adultas, defoliación, decoloración de los órganos aéreos, oscurecimiento de los haces vasculares y menor desarrollo de la planta. A nivel de parcela los síntomas aparecen precozmente, pero tienen una progresión lenta de 30 días y se producen por rodales (Palazón y Palazón, 1989; Fradin y Thomma, 2006).

La "tristeza" está estrechamente relacionada con la alteración del equilibrio hídrico. Así, en la patata se ha visto que *V. dahliae* reduce el potencial hídrico aunque no se producen cambios en el potencial osmótico (Sadras y col., 2000), y en el pimiento se ha observado que desde el primer día tras la inoculación ya hay un descenso en el potencial hídrico y un aumento en la concentración del aminoácido prolina, típico síntoma del estrés causado por la sequía (Goicoechea y col., 2000).

En un principio se postuló que el crecimiento del patógeno en el sistema vascular era el responsable de la oclusión, pero la biomasa del hongo en el xilema no es suficiente para ser la causa de la marchitez (Bishop, 1988). La formación de tilosas y geles ante una invasión vascular o ante heridas es común para un amplio rango de especies. Además, la invasión del patógeno provoca una serie de cambios en el revestimiento de los haces vasculares que sirven para prevenir el movimiento lateral del agua y que tienen como consecuencia el oscurecimiento de los haces vasculares (Bishop, 1988; Sadras y col., 2000). Por tanto podría concluirse que la oclusión vascular es el principal factor responsable de la marchitez, que se produce por el resultado de numerosos factores en los que intervienen la acción directa del patógeno, su interacción con la planta y la respuesta de ésta (Bishop, 1988; Blanco, 1996).

1.1.5.- Mecanismos de penetración del patógeno

La patogénesis se produce en varias etapas: localización de la planta huésped, adhesión a la superficie, penetración, colonización de los tejidos del huésped, supresión de los mecanismos de defensa de la planta, reproducción del patógeno y, por último, su dispersión (Lucas, 1998). El resultado de la interacción entre la planta y el patógeno, y por tanto, del desarrollo o no de la enfermedad depende de los genotipos de ambos organismos y de las condiciones ambientales a las que ambos están sometidos (Hahn y col, 1997).

V. dahliae entra a través de la raíz por heridas o por la superficie intacta y la primera línea de defensa que tiene que atravesar es la pared celular (Schäfer, 1994; Jiménez-Díaz, 1996). La pared celular constituye un exoesqueleto que protege, soporta mecánicamente a la célula y mantiene el balance de la presión osmótica. Está compuesta por tres tipos de polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas. Además contiene proteínas, lípidos y minerales y en los últimos estados del desarrollo también puede presentar grandes cantidades de lignina; en los órganos aéreos está recubierta por una capa llamada cutícula formada por ceras, cutina y suberina.

La mayoría de los patógenos y organismos saprófitos, incluyendo bacterias, nemátodos y hongos, necesitan abrir una brecha en esas barreras para acceder a los tejidos de la planta. Los hongos fitopatógenos son conocidos por producir un rango de enzimas extracelulares que permiten la penetración y colonización del huésped (Lehtinen, 1993). Está generalmente aceptado que el arsenal enzimático contribuye, junto con las fuerzas mecánicas, a la degradación tanto de la cutícula como de la pared celular (De Lorenzo y col., 1997; Novo y col., 2006).

1.2.- Solanáceas

La familia de las Solanáceas es una de las más grandes del reino vegetal, con más de 3,000 especies diseminadas por todo el mundo, pero sobre todo en América tropical. Incluye importantes especies comestibles y

de gran interés económico, como la patata (*Solanum tuberosum* L.), la berenjena (*Solanum melongena* L.) el tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y el pimiento (*Capsicum annuum*). También incluye especies ornamentales de los géneros *Browallia*, *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Datura*, *Nicotiana*, *Salpiglossis*, *Solanum*, *Solandra*, etc. Esta familia se caracteriza por contar con abundantes especies que contienen diversos tipos de alcaloides más o menos activos o venenosos, tales como la escopolamina, la atropina, la hiosciamina y la nicotina. Se encuentran en plantas como el beleño (*Hyoscyamus albus*), la belladona (*Atropa belladonna*), el estramonio (*Datura stramonium*), la mandrágora (*Mandragora autumnalis*), el tabaco y otras.

1.2.1.- El pimiento

La mayor parte de las variedades de pimiento cultivadas pertenecen a la especie *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. El género *Capsicum* pertenece al orden Tubiflora, familia Solanácea. Casi todas las especies de pimiento son originarias de la zona tropical e intertropical de América del Sur, en la región comprendida entre Bolivia y Perú. Después del descubrimiento de América el pimiento llegó a España y por sus especiales características fue muy pronto utilizado como substitutivo de la pimienta, que en estos tiempos todavía era monopolio de los mercaderes italianos y por lo tanto de precio muy elevado.

En Galicia, una de las variedades más significativas es la de Padrón, muy apreciada por los consumidores. En la provincia de La Coruña se cultiva mayoritariamente en la comarca de Padrón y en la de Bergantiños, mientras que en la provincia de Pontevedra, en las de Cambados y el Rosal.

En el ámbito gallego, la verticilosis del pimiento supone una grave amenaza para la producción del pimiento de Padrón (Pomar y col., 2001; Saavedra y col., 2003). Las pérdidas debidas a este patógeno del suelo son significativas, y no existe en la actualidad ningún procedimiento que permita su control. Los estudios realizados para encontrar resistencia a *V. dahliae* dentro de la especie *C. annuum* han resultado infructuosos (Barriuso y col., 1989; González-Salán y Bosland, 1992; Palloix y col., 1990), por lo que es

necesario plantearse el estudio de la resistencia en otras especies. Algunos autores señalan a las especies *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. baccatum* como resistentes a *V. dahliae* basándose en ensayos de virulencia en los que se cuantifican los síntomas de la enfermedad.

En las últimas décadas, el cultivo de variedades resistentes se ha revelado como una estrategia adecuada para la lucha contra los patógenos vegetales. Aporta una gran efectividad con un coste económico bajo y, debido al escaso uso de agroquímicos, su impacto nocivo en el medio ambiente es prácticamente nulo. Al no disponer en la actualidad de variedades de pimiento resistentes a *V. dahliae*, el estudio de los mecanismos de resistencia frente a este patógeno tiene que realizarse a partir de otras especies relacionadas.

1.2.2.- El Tomate

El tomate, *Lycopersicon esculentum*, es una planta que pertenece a la familia Solanaceae, natural del Oeste de Sudamérica y Centroamérica, en la zona que comprende desde el sur de México a Perú. Es una planta perenne efímera, cultivada como una planta anual (Graf, 1992). De acuerdo con Andrew Smith (1994), el tomate se originó muy probablemente en las tierras altas de la costa occidental de Sudamérica. En todo caso, el tomate emigró a América Central por diversos medios. Los mayas y otras culturas de la región utilizaron la fruta para su consumo y ya hacia el siglo XVI se cultivaba en México meridional, y probablemente en otras áreas. Los españoles distribuyeron el tomate a lo largo de sus colonias en el Caribe después de la conquista de Sudamérica. También lo llevaron a Filipinas y por allí entró al continente asiático. El cultivo de los frutos comestibles del tomate actualmente se encuentra extendido alrededor del mundo, con miles de cultivares obtenidos a partir de una amplia variedad de especies.

Los tomates cultivados varían en tamaño desde el tomate *cherry*, cuyo fruto tiene entre 1 y 2 cm, hasta los tomates *beefsteak* que alcanzan más de 10 cm de diámetro. Las variedades más ampliamente comercializadas tienden a estar entre los 5 y 6 cm de diámetro. La mayoría de los cultivares

producen frutos rojos, pero también existen algunos con frutos amarillos, naranja, rosados, púrpura, verdes o blancos. También se pueden encontrar frutos multicolores y rayados. En el conjunto de España, el tomate supone el principal cultivo hortícola, con una superficie cultivada de 63,030 hectáreas en 2002 (MAPA, 2003). *Verticillium spp* es uno de las agentes patógenos más importantes que amenaza este cultivo, y es responsable de importantes pérdidas económicas.

1.2.2.1.- Genes de resistencia

El único gen de resistencia a *Verticillium* conocido en Solanáceas es el gen *Ve* de tomate (Kawchuk y col., 2001). Este locus está compuesto por dos genes ligados, *Ve1* y *Ve2*, cada uno de los cuales es capaz de conferir resistencia a distintas especies de *Verticillium*. La estructura de los genes *Ve* sugiere que codifican glicoproteínas de superficie celular con señales de endocitosis mediada por receptores y con motivos de cremallera de leucina, en *Ve1*, o secuencias PEST, en *Ve2*. Las secuencias ricas en repeticiones de leucina (LRR), presentan homologías con las proteínas parecidas a receptor, RLPs (Kruijt y col., 2005). Actualmente no se conoce si los dos genes están implicados en la unión directa con el mismo elicitor del patógeno, ni dónde se establece la resistencia mediada por el gen *Ve* en la planta. Con el término "elicitor" se hace referencia a aquellos factores del patógeno capaces de desencadenar una respuesta hipersensible en la planta. Como el hongo está presente en el xilema, incluso en plantas resistentes, esto hace especular que las proteínas de resistencia *Ve* ejercen su actividad en las células del parénquima que rodean al xilema.

Aparte de los genes *Ve*, también pertenecen a la clase *RLP* de genes de resistencia el gen de resistencia *Cf* de tomate frente al hongo patógeno *Cladosporium fulvum*, y el gen *LeEix* del tomate, que participa en el mecanismo de percepción de un elicitor xilanasa inductor de etileno (EIX) para el biocontrol del hongo *Trichoderma viride* (Kruijt y col., 2005; Ron y Avni, 2004; Toma y col., 2005). Todos ellos codifican proteínas extracelulares implicadas en el reconocimiento del elicitor, con un dominio transmembrana y

una cola citopasmática corta que carece de dominios de señal obvios. Sin embargo, se ha predicho que muchos genes *RLP* contienen zonas conservadas de endocitosis típicas de mamíferos dentro de sus dominios citoplasmáticos cortos (Kawchuk y col., 2001; Kruijt y col., 2005; Ron y Avni, 2004).

Se ha comprobado que plantas de patata transformadas con cada uno de los genes *Ve* adquirirían resistencia al hongo, lo que indica que el resto de la maquinaria necesaria para la interacción incompatible con *Verticillium* está presente y es funcional como mínimo en otras especies de Solanáceas. Resulta razonable suponer que la misma maquinaria es activa en variedades susceptibles de tomate. En el trabajo de Tai y col. (1999) la introducción del gen de pimiento *Bs2*, responsable de la resistencia a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, convierte a las plantas transgénicas de tomate en resistentes a esta bacteria, lo que revela cierta superposición entre respuestas resistentes de pimiento y tomate.

La posibilidad de utilizar variedades de tomate emparentadas que difieran en la presencia o ausencia del gen de resistencia a *Verticillium*, gen *Ve*, proporciona un inmejorable sistema biológico para la identificación de aquellos factores que están específicamente relacionados con la resistencia a *Verticillium* en Solanáceas.

I.2.2.2.- Cultivo de tomate in vitro

La aplicación de métodos clásicos, cultivo de plantas y sus patógenos, en los programas de estudio de variedades resistentes a patógenos, además de ser muy laborioso y requerir mucho tiempo, plantea una serie de problemas de muy difícil solución. En efecto, los factores que intervienen en el desarrollo de interacción huésped patógeno son muchos (densidad del inóculo, edad del órgano, estado nutricional etc) (Resende y col., 1995), y por tanto difíciles de controlar por los procedimientos habituales, por lo que el grado de resistencia de una planta frente a un patógeno no es fácil de establecer en términos absolutos (Collin y Edwards, 1998). Sin embargo, la utilización de técnicas de cultivo *in vitro* se presenta como un procedimiento

adecuado tanto para el estudio de las interacciones huésped patógeno, como para la selección de líneas celulares resistentes a una determinada enfermedad.

La técnica del cultivo de tejidos celulares de plantas ocupa un papel clave en la "segunda revolución verde" en la que la modificación genética y la biotecnología han sido utilizadas para incrementar el rendimiento y la calidad. Para solucionar el problema del alto número de plantas requerido para los estudios *in vitro* se utilizan las suspensiones celulares (Egea, 2001).

Las células en suspensión pueden ser empleadas como sistema modelo para identificar los posibles eventos bioquímicos inducidos en respuesta a un ataque fúngico (Corchete y col., 1993), y constituyen un sistema apropiado para el estudio de la respuesta de defensa de las plantas ya que proporcionan una ilimitada fuente de material repetible exento de fluctuaciones. Una ventaja adicional es que las suspensiones celulares pueden ser rápida y uniformemente expuestas a la adición de elicitores (Egea, 2001).

La elicitación parece ser la técnica más apropiada para incrementar las tasas de producción de metabolitos y enzimas relacionadas. Varios son los agentes elicitores que se pueden emplear, incluyendo moléculas de origen microbiano (bioelicitores) y algunas otras inorgánicas como sales de metales pesados y detergentes (elicitores abióticos). Estas sustancias desencadenan reacciones de defensa en las plantas que son acompañadas por algunos acontecimientos bioquímicos, como la producción de metabolitos secundarios y la síntesis de enzimas como la quitinasa y peroxidasa, que están implicadas en algunos mecanismos de defensa (Flocco, 1998).

1.3.- Interacción planta patógeno

La respuesta temprana de las plantas a la infección por patógenos determina el grado de colonización, así como el daño causado por éste. Durante la interacción compatible un patógeno virulento se extiende desde el punto de entrada y causa un daño celular más allá del sitio de infección, con el consiguiente desarrollo de la enfermedad. Durante la interacción

incompatible las células de las plantas responden limitando la progresión del patógeno mediante una serie de estrategias de resistencia a la enfermedad que incluyen la estabilización de la pared celular (Bradley y col., 1992), la clausura o cierre de los estomas (Hammond-Kosack y col., 1996), la biosíntesis de fitoalexinas (Nicholson y Hammerschmidt, 1992), la expresión de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y otros péptidos tóxicos, la inducción de un suicidio celular o muerte celular programada que limita el sitio de infección (Doke, 1983) y la generación de especies reactivas de oxígeno, principalmente ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Doke y col., 1996). El hecho de que la respuesta sea compatible o incompatible viene normalmente determinado por la presencia, en la planta, de un gen de resistencia al patógeno (McDowell y Woffenden, 2003).

1.3.1.- Especies reactivas de oxígeno

Una desafortunada consecuencia de la vida aeróbica es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se forman mediante la reducción parcial de la molécula de oxígeno (Vranova y col., 2002). Los organismos aeróbicos necesitan O_2 para la producción eficiente de energía. Durante la reducción de O_2 a H_2O , se pueden formar especies reactivas de oxígeno, radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Figura 1.2.).

Las plantas poseen una maquinaria compleja de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que protegen a las células del daño oxidativo mediante la eliminación de las ROS. Esto se hace evidente cuando las ROS se generan durante el ataque por patógenos o en situaciones de estrés abiótico, y son reconocidas por las plantas como una señal que conduce a la respuesta de defensa.

En las plantas, las ROS se generan en la membrana plasmática o extracelularmente en el apoplasto. Se ha considerado a la enzima NADPH oxidasa de la membrana plasmática como una fuente de ROS para la bolsa oxidativa, que es típica de la respuesta hipersensible frente a patógenos avirulentos (Sagi y Fluhr, 2001; Torres y col., 2002), de la respuesta de

defensa frente al herbivorismo (Sagi y col., 2004), y de la respuesta frente a estrés abiótico, como por ejemplo estrés por agua u ozono (Jinang y Zhang, 2002; Joo y col., 2005). Esta enzima también está implicada en procesos de desarrollo como la expansión celular y el crecimiento de raíces (Foreman, 2003; Renew y col., 2005), en la diferenciación del xilema (Ros Barceló, 2005), en la dominancia apical y en la apertura de las hojas (Sagi y col., 2004).

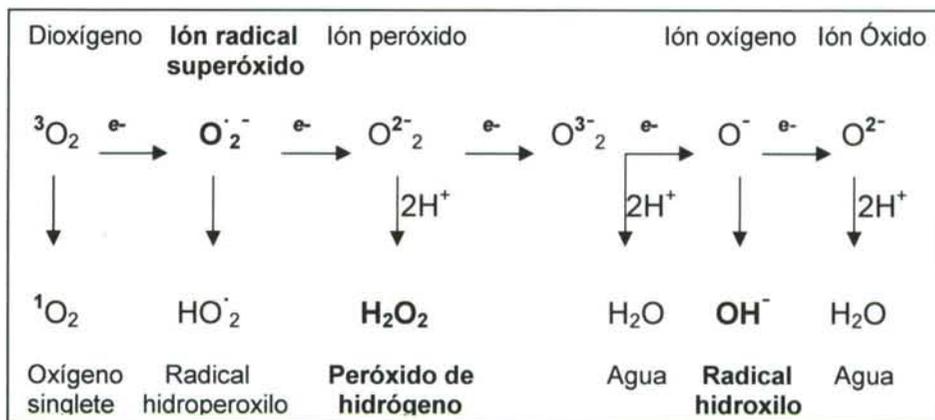


Figura 1.2.- Generación de las distintas especies reactivas de oxígeno mediante transferencia de energía. Tomado de Appel y Hirt, 2004.

La generación de especies reactivas de oxígeno en interacciones incompatibles parece ser un proceso bifásico. El incremento inicial de ROS es rápido y no específico y ocurre del mismo modo en interacciones compatibles. Únicamente se produce una segunda bolsa oxidativa, fuerte y prolongada, cuando las células de las plantas entran en contacto con patógenos o sus elicitores, que son capaces de conducir a una muerte celular hipersensible (Baker y Orlandi, 1995; Low y Mérida, 1996; Grant y Loake, 2000). Las formas predominantes de las ROS detectables en interacciones planta-patógeno son: ($\text{O}_2^{\cdot-}$), (H_2O_2) y (OH^{\cdot}).

La mayor parte de los compartimentos celulares tienen el potencial para ser una fuente de ROS (Tabla I.1). En el trabajo de Ashtamker y col. (2007) se han identificado sitios subcelulares para acumulación de H_2O_2 en el citoplasma, en el retículo endoplasmático y en la región nuclear. Además, sus resultados sugieren que la respuesta temprana inducida por la

criptogenina en las células de tabaco By-2 realmente se inicia dentro de las células, lo que sugiere que la producción de ROS extracelular pueda servir para amplificar señales procedentes de ROS internas.

Los mecanismos enzimáticos que conducen a la eliminación de las ROS en las plantas incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peróxidasa (APX) y catalasa (CAT) (Asada y Takahashi, 1987; Bowler y col., 1992; Willekens y col., 1997). El nivel de estas enzimas en la célula es crucial para determinar el balance del estado del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno (Bowler y col., 1991). Las diferencias en cuanto a la afinidad de APX (rango μM) y CAT (rango mM) por el H_2O_2 supone que pertenecen a diferentes clases de enzimas de eliminación del H_2O_2 : APX puede ser la responsable de una modulación fina para la señalización, mientras que CAT es responsable de la eliminación del exceso de ROS durante el estrés (Tabla.I.1) (Mittler, 2002).

La producción de intermediarios de oxígeno durante este estallido oxidativo es característica de la respuesta de defensa de las plantas (Doke y Ohashi, 1988; Baker y col., 1993; Legendre y col., 1993; Levine y col., 1994). Esta respuesta se ha observado en distintos sistemas planta-patógeno, frente a hongos (Doke, 1983), bacterias (Adam y col., 1989), virus (Doke y Ohashi, 1988) o elicitores (Apóstol y col., 1989). La bolsa oxidativa se ha correlacionado con la respuesta hipersensible (HR) (Tenhaken y col., 1995).

Una característica de los sistemas incompatibles es el aumento de las especies reactivas de oxígeno (Keppler y Baker., 1989), que pueden matar directamente al patógeno o limitar su colonización provocando la muerte de las células infectadas de la planta (Greenberg y col., 1994) e inducir el entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular (Bradley y col., 1992; Brisson y col., 1994). Ahora bien, los resultados de la infección en interacciones compatibles e incompatibles parecen más determinados por la velocidad de la respuesta que por las diferencias cualitativas entre ambos sistemas (Ciardi y col., 2000).

Tabla I.1.- Producción y eliminación de intermediarios de especies reactivas de oxígeno en plantas. Tomado de Mittler R., 2002.

Mecanismo	Localización	ROS primario	Referencia
Producción			
Fotosíntesis transporte electrónico y PSI o II	Clo	O_2^-	Asada y Takahashi, 1987; Asada, 1999.
Respiración ET	Mit	O_2^-	Dat y col., 2000; Maxwell y col., 1999.
Glicolato oxidasa	Per	H_2O_2	Corpas y col., 2001
Clorofila excitada	Clo	1O_2	Asada y Takahashi, 1987; Asada, 1999.
NADPH oxidasa	MP	O_2^-	Hammond-Kosack y Jones, 1996
β -oxidación	Per	H_2O_2	Corpas y col., 2001
Oxalato oxidasa	Apo	H_2O_2	Dat y col., 2000;
Xantina oxidasa	Per	O_2^-	Corpas y col., 2001
Peroxidasa, Mn^{2+} y NADH	PC	H_2O_2 ; O_2^-	Hammond-Kosack y Jones, 1996; Grant y Loake, 2000
Amino oxidasa	Apo	H_2O_2	Allan y Fluhr, 1997
Eliminación			
Superóxido dismutasa	Clo; Cit; Mit; Per; Apo	O_2^-	Bowler y col., 1992
Ascorbato peroxidasa	Clo; Cit; Mit; Per; Apo	H_2O_2	Asada y Takahashi, 1987; Asada, 1999.
Catalasa	Per	H_2O_2	Willekens y col., 1997
Glutacion peroxidasa	Cit	H_2O_2 ; ROOH	Dixon y col., 1998
Peroxidasa	PC; Cit; Vac	H_2O_2	Asada y Takahashi, 1987
Tiorredoxina peroxidasa	Clo; Cit; Mit	H_2O_2	Baier y Diezt, 1996
Ácido ascórbico	Clo; Cit; Mit; Per; Apo	H_2O_2 ; O_2^-	Asada K., 1999; Noctor y Foller, 1998
Glutati6n	Clo; Cit; Mit; Per; Apo	H_2O_2	Asada K., 1999; Noctor y Foller, 1998
α -tocoferol	Membranas	ROOH; O_2^-	Asada y Takahashi, 1987
Carotenos	Clo; Mit	O_2^-	Asada y Takahashi, 1987

Abreviaturas: Apo, apoplasto; Clo, cloroplasto; Cit, citosol; Mit, mitocondria; MP, membrana plasmática; PC, pared celular; Per, peroxisoma; PS, fotosistema; TE; transporte electrónico; Vac, Vacuola.

1.3.1.1.- H₂O₂

El peróxido de hidrógeno, H₂O₂, el más estable de los intermediarios del oxígeno, está implicado en el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular, en la señal de transducción como regulador de la expresión génica de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Chen y col., 1995), en el proceso de muerte celular de la planta (Levine y col., 1992) y en la muerte directa de los patógenos invasores (Peng y Kuc, 1992).

Estudios recientes sobre defensa de plantas y aclimatación al estrés han coincidido en el doble mecanismo en el que participa el H₂O₂. Por un lado, como molécula señal en el colapso celular que ocurre durante la HR y en la resistencia sistémica adquirida (SAR) dentro de los tejidos infectados por el patógeno (Lamb y Dixon, 1997), y por otro como mediadora del daño oxidativo.

El estallido oxidativo y la acumulación de H₂O₂ parecen estar mediados por la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa, anclado a la membrana (Auh y Murphy 1995; Lamb y Dixon 1997, Ogawa y col., 1997). En células fagocíticas animales el anión superóxido (O₂⁻) es producido por un complejo enzimático que facilita la reducción de oxígeno a superóxido mediada por la oxidación de NADPH citosólico. Este superóxido es dismutado rápidamente a H₂O₂ de forma espontánea o por medio de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Sutherland, 1991).

1.3.1.1.1.- Inducción de genes de defensa mediada por H₂O₂

Los resultados de Wu y col. (1997) sugieren que un aumento subletal de los niveles constitutivos de H₂O₂ es suficiente para activar una gran diversidad de mecanismos de defensa del huésped, y estos mecanismos de defensa pueden ser el principal factor que contribuye a la resistencia de la enfermedad mediada por H₂O₂ en plantas transgénicas. En este mismo estudio, se realiza una investigación de la resistencia a la enfermedad mediada por H₂O₂ en plantas de patatas transgénicas y se observa una inducción en la acumulación de ácido salicílico total y dos mRNA de genes que codifican una peroxidasa aniónica y una quitinasa ácida.

También se ha observado que tanto un elicitor bacteriano, el harpin, como la adición de H_2O_2 inician la muerte celular y también actúan como señales moleculares de inducción de genes relacionados con la defensa, que codifican enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la glutathion-s-transferasa (GST) y la antranilato sintasa (ASA1), una enzima de la biosíntesis de fitoalexinas en *Arabidopsis* (Desikan y col., 1998).

Existen estudios contradictorios en lo que se refiere a la activación de PAL por H_2O_2 . Mientras que la generación de H_2O_2 no indujo la expresión de genes PAL en cultivos celulares de judía (Levine y col., 1994), una concentración 5 mM de H_2O_2 , sí indujo la expresión de genes PAL en cultivos de *Arabidopsis* (Desikan y col., 1998).

Además del estallido oxidativo, existen otros elementos de la transducción de señal en las plantas ante el ataque de patógenos. Las fitohormonas etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico están implicadas en la regulación de la resistencia basal frente a diferentes patógenos (Thomma y col., 2001). Además, se sabe que estas señales pueden controlar varios procesos relacionados con la defensa de la planta, como son la producción de fitoalexinas (Fan y col., 2000), la inducción de proteínas PR (Díaz y col., 2002; Thomma y col., 2001) y la síntesis de compuestos fenólicos (Chappell y col., 1984). La mayor parte del conocimiento actual sobre la regulación hormonal de la respuesta defensiva de las plantas se ha adquirido mediante el estudio de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, pero dicha regulación puede ser diferente en otras especies. En el caso de solanáceas, existen particularidades específicas en cuanto a su respuesta defensiva que la hacen diferente a la de *Arabidopsis* (Díaz y col., 2002; Ryan, 2000).

1.3.2.- Fenilalanina amonio liasa

Otro mecanismo importante en la respuesta de defensa de las plantas a los patógenos es el metabolismo fenilpropanoide. Una de las enzimas más estudiadas al respecto es la fenilalanina amonio liasa, PAL (EC 4.3.1.5), que cataliza la desaminación de la fenilalanina a ácido trans-cinámico, precursor común de la biosíntesis de derivados fenólicos que son esenciales para el

desarrollo adaptativo, vascular y reproductivo de las plantas (Halbrock y Grisebach, 1979; Jones, 1984). Como resultado de este metabolismo se producen ácidos hidroxicinámicos sencillos, con un esqueleto de fenilpropano C_6C_3 característico. Sus funciones son muy variables: algunos sirven como pigmentos, fitoalexinas, fitoanticipinas, protectores contra la radiación UV o moléculas señal entre plantas y microorganismos.

La enzima PAL juega un importante papel en la resistencia de la planta frente a patógenos (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). Está implicada en la biosíntesis que da lugar a la formación de escopoletina (Fritig y Hirth, 1970), una cumarina con actividad fitoalexina (Ahl-Goy y col., 1993). Además, es un enzima clave que está implicada en la biosíntesis de moléculas señal como el ácido salicílico (SA) (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996), que se acumula en las células que sufren respuesta hipersensible (Dorey y col., 1997) y es esencial para la respuesta local y la respuesta sistémica (Gaffney y col., 1993; Delaney y col., 1994).

Usando plantas transgénicas, se ha visto que la actividad PAL es el principal punto de control para la regulación del metabolismo fenilpropanoide (Maher y col., 1994). Se han realizado diversos estudios con diferentes especies vegetales que muestran un incremento de la actividad PAL por factores ambientales, como bajos niveles de nutrientes, luz e infecciones fúngicas (Hahlbrock y Scheel, 1989; Kombrink y Somssich, 1995). Las distintas isoenzimas PAL en *Arabidopsis thaliana* son sintetizadas *de novo* en respuesta a luz UV, radiación, ataque microbiano y herbivorismo (Li y col., 1993; Logemann y col., 1995). Existen también en la literatura numerosos trabajos sobre el aumento de la expresión de PAL en respuesta a estímulos ambientales como frío (Leyva y col., 1995), heridas (Fukasawa-Akada y col., 1996) o luz UV-B (Maeda y col., 2005), entre otros. El silenciamiento de PAL en líneas transgénicas de tabaco inhibe la producción de ácido salicílico que ocurre normalmente tras la infección con el virus del mosaico y hace que fracase el establecimiento de una respuesta sistémica adquirida (Pallas y col., 1996).

Esta enzima está ampliamente distribuida en plantas superiores (Hao y col., 1996; Sarma y col., 1998), y algunos hongos y levaduras (D' Cunha y col., 1996). Además, en plantas superiores, *PAL* se presenta como una familia génica. Se han descrito 4 genes *PAL* en *Arabidopsis* (Cochrane y col., 2004), 5 en pino y en tomate (Butland y col., 1998; Lee y col., 1992) y la presencia de 16 homólogos en el genoma de un híbrido de patata (Castillo Ruiz y col., 2005). El significado de esta diversidad no está claro, pero resulta coherente con el alto grado de complejidad de las vías metabólicas del metabolismo fenilpropanoide.

PAL es de las pocas enzimas no hidrolíticas que poseen aplicaciones comerciales, ya que es efectiva en el tratamiento de ciertos tumores neoplásicos de ratas, en el análisis cuantitativo del suero L-Phe en pacientes monitorizados con fenilcetonuria y también en la preparación de dietas bajas en fenilalanina (Gacesa y Hubble, 1987).

1.3.2.1.- Fenilalanina amonio-liasa y compuestos fenólicos

1.3.2.1.1.- Compuestos fenólicos

En la respuesta frente a patógenos hay algunos compuestos fenólicos que son constitutivos y sirven como inhibidores asociados a la resistencia de no huésped (Stoessl, 1983; Mole y Waterman, 1987a,b), mientras que otros se forman en respuesta a la infección fúngica y actúan como parte de la respuesta de defensa activa (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Los compuestos fenólicos "antibióticos" pueden unirse a proteínas *in vitro*, formando complejos solubles e insolubles (Hagerman y Robbins, 1980; Hagerman y Butler, 1989). Se piensa que la interacción fenólicos-proteínas es la responsable de que estos compuestos posean una función de defensa de las plantas (Coley, 1983).

En algunos trabajos se correlaciona la síntesis de determinados compuestos fenólicos con la resistencia a la enfermedad. Pero sólo unos pocos proporcionan evidencias genéticas directas de la formación de un compuesto fenólico particular de defensa. Así, encontramos un incremento en la producción de fitoalexinas en la resistencia a la enfermedad en alfalfa

(He y Dixon, 2000). El estilbeno resveratrol puede conferir resistencia a la infección fúngica cuando se expresa en plantas transgénicas de tabaco y alfalfa, las cuales no producen este compuesto de forma natural (Hain y col., 1993; Hipskind y Paiva, 2000). La sobreexpresión de fenilalanina amonio liasa produce altos niveles de ácido clorogénico lo que se traduce en una reducción en la sensibilidad a la infección de plantas de tabaco con el hongo *Cercospora nicotianae* (Shadle y col., 2003).

Encontramos en la bibliografía evidencias que sugieren que la esterificación de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico o el ácido *p*-cumárico (Hartley y Ford, 1989; Fry, 1983) a la pared celular es un fenómeno común en la expresión de resistencia (Fry, 1987). Se conoce que los compuestos fenólicos juegan un papel importante en la modificación de las propiedades mecánicas de la pared celular (Parker y Waldron, 1995), limitando la degradación de polisacáridos de la pared celular mediante enzimas exógenas (Grabber y col., 1998; Hatfield, 1993) e incrementando la rigidez de ésta mediante la unión de polisacáridos y lignina (Ralph y col., 1994). En el caso de las gramíneas, Ralph y col. (1994) han detectado cantidades significativas de ácido *p*-cumárico esterificado en las ligninas. Estos datos sugieren la posible existencia de enlaces éster y éter del ácido *p*-cumárico en las ligninas de las gramíneas (Billa y cols., 1996).

El incremento de compuestos fenólicos unidos mediante enlaces éster a la pared celular se encuentra bien documentado en la respuesta de diferentes cultivares de pimientos frente a la infección de *V. dahliae*. El análisis mediante HPLC reveló un incremento del ácido cafeico y la vanillina (Novo, 2004). Junto con ellos se encontraron otros compuestos fenólicos como: ferúlico, *p*-cumárico y siringaldehído (Pomar y col., 2004; Novo, 2004).

1.3.2.1.2.- Ligninas

Las ligninas son heteropolímeros amorfos que resultan del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes cinamílicos: el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico, que dan lugar a las unidades H (hidroxifenilo), G (guayacilo) y S (siringilo) (Figura 1.3). Cada una de estas

subunidades posee un grado de metoxilación distinto y se incorpora a la lignina con un tipo de enlace diferente.

La composición monomérica de las ligninas varía entre las especies vegetales y durante el desarrollo de éstas. Normalmente las ligninas de gimnospermas contienen entre un 98-99% de unidades G, originadas a partir del alcohol coniferílico. Las ligninas de angiospermas están formadas principalmente por unidades G y S, derivadas éstas últimas del alcohol sinapílico. En gramíneas, el alcohol *p*-cumarílico sirve como precursor de las unidades H, que se encuentran junto con las S y las G (Sakakibara, 1980; Gómez Ros y col., 2007).

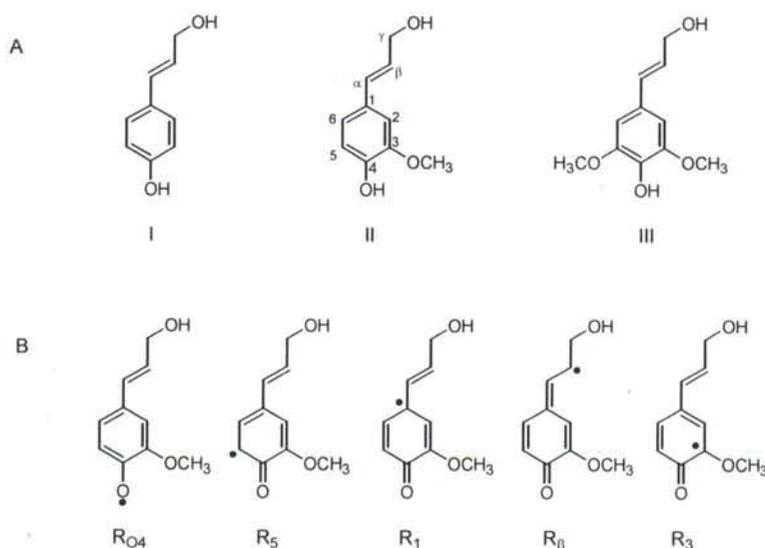


Figura 1.3.- Estructuras de los alcoholes *p*-cumarílico (I), coniferílico (II) y sinapílico (III). B. Principales formas mesoméricas de los radicales del alcohol coniferílico formados durante la oxidación del mismo por la peroxidasa. Tomado de Ros Barceló y col. (2004).

Las ligninas de angiospermas y gimnospermas no sólo difieren en el contenido relativo de unidades S/G, sino también en la abundancia de los tipos de entrecruzamiento en el núcleo de las ligninas. En este sentido, Lapierre y col. (1995) han demostrado, mediante tioacidólisis, que las ligninas de las angiospermas leñosas son distintas en cuanto a la proporción de fragmentos lineales unidos por enlace β -O-4 con respecto a las ligninas presentes en las gimnospermas leñosas y en las herbáceas.

Aproximadamente el 60-65% de los bloques C_6C_3 en las ligninas de las angiospermas leñosas se caracteriza por presentar enlaces β -O-4. Este valor se ve reducido a un 30% en el caso de las gimnospermas leñosas, siendo dicho porcentaje incluso menor en las herbáceas. Por tanto, las ligninas de las gimnospermas leñosas están más ramificadas mediante enlaces carbono-carbono que las ligninas de las angiospermas leñosas.

Las ligninas se depositan mayoritariamente en las paredes celulares de un número limitado de tipos de células como son las traqueidas, los vasos, las fibras del xilema y del floema y las esclereidas. La naturaleza de las ligninas varía según el tipo de célula. Este hecho se observa de forma clara en el xilema de *Arabidopsis*, en el que predominan las ligninas de tipo G, mientras que en las células altamente lignificadas y adyacentes del esclerénquima existen fundamentalmente ligninas de tipo S (Chapple y cols., 1992).

La biosíntesis de las ligninas se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones que implican a:

(a) La ruta común fenilpropanoide, que comienza por la acción de la PAL convirtiendo L-fenilalanina en ácido cinámico y que finaliza en la obtención de los ésteres CoA de los ácidos cinámicos, que son los precursores de las ligninas, pero también de otros compuestos fenólicos como los flavonoides y los taninos, que se acumulan en grandes cantidades en los órganos vegetales.

(b) La ruta específica de la biosíntesis de las ligninas es la que conduce a través de dos reacciones de los *p*-hidroxicinamoil CoA hacia la síntesis de los alcoholes cinámicos. Estas dos reacciones son catalizadas por las enzimas *p*-hidroxicinamil-CoA reductasa (CCR, EC 1.2.1.44) y la *p*-hidroxicinamoil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195) en sus formas coniferil alcohol deshidrogenasa (CAD) y sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD). Intercalada entre estos pasos reductores hay una reacción catalizada por la coniferilaldehído-5-hidroxilasa (CAld5H) que está acoplada con una OMT específica (AldOMT), que permite la síntesis de unidades siringilo en las angiospermas (Franke y col., 2000; Osakabe y col., 1999; Li y col., 2000).

La lignificación de paredes celulares está considerada como un acontecimiento clave para la resistencia inducida contra patógenos en plantas herbáceas y leñosas. Se han descrito evidencias indirectas del efecto de la lignina en la resistencia; los genotipos resistentes presentan una mayor acumulación de lignina (Kang y Buchenauer, 2000) y compuestos fenilpropanoides (El Modafar y col., 2000) y una mayor actividad de las enzimas del metabolismo fenilpropanoide después de la inoculación con patógenos (Bucciarelli y col., 1998). De hecho, el modo en que las ligninas inhiben el ataque de patógenos es incierto, pero se han postulado posibles mecanismos, como el sellado de las paredes celulares mediante el depósito de lignina que proporciona a los tallos resistencia mecánica y protege a las fibras de celulosa de la degradación química y biológica, en el caso de ataque por hongos (Grabber y col., 1998); o el efecto sobre los patógenos de los precursores fenólicos de la lignina en sí mismos (Woodward 1992). La composición relativa de estas subunidades cambia como resultado del ataque por patógenos (Pomar y col., 2004).

1.3.2.1.3.- Compuestos fenólicos y su unión a la pared por la enzima peroxidasa

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7, H₂O₂: donador oxidoreductasa) son enzimas que contienen un grupo hemo y pueden considerarse como enzimas bifuncionales que catalizan la oxidación de varios sustratos a expensas del H₂O₂, pero también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo) (Passardi y col., 2005). Muestran un amplio rango de sustratos sobre los que actúan, con un marcado grado de especificidad por el alcohol coniferílico. Probablemente para compensar el amplio rango de sustratos que las peroxidasas pueden oxidar, esta enzima muestra una compartimentalización muy específica en los tejidos vegetales, asociadas a la pared celular y la vacuola, dependiendo en última instancia de la naturaleza de la célula y de su estado de desarrollo (Griffing y Fowke, 1985).

Su implicación en procesos fisiológicos y de desarrollo puede detectarse desde la germinación hasta la senescencia: suberización

(Bernards y col., 1999); polimerización de extensinas (Brownleader y col., 1995); dimerización de ferulatos (Ikegawa y col., 1996); oxidación de fenoles (Lagrimini, 1991) y especialmente en la lignificación (Mäder, 1992; Quiroga y col., 2000), mecanismos todos ellos que se pueden ver activados en la defensa frente a patógenos (Kristensen y col., 1999; McLusky y col., 1999);

Las peroxidasas desempeñan un papel importante en la polimerización de los alcoholes cinámicos. Así, se ha visto cómo en tejidos lignificantes se expresan tanto los promotores del gen de la peroxidasa como una acumulación de sus transcriptos (Lagrimini y col., 1987; Mohan y col., 1993; Osakabe y col., 1994). Estudios histoquímicos (Ros Barceló y col., 2000), citoquímicos (Hepler y col., 1972) e inmunocitoquímicos (Smith y col., 1994) han mostrado que la peroxidasa está localizada en las paredes celulares lignificantes de los elementos del xilema, fundamentalmente a nivel de las esquinas celulares y la lámina media y a nivel de los engrosamientos secundarios. Asimismo, se ha comprobado que la peroxidasa presenta unos niveles de afinidad muy altos frente a los precursores de la lignina (Ros Barceló y Pomar, 2001).

De todos modos, las peroxidasas no son las únicas enzimas responsables de la polimerización de los alcoholes cinámicos. Diversos estudios realizados con plantas transgénicas de tabaco muestran que una reducción significativa en la expresión de una isoenzima ácida de la peroxidasa no viene acompañada de una reducción de la lignificación (Lagrimini, 1991; Lagrimini y col., 1997) y arrojan ciertas dudas sobre la participación exclusiva de las peroxidasas ácidas en este proceso. Sin embargo, la afinidad (K_M) para los alcoholes cinámicos de varias peroxidasas aisladas de tejidos lignificantes es de orden mucho menor que la de las lacasas (Ros Barceló y col., 1997; Bao y col., 1993), pero del mismo orden que las enzimas de la ruta de biosíntesis de las ligninas, por ejemplo CCR, CAD o β -glucosidasas (Grisebach, 1981; Dharmawardhana y col., 1995)

Otro aspecto que deberían cumplir las enzimas que participasen en la polimerización de los alcoholes cinámicos es la de presentar una correlación

cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidasas, esta correlación ha sido frecuentemente descrita en la literatura, en el endocarpo de melocotón (Abeles y Biles, 1991), en las fibras de lino (McDougall, 1992), en el álamo (Baier y col., 1993), en las agujas de píceas noruegas (Polle y col., 1994) y en células en suspensión de *Zinnia* inducidas para diferenciarse en traqueidas (Sato y col., 1995). De todos modos, en ningún caso ha sido una sola peroxidasa, bien sea básica o ácida, la única implicada en esas correlaciones. De todos estos estudios se desprende la idea de que parece haber más de una isoenzima implicada en la polimerización de los alcoholes cinamílicos. Estos estudios podrían explicar por qué la reducción en la expresión de una isoenzima de peroxidasa individual no está acompañada por una reducción en la lignificación de la pared celular.

Se han realizado trabajos en donde se demuestra la implicación de la peroxidasa en la formación de dímeros, utilizando mezclas equimolares de pares de ácidos hidroxicinámicos, concretamente de ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido cafeico (Arrieta-Baez y Stark, 2006). Con respecto a estos ácidos hidroxicinámicos, se conoce su acumulación en tubérculos de patata durante la cicatrización de heridas y han sido identificados como monómeros en la estructura de la suberina.

1.4.- PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la cuantificación de ácidos nucleicos en un único paso. Esto se consigue usando diferentes sustancias fluorescentes que correlacionan la concentración del producto PCR con la intensidad de fluorescencia (Higuchi y col., 1993). Las reacciones están determinadas por su ciclo umbral (C_t), el primer ciclo de PCR donde se detecta la amplificación de la diana de interés o, lo que es lo mismo, el ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia es mayor que la fluorescencia de fondo. De este modo, cuanto mayor sea la cantidad de dianas de DNA en el material inicial, más rápido aparece el aumento de la intensidad de fluorescencia, lo que se traduce en bajos C_t .

La introducción de la tecnología PCR en tiempo real ha mejorado y simplificado considerablemente la cuantificación de ácidos nucleicos, y esta tecnología se ha convertido en un instrumento inestimable para muchos científicos que trabajan en diferentes disciplinas (Klein, 2002).

Los ensayos de PCR en tiempo real se caracterizan por un amplio rango de concentraciones, una técnica de alta sensibilidad (<5 copias) y una alta precisión (desviación estándar <2 %) (Bustin, 2000; Klein y col., 2001). Otra ventaja de este método consiste en que no es necesario ningún paso post-PCR, y así se evita la posibilidad de contaminación cruzada. Esta ventaja es de especial interés para la aplicación en pruebas de diagnóstico (Jordan, 2000). Todo ello ha permitido el cambio del diagnóstico molecular aumentando el rendimiento y automatizando todo el proceso.

Las principales desventajas de la PCR en tiempo real son, además de un alto coste económico, la necesidad de desarrollar un cuidadoso diseño experimental y de conocer a fondo las técnicas de normalización para llegar a conclusiones exactas.

La técnica de PCR en tiempo real es de 10.000 a 100.000 veces más sensible que los ensayos de protección RNAsa (Wang y Brow, 1999), 1000 veces más que la hibridación dot blot (Malinen y col., 2003), y puede detectar hasta una única copia del transcrito específico (Palmer y col., 2003). Además, los ensayos de PCR en tiempo real pueden detectar de forma eficaz diferencias de expresión de genes tan pequeñas como el 23 % entre muestras (Gentle y col., 2001) y tienen coeficientes de variación más bajos (SYBR Green 14,2 %; TaqMan 24 %) que los de punto final, como densimetría de banda (el 44,9 %) y las sonda de hibridación (el 45,1 %) (Schmittgen y col., 2000).

I.4.1.- Aplicaciones

I.4.1.1.- Detección y cuantificación de patógenos

La PCR en tiempo real tiene aplicaciones en campos tan importantes como la microbiología clínica y la microbiología de alimentos, habiéndose publicado cientos de ensayos sobre la detección y cuantificación de agentes

infecciosos (Jordan, 2000). Pero sigue siendo necesaria la combinación con métodos microbiológicos clásicos, ya que la PCR en tiempo real detecta y cuantifica ácidos nucleicos de patógenos vivos y muertos, mientras que los ensayos microbiológicos clásicos sólo detectan patógenos vivos (Hein y col., 2001).

En biología vegetal se aplica este mismo método para la detección y cuantificación de patógenos en plantas. De este modo se puede valorar el grado de resistencia o susceptibilidad real de una planta ante un patógeno, cuantificando el grado de colonización de éste. Hasta hace poco esta detección y cuantificación se hacía mediante el examen visual de las plantas infectadas y el aislamiento del hongo en medios selectivos. Entre las alternativas a dichos métodos cabe destacar el uso de la PCR convencional. El ensayo de diagnóstico mediante la PCR consiste en el uso de cebadores específicos, es decir, capaces de amplificar sólo el DNA de la especie que interesa. Dicha técnica no requiere el aislamiento del hongo desde el tejido enfermo, y es sensible, rápida y menos laboriosa que los métodos convencionales. La PCR ya ha sido usada para la detección de patógenos en plantas, proporcionando mejores resultados que los métodos tradicionales. En el caso de *Verticillium*, se ha utilizado para cuantificar el grado de colonización de varias especies vegetales por dicho patógeno e incluso se ha utilizado para detectar el hongo en suelo (Hu y col., 1993; Nazar y col., 1991; Platt y col., 2000).

La tecnología PCR en tiempo real abre oportunidades crecientes para la detección en estudios de fitopatogenicidad (Silvar y col., 2005; Gayoso y col. 2007). Hace posible una cuantificación precisa, fidedigna y con un rendimiento específico alto, basándose en la amplificación mediante cebadores específicos diseñados a partir de una diana de DNA del patógeno. Esto permite el análisis en distintas muestras como tejidos de plantas, suelo, agua y aire, abriendo así nuevos caminos para el estudio de diagnóstico, niveles del inoculo umbral, epidemiología e interacciones planta patógeno (Shena y col., 2004; Silvar y col., 2005; Gayoso y col., 2007). Debido a su sensibilidad y su reproducibilidad, la PCR en tiempo real es perfectamente

adecuada para detectar cambios mínimos en la susceptibilidad y resistencia de una planta frente a un patógeno. Por ejemplo, los niveles de resistencia de distintos cultivares de arroz frente a *Magnaporthe grisea* fueron evaluados precisa y convenientemente con PCR en tiempo real, ya que se encontró que el crecimiento del hongo en variedades susceptibles era 80 veces superiores que en cultivares resistentes (Qi y Yang, 2002).

I.4.1.2.- Expresión génica

La transcripción reversa combinada con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) dio lugar a un método eficaz para la cuantificación de la expresión génica (Heid y col., 1996; Winer y col., 1999). Existen dos métodos diferentes para el análisis de datos para la RT-PCR cuantitativa en tiempo real, cuantificación absoluta y cuantificación relativa. La cuantificación absoluta determina el número de copias del transcrito de interés relativo a la señal de PCR respecto a una curva estándar. La cuantificación relativa describe los cambios en la expresión de genes diana relativo a un grupo de referencia como por ejemplo un control o una muestra a tiempo cero en el periodo de estudio (Livak y Schmittgen., 2001).

Los ensayos de RT-PCR en tiempo real han sido usados extensamente para estimar el nivel de expresión de genes de interés (Bustin, 2000). Sin embargo, los puntos críticos que definen la fiabilidad de los datos obtenidos son la elección del gen constitutivo y la preparación de sondas. Un gen constitutivo ideal tiene siempre el mismo nivel de expresión; sin embargo, no todos los propuestos cumplen este requisito previo. Por tanto, la expresión constante del gen constitutivo elegido para el sistema experimental debe ser probada y demostrada antes del análisis de datos de interés.

I.4.2.- Bases teóricas de la PCR en tiempo real

La PCR se puede dividir en cuatro fases principales: fase lineal, fase temprano exponencial, fase lineal exponencial y fase de meseta (Tichopad y col., 2003). Durante la fase lineal (por lo general los 10-15 primeros ciclos), que es al comienzo de la PCR, la emisión de fluorescencia en cada ciclo no

se eleva todavía encima del fondo. En la fase exponencial temprana, la cantidad de fluorescencia ha alcanzado un umbral donde es considerablemente más alto que los niveles de fondo. El ciclo en el cual ocurre esto es conocido como C_t o CP (Heid y col., 1996; Von Ahsen y col., 1999). Este valor es representativo del número de copias inicial y es usado para calcular los resultados (Heid y col., 1996). Durante la fase lineal exponencial, la PCR alcanza su período de amplificación óptimo con el producto PCR, que se duplica después de cada ciclo en condiciones ideales de reacción. Finalmente, la etapa de meseta se alcanza cuando los componentes de reacción se hacen limitantes y la intensidad de fluorescencia ya no es útil para el cálculo de datos (Bustin, 2000).

1.4.2.1.- Eficiencia de la amplificación

La eficiencia de la amplificación de la reacción es una consideración importante si se realiza una cuantificación relativa. Los métodos clásicos para el cálculo de la expresión asumían que la eficiencia de amplificación de la reacción era la ideal, 1, lo que significa que la concentración de producto de PCR se duplica en cada ciclo dentro de la fase exponencial de la reacción (Gibson y col., 1996). Sin embargo, muchas PCRs no tienen una eficiencia de amplificación ideal, y los cálculos de este factor sin una corrección apropiada pueden estar sobrestimando la concentración inicial (Liu y Saint, 2002). Tradicionalmente, la eficiencia de amplificación de una reacción se calcula realizando una curva estándar con la fórmula siguiente (Rasmussen, 2001):

Eficiencia = $e = [10^{(-1/m)}] - 1$; donde m es la pendiente de la recta patrón.

1.4.2.2.- Método $\Delta\Delta C_t$

El desarrollo laborioso de estándares de RNA exactos se puede evitar usando un método cuantitativo comparativo, $\Delta\Delta C_t$. El método está basado en la diferencia en los ciclos umbrales (ΔC_t) entre el gen de interés y el gen constitutivo, y es proporcional al nivel de expresión relativo del gen de interés

en cada una de las muestras experimentales. Los ensayos de la cinética de amplificación del gen de interés y del gen constitutivo o de referencia, debe ser aproximadamente igual (Medhurst y col., 2000), porque una eficiencia diferente genera errores usando este método (Liu y Saint, 2002). En los últimos tiempos, la técnica de PCR en tiempo real ha adquirido gran relevancia en los estudios de la expresión de genes (Bustin, 2000). El uso de PCR obvia la necesidad de hibridación, lo que permite analizar por separado la expresión de distintos miembros de familias génicas (Maurino y col., 2006)

La normalización del método supone la corrección de la variación de los datos de expresión génica del gen de interés ya que el material inicial obtenido de individuos diferentes por lo general varía en masa de tejido o número de células, integridad de RNA o cantidad o tratamiento experimental. Esto hace que el gen constitutivo debe expresarse de manera constante sin tener en cuenta condiciones experimentales, tipo de tejido, tipo de célula, etapa desarrollo o tratamiento de la muestra. Por ello, es necesario validar la estabilidad de expresión de un gen constitutivo para las exigencias específicas de un experimento antes de su uso para la normalización (Schmittgen y col., 2000). En la bibliografía encontramos genes de referencia no regulados como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, actinas, tubulinas, etc. Los genes de referencia están presentes en todos los tipos de célula ya que son necesarios para la supervivencia de ésta. La síntesis del RNAm de estos genes es considerada estable en los tejidos, hasta en tratamientos experimentales (Marten y col., 1994; Thellin y col., 1999), pero numerosos estudios han mostrado que estos genes estaban regulados y variaban bajo determinadas condiciones experimentales (Bhatia y col 1994; Zhang y Snyder, 1992), o incluso pueden variar en diferentes tejidos o tipos de célula (Bustin, 2000). Por consiguiente, la normalización con un falso gen constitutivo sólo puede influir negativamente en los resultados, y es absolutamente necesario validar su estabilidad en las propias muestras.

En el modelo matemático descrito por Pfaffl (2001) se tiene en cuenta tanto las eficiencias del gen de interés como las del gen constitutivo que se utiliza en el estudio. El esfuerzo que requiere el diseño experimental, la

búsqueda de los estándares, así como también la optimización y la validación de una curva de calibrado para la normalización de los transcritos de interés en relación a los transcritos de referencia del gen constitutivo, hace necesario un modelo fidedigno y preciso de cuantificación para el análisis de resultados de RT-PCR en tiempo real.

El modelo matemático descrito, es el siguiente:

$$\frac{(1+e_i)^{C_t(i,0)-C_t(i,x)}}{(1+e_h)^{C_t(h,0)-C_t(h,x)}} ; \text{ si } e_i=e_h (1+e_i)^{[C_t(i,0)-C_t(i,x)]-[C_t(h,0)-C_t(h,x)]}$$

$$(1+e_i)^{[C_t(i,0)-C_t(h,0)]-[C_t(i,x)-C_t(h,x)]} ; \text{ si } e_i=1; (2)^{[C_t(i,0)-C_t(h,0)]-[C_t(i,x)-C_t(h,x)]}$$

Siendo, e_i = el valor de la eficiencia obtenida a partir de los resultados del gen de interés; e_h = el valor de la eficiencia obtenida a partir de los resultados del gen constitutivo; $C_t(i,x)$ el valor C_t del gen de interés $t=x$; $C_t(i,0)$ el valor C_t del gen de interés en $t=0$ o control; $C_t(h,x)$ el valor C_t del gen constitutivo en el $t=x$; $C_t(h,0)$ el valor C_t del gen constitutivo en el tiempo $t=0$.

1.5.- Genoteca substractiva

Se han utilizado distintas técnicas para el estudio de variaciones en la expresión de genes en distintos tejidos o como respuesta a condiciones diferentes. Entre ellas figuran el "differential display" (Liang y Pardee, 1992), DNAC-AFLP (Bachem y col., 1998), "Serial Analysis of Gene Expression" (SAGE) (Velculescu y col., 1995) o la hibridación sustractiva por supresión (SSH) (Diatchenko y col., 1996). Cada una de estas técnicas presenta distintos inconvenientes, entre los que destacan la baja reproducibilidad del "differential display" o el conocimiento exhaustivo de la secuencia del genoma del organismo estudiado que es necesario para el SAGE.

La técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH) incluye la digestión de los cDNA que se comparan, su hibridación y un efecto de supresión mediado por la presencia de repeticiones invertidas en los adaptadores que se ligan a los extremos de los fragmentos de los cDNA. Como resultado se obtienen genotecas enriquecidas en genes cuya expresión varía en condiciones determinadas. El uso de PCR permite la

normalización de los transcritos, lo que hace posible la detección de clones cDNA de genes que se expresan a muy bajo nivel.

La técnica de SSH se ha utilizado en el estudio de la respuesta de diferentes plantas a distintas condiciones, como en los cambios en la expresión génica de *Arabidopsis* por el ataque de *Pseudomonas syringae* o *Peronospora parasitica* (Mahalingam y col., 2003); en la expresión temprana de genes de *Arabidopsis* durante la transformación por medio de *Agrobacterium* (Veena y col., 2003); o en la respuesta a heridas en arroz (Cho y col., 2004). Por ejemplo, en el análisis de la respuesta de *A. thaliana* a la infección por *P. parasitica* (Bittner-Eddy y col., 2003), los autores obtuvieron clones de cDNA correspondientes a 615 genes de *Arabidopsis* y a 25 genes de *Peronospora*, 15 de los cuales sólo se expresaban *in planta*. En otro estudio de la respuesta de un mutante de arroz resistente a *Magnaporthe grisea* (Han y col., 2004), se clonaron 26 cDNA correspondientes a genes cuya expresión aumenta tras la infección del mutante. Entre estos se encontraron genes cuya relación con el proceso de resistencia era conocida, así como otros relacionados con regulación y señalización. Se ha utilizado la misma técnica en estudios en que se comparaban las reacciones compatible e incompatible de variedades isogénicas de arroz, una que portaba el gen *Pi(9)t*, que confiere resistencia a *M. grisea* y otra que carece de este gen y es susceptible al hongo (Lu y col., 2004). Como resultado, se obtuvieron 47 clones asociados a la respuesta resistente, entre los que aparecían genes con funciones muy diversas. Recientemente se ha aplicado esta técnica al estudio de la interacción de *V. dahliae* con una variedad tolerante de algodón (Qu y col., 2005). Típicamente, se encontraron genes de estructura y función muy diversas. Entre los genes detectados aparecieron algunos cuya relación con el proceso de resistencia era conocida, y también otros relacionados con regulación y señalización.

Objetivos

II.- Objetivos

- II.1.- Desarrollo de un método de detección de *Verticillium dahliae* basado en la PCR en tiempo real y comprobación de su eficacia en plantas de pimiento y tomate, suelo y agua de riego.
- II.2.- Estudio de enzimas y productos del metabolismo secundario de tomate en respuesta a *V. dahliae* en la interacción compatible e incompatible.
- II.3.- Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de los distintos homólogos *PAL* en planta y cultivos celulares de tomate en respuesta a diferentes estímulos bióticos y abióticos.
- II.4.- Caracterización de los mecanismos moleculares de resistencia de tomate a *V. dahliae* por medio de la clonación de cDNA de genes expresados diferencialmente en los estadios iniciales de la interacción incompatible.

Material y Métodos

III.- Material**III.1.- Reactivos**

Acetato de etilo	Panreac 131318
Acetonitrilo HPLC	Panreac 221881
Ácido acético	Panreac 131008
Ácido cafeico	Sigma C-0625
Ácido ferúlico	Sigma F-3500
Ácido <i>p</i> -cumárico	Sigma C-9008
Ácido sulfúrico	Panreac 21058
Ácido <i>trans</i> -cinámico	Sigma C-06004
Agar	Roko AB-030943
Agarosa D-1	R. Costoya 116.8008
Amonio sulfato ferroso	Sigma S-1876
Ampholine PAGplate	Pharmacia Biotech
Arena de mar lavada	Panreac 211160
Aurum TM Total RNA Mini Kit	BioRad 732-6820
BF3 (Eterato)	Aldrich S08983
Bicarbonato sódico	Prolabo 27 778.293
Bisulfito sódico	Sigma S-9000
Bromuro de acetilo	Fluka 00960
BSTFA	Sigma 5524
Cloranfenicol	Sigma C-1919
Cloruro de hidroxilamina	Panreac 471914
Cloruro potásico	Panreac 131494
Cloruro sódico	Panreac 121659
CTAB (Cetiltrimetil bromuro de amónio)	Panreac H-6269
Czapec-Dox broth	Sigma L-4509
2-4D (Ácido 2-4 Diclorofenoxiacético)	Sigma D-7299
Diclorometano	Panreac 361254
Dioxano	Panreac 361296
DL-Ditiotreitol	Sigma D-0632

dNTPs	Roche
<i>E. coli</i> competentes	Dominion L07061
EDTA (Acido etilendiaminotetraacético)	Sigma ED-255
Estreptomicina	Sigma S-0774
Etanol	Panreac 121086
Éter dietílico	Panreac 212770
EtSH (Etanotiol)	Aldrich 200-837
L- Fenilalanina	Sigma P-2126
Fenilalanina amonio liasa	Sigma P1016
Fenol	USB 75829
Glicerol	Sigma G-7893
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	Duchefa c1714
Hidróxido sódico	Panreac 131687
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad 170-8891
Kinetina	Sigma D-7299
Kit pMBL-T vector	Dominion V09061
Membrana de diálisis	Sigma D-9777
Metanol	Panreac 2110091
3-Metil-1-butanol	Panreac 131079
4 Metoxi α -naftol	Aldrich 17.455-6
Murashige y Skoog Medio	Sigma K-0753
Naranja de xilenol	Fluka 09720
Nitrobenceno	Panreac 131447
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen 70022
PCNB (pentacloro nitro benceno)	Sigma P-8556
PCR Select cDNA subtraction Kit	Clontech 637401
PDA (Patata dextrosa agar)	Sigma P-3502
Peróxido de hidrógeno	Merck 1.08600
Piridina	Fluka 82702
Potasio fosfato monopotásico	Panreac 141509
2-Propanol	Panreac 131090
PVPP (Polivinilpolipirrolidona)	Sigma P-6755

Queroseno	Anatema
Reactivo de Bradford	Sigma B 6916
Reactivo de Folin & Ciocalteau	Merck 9001
SDS (Dodecil sulfato sódico)	Sigma P-3653
Seroalbúmina bovina	Sigma A-4503
Siringaldehído	Aldrich S760-2
Sodio carbonato anhidro	Sigma S-2127
Sodio hidrógeno arseniato	Panreac 141635
D-Sorbitol	Sigma S-1876
Sulfato cúprico	Fluka 2318476
Sulfato de Zinc	Panreac
Sulfato férrico	Panreac 131362
Sulfato magnésico	Panreac 131404
Sulfato sódico anhidro	Panreac 131716
SYBR Green Supermix	BioRad
<i>Taq</i> polimerasa	Sigma X-0127
Tartrato sodio potásico	Probus 175720
Triclorometano	Panreac 131252
Tris (Tris(hidroximetil)aminometano)	Sigma T-1378
Tritón X-100	Sigma T-6878
Vanillina	Sigma V-2375

III.2.- Material Instrumental

Agitador magnético	SBS A-06
Agitador orbital	AK-15
Autoclave	Raypa
Balanza de precisión	Denver Instrument Co.XE Series model 50
Balanza electrónica	Gram ST-210
Baño de órganos	Kowel N6
Baños de reflujo	Selecta
Bloque metálico	Selecta
Bomba de vacío	Telstar MD-5
Cámara de conservación de hongos	Pecomark
Cámara de flujo laminar	Indelab
Cámara fotográfica digital	Nikon DC 290
Cámara fría 4°C	KoxKa P-33014
Cámaras de cultivo	Ing. Climas
Centrífuga refrigerada de alta velocidad	Eppendorf 5810 R
Congelador (-80°C)	Ing. Climas
Cubetas de electroforesis	BioRad Sub-cell GT
Espectrofotómetro UV/Visible	Cary 3E (Varian)
Estufa	Selecta Serie 2000
Frigorífico	Edesa
HPLC	Alliance- Waters
Liofilizador	Christ Beta 2-15
Luxómetro	"Light Meter lux/FC840020" Sper Scientific
Microcentrífuga Microfuge E	Beckman
Microscopio	Olympus Labophot
pHmetro	Crison 2001
Termociclador	iCycler iQ (BioRad)
Termociclador	MWG AG Biotech Primus 96 plus
Transiluminador	SBS IV-I

III.3.- Material biológico

III.3.1.- Material vegetal

Se utilizaron semillas de cuatro cultivares diferentes de *C. annuum*: Luesia, Padrón, PI201234, SCM331, un cultivar de *C. chinense*, C118, y dos líneas isogénicas de *L. esculentum*, LA 3030 y LA 3038. Estas últimas fueron suministradas por el CM Rick Tomato Genetics Resource Center (UC Davis, CA, USA). LA3038 presenta el gen *Ve* de resistencia a *Verticillium dahliae* y *Verticillium albo-atrum* y el gen *I* de resistencia a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Las semillas eran desinfectadas mediante una inmersión de 30 minutos en una disolución al 10% de lejía comercial (hipoclorito sódico 50 mg mL⁻¹). Luego se retiraba dicha disolución y se realizaban sucesivos lavados de las semillas con agua destilada, para finalmente dejarlas en agua destilada toda la noche. Al día siguiente se sembraban en pocillos, cuyo volumen era de 250cm³, usando como sustrato una mezcla estéril (1:1) de tierra-perlita. Al cabo de 8-11 días, en el caso de pimiento y entre 3-5 días en el caso del tomate, las plantas emergían del sustrato, y se consideró ese momento como tiempo cero.

Desde el momento de la siembra se controlaron tanto la temperatura como el fotoperíodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C. Este control se llevó a cabo en invernadero.

III.3.2.- Material fúngico

Se utilizó el aislado de *V. dahliae* Kleb. VD53, caracterizado como virulento por nuestro grupo de investigación (Novo y col., 2006). Se obtuvo a partir de plantas de pimiento del cv Padrón en la prospección realizada en la localidad de Cambados (Pontevedra), durante el año 1998 (Pomar y col., 2001).

III.4.- Métodos

III.4.1.- Mantenimiento del material fúngico

Con objeto de mantener el grado de virulencia de *V. dahliae*, se alternaron dos medios de cultivo sólido, PDA (patata-dextrosa-agar) que es un medio rico y AW (agua-agar) que es un medio pobre. El PDA se preparaba a partir de 39g de un producto comercial en 1L de agua destilada. El AW se preparaba a partir de 20g de agar en 1L de agua destilada ajustándose el pH a 7,0 con HCl. El hongo se dejaba crecer en PDA durante aproximadamente 20 días sin dejar que cubriese completamente la placa y entonces se repicaba a AW donde se cultivaba entre 10 y 15 días para finalmente pasarlo de nuevo a PDA. Asimismo se mantenían placas madre del aislado en PDA a 4°C y en oscuridad, realizándose resiembras anuales del mismo.

En los casos en los que fue necesario limpiar los aislados de bacterias se usó PDA-Estreptomicina (PDA-S) y medio VD (Dhingra y Sinclair, 1995). El PDA-S se preparaba a partir del producto comercial al que, una vez autoclavado a 120°C durante 20 minutos, se le añadían 100mg del antibiótico. VD es un medio selectivo para *Verticillium* que contiene por litro: 7,5g de sacarosa, 0,5g de KCl, 1g de K₂HPO₄, 2g de NaNO₃, 0,5g de MgSO₄.7H₂O, 0,01g de FeSO₄.7H₂O y 20g de agar, ajustándose el pH a 7,0 con HCl. Una vez esterilizado en autoclave se le añadían 250mg de cloranfenicol disuelto en 5mL de etanol, 100mg de estreptomicina y 66,6mg de PCNB.

III.4.2.- Método de inoculación

Cuando las plantas alcanzaban los 16 días en el caso de pimiento y 4 semanas en el caso del tomate, se realizaba la inoculación. El inóculo se preparó a partir de placas de PDA donde crecía el patógeno durante 20 días en oscuridad y a 25°C. La suspensión de conidios se preparó añadiendo 5mL de agua destilada estéril a cada placa donde crecía el patógeno. El micelio se raspó con una espátula estéril para conseguir que los conidios se desprendiesen de éste. Finalmente, para eliminar restos de micelio la suspensión así obtenida se filtró a través de una doble gasa estéril. El

recuento de los conidios se llevó a cabo con una cámara Thoma y el inóculo se ajustó a una concentración de 10^7 conidios mL^{-1} . Un mL de suspensión de conidios fue directamente pipeteado sobre la superficie de cada uno de los pocillos que contenían las plantas. Simultáneamente, otro grupo de plantas fue tratado con agua estéril, en vez del inóculo, considerándose este grupo como control. Las plantas se mantuvieron en el invernadero donde se controlaba la temperatura y el fotoperíodo: 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 25°C durante el día y 18°C durante la noche, hasta el momento en que tenía lugar la recogida de muestras. Durante las horas de día la iluminancia media medida con un luxómetro "Light Meter lux/FC840020" Sper Scientific, fue de $342,4\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

III.4.3.- Seguimiento de la enfermedad en los distintos cultivares de solanáceas

Durante los treinta días posteriores a la inoculación, con el objeto de determinar la incidencia de la enfermedad (presencia o ausencia de síntomas), se realizó un seguimiento periódico de cada planta. Durante este periodo se realizaron anotaciones acerca de la aparición de los distintos síntomas.

III.4.4.- Recogida de muestras en invernadero: plantas, agua y suelo

Las muestras de pimiento de Padrón se recogieron en zonas productoras del Noroeste de España, Padrón y Betanzos, en Julio de 2003. En Padrón se muestrearon tres parcelas (P1, P2 y P3) mientras que en Betanzos fueron cinco (B1, B2, B3, B4 y B5). La severidad de la infección en los diferentes invernaderos se determinó después de una inspección visual. Según esto las parcelas se clasificaron en: no afectadas, cuando no se observaban síntomas de enfermedad, ligeramente afectadas, cuando el grado de infección no superaba el 10% de las plantas, relativamente afectadas, cuando la cantidad de plantas que mostraban síntomas estaba entre el 10-25% y muy afectadas cuando el grado de infección superaba el 25%. En cada una de las parcelas se recogieron plantas de pimiento cv Padrón que no mostraban síntomas de verticilosis así como plantas enfermas. La zona recogida se correspondía a la

zona del cuello de la raíz, por ser la zona de penetración del patógeno. Asimismo, se recogieron muestras de suelo y de agua de riego en estas mismas parcelas. Las muestras de agua se recogieron directamente del sistema de riego, mientras que las muestras de suelo se recogieron en diferentes zonas de los invernaderos escogidas mediante un método aleatorio. La recogida de muestras se realizó asignando un número al azar a distintas zonas de los invernaderos y con una tabla de números aleatorios se escogieron las parcelas.

III.4.5.- Extracción del DNA en los distintos cultivares de solanáceas inoculados y en las muestras recogidas en los invernaderos

III.4.5.1.- Extracción en tejido vegetal

La extracción de DNA se realizó a partir de dos tejidos de pimiento, raíz e hipocotilo. En el tomate y en las plantas recogidas en los invernaderos se usó únicamente la zona del cuello de la raíz. Cada una de las muestras se homogenizó en un mortero con nitrógeno líquido. Al polvo resultante se le añadía tampón CTBA (Edwards y col., 1991) en una proporción 1:10 (p:v) y las mezclas se incubaban durante 10 minutos a 65°C. Una vez enfriadas se les añadían 0,5mL de una mezcla 24:1 de cloroformo-alcohol isoamílico (3-metil 1-butanol) y se agitaban. A continuación se centrifugaban a 6800g durante 5 minutos recogiendo la fase superior. A esta fase se le volvía a añadir la mezcla y después de agitar se centrifugaba de nuevo en las mismas condiciones. Una vez que se recogían las muestras se les añadía isopropanol (2-propanol), se agitaban suavemente, se incubaban 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaban a 18000g durante 10 minutos, obteniéndose un precipitado (DNA) que se lavaba con 0,5mL de acetato sódico 0,4M en etanol al 76% durante 10 minutos. Se realizaba una centrifugación a 18000g durante 10 minutos y se realizaba otro lavado con etanol al 70%. Por último, se centrifugaba de nuevo en las mismas condiciones. El precipitado obtenido se secaba en una estufa a 30°C durante 5 minutos para retirarle todo el alcohol, se resuspendía en agua Milli-Q estéril y finalmente se dejaba reposar un día a 8°C antes de cuantificar el DNA

obtenido. La cantidad de DNA se medía espectrofotométricamente a 260nm (Sambrook y col., 1989) y su integridad se comprobaba mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%), visualizando el DNA con luz UV al teñirlo con bromuro de etidio ($5\mu\text{g mL}^{-1}$).

III.4.5.2.- Extracción en agua de riego

Previamente a la extracción de DNA, 5mL de agua de riego recogida en los diferentes invernaderos era incubada con 25mL de medio de cultivo líquido Czapek a 20°C durante 20 días. Tras esta incubación el medio era centrifugado a temperatura ambiente a 6800g durante 5 minutos y el precipitado así obtenido fue sometido al protocolo para la extracción de DNA descrito en el apartado anterior (III.4.5.1).

III.4.5.3.- Extracción en suelo

Para la extracción de DNA de los organismos del suelo se homogenizaron cada una de las muestras recogidas en los distintos invernaderos con nitrógeno líquido. El DNA se extrajo con dodecil sulfato sódico-fenol en una proporción (2:1) y fue recolectado por precipitación en etanol (Volossiouk y col., 1995).

III.4.6.- Cuantificación de *V. dahliae* en plantas de tomate y pimiento

III.4.6.1.-Diseño de cebadores

Para la detección e identificación de las especies a analizar por medio de PCR en tiempo real, es necesaria la utilización de secuencias diana específicas. En el caso de *V. dahliae* su cuantificación se realizó utilizando un SCAR (Li y col., 1999) fragmento específico de DNA amplificado mediante la técnica de RAPD y posteriormente secuenciado.

Las parejas de cebadores para *C. annuum*, *C. chinense* y *L. esculentum* se diseñaron usando el programa Primer-3 (Rozen y Skaletsky, 2000), a partir de secuencias depositadas en el Genbank. Para *C. annuum* y *L. esculentum* se utilizó la secuencia de la *PR-1* y la secuencia de la *PAL 1*, para *C.*

chinense. Las secuencias de los primers y el tamaño de cada amplicón se detallan en la Tabla IV.1.

III.4.6.2.-Ensayo de PCR

La reacción de PCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real iCycler iQ (BioRad) y para la detección de los amplicones formados se usó SYBR Green (kit SYBR Green supermix, BioRad).

Cada mezcla de reacción contenía un volumen final de 50 μ L; 1x iQ SYBR Green supermix, 0,3mM de cada uno de los cebadores y 2,5 μ L de soluciones de DNA de concentraciones 100, 10 y 1 μ g μ L⁻¹. Se hicieron dos replicas de 20 μ L.

El programa de PCR en tiempo real utilizado para *C. annuum*, *C. chinense* y *L. esculentum* consistió en una primera etapa de desnaturalización de 2 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 25 segundos a 60°C y 50 segundos a 72°C, y de una última etapa de 5 minutos a 72°C.

Cuando se usaban los oligonucleótidos de *V. dahliae*, las condiciones de PCR constaron de una primera etapa de desnaturalización de 2 minutos a 95°C seguida de 50 ciclos de 20 segundos a 95°C, 25 segundos a 64°C, 50 segundos a 72°C y 30 segundos a 80°C, un último paso de extensión de 5 minutos a 72°C completó el programa de PCR. La emisión de fluorescencia del amplicón obtenido se midió a 80°C.

Las rectas estándar se realizaron representando el valor de Ct obtenido frente al logaritmo de concentración conocido, del hongo o del DNA de la planta, desde 100ng hasta 1pg de DNA. Todos los resultados se presentaron como pg ADN *V. dahliae* /ng DNA planta.

La cuantificación se llevó a cabo con el software iCycler version 3.0a.

III.4.6.3.- Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el modelo del análisis de la varianza, ANOVA de una vía con bloques no aleatorizados y con el software SPSS 11.5 (Norusis y SPSS, 1990), considerando los cultivares como el tratamiento y el

tiempo y los órganos como bloques. Se utilizó el test *t*-student para identificar diferencias entre los grupos, con $\alpha \leq 0,05$.

III.4.7.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* en plantas de tomate

III.4.7.1.- Efecto de la inoculación en los niveles de H_2O_2

Para las medidas de H_2O_2 se tomaron muestras de plantas controles e inoculadas de ambas variedades de tomate a las 0, 1, 2, 4, 8 y 16 horas tras la inoculación, y a los 1, 2, 4, 8 y 16 días tras la inoculación. Los niveles de H_2O_2 en raíces de plantas control e inoculadas, en los sistemas compatible e incompatible *V. dahliae*-*L. esculentum* se midieron mediante el método del naranja de xilenol (Jiang y col., 1990; Wolff, 1994; Bellincampi y col., 2000), basado en la oxidación del Fe^{2+} mediante el peróxido a Fe^{3+} . A continuación este Fe^{3+} reacciona con la sal de sodio del naranja de xilenol dando lugar a la aparición de color. Este método presenta una elevada sensibilidad para detectar niveles bajos de hidroperóxidos solubles en agua, siendo el coeficiente de extinción molar a 560nm de $15000M^{-1} cm^{-1}$.

Para determinar la concentración de H_2O_2 se añadieron 500 μ L de la mezcla de reactivo (sulfato de amonio ferroso 500 μ M, H_2SO_4 50mM, naranja de xilenol 200 μ M y sorbitol 200mM) a 500 μ L de extracto crudo de las raíces analizadas y extraídas con tampón Tris 50mM, ajustando el pH con HCl a 7,5.

Tras un tiempo de incubación de 45 minutos, se midió la absorbancia del complejo naranja de xilenol-hierro a 560nm en un espectofotómetro UV/Visible Cary 3E (Varian).

El cálculo de la concentración de H_2O_2 se realizó interpolando los valores de absorbancia a 560nm en una recta de calibrado realizada con concentraciones de H_2O_2 de 100, 50, 10, 5 y 1 μ M. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C.

III.4.7.2.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre la actividad peroxidasa de *L. esculentum*

III.4.7.2.1.- Extracción de la peroxidasa total

Las distintas muestras de raíces eran homogeneizadas a 4°C, en un mortero con arena y tampón de extracción en una proporción 1:2 (p/v). El tampón estaba compuesto por EDTA 1mM, KCl 1mM, Tris 50mM, ajustando el pH con HCl a 7,5. En el momento de la homogeneización del tejido se añadía 0,5g de PVPP por cada 10g de tejido. A continuación el homogeneizado era filtrado a través de dos gasas previamente enfriadas, descartándose el material retenido. El eluido se centrifugaba a 27000g durante 30 minutos a 4°C.

III.4.7.2.2.- Determinación de la actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa de las distintas muestras se determinó a 25°C en un tampón Tris acetato 50mM pH 5,0, con H₂O₂ 0,5mM y con 4-metoxi- α -naftol 1mM ($\epsilon_{595} = 21,6\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) como donador de electrones. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. La medida de actividad se realizó a 25°C.

III.4.7.2.3.- Isoelectroenfoque analítico

III.4.7.2.3.1.- Preparación de los geles y de la cubeta

Para el isoelectroenfoque se utilizaron geles comerciales de poliacrilamida Ampholine PAGplate de Pharmacia-Biotech, con una concentración T= 5% y C= 3% y un rango de pH de 3,5-9,5. El gel se cortaba a un tamaño de 65 x 110mm.

Para llevar a cabo el enfoque se utilizó un sistema Multiphor II de Pharmacia, manteniendo la temperatura constante a 10°C mediante un circuito cerrado de refrigeración conectado a un estabilizador de temperatura Multitemp III de Pharmacia-Biotech. En el interior de la cubeta se colocaron dos frascos con una solución de NaOH 1M con objeto de que permitiesen la disolución del CO₂ desprendido durante el isoelectroenfoque, ya que este CO₂ puede provocar variaciones en el gradiente de pH deseado.

III.4.7.2.3.2.- Cargado de las muestras e isoelectroenfoque

Los geles, en su soporte de plástico, eran colocados sobre la placa de porcelana del Multiphor II de Pharmacia depositándose entre el plástico y la placa una gota de queroseno para facilitar una temperatura homogénea en toda la superficie del gel. Seguidamente, se colocaban unas bandas de isoelectroenfoque de Pharmacia empapadas en soluciones electrolíticas, NaOH 1M para la banda del cátodo y ácido fosfórico 1M para la banda del ánodo. A continuación se depositaban 10 μ L de muestra sobre los papeles de aplicación de Pharmacia, de 5 x 2mm de tamaño, colocados encima del gel. Por último, se sometía al gel a una corriente de 1500V, 8mA, 2W durante 110 minutos. El desarrollo del enfoque era seguido por medio de rojo de metilo que era cargado en el gel a modo de muestra.

III.4.7.2.3.3.-Revelado de los geles

Una vez finalizado el isoelectroenfoque se retiraban los papeles de las muestras y se revelaban los geles incubándolos a 25°C en un medio de tinción compuesto por: 4-metoxi- α -naftol 1mM, H₂O₂ 0,5mM en un tampón Tris acetato 50mM pH 5,0.

III.4.7.3.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* en los fenoles presentes en *L. esculentum*

III.4.7.3.1.- Extracción de los compuestos fenólicos

Las muestras de raíces eran liofilizadas y pulverizadas con nitrógeno líquido. Entre 100 y 300mg de material eran homogeneizados en metanol al 70% e incubados durante 30 minutos a 80°C en un bloque térmico. Pasado este tiempo se centrifugaron las distintas muestras a 1300g durante 5 minutos, recogándose a continuación el sobrenadante. Al residuo de esta centrifugación se le añadían 2ml de metanol al 70% y se volvían a centrifugar en las mismas condiciones. Este segundo sobrenadante se añadió al anterior incorporándole 4ml de H₂O. Con el fin de eliminar el metanol de las muestras, se evaporaron al vacío y se extrajeron 2 veces con acetato de etilo. Los

nuevos sobrenadantes eran evaporados a sequedad en un rotavapor y resuspendidos en 1mL de metanol, considerándose esta fracción como fenoles solubles.

Los precipitados de la extracción de fenoles solubles eran incubados en un bloque metálico a 170°C durante 2 horas en atmósfera de N₂ con 2mL de NaOH 4N. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente se añadían 2ml de H₂O destilada y se acidificaban a pH 2-3 con 1mL de HCl al 35%. Dado que la reacción es muy exotérmica, los tubos se dejaban enfriar y seguidamente se centrifugaban durante 10 minutos a 3200g, descartándose el precipitado. Estos sobrenadantes se sometieron a tres extracciones seguidas con acetato de etilo. A continuación se añadió sulfato de sodio anhidro en exceso y tras ser filtradas las distintas muestras fueron evaporadas a sequedad en un rotavapor. Finalmente se resuspendieron en 1mL de metanol, considerándose esta fracción como fenoles ligados.

III.4.7.3.2.- Medida de los compuestos fenólicos

La cantidad de compuestos fenólicos, tanto libres como ligados, de cada una de las muestras fueron determinados por el método de Singleton y Rossi (1965), modificación del desarrollado por Folin y Ciocalteau (1927), que se basa en la reacción de ácido fosfomolibdotúngstico con los fenoles para dar lugar a la aparición de un compuesto de color azul que absorbe a 760nm.

Los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes muestras eran transformados en equivalentes de ácido ferúlico basándose en la recta de calibrado obtenida mediante disoluciones de ácido ferúlico a 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01µg mL⁻¹.

III.4.7.3.3.- Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

Las muestras eran analizadas utilizando un sistema cromatográfico Alliance de Waters equipado con bombas, un inyector automático Waters Alliance 2695 Waters 717 plus, un módulo de control de temperatura Waters y un detector de selección fotodiódico en batería Waters 2996. La estación de

control y procesado de datos se realizaba mediante software Empower Pro © Waters.

La cromatografía en fase reversa se llevó a cabo sobre una columna Spherisorb ODS2 C₁₈ (5 μm de tamaño de partícula, 150mm x 46mm) Tracer analítica (Teknokroma), provista de una precolumna Spherisorb ODS2 C₁₈. La detección se llevó a cabo entre 225 y 400nm, y la longitud de onda seleccionada para la cuantificación fue de 280nm, a la cual los compuestos analizados presentaban una absorbancia adecuada. El volumen de inyección utilizado fue de 10μl, siendo la temperatura de la columna de 30°C, operando con un flujo de 0,8ml minuto⁻¹.

La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando el sistema 2 propuesto por Treutter (1988) con modificaciones.

La fase móvil era un gradiente lineal compuesto por dos disolventes: A: Acetonitrilo-Ácido acético-Agua (50-2-48), B: Agua-Ácido acético 2 %

Tiempo	Solvente A	Solvente B
0	35	65
5	40	60
14	50	50
16	35	65

Se utilizaron como patrones los compuestos señalados en la Tabla III.1.

Tabla III.1- Relación de los compuestos inyectados con sus tiempos de retención

Tiempo de retención	Compuesto
9,28 ± 0,02	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído
10,69 ± 0,03	ácido <i>p</i> -cumárico
10,79 ± 0,02	Vanillina
12,10 ± 0,03	ácido ferúlico

La identidad de los compuestos fenólicos se determinó atendiendo a los tiempos de retención y a los espectros de absorción de los picos y de los patrones conocidos. La cuantificación de las sustancias detectadas se realizó mediante el uso de rectas de calibrado elaboradas con patrones comerciales para cada uno de los compuestos identificados.

III.4.7.4.- Estudio de los cambios en la pared celular de plantas de tomate resistentes inoculadas con *V. dahliae*

III.4.7.4.1.- Obtención de paredes celulares

Como material inicial, se utilizaron 10g de tejido fresco que eran homogeneizados con agua destilada, centrifugándose a continuación a 3000g durante 10 minutos, después de lo cual se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con una solución al 1% de Tritón X-100, volviéndose a centrifugar de nuevo en las mismas condiciones. Seguidamente, el precipitado de esta última centrifugación se lavó con agua, hasta conseguir la total eliminación del Tritón X-100, y a continuación se realizaron cuatro lavados con etanol absoluto.

El precipitado final se filtró a vacío sobre un disco de celulosa, realizándose varios lavados con éter etílico, hasta conseguir el secado total de las paredes celulares.

III.4.7.4.2.- Medida de ligninas de paredes celulares de plantas de *L. esculentum*

Uno de los métodos más usados es el ensayo con acetil-bromuro, desarrollado por Johnson y col. (1961) para permitir de una forma rápida y fácil la determinación de ligninas en muestras pequeñas de paredes (3-6mg).

Para llevar a cabo la cuantificación se tomaban 5mg de muestra de paredes y se les añadían 5mL de una mezcla 1:3 de bromuro de acetilo/ácido acético sometiéndolas a 70°C durante 30 minutos. Una vez enfriadas las muestras, se añadían 4,5mL de NaOH 2N. A continuación se centrifugaban durante 5 minutos a 1500g, descartándose el precipitado. Seguidamente se añadían 0,5mL de cloruro de hidroxilamina 7,5M, se filtraban las muestras a

través de un filtro de $0,45\mu\text{m}$ y se ajustaba el volumen final a 10mL con ácido acético. Por último se medía la absorbancia a 280nm usando como blanco 5mL de bromuro acetilo/ácido acético (1:3), 4,5mL de NaOH2N y 0,5mL de cloruro de hidroxilamina 7,5M. Para calcular la concentración de lignina nos basamos en la estimación de Johnson y col. (1961), según la cual una absorbancia de 0,24 se corresponde con una concentración de $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

III.4.7.4.3.- Oxidación con nitrobenzeno de paredes celulares de plantas de *L. esculentum*

Para llevar a cabo la reacción, 25mg de paredes celulares obtenidas según lo descrito en el apartado III.4.7.4.1 eran incubados durante 2 horas y media a 160°C en una mezcla de 5mL de NaOH 2N y 0,5mL de nitrobenzeno, usando para ello tubos pirex de tapón de teflón que eran agitados suavemente cada cierto tiempo. Al terminar el período de incubación los tubos se enfriaban y a cada uno se le añadían 10mL de H_2O destilada, extrayéndose en un embudo de decantación con 30mL de diclorometano (CH_2Cl_2). Esta extracción se realizaba tres veces con el fin de eliminar los productos de degradación del nitrobenzeno. El residuo acuoso de las tres extracciones se acidificaba entonces a un pH entre 1,0 y 2,0 con HCl 5N. Una vez ajustado el pH se extraía en un embudo de decantación con 30mL de diclorometano-acetato de etilo (1:1) repitiendo esta extracción tres veces. El conjunto de extracciones se juntaban en un único volumen, se le añadía Na_2SO_4 en exceso y tras haberlo filtrado se evaporaba a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo final se resuspendía en 1mL de metanol y se pasaba a través de un filtro de tamaño de poro de $0,45\mu\text{m}$ ajustándose el volumen final de nuevo a 1mL de MeOH.

Las muestras eran analizadas utilizando un sistema cromatográfico Alliance de Waters en las mismas condiciones que las descritas en el apartado III.4.7.3.3.

La oxidación con nitrobenzeno es probablemente el método degradativo más usado para el estudio de las ligninas pero, aunque es el más efectivo, tiene el inconveniente de que se acortan las cadenas laterales de las ligninas

y no proporciona información sobre sus grupos funcionales ni sobre sus interconexiones.

III.4.7.4.4.- Tioacidolisis de paredes celulares de raíces de *L. esculentum*

Para llevar a cabo la reacción se pesaban 10mg de las paredes celulares, obtenidas de muestras de raíces como se describe en el apartado III.4.7.4.1, y se mezclaban con 10mL de la disolución BF_3 eterato 0,2M en una mezcla 8,75/1 (v/v) dioxano/EtSH. La tioacidolisis se realizaba en un tubo de vidrio pirex con tapón de teflón en un bloque metálico a 100°C durante 4 horas, agitando suavemente cada cierto tiempo.

Una vez transcurridas 4 horas, se añadían 30mL de agua con el fin de detener la reacción y enfriar la mezcla. Seguidamente, se ajustaba el pH de la mezcla a un valor entre 3,0 y 4,0 con una solución 0,4M de carbonato sódico.

Una vez ajustado el pH, se procedía a la extracción con 30mL de diclorometano, usando para ello un embudo de decantación. Esta extracción se realizaba tres veces, tras lo cual los volúmenes obtenidos se juntaban, añadiéndose Na_2SO_4 en exceso para eliminar el agua arrastrada. A continuación se procedía a la evaporación, hasta sequedad, del diclorometano en un evaporador rotatorio a 40°C. El residuo final se disolvía en 1mL de diclorometano.

Finalmente, 5-10 μL de la solución se mezclaban con 100 μL de BSTFA y 10 μL de piridina (grado GC), y los trimetil-silil derivados se analizaban con un equipo de CG-espectroscopía de masas Trace GC (Thermo Finnigan).

Análisis de los trimetil-silil derivados en cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Para el análisis de las muestras anteriormente obtenidas, se utilizó un cromatógrafo Thermo Finnigan Trace GC, equipado con una columna DB-*XLB*, J&W, de 60m x 0,25mm de diámetro interno, usando Helio como gas portador a un flujo constante de 1mL min^{-1} .

El programa de temperatura fue desde 90°C hasta 270°C, a una velocidad de 5°C minuto^{-1} .

El cromatógrafo estaba acoplado a un detector de masas Thermo Finnigan Polaris Q, que trabajaba con una intensidad de impacto electrónico de 70 eV.

III.4.7.5.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre la medida de la actividad Fenilalanina amonio liasa

III.4.7.5.1.- Extracción de la enzima Fenilalanina amonio liasa

La enzima PAL se extrajo por el método descrito por El Ghaouth y col. (2002). Siguiendo este método las muestras eran homogeneizadas en un mortero con acetato sódico 50mM, pH 5,0 en una relación 1:2 (p:v). A continuación el homogeneizado era centrifugado a 4°C a 10000g durante 15 minutos, recogiendo finalmente el sobrenadante.

III.4.7.5.2.-Medida de la actividad de la enzima Fenilalanina amonio liasa

La actividad PAL se determinó siguiendo el método Beaudoin-Eagan y Thorpe (1985) que se basa en la medida directa de la formación de ácido *trans*-cinámico a partir de la L-fenilalanina por la acción de la enzima. La mezcla de reacción estaba constituida por L-fenilalanina 10mM en tampón Tris HCl 0,5M, pH 8,0. Tras una incubación entre 1-2 horas a 37°C, la reacción era detenida por la adición de 500µL de HCl 5,0M. A continuación la mezcla de reacción era centrifugada a 21000g durante 25 minutos a 4°C, recogiendo finalmente el sobrenadante. La cantidad de ácido *trans*-cinámico formado se determinó a partir de la absorbancia detectada a 290nm, y mediante el uso de una recta de calibrado realizada con concentraciones de ácido *trans*-cinámico de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100µg mL⁻¹, con un espectrofotómetro UV/Visible, Cary 3E (Varian).

III.4.7.5.3.- Medida de la expresión génica de los distintos homólogos PAL

III.4.7.5.3.1.- Extracción de RNA

El RNA total se extrajo a partir de muestras de raíces congeladas en nitrógeno líquido empleando el Kit comercial "Aurum™ Total RNA Mini Kit" (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA

obtenido se cuantificó espectrofotométricamente y su integridad se examinó por electroforesis en gel de agarosa con formaldehído (Sambrook y col., 1989)

El cDNA (RT-PCR) se sintetizó a partir de 100ng de RNA total, empleando el kit comercial "iScript DNA Synthesis Kit" (BioRad) según el protocolo suministrado por el fabricante.

III.4.7.5.3.2.- Diseño de cebadores

Las parejas de cebadores específicos para cada uno de los homólogos *PAL* se diseñaron usando el programa Primer-3 (Rozen y Skaletsky, 2000), a partir de secuencias depositadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias de los cebadores se detallan en la tabla IV.16.

La especificidad de los cebadores se evaluó mediante alineamientos con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando la herramienta BLAST, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Además, después de optimizar las condiciones de la reacción para cada pareja de cebadores, la calidad de los productos de PCR obtenidos con los distintos cebadores se comprobó por electroforesis finalmente, y como criterio de especificidad, se secuenciaron los productos de RT-PCR con cada una de las parejas de cebadores, comprobando que se trataba del fragmento de interés en todos los casos.

Una vez diseñados los cebadores, se optimizaron las condiciones de PCR, así pues fue necesario ajustar tanto las concentraciones de cebadores como de nucleótidos, las temperaturas de anillamiento y las concentraciones de cDNA que se añadieron en cada mezcla de reacción. La cantidad de producto de PCR para cada una de las diluciones de cDNA ensayada, era detectada mediante electroforesis en geles de agarosa y visualizada con EtBr. Las concentraciones de cDNA más adecuadas se utilizaron seguidamente para su análisis mediante la técnica de PCR en tiempo real.

III.4.7.5.3.3.- Ensayo de RT-PCR en tiempo real

La expresión génica relativa se cuantificó con el sistema de PCR en tiempo real iCycler iQ (BioRad). La mezcla de reacción (50 μ L) contenía 1X iQ SYBR Green Supermix (BioRad), 0,3 μ M de cada cebador y 2,5 μ l de cDNA. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de amplificación: 20 segundos a 95°C, 25 segundos a 60°C y 50 segundos a 72°C. Finalmente, se añadía un paso de elongación de 5 minutos a 72°C. El análisis de los resultados se realizó usando el software del fabricante, Optical System Software 3.0 (BioRad).

Como gen constitutivo, aquel que mantiene una expresión constante, se empleó el gen de la β -tubulina. Se comprobó que las eficiencias de amplificación siempre fueran mayores del 98%, así como que la eficiencia de la amplificación de todos los genes testados y del gen de la β -tubulina fueran equivalentes. Para ello se realizaron diluciones del cDNA y se representó el incremento de Ct (Δ Ct) de cada gen respecto al control (β -tubulina) frente al logaritmo de las diluciones de cDNA. El Ct se define como aquel ciclo en el que la emisión de fluorescencia por el producto de la PCR puede distinguirse del fondo. Cuando la pendiente de la recta era menor de 0,1, la cuantificación relativa de la expresión génica se realizó siguiendo el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), donde:

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{GI} (\text{muestra desconocida})_t - Ct_{\beta\text{-tub}} (\text{muestra desconocida})_t] - [Ct_{GI} (\text{muestra control})_{t=0} - Ct_{\beta\text{-tub}} (\text{muestra control})_{t=0}].$$

GI es el gen de interés y β -tub actúa como control constitutivo. La muestra control es la muestra que representa el valor 1 \times de expresión para el gen de interés y en nuestro caso son muestras de tallo de plantas no infectadas. Cada ensayo se repitió dos veces y cada medida de expresión se realizó por duplicado.

III.4.7.5.3.4.- Análisis evolutivo

El análisis filogenético se restringió exclusivamente a 116 nucleótidos del extremo 3' de 48 secuencias PAL localizadas National Center for

Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y de The Institute for Genomic Research (TIGR, <http://www.tigr.org/tdb/agi/>).

El análisis de los alineamientos de las secuencias de nucleótidos se llevó a cabo usando el programa BioEdit (Hall 1999) y Clustal X (Thompson y col., 1997). El árbol de máxima parsimonia se obtuvo con el programa MEGA versión 3.1 (Kumar y col., 2004).

La fiabilidad de las topologías resultantes se comprobó comprobando el "bootstrap" de cada rama interior del árbol después de 1000 réplicas.

III.4.8.- Obtención y caracterización de líneas celulares de *L. esculentum* cultivar Gardener

III.4.8.1.- Obtención de plantas *in vitro*

Semillas de *L. esculentum* se esterilizaron durante dos minutos en una dilución de etanol al 70% y se transfirieron inmediatamente a una disolución de hipoclorito sódico al 20% donde se mantuvieron durante 20 minutos. A partir de este momento las semillas fueron siempre manipuladas en condiciones asépticas en el interior de una cámara de flujo laminar, y todo el instrumental necesario fue previamente esterilizado en autoclave. Las semillas se lavaron repetidamente en agua destilada estéril. Tras dejar que se secan completamente fueron depositadas en la superficie del medio de cultivo sólido contenido en tubos de germinación. Se utilizó como medio base el descrito por Murashige y Skoog (1962) con las modificaciones que se especifican, que consisten en la adición de aquellos productos que se señalan (*) en la Tabla III.2. En lo sucesivo se referirá a este medio como medio base (MB). Se añadió agar en una concentración final de 8g L^{-1} y se ajustó el pH a 5,8. El medio con estas características será identificado en adelante como MBs (medio base sólido).

A continuación, los tubos que contenían las semillas se colocaron en una cámara de germinación durante 12-15 días, a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Tabla III.2.- Componentes del medio de cultivo.

Constituyente	Concentración mg L ⁻¹
Macronutrientes:	
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1900
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1650
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	170
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	440
Micronutrientes:	
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6,2
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .4H ₂ O)	22,3
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8,6
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,25
Sulfato cúprico (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,025
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,025
Yoduro de potasio (KI)	0,83
Fuente de hierro	
Sulfato férrico (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,8
EDTA disódico	37,3
Vitaminas de Morel (*)	
Tiamina	0,001
Piridoxina	0,001
Biotina	0,00001
Pantotenato de calcio	0,001
Ácido nicotínico	0,001
Mio- Inositol	0,1
Caseína (*)	250
Sacarosa	3x10 ⁴

III.4.8.2.- Inducción, optimización y mantenimiento de callos de *L. esculentum*

Para la obtención de callos friables, entendiendo por tales aquellos que se disgregan con facilidad, se procedió a la inducción de los mismos usando explantos procedentes de distintas partes de la planta y una combinación de

dos hormonas; el 2,4-D y la kinetina (Razdan, 1993; Arroyo y col., 1991 Steinitz y col., 2003), en concentraciones de $0,25\text{mg L}^{-1}$ y $0,0125\text{mg L}^{-1}$ respectivamente.

Cuando las plantas "in vitro" tenían una edad de 15-20 días se retiraron de los tubos en los que habían germinado y se practicaron secciones de tallo, cotiledón y hoja. En el tallo las secciones eran de una longitud de 0,3 cm aproximadamente. En el cotiledón se descartaron las zonas proximal y apical y se cortaron transversalmente secciones de la misma longitud, cuidando que cada una de ellas contuviese el tejido vascular central. Con las hojas se procedió de igual forma y, cuando fue posible, se obtuvieron explantos de $0,5\text{cm}^2$ de superficie. Todos los fragmentos así obtenidos se depositaron sobre el medio de cultivo sólido contenido en placas Petri de 9cm de diámetro. Las placas con los explantos fueron depositadas en la cámara de cultivo en total oscuridad y a una temperatura de 25°C .

Transcurridos 15 días los callos que presentaban aspecto friable fueron mantenidos por traslado de porciones de los mismos a placas Petri con medio fresco. Este proceso es necesario ya que existe un agotamiento de los nutrientes esenciales y una falta de agua. Por otro lado, las células secretan metabolitos al medio y estos pueden acumularse hasta unos niveles que resulten tóxicos. Estas porciones se usaron para iniciar suspensiones celulares una vez que crecieron y su aspecto era el adecuado.

III.4.8.3.- Obtención, optimización y mantenimiento de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares de tomate se iniciaron a partir de callos friables de aproximadamente 15 días. Para ello, 20g de callo friable eran introducidos en matraces Erlenmeyer con 80 mL de medio de cultivo MB al que se le añadieron las hormonas 2,4-D y kinetina en concentraciones de $0,25\text{ mg L}^{-1}$ y $0,0125\text{mg L}^{-1}$ respectivamente; ajustando el pH a 5,7 (se identificará este medio como MG). Las suspensiones se mantuvieron en agitación (140 rpm) en una cámara de cultivo a 20°C en total oscuridad.

Transcurridos 15-20 días, las suspensiones se mantuvieron transfiriendo parte de la suspensión a medio fresco. Se procedió a verter 100ml de medio

fresco sobre la suspensión de 15-20 días, se mezcló y se repartió en dos matraces Erlenmeyer de 250mL, conteniendo finalmente cada uno aproximadamente 100mL de suspensión. Estas suspensiones fueron mantenidas en las condiciones anteriormente descritas.

III.4.8.4.- Caracterización del crecimiento de las suspensiones celulares

Para caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares se midieron en distintas fases del crecimiento celular tres parámetros: volumen de empaquetamiento celular (PCV), conductividad y pH, valorándose a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de iniciadas las suspensiones.

El PCV es una variable indicativa de la tasa de división celular que permite identificar y diferenciar la fase logarítmica de crecimiento y la fase estacionaria.

La conductividad da una idea del consumo de nutrientes de las células. Una disminución de la conductividad se asocia a un descenso en la concentración de sales (nutrientes) en el medio e indica su agotamiento.

La variación del pH da una idea de la posible acidificación/alcalinización del medio debida a la producción de metabolitos por parte de las células en suspensión.

III.4.8.4.1.- Determinación del volumen de empaquetamiento celular (PCV)

Para determinar el PCV se tomaron muestras de 4mL de las suspensiones. Tras centrifugarlas a 4°C con un rotor basculante a 1000g durante 5 minutos se determinaba la proporción de volumen celular respecto del volumen total de la suspensión, considerando el valor obtenido como PCV. En el momento de establecer el PCV se separaron, con ayuda de una pipeta Pasteur, el sobrenadante considerándose como fluido extracelular y el precipitado tomándolo como masa celular.

III.4.8.4.2.- Determinación de la conductividad (Con) y pH

La conductividad eléctrica se midió mediante un conductivímetro Crison CM35, que proporciona además una medida de la salinidad. Los resultados se expresan en mS cm^{-1} .

La determinación del pH se efectuó mediante un pH-metro Crison microPH 2001.

III.4.8.5.- Elicitación de cultivos celulares de la línea de tomate resistente a *V. dahliae*

III.4.8.5.1.- Elicitación de cultivos celulares con un agente oxidante, H_2O_2

Las suspensiones celulares se elicitaron añadiéndoles 5mL de una solución concentrada de H_2O_2 a los cultivos celulares para alcanzar una concentración final de $100\mu\text{M}$. Para asegurar la esterilidad del proceso la solución se pasaba a través de un filtro de jeringa de $0,22\mu\text{m}$. Comenzando 20 minutos después de la elicitación, se recogieron muestras cada 5 minutos. Las se centrifugaron a $160g$ durante 5 minutos, y el fluido extracelular se utilizó para la medida de la actividad POD, mientras que las células de cultivo se utilizaron para la medida de la actividad PAL. El H_2O_2 se midió en ambas fracciones. Estas medidas se realizaron como se describe en los apartados III.4.7.1. III.4.7.2 y III.4.7.5.

Asimismo, se realizó una elicitación con $100\mu\text{M}$ de H_2O_2 en presencia de ácido ascórbico $200\mu\text{M}$.

III.4.8.5.2.- Elicitación con micelio liofilizado de *V. dahliae*

Para la obtención del micelio liofilizado, se tomaron trozos de 1cm^2 de hongo crecido en medio PDA y se incubaban en medio líquido PDB. Este cultivo se mantenía en agitación continua durante tres semanas. Posteriormente estos cultivos se pasaron a través de un filtro Whatman nº1 y se liofilizaron los micelios, obteniéndose un polvo fino.

Las suspensiones celulares se elicitaron con 5mL del polvo de micelio resuspendido en H_2O estéril, ajustado la concentración para que la concentración final en la suspensión fuera de $120\mu\text{g mL}^{-1}$ de medio

extracelular. La toma de muestras, la recogida y las medidas de POD PAL y H₂O₂ se llevaron a cabo como en el apartado III.4.8.5.1.

III.4.8.5.3.- Elicitación con micelio liofilizado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para la obtención del micelio liofilizado y la elicitación de suspensiones celulares de tomate se siguió la misma pauta de trabajo que ha sido descrita para el caso de *V. dahliae* (III.4.8.5.2). La toma de muestras, la recogida y las medidas de POD, PAL y H₂O₂ se llevaron a cabo como en el apartado III.4.8.5.1.

III.4.8.5.4.- Irradiación de suspensiones celulares con UV

Los cultivos se introdujeron en una placa petri de cristal 10cm de diámetro en agitación vigorosa y se sometieron a irradiación por luz ultravioleta durante 10 minutos a unos 20 cm de la fuente de luz, UV-C (Philips; TUV 15W/G15T8).

Una vez transcurrido el tratamiento, la toma de muestras, la recogida y las medidas de POD, PAL y H₂O₂ se llevaron a cabo como en el apartado III.4.8.5.1.

III.4.9.- Hibridación sustractiva por supresión (SSH)

La técnica de hibridación sustractiva permite comparar dos poblaciones de mRNA y obtener clones de genes que se expresan de manera diferencial en una de las poblaciones. Para ello es necesario un cDNA de referencia, denominado "driver" y un cDNA que contiene transcritos específicos diferencialmente expresados, denominado "tester".

En nuestro caso se realizó un tipo de hibridación sustractiva. En la que se utilizó como "driver", cDNA obtenido de raíces de plantas de tomate susceptibles a *V. dahliae* inoculadas con el hongo y como "tester" cDNA de raíces de plantas de tomate resistentes a *V. dahliae*, también inoculadas.

La extracción de RNA se realizó como se describe en el apartado III.4.7.5.3.1 y la purificación de mRNA se llevó a cabo con Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con el manual de instrucciones

La hibridación substractiva por supresión se realizó con el PCR-Select cDNA Subtraction kit de acuerdo con el manual de instrucciones (BD-Biosciences- Clontech, Palo alto, CA).

La mezcla de cDNAs parciales enriquecida de las secuencias expresadas diferencialmente en la población "tester" fue clonada en el plásmido pCRII-TOPO Vector (Invitrogen). Los plásmidos recombinantes se utilizaron para la transformación de células competentes de *Escherichia coli* (TOP10F').

La mezcla de transformación se añadió sobre placas petri que contenían medio LB con ampicilina a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ y estas placas se cultivaron 16 horas a 37°C . Como resultado, se obtuvieron colonias aisladas. Se amplificaron los insertos de cDNA de tomate a partir de 300 colonias bacterianas utilizando oligonucleótidos universales que reconocen secuencias del plásmido que flanquean la zona de inserción. La presencia de un inserto se comprobó por medio de electroforesis de los productos de amplificación en un gel de agarosa. En aquellos casos en que se determinó la existencia de un inserto de cDNA de tomate, el amplicón resultante se seleccionó para su secuenciación (Servicios Xerais, Universidade de A Coruña).

Resultados

IV.- Resultados

IV.1.- Detección y cuantificación de *V. dahliae* en distintos cultivares de Solánaceas

IV.1.1.- Diseño de cebadores

Como primer paso para llevar a cabo la detección y cuantificación de diferentes especies por medio de la metodología de PCR en tiempo real, es necesario el uso de secuencias diana específicas. Para la detección del hongo patógeno *V. dahliae* utilizamos un SCAR (Li y col. 1999). En el caso de *C. annuum*, *C. chinense* y *L. esculentum* diseñamos las parejas de cebadores con el programa primer-3, (Rozen y Skaletsky, 2000), a partir de secuencias depositadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias de los cebadores y los fragmentos de genes amplificados se detallan en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1.- Secuencias de cebadores utilizados para la cuantificación de *V. dahliae* mediante PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Diana	Número de acceso	Tamaño del fragmento (pb)
CAPR1F CAPR1R	GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT CAAGCAATTTAAACGATCCA	<i>C. annuum</i> ;PR1	AF053343	301
CChPAL1F CChPAL1R	AGCAATGTGCAATGGACAAG GCAGTATGCTAACTCCATGACAA	<i>C. chinense</i> ;PAL1	AF081215	301
LEPR1F LEPR1R	GCAACACTCTGGTGGACCTT ATGGACGTTGCTCCTCTCCAG	<i>L. esculentum</i> ;PR1	X71592	272
VDS1 VDS2	CACATTCAGTTCAGGAGACGGA CCGAAATACTCCAGTAGAAGG	<i>V. dahliae</i> ; SCAR	U23151	520

IV.1.2.- Ensayos de especificidad

Para comprobar la linealidad de la amplificación en un rango dinámico en PCR cuantitativa en tiempo real se analizaron previamente diluciones conocidas de DNA. En la figura IV.1 se muestran las curvas de regresión obtenidas después de la amplificación de DNA con las siguientes concentraciones 100, 10, 1, 0,1, 0,01 ng de DNA genómico tanto del patógeno *V. dahliae* como de sus huéspedes, *C. annuum*, *C. chinense* y *L. esculentum* con los cebadores VDS1/VDS2, CAPR1F/CAPR1R, CChPAL1F/CChPAL1R y

LEPR1F/LEPR1R, respectivamente. Sus coeficientes de correlación lineal varían entre $r = 0,972$ a $r = 0,996$. El ciclo umbral (Ct), ciclo de amplificación a partir del cual la intensidad de fluorescencia es mayor que la fluorescencia de fondo, se analizó frente al log de una concentración conocida de DNA genómico y las ecuaciones de regresión lineal se calcularon para la cuantificación de las muestras desconocidas por interpolación.

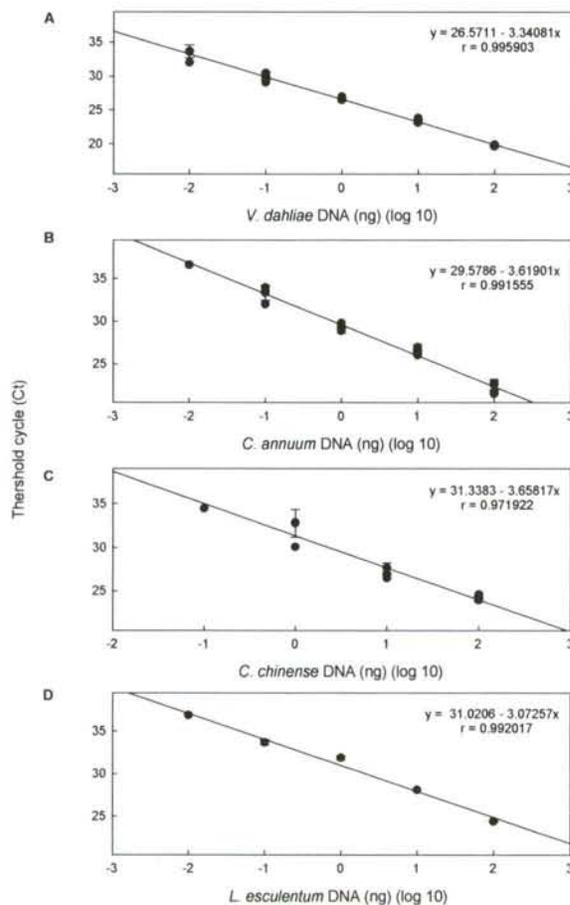


Figura VI.1.- Curvas estándar realizadas por amplificación de diluciones seriadas de DNA de A, *V. dahliae*; B, *C. annuum*; C, *C. chinense* y D, *L. esculentum*.

Cada pareja de cebadores es específica de especie y no amplificó DNA de los demás organismos analizados en este estudio ni de otros patógenos de Solanáceas, como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* o *V. albo-atrum* (Figura VI.2) todos ellos ampliamente distribuidos en las plantaciones gallegas de pimiento (Pomar

y col., 2001). La utilización de mezclas de DNA de planta y hongo como molde nos permitió establecer un límite de detección entre 0,1 y 1,0 ng μl^{-1} de DNA de hongo en plantas infectadas.

Para revisar la especificidad de los cebadores se secuenciaron los productos de amplificación y se pudo comprobar que las secuencias fueron idénticas a la de los genes a partir de los cuales fueron diseñados.

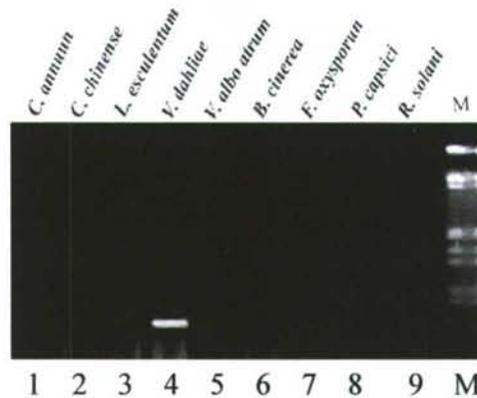


Figura VI.2.- Especificidad de los cebadores de *V. dahliae* VDS1/VDS2. Línea 1, *C. annuum*; línea 2, *C. chinense*; línea 3, *L. esculentum*; línea 4, *V. dahliae* VD53 (control positivo); línea 5, *V. albo-atrum*; línea 6, *B. cinerea*; línea 7, *F. oxysporum*; línea 8, *P. capsici*; línea 9, *R. solani*; línea 10, M, marcador molecular.

IV.1.3.- Detección y cuantificación de *V. dahliae* en plantas de pimiento

Para la detección y cuantificación de *V. dahliae* se utilizaron cinco cultivares de pimiento, cuatro cultivares de *C. annuum* (SCM331, Padrón, PI201234 y Luesia) y un cultivar de *C. chinense* (C118). Todos ellos se inocularon con *V. dahliae* y se recogieron muestras a los 23 y 34 días posteriores a la inoculación (dpi) para su posterior análisis. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecieron en las plantas a los 34 dpi. Como se describe en la Tabla IV.2., el único cultivar de los analizados que al ser inoculado con este patógeno experimenta defoliación es SCM331, y el cultivar que presenta un enanismo más severo es C118, único cultivar analizado de la especie *C. chinense*. Los demás cultivares analizados presentan lesiones, enanismo y engrosamiento en la zona del cuello raíz, a los 34 días post inoculación (dpi).

Tabla IV.2. Síntomas observados en los cultivares de pimiento analizados a los 34 dpi

Especie	Cultivar	Sintomatología
<i>C. chinense</i>	C118	Enanismo severo.
<i>C. annuum</i>	SCM331	Defoliación, enanismo, lesión leve y engrosamiento del cuello raíz.
	Padrón	Enanismo; lesión y engrosamiento del cuello raíz.
	PI201234	Enanismo; lesión y engrosamiento del cuello raíz.
	Luesia	Enanismo; lesión leve y engrosamiento del cuello raíz.

Después de la extracción de DNA de raíces e hipocótilos de los diferentes cultivares analizados, las distintas muestras se cuantificaron mediante PCR en tiempo real, pudiéndose observar los resultados en la figura IV.3. A través del análisis estadístico de los resultados se encontraron diferencias significativas en la relación DNA *V. dahliae*/DNA planta cuando se compararon los diferentes cultivares, con un $\alpha=0,05$. No se encontraron diferencias significativas en la relación de DNA *V. dahliae*/DNA planta entre las raíces de los cultivares SCM331, Padrón y PI201234, y tampoco se encontraron diferencias significativas entre raíces de PI201234 y Luesia. En cambio, en raíces de *C. chinense*, C118, encontramos una alta relación de DNA *V. dahliae*/DNA planta, significativamente mayor que en raíces de plantas de los cultivares analizados pertenecientes a la especie *C. annuum*. Cuando se compararon los resultados en hipocótilos, no se encontraron diferencias entre Padrón, PI201234 y Luesia; los hipocótilos de C118 y SCM331 difieren entre ellos y los demás cultivares. En este órgano la mayor relación entre DNAs se observó en SCM331 a los 34 dpi.

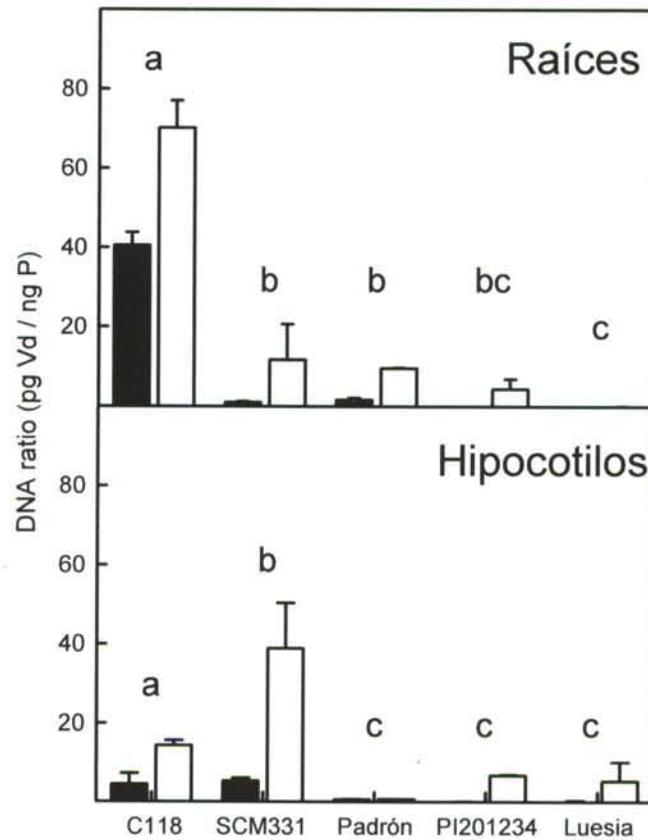


Figura IV.3.- Detección y cuantificación del DNA de *V. dahliae* en raíces e hipocotilos de cuatro cultivares de *C. annuum*, SCM331, Padrón, PI201234 y Luesia y un cultivar de *C. chinense*, C118, a los 23 (■) y a los 34 (□) días después de la inoculación. El contenido en DNA se expresó como pg de DNA del hongo por ng de DNA de planta. Los resultados son la media de tres ensayos independientes de qPCR e incluyen dos réplicas de cada muestra de DNA. Las barras de error representan la desviación estándar. Los cultivares marcados con la misma letra no presentan diferencias significativas a $\alpha = 0,05$.

Cuando se analizaron los cambios en la relación de DNA fúngico/DNA planta con el tiempo, se encontró un incremento general de los 23 a los 34 dpi en raíces e hipocotilos de los cultivares analizados. No se detectó DNA de *V. dahliae* en raíces de PI201234 y Luesia a los 23 dpi, posiblemente por encontrarse por debajo del límite de detección.

IV.1.4.- Detección y cuantificación de *V. dahliae* en plantas susceptibles y resistentes de tomate

Para la detección y cuantificación de *V. dahliae* se utilizaron dos líneas isogénicas de tomate, *Lycopersicon esculentum* cv. Gardener, una susceptible (LA3030) y otra resistente (LA3038). Las plantas se inocularon con *V. dahliae*, y las muestras se recogieron a los 23 y 34 dpi. Los síntomas observados en ambas líneas de tomate a los 34 dpi, se describen en la tabla IV.3. La línea resistente (LA 3038) no presentaba síntomas, mientras que en la susceptible (LA 3030) presentaba enanismo, lesiones y engrosamiento del cuello de la raíz.

Tabla IV.3.- Síntomas observados en las líneas de tomate analizadas a los 34 dpi

Especie	Línea	Sintomatología
<i>L. esculentum</i>	LA3030	Enanismo; lesión leve y engrosamiento del cuello raíz.
	LA3038	Asintomática.

Una vez extraído el DNA de raíces y cuello de la raíz, el contenido de DNA se cuantificó por medio de PCR en tiempo real. Cuando se compararon las líneas de tomate LA3030 y LA3038 (Tabla IV.4), se encontraron diferencias en la relación de DNA *V. dahliae*/DNA planta. En LA3030, la relación DNA *V. dahliae*/DNA planta en raíces permanece constante en el tiempo, pero esta relación en las muestras de cuello raíz se incrementa en 10 veces de los 23 a los 34 dpi. En LA3038, la relación de DNA fue significativamente menor en ambos órganos y decreció con el tiempo.

Tabla IV.4.- Detección y cuantificación de *V. dahliae* DNA en dos cultivares de *L. esculentum*, una susceptible (LA3030) y otra resistente que contiene el gen de resistencia *Ve* (LA3038) ($P \leq 0.05$).

	Síntomas ¹	pg DNA hongo / ng DNA planta (Media \pm DE) ²			
		23 dpi		34 dpi	
		Raíz	Cuello	Raíz	Cuello
LA3030	+	5,72 \pm 1,24a	2,38 \pm 0,67b	5,03 \pm 3,13a	25,6 \pm 0,810c
LA3038	-	0,55 \pm 0,05d	0,006 \pm 0,001e	0,01 \pm 0,006f	0,002 \pm 0,002g

Los resultados son la media de tres experimentos independientes de PCR cuantitativa en tiempo real.

¹(+), planta con síntomas; (-), planta sin síntomas.

Las medias con la misma letra no poseen diferencias significativas.

IV.1.5.- Detección y cuantificación de *V. dahliae* en muestras de invernadero

Para verificar la aplicación práctica del método, se realizó un muestreo para detectar verticilosis en ocho invernaderos de pimiento, localizados en Betanzos (B) y Padrón (P) (Tabla IV.5). En los invernaderos P1 y B1 se encontraron plantas aisladas con síntomas característicos de esta enfermedad; en los invernaderos P2, B2 y B3 sólo una o dos plantas presentaban síntomas; el invernadero B4 presentaba grandes zonas de plantas con síntomas de enfermedad como enanismo y marchitamiento y los invernaderos P3 y B5 no presentaba ningún síntoma característico de verticilosis.

Las muestras recogidas se analizaron y la mezcla de DNA del hongo y de la planta se cuantificó mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para cada uno de ellos. Las reacciones de amplificación se consideraron negativas cuando no se encontraba detección después de 50 ciclos. *V. dahliae* se detectó en plantas de los tres invernaderos de Padrón y también en suelo y agua de riego. De los cinco invernaderos de Betanzos, *V. dahliae* fue detectado en las plantas del invernadero B4, donde los síntomas de enfermedad eran más evidentes, pero no así en agua de riego. En los invernaderos P1 y B1, *V. dahliae* se detectó y cuantificó en una de las plantas recogidas en este invernadero. Además se detectó en suelo y agua de riego. En el invernadero P2, *V. dahliae* se detectó en una planta. En los invernaderos B2 y B3 el patógeno no fue detectado. El patógeno tampoco se detectó en el invernadero B5, donde además no se observaron síntomas de enfermedad.

Resultados

Tabla IV.5.- Detección y cuantificación de *V. dahliae* en diferentes explotaciones de Betanzos (B) y Padrón (P).

Explotación ¹		Planta ²	pg DNA hongo/ng DNA planta (Media ±DE)	Detección en suelo ³	Detección en agua de riego ³
P1	**	1 +	0,087 ± 0,002	+	+
		2 -	0,002 ± 0,0006		
P2	*	1 -	-	+	+
		2 -	0,002 ± 0,0009		
P3	-	1 -	0,002 ± 0,0009	+	-
		2 -	0,919 ± 0,199		
B1	**	1 -	-	+	+
		2 +	0,009 ± 0,0003		
B2	*	1 -	-	-	-
		2 -	-		
B3	*	1 -	-	-	-
B4	***	1 +	0,608 ± 1,03	+	-
		2 +	0,127 ± 0,0015		
B5	-	1 -	-	-	-

¹Grado de infección de la explotación, (-) no afectado, (·) ligeramente afectado, (··) relativamente afectado, y (···) muy afectado.

²(+), planta con síntomas; (-), planta sin síntomas.

³(+) detección positiva y amplificación de DNA de hongo y (-) detección negativa. Los resultados de la cuantificación de *V. dahliae* en planta son la media de dos experimentos independientes de PCR cuantitativa en tiempo real.

En el invernadero P3 no se observaron síntomas de enfermedad, aunque se detectó el patógeno en planta y en suelo. Los resultados de amplificación de las diferentes muestras con los cebadores específicos de *C. annuum* y *V. dahliae* se correlacionaba bien con el aspecto general de los invernaderos y del número de plantas infectadas.

IV.2.- Caracterización de la interacción *V. dahliae*-*L. esculentum*

Para llevar a cabo la caracterización de la interacción *V. dahliae*-*L. esculentum*, se estudiaron las posibles variaciones en el contenido en H₂O₂ y en las actividades enzimáticas POD y PAL. Ambas enzimas se las ha considerado llaves en el desarrollo de la resistencia contra patógenos (Madhaiyan et al., 2006). Su acción coordinada tiene como resultado cambios en las cantidades relativas de los compuestos fenilpropanoides, apreciados en sí mismos como compuestos de defensa (Hano et al., 2006). Para analizar estos parámetros, se utilizaron dos líneas de tomate del cultivar Gardener, LA

3030 y LA 3038, que difieren en la presencia del gen *Ve* que confiere resistencia frente al patógeno *V. dahliae*. Las líneas seleccionadas se inocularon con 1mL de una suspensión de 10^7 conidios mL^{-1} cuando las plantas tenían cuatro semanas de edad y se recogieron muestras a las 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 96 y 192 horas post inoculación (hpi). Una vez observados los cambios en el metabolismo descrito previamente, nos interesamos en el comportamiento de los distintos homólogos *PAL* durante la interacción.

IV.2.1.- Contenido en H_2O_2

La producción de H_2O_2 en raíces de las líneas isogénicas de *L. esculentum* cv. Gardener, LA3030 (susceptible) y LA3038 (resistente), control e inoculadas con *V. dahliae*, se determinó mediante el método del naranja de xilenol. Este método, que permite cuantificar la producción de H_2O_2 en tejidos vegetales, presenta una elevada sensibilidad para la detección de bajos niveles de hidroperóxidos solubles, de los que el más abundante es el H_2O_2 .

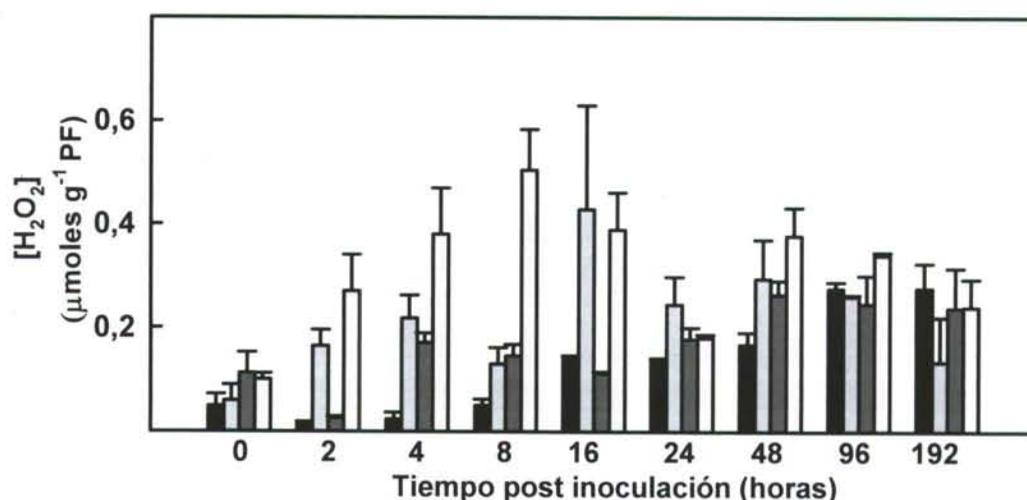


Figura IV.4.- Medida del contenido de H_2O_2 mediante el método del naranja de xilenol, en raíces de las líneas LA3030 y LA3038 de tomate, control e inoculadas. Control LA 3030 (■), Inoculada LA 3030 (◐), Control LA 3038 (▣), Inoculada LA3038 (◑).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.4. Durante las primeras 8 horas posteriores a la inoculación (hpi) se observó un aumento en el contenido en H_2O_2 en raíces de plantas resistentes (LA 3038) inoculadas

con *V. dahliae*, con un máximo a las 8 hpi, momento en el que dicho contenido es tres veces mayor respecto a plantas inoculadas de la línea susceptible y al control de la misma línea. Un segundo aumento en el contenido de H₂O₂ en estas muestras se produjo a partir de las 48 hpi y hasta las 96 hpi.

En raíces de plantas susceptibles (LA3030) inoculadas, se observa un único aumento a partir de las 2 hpi hasta las 96 hpi con un máximo a las 16 hpi. Al final del periodo analizado, 192 hpi, el contenido en peróxido de hidrógeno es similar en plantas control e inoculadas y en ambas líneas de tomate.

IV.2.2.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre la actividad de la enzima peroxidasa

IV.2.2.1.- Actividad de la enzima peroxidasa

En la gráfica IV.5 se muestra la evolución en el tiempo de la actividad peroxidasa en las líneas de tomate LA 3030 y LA 3038, tanto controles como inoculadas con *V. dahliae*. En ella se observa un leve aumento a partir de las 2 hpi hasta las 8 hpi que alcanza el mismo valor de actividad que en el resto de los controles y las inoculadas susceptibles. A partir de este momento se observa un segundo aumento de actividad en plantas inoculadas resistentes con un máximo a los 24 hpi. Al final de período analizado los valores de actividad peroxidasa son semejantes entre las distintas muestras analizadas, raíces de plantas control y raíces de plantas inoculadas con *V. dahliae*.

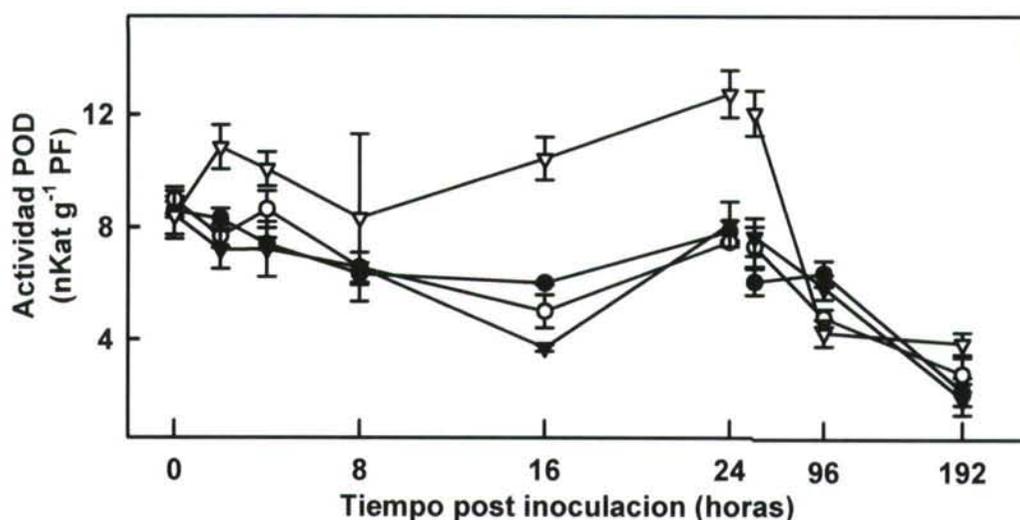


Figura IV.5.- Actividad Peroxidasa usando como sustrato 4-methoxynaphtol. Control LA 3030 (●), Inoculada LA 3030 (○), Control LA 3038 (▼), Inoculada LA 3038 (▽).

IV.2.2.2.- IEF de peroxidasa en raíces, controles e inoculadas de las líneas de tomate, susceptible LA 3030 y resistente LA 3038 a *V. dahliae*

Con el fin de comprobar si los cambios en la enzima peroxidasa eran sólo a nivel cuantitativo o implicaban una variación en el patrón isoenzimático, analizamos las muestras más significativas por medio de un isoelectroenfoco.

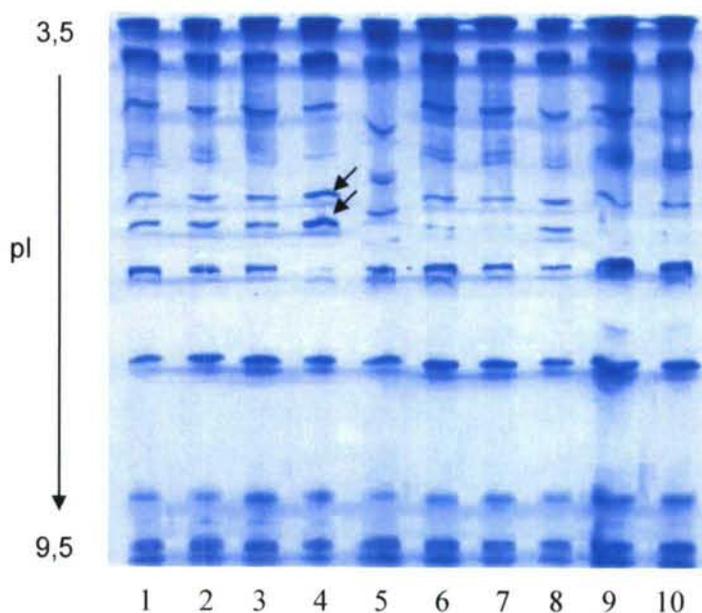


Figura IV.6.- Isoelectroenfoco de muestras de raíces inoculadas con *V. dahliae*, de plantas control de la línea LA 3030 (1) y LA 3038 (2) y plantas inoculadas LA 3030 2hpi (3), 1dpi (5), 2dpi (7) y 8dpi (9), y los mismos tiempos para la línea LA 3038 inoculada 2hpi (4), 1dpi (6), 2dpi (8) y 8dpi (10).

Como se observa la figura IV.6, la intensidad de bandas en los controles de ambas líneas es semejante. En las raíces de plantas inoculadas resistentes a las 2 hpi se observa un aumento de la intensidad en dos isoenzimas ácidas.

IV.2.2.3.- Estudio del metabolismo fenólico: fenoles totales, fenoles ligados a pared y ligninas

IV.2.2.3.1.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre los fenoles totales y fenoles ligados a pared

IV.2.2.3.1.1.- Cuantificación de compuestos fenólicos totales en raíces

Una vez estudiadas las variaciones en la actividad de la enzima POD, nos propusimos estudiar las variaciones en el contenido de compuestos fenólicos en los mismos sistemas estudiados: *V. dahliae* – *L. esculentum* cv. Gardener, líneas LA 3030 y LA 3038.

Para ello se realizó la extracción de los compuestos fenólicos en muestras de raíces, recogidas en los mismos tiempos que en los análisis realizados para medir el contenido en H₂O₂ y la actividad de la enzima POD.

El único cambio claro que se aprecia en el conjunto de compuestos fenólicos, solubles y ligados, de las muestras ensayadas, es un incremento en el contenido total en las raíces de las plantas resistentes inoculadas a las 2 hpi (Tabla IV.6).

Tabla IV.6.- Compuestos fenólicos totales en raíces de plantas control e inoculadas con *V. dahliae* (LA3030 y LA3038).

Tiempo post inoculación (horas)	µg equivalentes ácido ferúlico mg ⁻¹ PF			
	LA 3030		LA 3038	
	Control	Inoculada	Control	Inoculada
2	9,49±1,19	9,97±1,04	10,25±0,33	15,51±1,15*
4	9,94±0,39	10,12±0,13	9,79±0,34	9,23±0,94
8	8,79±1,10	9,54±0,05	7,95±1,23	9,29±0,43
16	7,35±1,96	7,92±0,57	8,13±0,86	9,39±2,15
24	10,18±1,04	10,43±1,40	10,84±0,12	8,70±1,35
48	8,50±1,33	7,60±1,17	9,43±1,17	8,07±1,57
96	10,48±2,18	9,30±2,28	8,88±0,88	8,31±0,80
192	8,42±1,52	9,73±0,20	9,75±0,17	9,81±0,16

Los resultados son la media de tres ensayos independientes.
Medias seguidas con *, difieren significativamente.

IV.2.2.3.1.2.- Identificación mediante HPLC-DAD de los compuestos fenólicos ligados a paredes celulares en raíces de las líneas LA 3030 y LA 3038 de *L. esculentum* cv Gardener, inoculadas con *V. dahliae*

Para comprobar si había cambios en las cantidades relativas de diferentes compuestos fenólicos en las muestras, éstas se analizaron mediante HPLC. Los resultados de la cromatografía fueron similares en todos los casos, pero en el caso de los fenólicos ligados a la pared se detectaron algunas variaciones en cuatro de los picos. Por sus tiempos de retención y los espectros de absorción UV/VIS de los picos, éstos se identificaron como ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, vanillina y *p*-hidroxibenzaldehído .

Cuando se analizó el contenido en ácido ferúlico de raíces de plantas control e inoculadas, de ambas líneas de tomate, LA 3030 y LA 3038, se encontró un único incremento a las 2 hpi en plantas inoculadas resistentes (Tabla IV.7). En el caso del ácido *p*-cumárico se observó un incremento en plantas resistentes inoculadas entre las 16 y las 24 hpi (Tabla IV.8) y entre las 48 y las 96 hpi en plantas susceptibles inoculadas.

Tabla IV.7.- Análisis mediante HPLC del contenido en ácido ferúlico en raíces de plantas de tomate (LA3030 y LA3038) control e inoculadas con *V. dahliae*.

Tiempo post inoculación (horas)	µg ácido ferúlico mg ⁻¹ PF			
	LA 3030		LA 3038	
	Control	Inoculada	Control	Inoculada
2	2,63±0,36	3,50±0,01	2,59±0,01	5,16±0,29*
4	3,39±1,12	2,31±1,63	2,68±0,01	3,34±0,93
8	2,75±0,49	2,34±1,62	2,91±0,14	3,30±0,93
16	1,89±0,12	3,22±0,02	3,42±0,12	2,92±0,13
24	2,94±0,03	3,68±0,17	2,95±0,43	3,56±0,31
48	2,85±0,03	1,88±0,59	3,61±1,39	3,33±1,29
96	3,65±0,25	4,85±0,09	3,25±0,21	4,57±0,50
192	3,31±0,01	3,46±0,26	3,44±0,17	4,48±1,68

Los resultados son la media de tres ensayos independientes.
Medias seguidas con *, difieren significativamente.

Tabla IV.8.- Análisis mediante HPLC del contenido en ácido *p*-cumárico en raíces de plantas de tomate (LA3030 y LA3038) control e inoculadas con *V. dahliae*.

Tiempo post inoculación (horas)	µg ácido ferúlico mg ⁻¹ PF			
	LA 3030		LA 3038	
	Control	Inoculada	Control	Inoculada
2	0,22±0,02	0,41±0,06	0,54±0,01	0,27±0,01
4	0,43±0,05	0,38±0,15	0,33±0,09	0,37±0,07
8	0,42±0,02	0,51±0,09	0,48±0,01	0,44±0,18
16	0,20±0,19	0,35±0,14	0,46±0,01	1,00±0,29*
24	0,10±0,02	0,41±0,11	0,51±0,05	1,01±0,12*
48	0,63±0,46	1,01±0,68*	0,60±0,23	0,92±0,40*
96	0,40±0,02	1,51±0,34*	0,46±0,30	0,61±0,14*
192	0,57±0,27	0,66±0,46	0,40±0,35	0,45±0,22

Los resultados son la media de tres ensayos independientes.
Medias seguidas con *, difieren significativamente.

La tabla IV.9 muestra los resultados del análisis del contenido en vanilina de las mismas muestras. Únicamente se aprecia un aumento en las raíces de la línea resistente inoculada entre las 98 y las 192 hpi.

Tabla IV.9.- Análisis mediante HPLC del contenido en vanillina en raíces de plantas de tomate (LA3030 y LA3038) control e inoculadas con *V. dahliae*.

Tiempo post Inoculación (horas)	µg vanillina mg ⁻¹ PF			
	LA 3030		LA 3038	
	Control	Inoculada	Control	Inoculada
2	0,14±0,01	0,24±0,01	0,09±0,01	0,26±0,01
4	0,20±0,01	0,20±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01
8	0,21±0,01	0,20±0,09	0,20±0,01	0,24±0,05
16	0,16±0,01	0,20±0,01	0,15±0,01	0,19±0,02
24	0,14±0,01	0,22±0,03	0,23±0,01	0,27±0,01
48	0,15±0,01	0,17±0,01	0,20±0,01	0,27±0,06
96	0,23±0,01	0,23±0,01	0,21±0,02	0,43±0,02*
192	0,20±0,01	0,22±0,05	0,21±0,03	0,34±0,02*

Los resultados son la media de tres ensayos independientes.
Medias seguidas con *, difieren significativamente.

En el caso del *p*-hidroxibenzaldehído se observa un incremento en las raíces de plantas resistentes inoculadas entre las 24 y las 192 hpi (Tabla IV.10) y un ligero aumento en las raíces de plantas susceptibles inoculadas entre las 48 y las 96 hpi.

Tabla IV.10.- Análisis mediante HPLC del contenido en *p*-hidroxibenzaldehído en raíces de plantas de tomate (LA 3030 y LA 3038) control e inoculadas con *V. dahliae*.

Tiempo post inoculación (horas)	µg <i>p</i> -hidroxibenzaldehído mg ⁻¹ PF			
	LA 3030		LA 3038	
	Control	Inoculated	Control	Inoculated
2	0,49±0,03	0,40±0,01	0,48±0,01	0,421±0,05
4	0,43±0,04	0,37±0,01	0,38±0,02	0,43±0,01
8	0,39±0,04	0,38±0,08	0,37±0,01	0,48±0,02
16	0,25±0,09	0,34±0,05	0,38±0,01	0,54±0,03
24	0,32±0,07	0,37±0,07	0,33±0,06	0,85±0,07*
48	0,35±0,07	0,52±0,04*	0,49±0,02	0,97±0,01*
96	0,31±0,03	0,57±0,04*	0,44±0,02	1,61±0,01*
192	0,38±0,01	0,38±0,01	0,37±0,08	0,80±0,07*

Los resultados son la media de tres ensayos independientes.
Medias seguidas con *, difieren significativamente.

IV.2.2.3.2.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre las ligninas de plantas de tomate

IV.2.2.3.2.1.- Cuantificación de las ligninas en paredes celulares de raíces de *L. esculentum* inoculadas con *V.dahliae*

Una vez estudiadas las variaciones en los compuestos fenólicos ligados a la pared celular, nos dispusimos a estudiar el efecto que podría tener la inoculación con *V.dahliae* sobre la cantidad total de ligninas. Para ello aplicamos el método del bromuro de acetilo, que permite conocer la cantidad total de ligninas presente en las paredes celulares. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.11 Como se observa, encontramos un aumento de ligninas en las raíces de la línea resistente inoculada a los 16 y a los 28 dpi respecto a su control. En las raíces inoculadas de la línea susceptible este aumento no aparece hasta los 28 dpi.

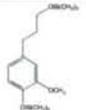
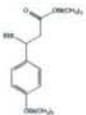
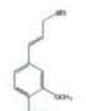
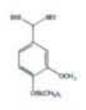
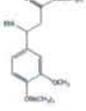
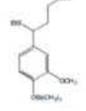
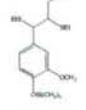
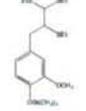
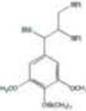
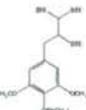
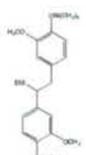
Tabla IV.11.- Cuantificación de las ligninas en raíces de raíces de plantas control e inoculadas mediante el método del bromuro de acetilo. Datos expresados en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ pared celular)

		Tiempo tras la inoculación		
		8 días	16 días	28 días
LA 3030	Control	12,36 \pm 0,24	11,24 \pm 0,64	10,64 \pm 0,19
	Inoculadas	13,31 \pm 0,51	12,98 \pm 0,90	19,53 \pm 0,33*
LA 3038	Control	11,27 \pm 0,48	10,24 \pm 0,82	13,53 \pm 0,46
	Inoculadas	12,10 \pm 0,92	18,63 \pm 0,18*	17,34 \pm 0,73*

IV.2.2.3.2.2.- Estudio de la composición monomérica y nivel de polimerización de las ligninas en paredes celulares de raíces de *L. esculentum* inoculadas con *V.dahliae*

Una vez observados los aumentos en la cantidad total de ligninas mediante el método del bromuro de acetilo, y con el objeto de conocer si estaban acompañados por cambios cualitativos en la composición y estructura de las mismas, sometimos a las paredes celulares a dos métodos degradativos: la tioacidolisis y la oxidación con nitrobenzeno.

Tabla IV.12.- Derivados trimetilsilil de los productos de degradación obtenidos por tioacidolisis de las ligninas.

Ref.	TR* (min)	m/z (Intensidad relativa)	Producto de tioacidolisis	Fragmento original en las paredes celulares
DHCA	22,2	326(4), 311(7), 236(2), 221(11), 209(23), 206(33), 179(12), 73(100)		Grupos terminales dihidroconiferil alcohol
pC	26,7	370(1), 309(11), 265(100), 239(10), 177(32), 75(21), 73(92)		Unidades derivadas del ácido p-cumárico
CAlc O-4	27,3	296(18), 281(3), 235(100), 204(31), 131(64), 75(12), 73(94)		Grupos terminales O-4 del coniferil alcohol
V	27,4	333(1), 315(6), 269(100), 239(10), 73(45)		Grupos terminales de la vanillina
Fer	27,9	400(1), 385(1), 339(1), 295(1), 269(3), 207(30), 192(4), 73(100)		Unidades derivadas del ácido ferúlico
CAlc O-4	30,6	358(7), 343(6), 297(92), 235(38), 209(31), 205(10), 75(86), 73(100)		Grupos terminales O-4 del coniferil alcohol
CAlc β-O-4	35,2	418(1), 403(2), 295(8), 269(100), 235(10), 75(2), 73(6)		Coniferil alcohol β-O-4 (eritro y treo)
CAld β-O-4	35,4	418(4), 403(10), 283(100), 222(65), 192(27), 135(48), 75(13), 73(34)		Coniferilaldehído β-O-4 (eritro y treo)
SAlc β-O-4	36,7	448(1), 403(1), 325(5), 299(100), 269(8), 265(14), 239(2), 75(3), 73(8)		Sinapil alcohol β-O-4 (eritro & treo)
SAlld β-O-4	36,9	448(1), 433(5), 313(40), 252(100), 222(20), 135(62), 75(40), 73(56)		Sinapilaldehído β-O-4 (eritro y treo)
Est	37,9	478(1), 463(1), 417(6), 269(100), 73(34)		Unidades derivadas de estructuras estilbeno

TR*: tiempo de retención medio aproximado para el conjunto de todas las muestra

IV.2.2.3.2.2.1.- Tioacidolisis

La tioacidolisis es una depolimerización ácida, que actúa mediante la escisión de los enlaces β -O-4. El método combina la acción de un ácido fuerte, el BF₃ eterato, y un nucleófilo, EtSH.

Como la tioacidolisis degrada las ligninas a estructuras que mantienen las características de las cadenas originales, la determinación de los monómeros obtenidos y sus cantidades nos permiten obtener gran cantidad de información sobre los grupos funcionales y la estructura de las ligninas.

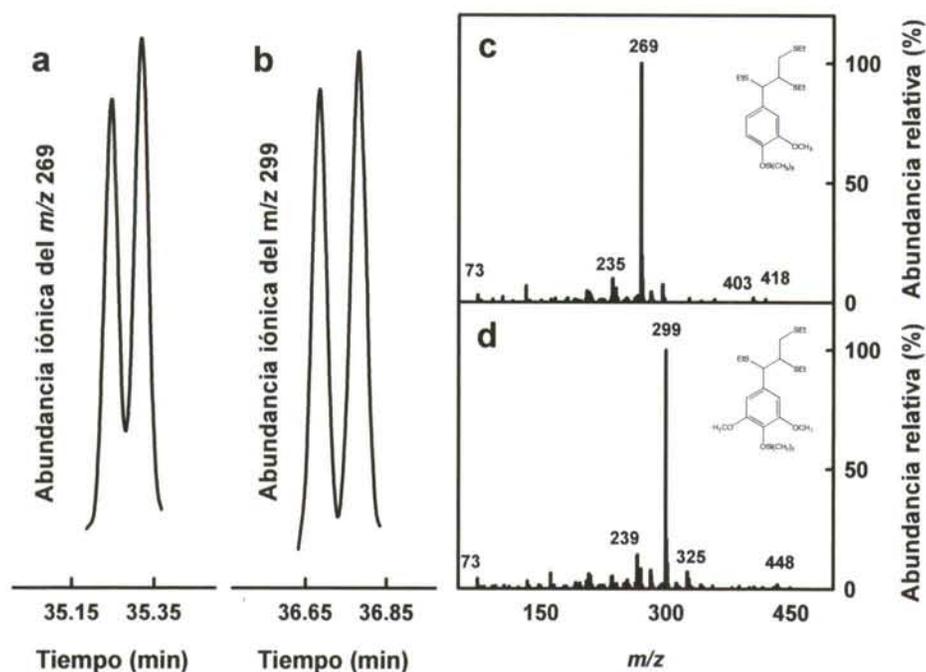


Figura IV.7.- Perfiles de cromatografía de gases (a y b) y espectros de masas (c y d) de los monómeros tioetilados derivados de estructuras aril-glicerol- β -aril-éter del alcohol coniferílico (a y c) y del alcohol sinapílico (b y d).

En la tabla IV.12 se muestran los distintos fragmentos identificados tras el análisis mediante CG/MS de los productos de tioacidolisis de las diferentes muestras. Principalmente, se han detectado monómeros tioetilados (isómeros eritro y treo), que surgen de estructuras aril-glicerol- β -aril éter derivadas de los alcoholes coniferílico y sinapílico (Figura IV.7) y de sus respectivos cinamaldehydos, estructuras todas ellas típicas de las ligninas de

angiospermas. Cabe destacar que no se detectaron estructuras derivadas del alcohol cumarílico.

Asimismo, se han detectado estructuras terminales O-4 del alcohol coniferílico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, vanillina y dihidroconiferil alcohol. Por último, también se encontraron estructuras estilbeno derivadas del alcohol coniferílico.

El valor de corriente iónica total nos permite cuantificar cada uno de los fragmentos detectados. En la tabla IV.13 se muestran estos valores para las diferentes muestras. Como se puede observar, en las plantas inoculadas a los 28 dpi se produce un aumento generalizado en la abundancia de casi todos los fragmentos, en consonancia con lo observado en la cuantificación de ligninas por el método del bromuro de acetilo, independientemente de si se trata de la línea susceptible o la resistente. Son destacables los cambios mostrados en las plantas inoculadas resistentes a los 28 dpi, con aumentos muy importantes en monómeros β -O-4, y con un aumento del coniferilaldehído de 3,3 veces la cantidad presente en el control. En esta muestra es también muy significativo el aumento mostrado por los monómeros terminales O-4 del DHCA y la vanillina, que aumentan 8,4 y 4,2 veces, respectivamente.

Tabla IV.13.- Abundancia absoluta de los diferentes productos de degradación obtenidos tras la tioacidólisis de paredes celulares. Los datos están expresados como corriente iónica total ($\times 10^{-8}$)

		β -O-4				Est	DHCA	O-4 terminales				
		CAIc	CAId	SAIc	SAId			pC	CAIc	V	Fer	
16 dpi	3030	Control	1438,9	18,1	998,4	49,0	18,2	Tr	2,1	8,5	3,2	10,1
		Inoculadas	1363,8	40,1	719,5	32,2	7,6	Tr	2,0	7,9	4,3	148,1
	3038	Control	1307,9	18,3	916,7	21,0	12,3	Tr	2,1	9,8	3,1	4,1
		Inoculadas	1240,2	40,3	659,2	18,0	16,8	8,0	2,0	18,3	6,4	287,3
28 dpi	3030	Control	1499,2	52,3	702,0	83,0	17,1	0,9	1,9	18,0	4,1	120,8
		Inoculadas	1707,2	59,8	1351,9	65,0	10,3	1,2	3,4	15,9	5,1	158,9
	3038	Control	1213,9	40,2	973,7	67,0	15,9	0,7	2,2	40,1	3,9	162,1
		Inoculadas	2173,4	133,5	1703,2	97,0	30,7	5,9	4,1	63,7	16,2	385,1

Además de las cantidades individuales de cada uno de los monómeros obtenidos, se han calculado las relaciones existentes entre diferentes grupos, atendiendo a la naturaleza química de cada monómero y al tipo de enlace en el

que participa (Tabla IV.14). A los 16 dpi, se observa un aumento, en las plantas inoculadas, en la relación de grupos guayacilo (G), frente a los siringilo (S), tanto en la línea susceptible como en la resistente, pasando de valores próximos a 1,4 a valores superiores a 2,0. Este aumento observado a los 16 dpi desaparece a los 28 dpi, donde las relaciones mostradas por las plantas control e inoculadas vuelven a ser muy similares. Por su parte, la relación entre monómeros β -O-4 y O-4 terminales, indicativa del nivel de polimerización de la fracción lineal de las ligninas, se reduce a los 16 dpi desde valores próximos a 100 en los controles hasta 13,3 y 6,1 en las plantas inoculadas de la línea susceptible y la línea resistente, respectivamente. Este descenso en la relación es debido mayoritariamente a un aumento drástico en los niveles de grupos terminales O-4 en las plantas inoculadas, sobre todo del ácido ferúlico (Tabla IV.13).

Tabla IV.14.- Relaciones existentes entre los diferentes tipos de monómeros y enlaces obtenidos tras la tioacidólisis de paredes celulares de tomate

	ΣG	ΣS	G/S	$\Sigma \beta-O-4$	$\Sigma O-4$	$\beta-O-4/ O-4$	TIC/ μg lignina
16 dpi							
3030 Control	1497,00	1047,40	1,43	2504,40	23,90	104,79	227,37
Inoculadas	1571,80	751,70	2,09	2155,60	162,30	13,28	178,88
3038 Control	1355,50	937,70	1,45	2263,90	19,10	118,53	225,03
Inoculadas	1617,30	677,20	2,39	1957,70	322,00	6,08	123,27
28 dpi							
3030 Control	1712,40	1434,90	1,19	2986,40	145,70	20,50	235,78
Inoculadas	1948,10	1416,90	1,37	3183,90	194,50	16,37	173,00
3038 Control	1476,80	1040,70	1,42	2294,80	209,00	10,98	186,72
Inoculadas	2808,50	1800,20	1,56	4107,10	475,00	8,65	266,64

Por último, se calculó la relación entre la corriente iónica total, para todos los monómeros obtenidos de la tioacidólisis y la cantidad total de lignina cuantificada por el método del bromuro de acetilo (Tabla IV.14). Esta relación refleja qué parte de la lignina es susceptible de ser degradada por la tioacidólisis y en consecuencia pertenece a la fracción lineal de las ligninas. En las plantas control, esta relación permanece constante en valores próximos a 230. La inoculación provoca que, a los 16 días, las plantas susceptibles y las resistentes vean reducida esta relación a valores de 179 y 123 respectivamente, lo que indica una fase lineal relativa al total de ligninas mucho menor. A los 28 dpi las plantas susceptibles continúan con valores

similares, pero las resistentes aumentan drásticamente su fase lineal, superando incluso los valores de las plantas control, debido principalmente a la incorporación de monómeros β -O-4 del alcohol coniferílico y del alcohol sinapílico (Tabla IV.15).

IV.2.2.3.2.2.2.- Oxidación con nitrobeneno

La oxidación en medio alcalino con nitrobeneno es un método que degrada las ligninas dando lugar a la obtención de los benzaldehídos: *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído, dependiendo de si la degradación proviene de estructuras tipo hidroxifenilo (H), guayacilo (G) o siringilo (S), respectivamente.

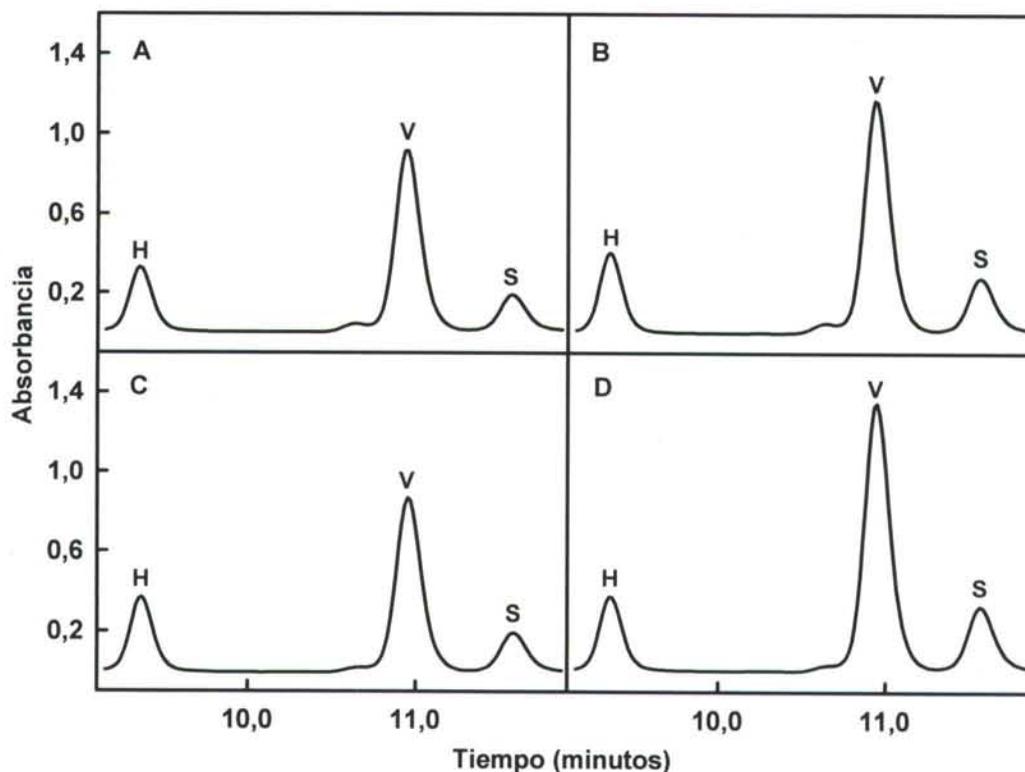


Figura IV.8.- Cromatogramas de HPLC de los productos de oxidación con nitrobeneno; *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanillina (V) y siringaldehído (S), de paredes celulares obtenidas a partir de raíces de *L. esculentum* cv Gardener, LA 3030 control (A), LA 3030 inoculada con *V. dahliae* (B), LA 3038 control (C) y LA 3038 inoculada con *V. dahliae* (D), recogidas a los 28 días post inoculación.

Resultados

Por ello, el análisis por HPLC (Figura IV.8) de los productos de degradación obtenidos tras someter a las muestras de paredes celulares a la oxidación con nitrobenzenceno nos ha permitido calcular las cantidades de cada uno de estos benzaldehídos y las proporciones H/G/S de cada una de las muestras.

En la tabla IV.15, se muestran los resultados obtenidos a partir de paredes celulares de raíces de plantas resistentes y susceptibles a los 16 y 28 dpi. A los 16 dpi en plantas inoculadas del cultivar resistente se observa un aumento en el total de monómeros obtenidos con respecto a las plantas control, y este aumento se corresponde con los mayores valores mostrados también en la cuantificación llevada a cabo por el método de bromuro de acetilo (Tabla IV.11). Este aumento va acompañado de un cambio en las proporciones relativas de los monómeros aumentando la proporción de grupos G en las plantas inoculadas en detrimento de los grupos S, hecho que ya había sido observado en la fracción lineal de las ligninas mediante la tioacidolisis. Este cambio de composición se observa de igual manera en la variedad susceptible LA3030.

Tabla IV.15.- Composición monomérica de las ligninas en raíces de plantas de tomate control e inoculadas con *V.dahliae*

		Producto de oxidación con nitrobenzenceno ($\mu\text{g}/\text{mg}$ pared celular)			Relación G/S H/G/S (%)			
		<i>p</i> -HBA*	Vanillina	Siringaldehído	H	G	S	
16 dpi	3030 Control	45,0 \pm 2,2	91,5 \pm 1,5	41,0 \pm 9,0	2,2	25	52	23
	3030 Inoculada	41,0 \pm 2,0	99,0 \pm 7,0	18,0 \pm 4,9	5,5	26	62	12
	3038 Control	47,0 \pm 1,1	86,0 \pm 5,9	29,1 \pm 0,9	2,9	29	53	17
	3038 Inoculada	59,0 \pm 5,8	113,0 \pm 1,1	18,9 \pm 0,9	5,9	30	59	10
28 dpi	3030 Control	46,0 \pm 12,9	95,0 \pm 15,4	23,1 \pm 5,9	4,1	28	58	14
	3030 Inoculada	52,0 \pm 0,9	90,1 \pm 1,1	19,1 \pm 2,0	4,7	32	55	12
	3038 Control	47,0 \pm 1,0	98,1 \pm 2,1	22,0 \pm 5,9	4,5	28	58	13
	3038 Inoculada	57,0 \pm 4,9	100,5 \pm 9,0	23,1 \pm 5,2	4,4	31	56	13

**p*-HBA: *p*-hidroxibenzaldehído

A los 28 dpi, las relaciones G/S se igualan entre plantas control e inoculadas, independientemente de la variedad, pero se observa en ambas un aumento en unidades de tipo H, hecho que no se observaba en la tioacidolisis,

donde no se pudo detectar alcohol *p*-cumarílico. Atendiendo sólo a la relación entre los grupos G y S, se observa a las 16 dpi un comportamiento similar al detectado mediante la tioacidolisis, aumentando la proporción de los grupos G ante la inoculación con *V. dahliae*; a los 28 dpi los valores entre plantas control e inoculadas se vuelven a igualar. En este caso los valores de la relación G/S son mayores a los mostrados en la tioacidolisis, hecho que concuerda con una mayor riqueza del núcleo condensado de las ligninas en grupos G, respecto a la fase lineal susceptible de degradación por parte de la tioacidolisis.

IV.2.3.- Estudio de la Fenilalanina amonio liasa

IV.2.3.1.- Medida de la actividad Fenilalanina amonio liasa

La medida de la actividad fenilalanina amonio liasa se llevó a cabo en raíces, tanto control como inoculadas con *V. dahliae*, en los dos cultivares de *L. esculentum*, LA 3038 y LA 3030.

Para medir la actividad de esta enzima se siguió el método de Beaudoin-Eagan y Thorpe (1985), que se basa en la formación de ácido transcinámico a partir de la fenilalanina por la acción de la enzima.

En la figura IV.9 se observa un aumento de actividad PAL en raíces de plantas resistentes a *V. dahliae*, LA 3038, a partir de las 2 hpi, alcanzando un máximo a las 8 hpi. A las 8 hpi la actividad de esta enzima en estas muestras es el triple que en las plantas susceptibles inoculadas y en los controles de ambas líneas. A su vez, los controles de ambas líneas y la susceptible inoculada presentaban valores similares durante este primer período.

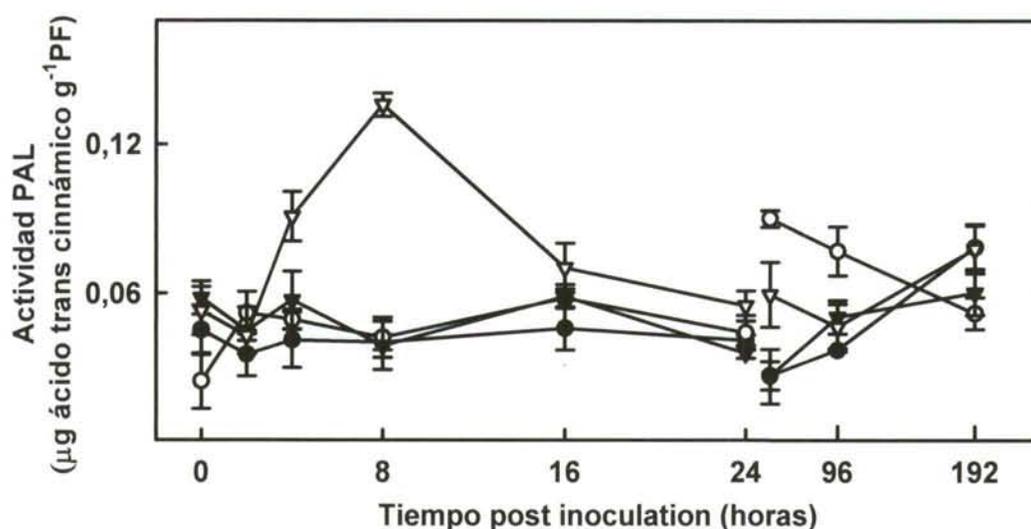


Figura IV.9.- Medida de la actividad fenilalanina amonio liasa usando L-fenilalanina como sustrato. Control LA 3030 (●), Inoculada LA 3030 (○), Control LA 3038 (▼), Inoculada LA 3038 (▽).

Entre las 48 hpi y las 96 hpi aparece un segundo aumento en la actividad de la enzima PAL, en las muestras de raíces de las plantas susceptibles inoculadas. Este aumento cuyo máximo de actividad tiene lugar las 48 hpi, fue inferior al máximo observado en las plantas resistentes inoculadas. Al final del período analizado los valores de actividad, tanto de raíces de ambas líneas de plantas control como de plantas inoculadas con el patógeno, fueron similares.

IV.2.3.2.- Expresión génica de los distintos homólogos PAL

IV.2.3.2.1.- Búsqueda y diseño de cebadores de los distintos homólogos PAL

Una vez observado el rápido incremento en la actividad de la enzima PAL en las raíces de las plantas inoculadas resistentes, decidimos estudiar las posibles diferencias en los niveles de expresión de los diferentes genes PAL en tomate.

Tabla IV.16.- Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR de los diferentes homólogos PAL de *L. esculentum*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Diana	Número de acceso	Tamaño (pb)
LE02F	AGTGGCAACCCTTTAATTCG	<i>L. esculentum</i> ; PAL 1	TC153702 M83314	479
LE02R	CATGTCATCATGTTCACAAAGC			
LE415F	GGACAATGGAAAGGCACCTA	<i>L. esculentum</i> ; PAL 2	TC165415	303
LE415R	ATGTCGCTTGCACTGTCTCA			
LE86F	ACGAATTAAGGCCGTGTTG	<i>L. esculentum</i> ; PAL 3	TC153686	295
LE86R	TTTCTGGCAAGCATCTAGCA			
LE99F	CGGTGAGGAGATTGACAAGG	<i>L. esculentum</i> ; PAL 4	TC153699	199
LE99R	CCTGTAAAGTTGTAGAAATTGAATGAA			
LE88F	GGTTGGTTAGACAAGAAGTTGGA	<i>L. esculentum</i> ; PAL 5	TC153688 M90692	404
LE88R	TGTCGTAGTGGGCGTGATTA			
LE67F	TTGCAACAGGATCAACGAA	<i>L. esculentum</i> ; PAL 6	TC165267	220
LE67R	TTGCTTCACTTCACTTCTAACAGACTGG			
LEbtubF	GGGTAAGATGAGCACAAAGGA	<i>L. esculentum</i> ; β -tubulina	TC153831	440
LEbtubR	GGCAGAAATTGAACAAACCAA			

Con objeto de poder llevar a cabo el análisis de la expresión, las secuencias de los distintos homólogos PAL de *L. esculentum* se obtuvieron del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (PAL1, PAL5) y del Institute for Genomic Research (TIGR) (<http://www.tigr.org/tdb/agi/>) (PAL2, PAL3, PAL4 y PAL6). Después se diseñaron cebadores específicos de cada homólogo PAL usando el programa Primer-3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Las secuencias se detallan en la tabla IV.16.

En la figura IV.10 se muestra el alineamiento de los distintos homólogos y la situación de los cebadores diseñados para cada una de las secuencias. Se observa además que el extremo 3' no codificante difiere entre ellas, mientras que en la parte codificante presentan una elevada homología.

Resultados

```

PAL 1 AAGAATGTCAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATTGGAGCTTTCGAGGACGAATTAATCGCT 1975
PAL 2 -----
PAL 3 AAGAATGTGAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATTGTAGCTTTCGAGGACGAATTAAGGCC 580
PAL 4 AAGAATGTGAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATTGTAGCTTTCGAGGACGAATTAAGGCC 301
PAL 5 AAGAATGTGAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATTGTAGCTTTCGAGGACGAATTAAGGCC 2037
PAL 6 -----GCTCAATCTTCCAAAAGATTGTAGCTTATAAGAA--AAGTTTANGTCT 46

PAL 1 GTGTGGCTAAAGAAGTTGAGAGTGTAAAGAGCTGTTTTGAAAGTGGCAACCTTTAATT 2035
PAL 2 -----GGAGATTGAGAGTGTAGATGTGATTTGGACAATGGAAAGGCACCTATT 49
PAL 3 GGGTTGCCTAAAGAAGTTGAGAGTGTCAAGAGCTGTTGTTGAAAGTGGCAACCTTCAATT 640
PAL 4 GCGTTGCTAAAGAAGTTGAGAGTGTCAAGAGCTGTTGTTGAAAGTGGCAACCTTCAATT 361
PAL 5 GTGTGGCTAAAGAAGTTGAGAGTGTCAAGAGCTGTTGTTGAAAGTGGAAACCTTCAATT 2097
PAL 6 GTTTTACCAAGAGAAGTCGAGAGTGTCCAGAGTCGCGTTGAAAGTGGAAACCCCGCGAAT 106
    * * * * *

PAL 1 CGTTAACAGGATCACAGAATGCAGATCATATCCATTGTACAGGTTGGTGAGAGAAGAAGCT 2095
PAL 2 GGTAAATAGAATCAAGAATGCAGGTCATATCCATTGTACAAATTTGTAGGGGAAGAATTA 109
PAL 3 CCTAACAGGATCACAGAATGCAGATCATATCCATTGTACAGGTTGGTGAGACAAGAAGCT 700
PAL 4 CCTAACAGGATCACAGAATGCAGATCATATCCATTGTACAGGTTGGTGAGACAAGAAGCT 421
PAL 5 CCTAACAGGATCACAGAATGTAGATCATATCCATTGTACAGGTTGGTTAGACAAGAAGCT 2157
PAL 6 CGAAACAGGATCAACGAATGCAGATCATACCCGCTCTACAAGTTGTTAGGGAGGAGCTC 166
    * * * * *

PAL 1 GGAACAGAATTTGTACGGGTGAAAAGTTTCGATCACCTGGTGAGGAGATTGATAAAGTG 2155
PAL 2 GGTGCTAAGTATTTGACAGGTGAAAAGCTCTATCTCCTGGTGAAGTATTTGATAAAGTG 169
PAL 3 GGATCAGAATTTGACAGGTGAAAAGTTTCGATCACCCGGTGAGGAGATCGACAAGGTG 760
PAL 4 GGATCAGAATTTGACAGGTGAAAAGTTTCGATCACCCGGTGAGGAGATTGACAAGGTG 481
PAL 5 GGAACAGAATTTGACAGGTGAAAAGTTTCGATCACCCGGTGAGGAGATTGATAAAGTTA 2217
PAL 6 GGGACGGAATTTGTACAGGAGAAAAGTAAAGTACCAGGTGAAGAATGTGACAAGGTG 226
    * * * * *

PAL 1 TTTACAGCAATATGTAATGGACAGATTATTGATCCATTGTTGGAGTGTCTGAAGAGCTGG 2215
PAL 2 TTTACAGCTATGAATGAAGTAAAGTTGATAGATCCATTGCTTAATTGCTTGAAGGAATGG 229
PAL 3 TTTACAGCAATGTGCAATGGACAGATCATGATCCATTGTTGGAGTGTCTCAAGAGCTGG 820
PAL 4 TTTACAGCAATGTGCAATGGACAGATCATGATCCATTGTTGGAGTGTCTCAAGAGCTGG 541
PAL 5 TTTACAGCAATTTGCAATGGACAAATCATGATCCATTGTTGGAGTGTCTCAAGAGCTGG 2277
PAL 6 TTTACAGCAATGTGCAATGGACAAATCATGATCCATTGTTGTAATGCTTAAAGGAATGG 286
    * * * * *

PAL 1 AATGGTCTCCTCTTCCAATCTGCTAAATGTGTTATCTTTCAAGTCTTTTTTTGTACC 2275
PAL 2 AATGGTCTCCTCTTCCAATCTGCTAAAGAGAACTAGGACTTATGTTGCTTGGACACTTC 289
PAL 3 AATGGTCTCCTCTTCCAATCTGCTAGATGCTTTCCAGAAAAAAAAGACCAAGTTGTGAATG 880
PAL 4 AATGGTCTCCTCTTCCAATCTGCTAGATGTTTGTCAAGTCTTATTTTTTCAGTGAATTA 601
PAL 5 AATGGTCTCCTCTTCCAATCTGCTAAATGTTTGTCAACTGTTACTTTCAAAATCTTTTT 2337
PAL 6 AATGGTCTCCTCACTCCAGTCTGTAGAGTGAAGCAAGGTTTTATTATGTTAAATGT 346
    * * * * *

PAL 1 TTTTAGTAATTACTAGAATTATAATGATGTTATGAACTTATATTAATAAATAATATTTT 2335
PAL 2 AAAGCGTGGTGTGGGATCCTTTAAAGTGGTATATTTTAGAGGATTTGAGACAGTCCA 349
PAL 3 CT-TGTCTAGTGCTA-TTT--TTCAGATCTTTTTTGTCTTATGGTGAATTAATCA-CA 935
PAL 4 CT-ACAATTATAATA-AT---CTCAAAATGTATCTTCAATGCAATTTTCAACATTTTACA 656
PAL 5 TT-TACCTTACAGTA-ATTTACTATAATCATAATATCATTTTATTGTATTTTGGCC-ATA 2394

PAL 1 TGACTATAAAATTTAGTTTTGTTAATGAAATTAAGGCTCAATCTGTGTTCT---TTCCT 2392
PAL 2 AGCGACATAGGGAAAACATATTTGCTTAATATTTGAGTACATATTTTCAAGTTTAT 409
PAL 3 TAATATGTTGTGAACCTACATCTTTTGGTTAACTTGAGAGAGTGTAAAC---TCTCT 992
PAL 4 GGTTATAATACATATCTTTGTGCTCTCG----- 685
PAL 5 TGAACCTCTTGAATATATTGGTTGTAGCTATATATTTATCAAGTCTCTTT---TTTAT 460
PAL 6 TGAATATTGCTATCAATATAAGATTTTGTCTATTAGATTGTTAATCTTAAACAACAT 2454
PAL 7 TTGCAATTACTTCA-ATT--ATTTTTTACATTTACCAATTTGGAGTTAAAACTAAATA 403

PAL 1 TCTGTTATCTGAATATTATAAGAATTAAGTAATCTTTTAGCTTTGTGAACATGATGACA 2452
PAL 2 TTTTCTAGTTTTGGAACCTTTTCTAATGGTTGTATGAATATTGGTGAATCTTTGAAC 469
PAL 3 TAAATATGAATATGCTCTTTTTCAGTAAAAAAGCTTAAATGAAAAGTGACAGTGTGCTTAT 1052
PAL 4 -----
PAL 5 ATTAGATGATATCATTTAACATTAACAATAACGTACCCAATTTTATATTAAGATTTAAC 2514
PAL 6 TCTATGAAAATAAAGAAAAGTGACCTGTGCTTAT----- 496

PAL 1 TGCTTTCTT----- 2461
PAL 2 TTATAGATGACACTATAAAGCAATTTGATTTGAACTTTTGTGGCTTCTTTCAAGAGACA 529
PAL 3 GTCATTTCAATCTTCTGTCA----- 1074
PAL 4 -----
PAL 5 AATTTTTAATCAGCCCACTACGACAAAAACAGCTTTTAGCGATATTAATATTGACAT- 2573
PAL 6 -----

```

Figura IV.10.- Alineamiento de las secuencias de los homólogos PAL de tomate. Los codones Stop aparecen en cursiva y negrita. Se indican subrayados los cebadores utilizados tanto para RT-PCR semicuantitativa como para RT-PCR en tiempo real.

IV.2.3.2.2.- Especificidad de los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los distintos homólogos *PAL*

Para demostrar la especificidad de los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los distintos homólogos *PAL*, se secuenciaron los productos de amplificación resultantes y se pudo comprobar que las secuencias eran idénticas a las esperadas. En la figura IV.11 se muestra los distintos productos de amplificación utilizando DNA de *L. esculentum* como molde. En el carril 7 aparece el producto de amplificación del gen de la β -tubulina, gen constitutivo que hemos utilizado en nuestro trabajo.

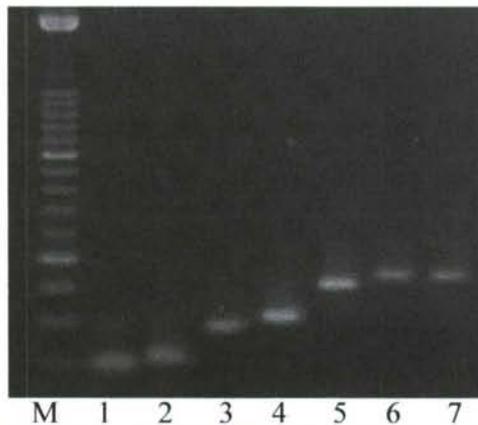


Figura IV.11.- Productos de amplificación de los distintos homólogos *PAL* utilizando como molde DNA genómico. (M) marcador molecular; (1), *PAL* 4; (2), *PAL* 6; (3), *PAL* 3; (4), *PAL* 2; (5), *PAL* 5; (6), *PAL* 1; (7), β -tubulina.

IV.2.3.2.3.- RT-PCR semicuantitativa en distintos órganos de ambas líneas de tomate, LA 3030 y LA 3038 controles

Después de haber observado la presencia de 6 homólogos diferentes para la *PAL*, pasamos a estudiar su expresión en los distintos órganos de la planta de tomate por medio de RT-PCR semicuantitativa.

Para realizar la RT-PCR semicuantitativa, cada muestra se amplificó con los distintos cebadores de los homólogos *PAL*. Las concentraciones de RNA total utilizadas para poder visualizar en geles de agarosa al 1%, los productos de amplificación de los distintos homólogos, fueron de 20 ng μL^{-1} para *PAL* 2, *PAL* 3, *PAL* 4 y *PAL* 6, para la detección del homólogo *PAL* 5 se necesitaron 200 ng μL^{-1} y finalmente para la *PAL* 1 fueron necesarios 600 ng μL^{-1} de RNA

total, lo que muestra que no todos los homólogos presentan los mismos niveles de expresión. También se realizó una PCR convencional con los cebadores de la β -tubulina para comprobar que el RNA no estaba contaminado con DNA.

En la figura IV.12, que se analizó con el sistema de imagen Quantity One de Biorad, se observa que los diferentes genes *PAL* se expresan en todos los órganos estudiados (raíces, hipocótilos, epicótilos, hojas y flores) de las plantas de las líneas LA 3030 y LA 3038. Los genes *PAL 2*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 6* se expresan a niveles comparables, mientras que *PAL 1* y *PAL 5* se expresan a niveles mucho más bajos en todos estos órganos. Los niveles de expresión de cada uno de los homólogos en todos los órganos analizados parecen muy uniformes, con la probable excepción de los cotiledones, en los que podría haber una expresión reducida.

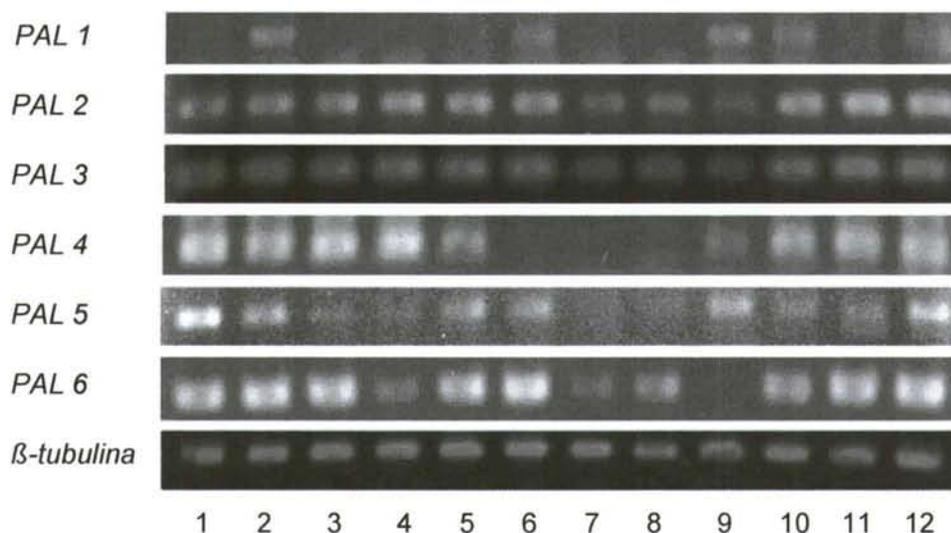


Figura IV.12.- Expresión de los homólogos PAL en diferentes órganos de las líneas isogénicas de tomate susceptible y resistente, comparados con la expresión en los mismos órganos del gen constitutivo de la β -tubulina. (1), Raíz LA 3030; (2), Raíz LA 3038; (3), Hipocotilo LA 3030; (4), Hipocotilo LA 3038; (5), Epicotilo LA 3030; (6), Epicotilo LA 3038; (7) Cotiledón LA 3030; (8), Cotiledón LA 3038; (9), Hoja LA 3030; (10), Hoja LA 3038; (11), Flor LA 3030; (12), Flor LA 3038.

La *PAL 2* se expresa ligeramente más en cotiledones, hojas y flores de la línea de tomate resistente a *V. dahliae*, LA 3038, así como la *PAL 3* en hojas de la línea LA 3038. Respecto a la *PAL 4* se observa una mayor intensidad en las muestras correspondientes a raíces e hipocótilos de la línea susceptible al

patógeno. La *PAL 6* se expresa ligeramente más en raíces, cotiledones, hojas y flores de la línea resistente y también se observa mayor intensidad en hipocotilos de la línea susceptible. La *PAL 5* se expresa más en todos los órganos de la línea de tomate susceptible a *V. dahliae*, excepto en flores donde se observa mayor intensidad en la línea resistente. Finalmente en lo relativo a la *PAL 1* se observa mayor intensidad de banda en raíces, epicotilos, hojas y flores de la línea LA 3038.

Las muestras de los distintos órganos de las líneas isogénicas de tomate se analizaron también con los cebadores de la β -tubulina, como control interno. Como se observa en la figura, la intensidad de los productos de amplificación con estos cebadores, se mantiene constante independientemente del órgano.

IV.2.3.2.4.- Análisis de expresión de los homólogos *PAL 2*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 6* mediante RT-PCR en raíces de plantas control

Con el fin de conocer si los niveles de expresión de los homólogos *PAL 2*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 6*, eran semejantes entre sí, se analizaron muestras de raíces de ambas líneas de tomate, LA 3030 y LA 3038, mediante la técnica de PCR en tiempo real (Figura IV.13). Los resultados mostraron ligeras diferencias en los valores Ct al analizar las muestras control con los distintos cebadores de estos homólogos. El análisis de los resultados se realizó utilizando como valor control de referencia, el menor valor Ct, perteneciente al homólogo *PAL 2*. Todos, respecto a los valores Ct obtenidos al analizar ambas muestras, se relacionaron con los obtenidos con los cebadores diseñados para el gen constitutivo, gen de la β -tubulina.

El mayor nivel de expresión relativo, lo presenta la *PAL 2*, seguido de la *PAL 3* y *PAL 4*, que presentan valores de expresión muy semejantes entre sí. Finalmente, el menor nivel de expresión en raíces de plantas de tomate lo presenta el homólogo *PAL 6*; además, este es el único homólogo que presenta diferencias en el nivel de expresión entre plantas que contienen los genes *Ve* e *I*, LA 3038 y las que no los contienen, LA 3030, ya que el nivel de expresión en la línea LA 3038 es tres veces mayor que en la línea LA 3030.

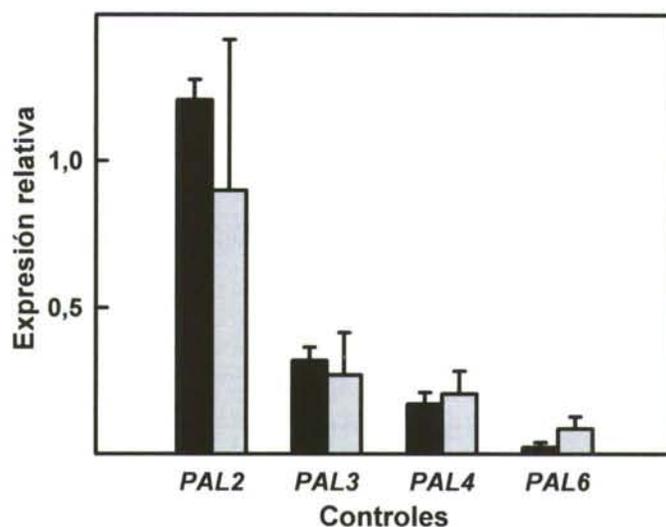


Figura IV.13.- Análisis mediante RT-PCR en tiempo real del nivel de expresión de los homólogos *PAL 2*, *PAL3*, *PAL4* y *PAL 6* en raíces de plantas de tomate de la línea susceptible LA 3030 (■) y resistente LA3038 (◐)

IV.2.3.2.5.- Análisis de los homólogos *PAL* de mayor expresión mediante RT-PCR en tiempo real durante la interacción de las líneas isogénicas de *L. esculentum* cv. Gardener, LA 3030 y LA 3038 con *V. dahliae*

La técnica de RT-PCR en tiempo real nos permitió conocer la expresión génica relativa de los homólogos de la familia génica *PAL*: *PAL 2*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL6*, en el transcurso de la infección con *V. dahliae* en las raíces de las líneas de tomate resistente (LA 3038) y susceptible (LA 3030) a este patógeno. La expresión relativa de los distintos homólogos se midió a las 0, 4, 8, y 48 hpi (Figura IV.14).

El homólogo *PAL 2* muestra un máximo de expresión en raíces de plantas resistentes e inoculadas con el patógeno, a las 4 hpi descendiendo hasta valores control a las 8 hpi. Este aumento es 6 veces mayor que en plantas control de ambas líneas. En plantas susceptibles se aprecia un descenso de expresión de este homólogo.

En el caso del homólogo *PAL 3* se observa un aumento a partir de las 4 hpi pero el máximo se alcanza a las 8 hpi. Este máximo es 9 veces mayor respecto a las plantas control de ambas líneas así como a la línea susceptible inoculada. En las plantas susceptibles inoculadas se aprecia un aumento de expresión a las 48 hpi, 3,5 veces mayor respecto a los controles y el doble que

la planta resistente inoculada en el mismo tiempo, pero no llega a alcanzar el máximo valor de expresión alcanzado en de los homólogos de plantas resistentes inoculadas con *V. dahliae*.

Respecto a *PAL 4* observamos que su expresión es mayor en las raíces de plantas inoculadas resistentes que en las raíces de plantas inoculadas susceptibles durante todo el período analizado respecto a los niveles de expresión de este homólogo en las raíces de plantas inoculadas susceptibles al patógeno.

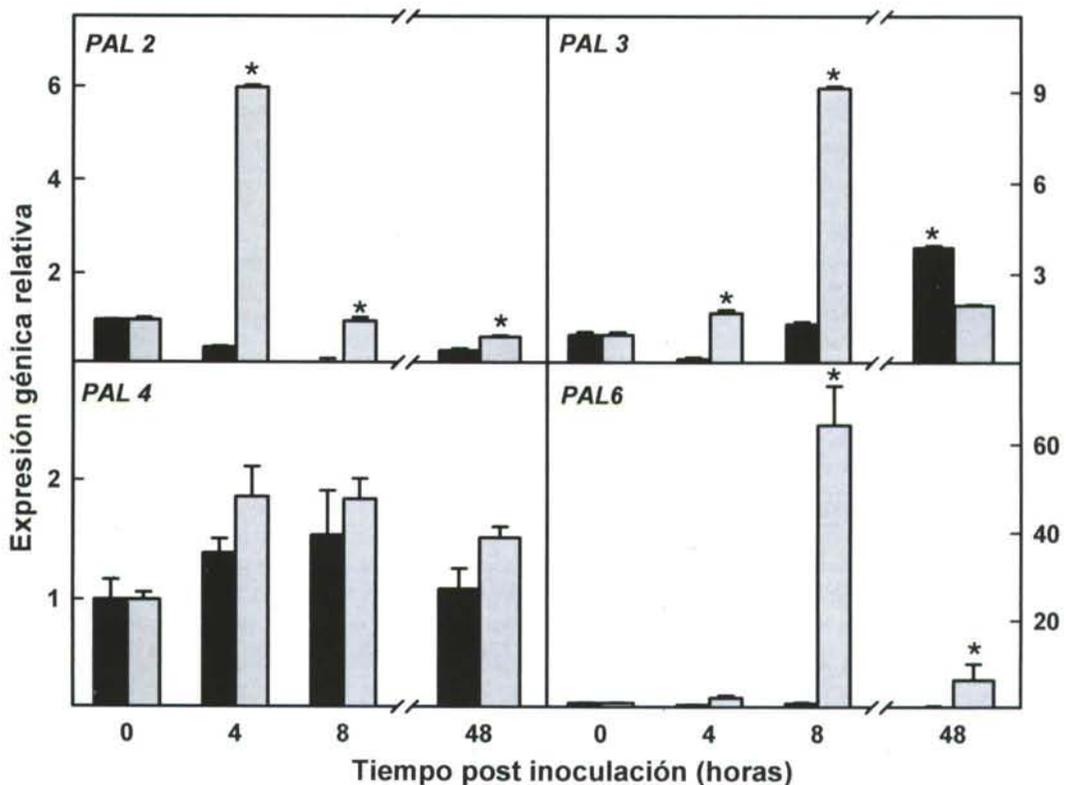


Figura IV.14.- Análisis por RT-PCR en tiempo real de los niveles de expresión génica relativa de los homólogos *PAL 2*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 6* en raíces de plantas de tomate de la línea susceptible LA 3030 (■) y resistente LA3038 (■) después de la inoculación con *V. dahliae* por medio de RT-PCR en tiempo real.

Finalmente, el homólogo *PAL 6*, experimenta un aumento de expresión en las raíces de plantas resistentes inoculadas con *V. dahliae* resistentes entre las 4 y las 48 hpi, con un máximo a las 8 hpi. Este aumento es aproximadamente 60 veces mayor que en las raíces de plantas control de ambas líneas y en las raíces de plantas susceptibles inoculadas. En estas

últimas, a lo largo de todo el proceso, los valores relativos de expresión génica son similares entre sí y también respecto a los de las raíces de las plantas control de ambas líneas de tomate.

IV.2.3.2.6.- Relaciones filogenéticas de los genes *PAL*

Las secuencias de los genes *PAL* almacenadas en el GenBank (Tabla IV.17) se compararon con las seis secuencias de tomate de nuestro estudio. Concretamente, se comparó una secuencia de 116 nucleótidos de la región 3', parte de ella perteneciente a la región no codificante. El árbol filogenético de máxima parsimonia obtenido (Figura IV.15) se enraizó en las secuencias pertenecientes a las especies más antiguas, *Isoetes lacustis* y *Selaginella kraussiana*. El árbol muestra una topología que agrupa a la mayoría de las especies de angiospermas analizadas en cuatro ramas claramente diferenciadas (A, B, C y D), mientras que *Picea abies* y *Equisetum arvense* aparecen en dos ramas independientes. Los 6 homólogos *PAL* de *L. esculentum* se agruparon en dos ramas diferentes, A y B. En la rama A, además de los homólogos de tomate *PAL 2* y *PAL 6*, la mayor parte de las secuencias de genes pertenecieron a plantas leñosas, plantas como *Populus kitakamiensis*, *Populus tremuloides*, *Coffea canephora* y *Quercus suber*; también se encontraron, además, las secuencias de genes de *Trifolium pratense*, *Nicotiana tabacum* y *Daucus carota*. En la rama B, encontramos los cuatro homólogos de tomate restantes, *PAL 1*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 5*, así como homólogos de otras especies dicotiledóneas como *N. tabacum*, *D. carota*, *Solanum tuberosum*, *Capsicum chinense* e *Ipoema batatas*.

Una tercera rama, C, estaba formado por los diferentes homólogos *PAL* de distintas especies de monocotiledóneas (*Hordeum vulgare*, *Oriza sativa* y *Triticum aestivum*) y una cuarta rama, D, estaba formada por los cuatro homólogos *PAL* de *Arabidopsis thaliana*.

Tabla IV.17.- Relación de especies utilizadas para realizar el árbol filogenético junto con el número de acceso al banco de genes.

Especie	Nombre identificativo	Número de acceso	Especie	Monbre identificativo	Número de acceso
<i>A. thaliana</i>	AIPAL1	AY303128	<i>N. tabacum</i>	PALTobac	X78269
<i>A. thaliana</i>	AIPAL2	AY303129	<i>N. tabacum</i>	TagT402	(1)
<i>A. thaliana</i>	AIPAL3	AY528562	<i>N. tabacum</i>	TOBPAL1	D17467
<i>A. thaliana</i>	AIPAL4	AY303130	<i>N. tabacum</i>	TOBTPA1A	M84466
<i>C. chinense</i>	CapchiPAL1	AF081215	<i>O. sativa</i>	OSPALa	XM_473192
<i>C. canephora</i>	PAL1Cofcan	AF460203	<i>O. sativa</i>	OSPALb	XM_466843
<i>D. carota</i>	gDcPAL1	D85850	<i>P. abies</i>	pal2piabi	AM293549
<i>D. carota</i>	gDcPAL3	AB089813	<i>P. kitakamiensis</i>	palg1Popkit	D30656
<i>E. arvense</i>	PALEquiar	AY803283	<i>P. kitakamiensis</i>	PALPopkit	D30657
<i>H. vulgare</i>	HVPAL2MR	Z49145	<i>P. kitakamiensis</i>	POPPALG2BA	D43802
<i>H. vulgare</i>	HVPAL3MR	Z49146	<i>P. kitakamiensis</i>	POPPALG4B	D43803
<i>I. batatas</i>	IPBPALA	D78640	<i>P. tremuloides</i>	PAL1Poptre	AF480619
<i>I. batatas</i>	IPBPAL	M29232	<i>P. tremuloides</i>	PAL2Poptre	AF480620
<i>C. canephora</i>	PAL2Coffcan	AF460204	<i>Ph. Vulgaris</i>	PHVPAL	M11939
<i>I. lacustris</i>	PALIsolacus	AY803281	<i>Q. suber</i>	PALQuersu	AY443341
<i>L. esculentum</i>	PAL1	TC153702	<i>S. kraussiana</i>	PALSekrau	AY803282
<i>L. esculentum</i>	PAL2	TC165415	<i>S. tuberosum</i>	PAL-1	X63103
<i>N. tabacum</i>	-	AJ539006	<i>T. aestivum</i>	PAL1Triaes	X99705
<i>N. tabacum</i>	<i>NTpalA</i>	AB008199	<i>T. aestivum</i>	PAL2Triaes	X99725
<i>N. tabacum</i>	NTPALb	AB008200	<i>T. aestivum</i>	PALaTrieas	AY005474
<i>L. esculentum</i>	PAL3	TC153686	<i>T. pratense</i>	PAL1Tripra	DQ073809
<i>L. esculentum</i>	PAL4	TC153699	<i>T. pratense</i>	PAL2Tripra	DQ073810
<i>L. esculentum</i>	PAL5	TC153688	<i>T. pratense</i>	PAL3Tripra	DQ073808
<i>L. esculentum</i>	PAL6	TC165267	<i>T. pratense</i>	PAL4Tripra	DQ073811

(1) Vandenablee y col., 2003

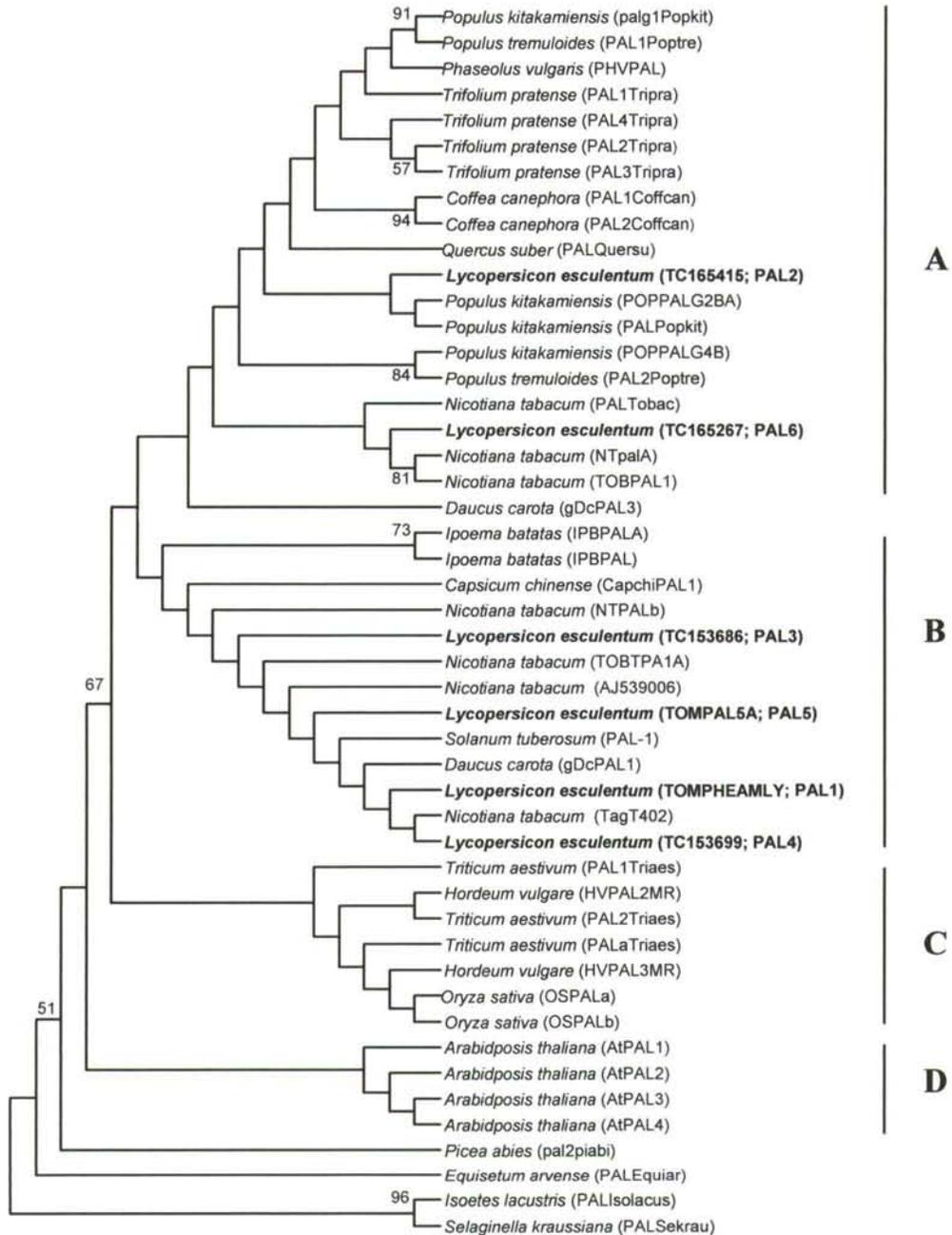


Figura IV.15.- Árbol consenso estricto de los 814 árboles más parsimoniosos obtenidos a partir de 48 secuencias de nucleótidos *PAL* provenientes de 19 especies de plantas. La comparación se realizó estudiando 116 nucleótidos del extremo 3' codificante (CI = 0.475, RI = 0.756, RCI = 0.359). Los números después del nombre de la especie hace referencia a distintos homólogos de una misma especie.

IV.3.- Inducción y mantenimiento de callos de *L. esculentum*, LA 3038

El proceso fisiológico de inducción de callos está condicionado por las características físicas del cultivo, las hormonas utilizadas para complementar el medio de cultivo y la parte de la planta empleada para obtener los explantos que darán lugar a la formación del callo (Collin y Edwards, 1998).

Se obtuvieron callos a partir de cotiledones e hipocótilos de tomate de la línea resistente, LA 3038 y después de que estos alcanzaron un estado friable se disgregaron y se utilizaron para iniciar suspensiones celulares.

IV.3.1.- Caracterización del crecimiento de suspensiones celulares de *L. esculentum*

Para caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares se utilizaron tres parámetros: el empaquetamiento celular (PCV), la conductividad (Con) y el pH.

El empaquetamiento celular mide la relación existente entre el volumen de la masa celular y el volumen total de la suspensión y da una idea de la tasa de crecimiento de la suspensión (Vurro y Ellis., 1997; Falco y col., 1996; Gómez-Vásquez y col., 2004). Dado que las células tienen tamaños idénticos, un aumento del empaquetamiento indica división celular y aumento de la concentración celular.

Analizando las evoluciones del PCV de las suspensiones mantenidas en oscuridad (Figura IV.16), podemos observar un aumento lineal durante los primeros días de la suspensión, que continúa de forma progresiva hasta los 13 días de mantenimiento de la suspensión. A partir de este momento no se observó más crecimiento y sí un pardeamiento del cultivo celular, probablemente debido al agotamiento del medio nutritivo en el que se encontraban.

En la figura IV.16 se observa un descenso de la conductividad, que se relaciona con el consumo de nutrientes por las células de la suspensión. La conductividad está en relación inversa con el PCV, ya que un aumento en el número de células indica más consumo de nutrientes y por tanto descenso de la conductividad.

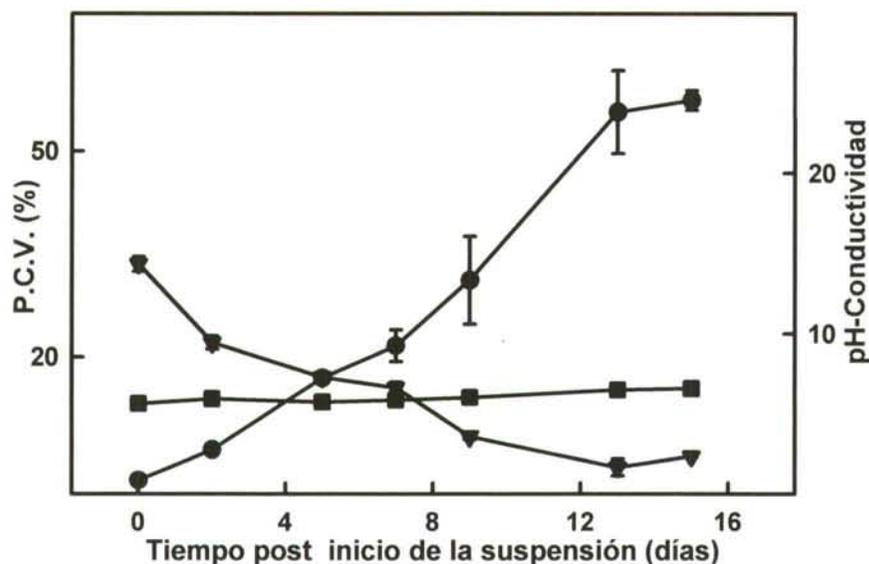


Figura IV.16.- Parámetros de crecimiento de las suspensiones celulares de *L. esculentum*. ●P.C.V., ■pH y ▼Conductividad.

Respecto al pH, en las suspensiones no se detectaron grandes variaciones con respecto a los valores iniciales, ya que se partió de un pH de 5.67 y se finalizó el experimento con un valor de pH de 6.94.

IV.3.2.- Inducción de cultivos celulares de *L. esculentum* cv Gardener línea LA 3038

La elicitación de los cultivos de tomate se realizó con distintos tipos de elicitores: abióticos como el H_2O_2 , una mezcla de ácido ascórbico y H_2O_2 , y luz ultravioleta; y bióticos, como micelio liofilizado y pulverizado de *V. dahliae* o de *F. oxysporum*. En todos los casos se tomaron muestras control inmediatamente antes de la inducción, y se consideró esta muestra como tiempo 0. 15 minutos después del tratamiento se comenzaron a recoger muestras cada 5 minutos hasta los 45 minutos post elicitación (mpe). Se analizó el contenido en H_2O_2 y la actividad POD en el fluido y se midió el contenido en H_2O_2 y la actividad PAL en las células.

IV.3.2.1.- Cuantificación de H₂O₂ en cultivos celulares elicitados con luz UV, H₂O₂, *Fusarium oxysporum* f. sp *licopersici* y *V. dahliae*

IV.3.2.1.1.- Cuantificación en el fluido extracelular

En la figura IV.17 se representa la medida del contenido de H₂O₂ en el fluido extracelular de cultivos de tomate inducidos con H₂O₂, con H₂O₂ + ac ascórbico, luz UV, micelio liofilizado de *F. oxysporum* y micelio liofilizado de *V. dahliae*. En el tratamiento con H₂O₂ (Figura IV.17.A) se observó un aumento en el contenido de H₂O₂ a los quince minutos tras la inducción, siendo 2.5 veces mayor que al inicio del estudio (t=0). Al final del periodo analizado vuelve a los valores iniciales. Al añadir ácido ascórbico, un agente antioxidante, como control del tratamiento anterior, se observó que el contenido en H₂O₂ es menor que en ausencia del antioxidante en todo el periodo analizado. El contenido en H₂O₂ sufre un descenso en los primeros momentos del tratamiento seguido de dos ligeros incrementos, uno a los 30 mpe y otro a los 40 mpe dos veces mayor que el primero.

Al utilizar como elicitor luz UV se observó un aumento sostenido en el contenido de H₂O₂ en el fluido extracelular, que al final del periodo analizado (t=45) era el doble respecto al inicio del tratamiento (Figura IV.17.B).

El contenido en H₂O₂ sufrió un aumento tras la inducción con el elicitor de *F. oxysporum* (Figura IV.17.C), alcanzándose un máximo a los 15 mpe, 2 veces mayor que su control. Al final del periodo analizado se alcanzaron de nuevo valores semejantes a los obtenidos antes de la inducción. Por último, el contenido en H₂O₂ aumenta tras la inducción con el micelio liofilizado del patógeno *V. dahliae*, alcanzándose un máximo a los 25 mpe, 1,6 veces mayor que su control (Figura IV.17.D).

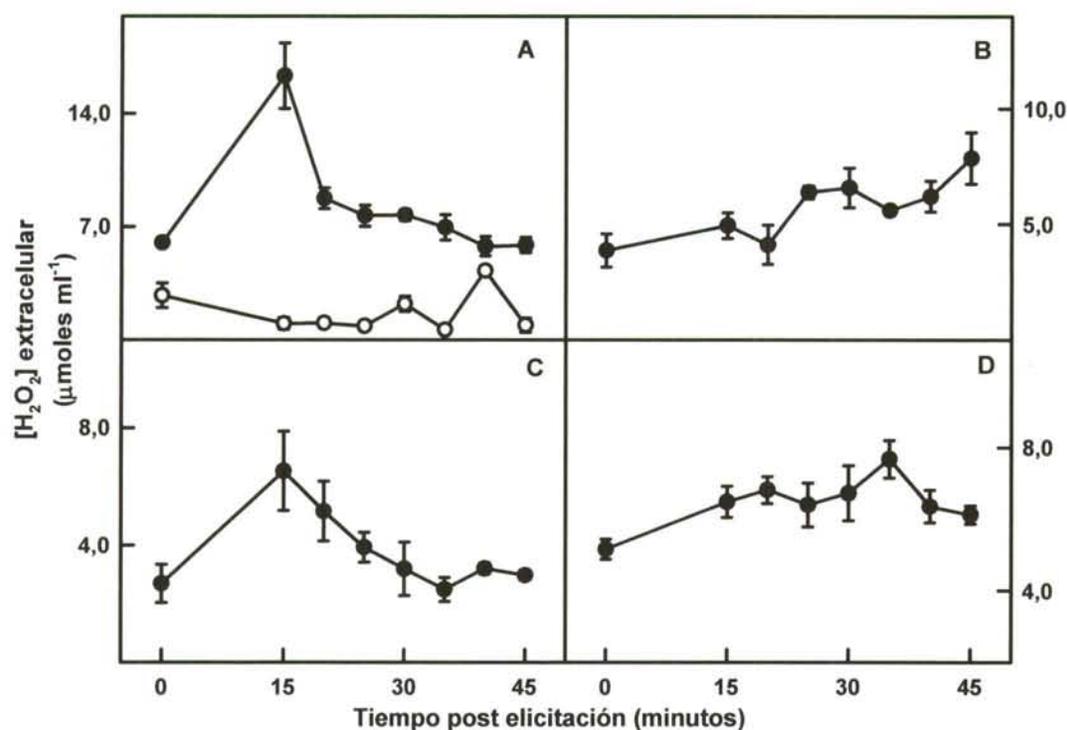


Figura IV.17.- Medida de H₂O₂ en fluido extracelular de cultivos celulares de tomate elicitados con A, 100µM de H₂O₂ (●) y 100µM de H₂O₂ +200µM ac ascórbico (○); B, luz UV; C, *F. oxysporum* y D, *V. dahliae*.

IV.3.2.1.2.- Cuantificación de H₂O₂ en células del cultivo

En las células del cultivo inducidos con una concentración 100µM de H₂O₂ se produjo un aumento en el contenido de H₂O₂ hasta el final del periodo analizado. Al añadir ácido ascórbico no se observan modificaciones en el contenido en H₂O₂ (Figura IV.18.A).

En cuanto al contenido de H₂O₂ en las células elicitadas con luz UV se observa un máximo 15 minutos después de dejar de aplicar el tratamiento, que desciende después paulatinamente y regresa a los valores iniciales a los 40 mpe (Figura IV.18.B).

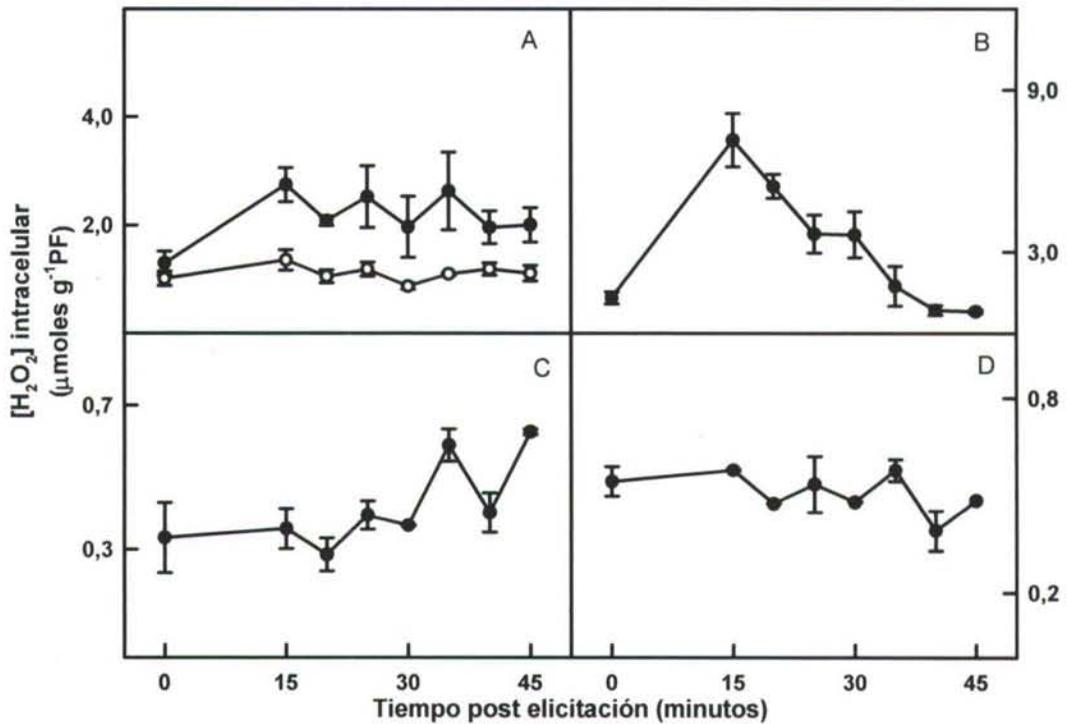


Figura IV.18.- Medida del contenido en H_2O_2 en las células de cultivos celulares de tomate elicitados con A, 100 μM de H_2O_2 (●) y 100 μM de H_2O_2 + 200 μM ac ascórbico (○); B, luz UV; C, *F. oxysporum* y D, *V. dahliae*.

Al inducir cultivos con micelio liofilizado del patógeno *F. oxysporum*, el contenido de H_2O_2 en las células de cultivo experimenta dos aumentos a los 35 y 45 mpe, con valores muy similares entre sí y 2 veces mayor que el control (Figura IV.18.C). El contenido de H_2O_2 en las células de cultivo inducidas con micelio liofilizado de *V. dahliae* no experimenta cambios hasta el final del periodo analizado (Figura IV.18.D).

IV.3.2.2.- Actividad POD en el fluido extracelular de cultivos de tomate elicitados con luz UV, H_2O_2 , ácido Ascórbico, *Fusarium oxysporum* f. sp *licopersici* y *V. dahliae*

La actividad POD en las células de cultivo inducidas con 100 μM de H_2O_2 , muestra una distribución bimodal (Figura IV.19.A), con un primer máximo a los 20 mpe y el otro a los 30 mpe, ambos con valores muy próximos entre sí y 6 veces mayores respecto al momento inicial. En el tratamiento de los cultivos celulares con H_2O_2 y ácido ascórbico, la actividad POD no varió en todo el

periodo analizado, aunque se observa una tendencia al descenso en la actividad de esta enzima.

En cultivos elicitados con luz UV (Figura IV.19.B) se observó que la actividad POD sufre una brusca disminución entre el tiempo 0 y los 15 mpe, llegando a inactivarse al final del periodo analizado.

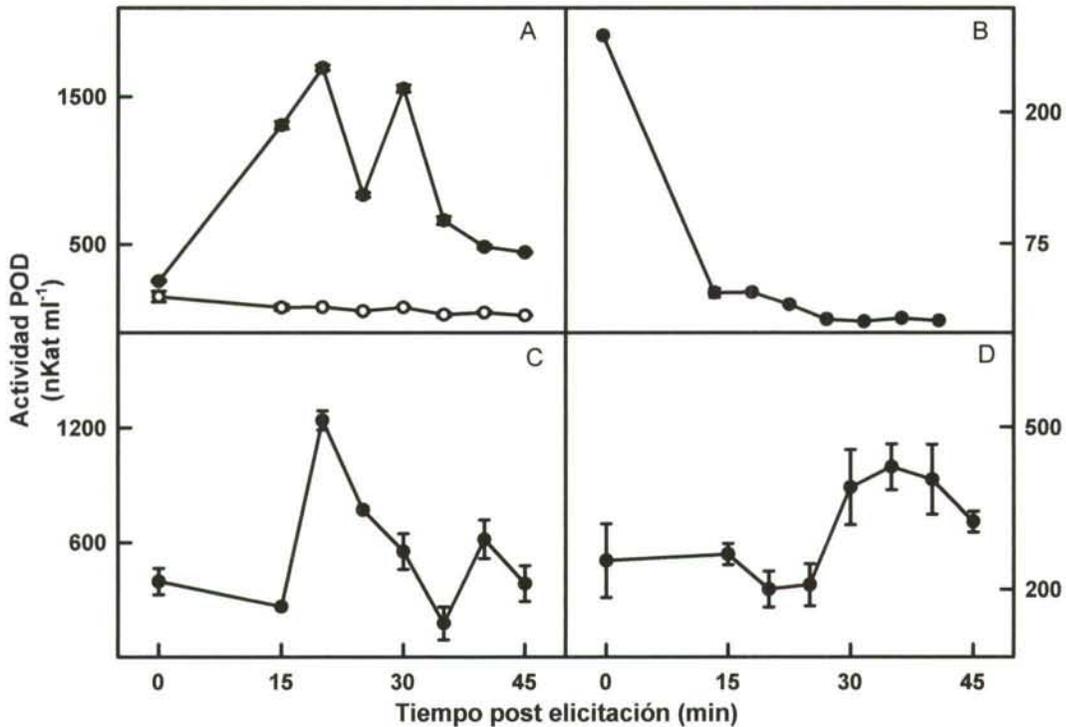


Figura IV.19.- Medida de la actividad específica POD en el fluido extracelular de cultivos celulares de tomate elicitados con A, 100µM de H₂O₂ (●) y 100µM de H₂O₂ +200µM ac ascórbico (○); B, luz UV; C, *F. oxysporum* y D, *V. dahliae*.

Durante el tratamiento de cultivos celulares con micelio liofilizado del patógeno *F. oxysporum* (Figura IV.19.C), la actividad POD aumentó a partir de los 15 mpe y hasta los 35 mpe, alcanzando un máximo a los 20 mpi, con un valor 3 veces mayor que en el control a tiempo 0. Se observó además un segundo aumento a los 40 mpe, 1,2 veces mayor que el control. Por último, en el tratamiento de cultivos celulares de tomate con micelio liofilizado de *V. dahliae* se observó que la actividad POD aumentaba a partir de los 25 mpe, presentando entre los 30 y 45 mpe el doble de actividad que en el control (Figura IV.19.D).

IV.3.2.3.- Actividad PAL en las células de cultivos de tomate elicitados con H_2O_2 , luz UV, *F. oxysporum* f. sp *lycopersici* y *V. dahliae*

En las células del cultivo elicitadas con H_2O_2 , la actividad PAL presentó dos aumentos (Figura IV.20.A), el primero entre el inicio del experimento y los 25 mpe, con un máximo 5 veces mayor que al inicio de la toma de muestras. Un segundo aumento presentó un máximo 4 veces mayor que el control a los 40 mpe. Al añadir ácido ascórbico además de H_2O_2 , se observó un aumento entre los 35 y 45 mpe, con un máximo a los 40 mpe, 15 veces mayor respecto al control. Este pico coincidía con el segundo aumento observado en el tratamiento con H_2O_2 .

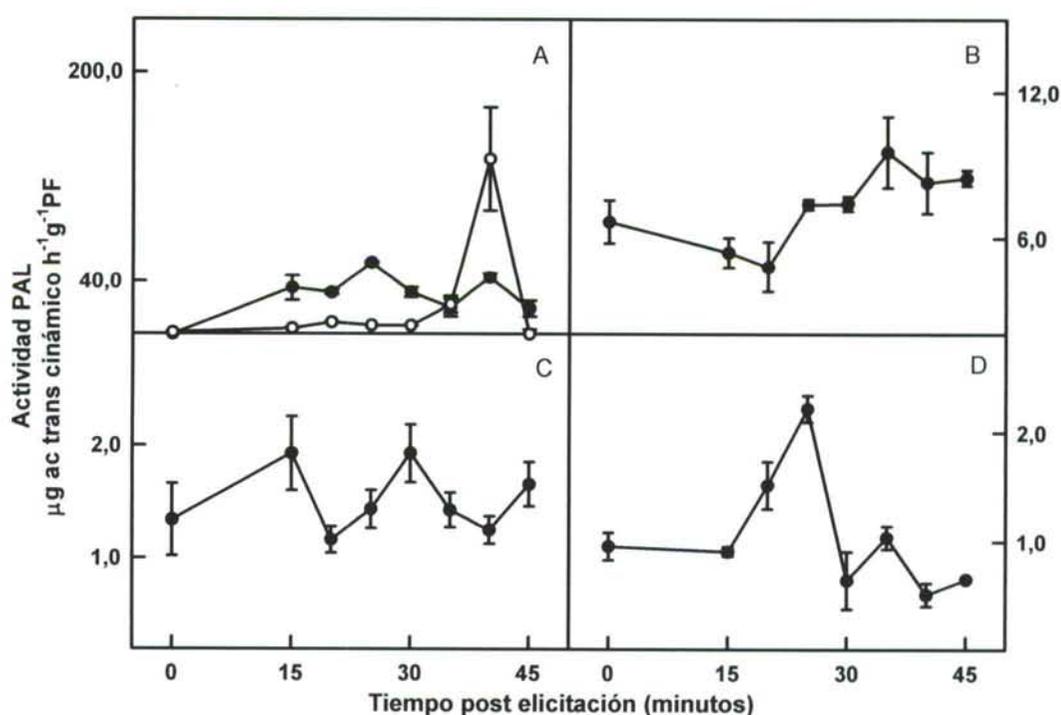


Figura IV.20.- Medida de la actividad PAL en las células de cultivos celulares de tomate elicitados con A, 100µM de H_2O_2 (●) y 100µM de H_2O_2 +200µM ac ascórbico (○); B, luz UV; C, *F. oxysporum* y D, *V. dahliae*.

La actividad del complejo enzimático PAL en cultivos elicitados con luz ultravioleta (Figura IV.20.B) experimentó un aumento a partir de los 20 mpe hasta los 45 mpe, con un máximo a los 35 mpe, 1,8 veces mayor que el control.

La actividad PAL en cultivos elicitados con micelio liofilizado de *F. oxysporum* (Figura IV.20.C), experimentó un primer aumento a los 15 mpe, 1,6 veces mayor que su control y aumentos con valores semejantes a los 30 y 45 mpe. Cuando utilizamos *V. dahliae* como elicitor (Figura IV.20.D), la actividad PAL experimentó un aumento entre los 15 y los 30 mpe, con un máximo a los 25 mpe, con un valor doble que en los controles.

IV.3.2.- Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de los genes PAL en cultivos celulares

IV.3.2.1.- Análisis de los homólogos PAL en cultivos elicitados con H₂O₂

Las muestras en que se observaron aumentos de actividad PAL se analizaron mediante RT-PCR. Se escogieron muestras tomadas a 0 mpe, antes de la aplicación del tratamiento y a t=25 mpe y t=40 mpe, momentos en que la actividad PAL presenta máximos (Figura IV.20.A). El aumento observado en la actividad PAL a los 25 mpe parece que se debió al aumento de expresión del homólogo PAL 3, (Figura IV.21) y el segundo aumento observado en la actividad PAL, a los 40 mpe, se debía al aumento en la expresión de los homólogos PAL 2 y PAL 4. La PAL 6 experimentó un descenso en su expresión a los 25 mpe.

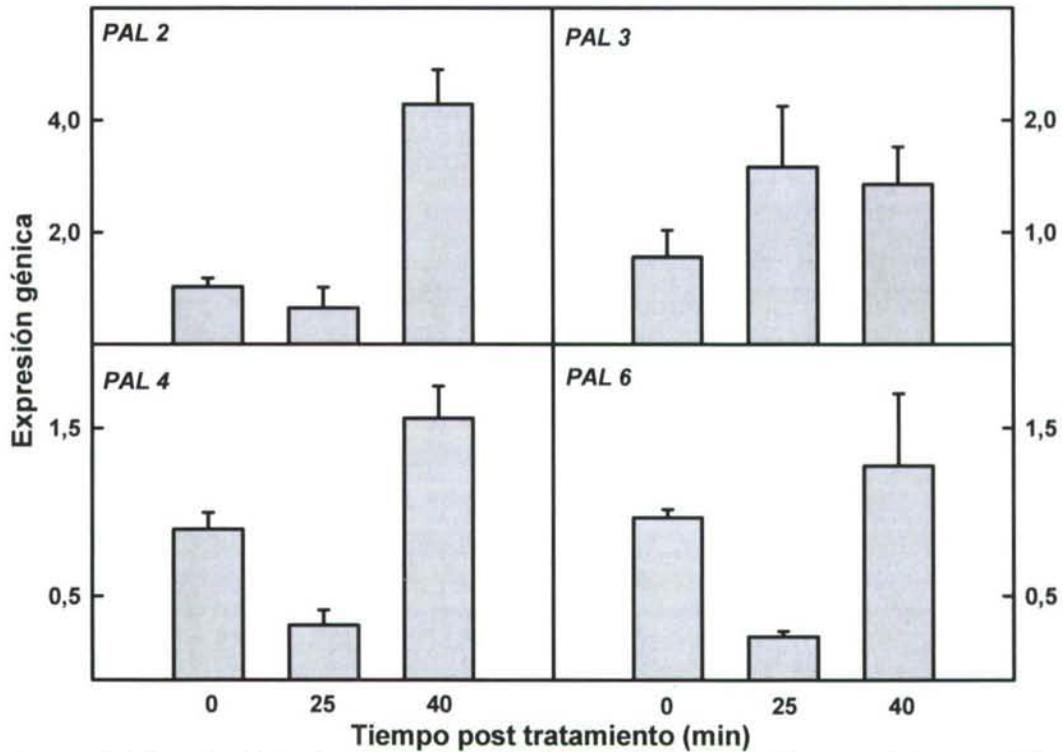


Figura IV.21.- Análisis de expresión de los distintos homólogos *PAL* en cultivos celulares de tomate elicitados con 100 μ M de H₂O₂.

IV.3.2.2.- Análisis de los homólogos *PAL* en cultivos elicitados con H₂O₂+Ácido ascórbico

Se analizaron por PCR en tiempo real control del tratamiento, 0 mpe, y las muestras 15 y 40 mpe. Los homólogos *PAL* que se inducían a los 40 mpt, donde se observó el único aumento de actividad de la enzima *PAL*, fueron *PAL* 3 y *PAL* 6 (Figura IV.22). No se observaron cambios en los niveles de expresión de *PAL* 2 y *PAL* 4 en estas muestras analizadas.

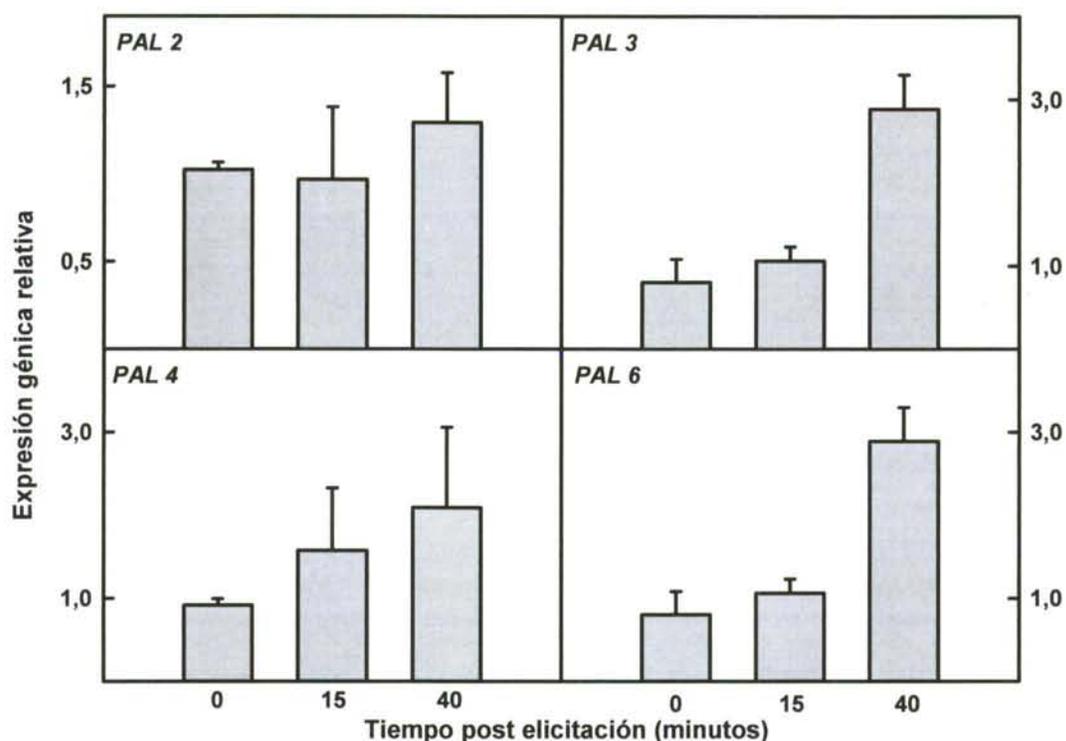


Figura IV.22.- Análisis de expresión de los distintos homólogos *PAL* en cultivos celulares de tomate elicitados con 100 μ M de H₂O₂ + 200 μ M ac ascórbico.

IV.3.2.3.- Análisis de los homólogos *PAL* en cultivos elicitados con luz UV

Tras el análisis de los resultados de la medida de actividad *PAL* (Figura IV.20.B), se realizó un análisis de homólogos *PAL* mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real a los tiempos 0, 20 y 30 mpe, para estudiar su posible participación en la defensa contra el estrés provocada por la luz UV. El homólogo *PAL 2* se vio inducido a los 20 mpe por la influencia de la luz UV y los homólogos *PAL 3* y *PAL 6* a los 30 mpe (Figura IV.23). El homólogo *PAL 4* no experimentó cambios de expresión durante el periodo analizado.

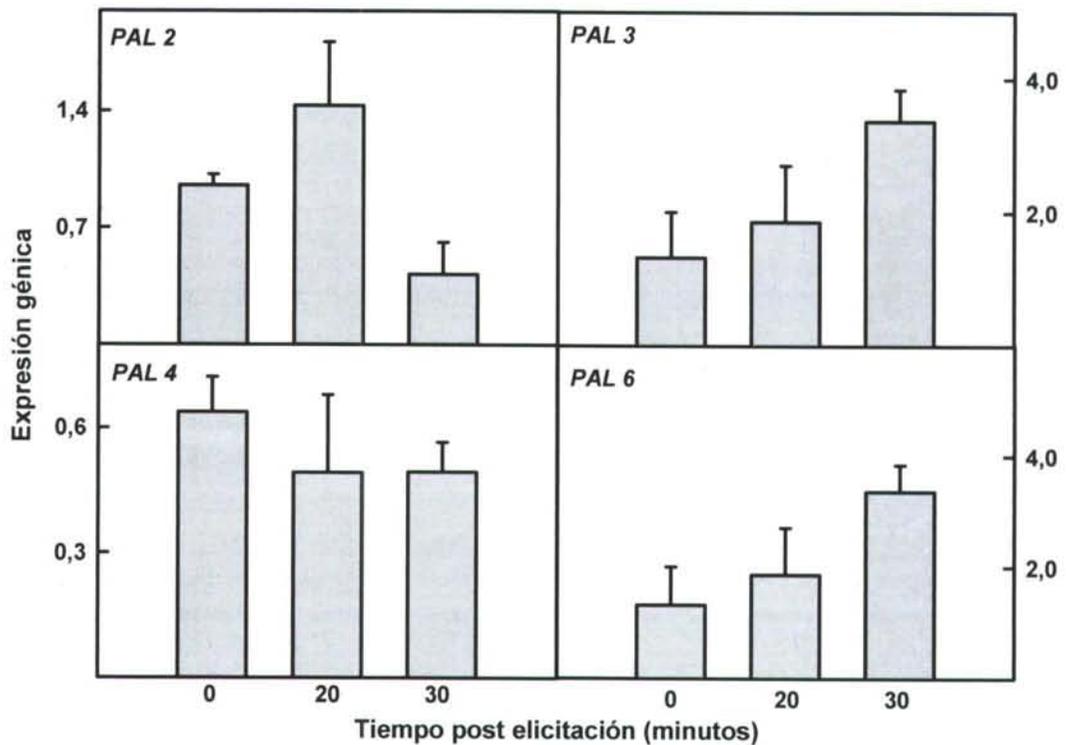


Figura IV.23.- Análisis de expresión de los distintos homólogos *PAL* en cultivos celulares de tomate elicitados con luz UV.

IV.3.2.4.- Análisis de los homólogos *PAL* en cultivos resistentes elicitados con *F. oxysporum*

Se analizaron las muestras tomadas a 0, 15 y 30 mpe, mediante RT-PCR en tiempo real. El primer aumento en la actividad PAL a los 15 mpe (Figura IV.20.C) pudo deberse al aumento de expresión de los homólogos *PAL 2* y *PAL 6* (Figura IV.24). El segundo aumento en la actividad PAL, a 30 mpe, podría deberse al aumento de expresión del homólogo *PAL 3*. Se observó, además, que la expresión del homólogo *PAL 4* descendía drásticamente durante el periodo analizado.

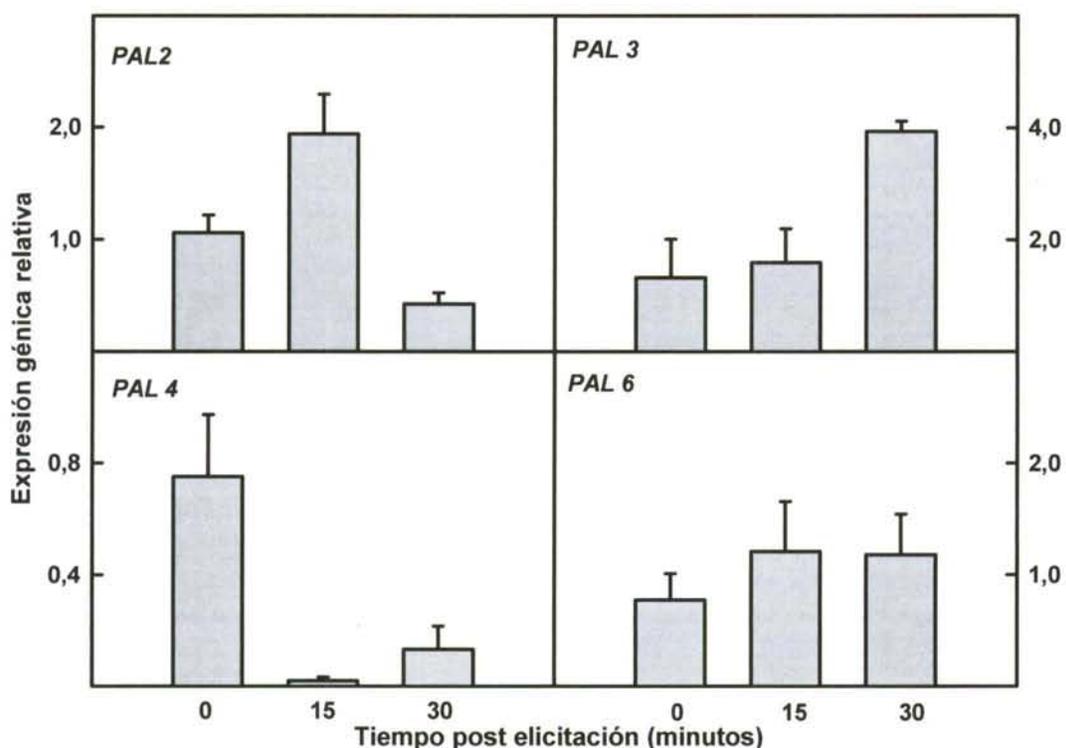


Figura IV.24.- Análisis de expresión de los homólogos *PAL* en cultivos celulares de tomate resistente elicitados con micelio liofilizado de *F. oxysporum*.

IV.3.2.5.- Análisis de los homólogos *PAL* en cultivos resistentes elicitados con *V. dahliae*

Se analizaron las muestras tomadas a 0 mpe, 30 mpe y 40 mpe (Figura IV.25). El aumento de expresión del homólogo *PAL 2* a los 30 mpe podría explicar el primer aumento de la actividad *PAL* (Figura IV.20.D). Mientras que el aumento de expresión de los homólogos *PAL 3* y *PAL 6* a los 40 mpe podría explicar el segundo aumento observado en la actividad *PAL*, a los 35 mpe. Como en el caso de la inducción por *F. oxysporium*, hubo un descenso en la expresión de *PAL 4*.

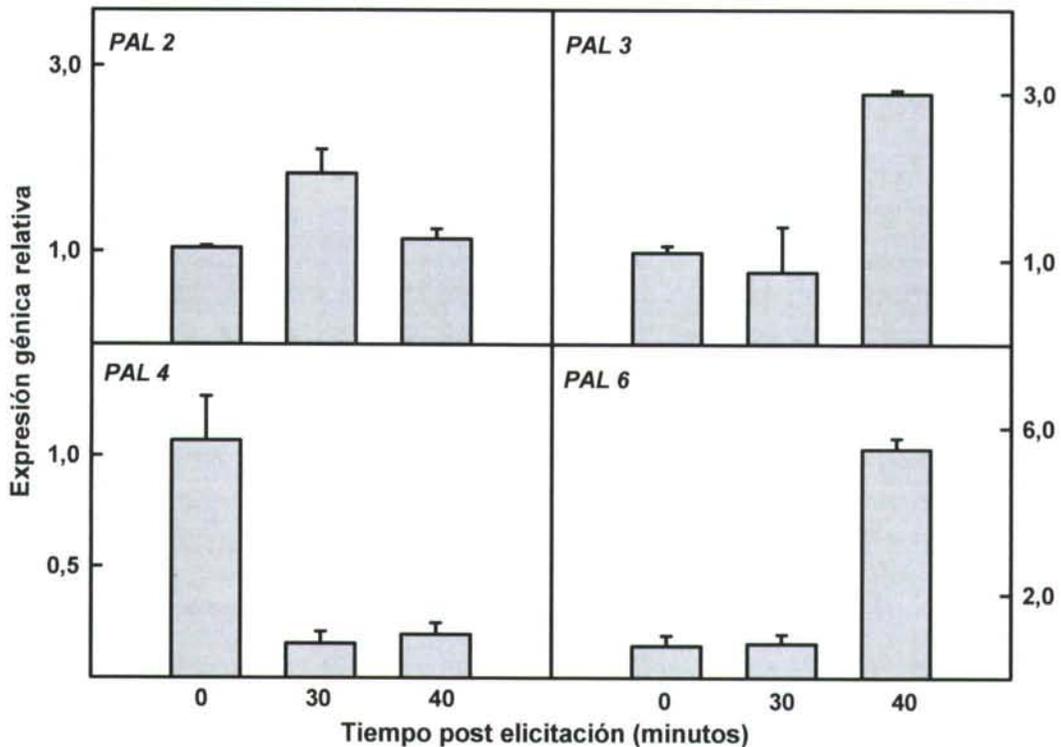


Figura IV.25.- Análisis de expresión de los distintos homólogos *PAL* en cultivos celulares de tomate resistente elicitados con micelio liofilizado de *V.dahliae*.

IV.4.- Genoteca substractiva LA 3038 vs LA 3030

Finalmente se realizó una genoteca de expresión utilizando para ello, la técnica de hibridación substractiva por supresión. De este modo, las secuencias así obtenidas, se expresan en la población de interés, en nuestro caso secuencias parciales de genes que, en principio, se expresan en la línea de tomate resistente inoculada y no en la susceptible también inoculada. Las secuencias parciales obtenidas tras la substracción se clonaron y tras la secuenciación de los primeros clones, se obtuvieron las secuencias que se muestran en la tabla IV.20.

Resultados

Tabla VI.20.- Relación de secuencias obtenidas tras la hibridación de las poblaciones LA 3038 vs LA 3030, y su relación con secuencias conocidas.

Nombre del clon	Est L. esculentum	NR a la que se parece	Score/ Homología de la comparación	Función	Autores
38i.1	X99214.1	AY133618 AY089164	81,3/6.010 ⁻²⁴	Inducción de genes por falta de fosfato	Liu y col., 1997; Alexandrov y col., 2006
38i.2	CO751447.1	NM_128601.1	53,3/1,010 ⁻⁶	<i>Cinamato-4-hidroxilasa</i>	Bell-Lelong y col., 1997
38i.5	AAB39556.1	NM_001074937.1	53,6/2,010 ⁻⁶	Proteína tumoral controlada a nivel de la traducción (TCTP)	Cans y col., 2003
38i.6	BM412755.1	U79958.1	387,0/4,010 ⁻¹⁰⁴	Receptor de transporte a vacuola	Paris y col., 1997
38i.23	BP905146.1	AF036618.1	336,0/2,010 ⁻⁹¹	<i>Acetil CoA sintetasa</i>	Yamamoto y col., 2005
38i.36	AI779165.1	AY081905.1	379,0/4.10 ⁻¹⁰⁵	<i>N-hidroxicinamoil transferasa</i>	von Roepenack y col., 2003
38i.44	AW034080.1	NM_124093	84,0/2,010 ⁻¹⁶	Factor de unión a un elemento que responde a etileno	Fujimoto y col., 2000
38i.46	AF204787	-	448/0.0	Proteína que se regula por la maduración	Giovannoni y col., 1999

Discusión

V. Discusión

V.1.- Detección y cuantificación de *V. dahliae* mediante la técnica de qPCR en tiempo real

La verticilosis se encuentra entre los problemas fitopatológicos más importantes que aparecen en, por ejemplo, los campos del Valle del Ebro (Palazón y Palazón, 1989) o en algunas zonas de cultivo en Galicia (Pomar y col., 2001; Saavedra y col., 2003).

En estos momentos, la enfermedad producida por *V. dahliae* no puede controlarse mediante la aplicación de fungicidas, de modo que el uso de variedades resistentes se considera el único método de lucha eficaz contra la enfermedad. Inicialmente, buscamos cultivares de *C. annuum* que pudiesen mostrar algún grado de resistencia a *V. dahliae*. Elegimos el cultivar Luesia basándonos en trabajos previos (Barriuso y col., 1989). El cultivar local Padrón, perteneciente a la especie *C. annuum*, se incluyó por la importancia de su producción en Galicia, y también porque su grado de resistencia a *V. dahliae* era previamente desconocido. Analizamos, además, los cultivares SCM331 y PI201234, que son resistentes frente a *Phytophthora capsici*, otro patógeno de pimiento que provoca unos síntomas semejantes a los producidos por *V. dahliae*, (Bosland y Lindsey, 1991; Gil Ortega y col., 1991), pero de los cuales no hay estudios previos de resistencia y susceptibilidad frente a *V. dahliae*. El cultivar C118 de *C. chinense* se incluyó en nuestro estudio porque presenta cierto grado de resistencia a este patógeno (Gil Ortega y col., 1989). Finalmente, se evaluó la posible resistencia a *V. dahliae* de dos líneas isogénicas de tomate, *L. esculentum*, una de las cuales contenía el gen de resistencia *Ve*.

La expresión de resistencia generalmente depende de las condiciones de infección: líneas de pimiento seleccionadas en condiciones naturales de infección resultaron susceptibles a la inoculación artificial, y variedades con bajos niveles de resistencia se comportaban como susceptibles cuando la concentración de inóculo era

Discusión

alta (Resende y col., 1995). La severidad de la expresión de los síntomas de verticilosis está claramente asociada con las temperaturas favorables de crecimiento de *Verticillium*, y al menos con el cultivar de pimiento susceptible. La severidad de la enfermedad decrece significativamente a 35 °C. (Barriuso y col., 1992). Parece además que esta severidad está más asociada con el crecimiento del patógeno que con el crecimiento del huésped (Kendrick y Middleton, 1959).

Palloix y col. (1990) compararon la severidad de la infección producida bien tras la inoculación directa de *V. dahliae* en el suelo, o cuando se realizaba un corte en las raíces y éstas eran sumergidas en una suspensión de esporas del hongo. Encontraron que el método de la inmersión era más agresivo para las plantas, y que los síntomas de infección y el crecimiento del micelio del hongo que se producían en la planta eran mayores que tras la inoculación en suelo. Para el estudio aquí presentado se consideró que la inoculación directa de esporas en el suelo se asemejaba más a las condiciones naturales, así que se adoptó ese método para realizar nuestro trabajo.

Bhat y col. (2003) estudiaron la Verticilosis en plantas de pimiento, y observaron síntomas a partir de, aproximadamente, los 24 dpi. De igual forma, en nuestros experimentos las plantas no mostraron ningún síntoma visible hasta al menos los 24 dpi. Por esta razón, decidimos recoger las muestras a los 23 dpi y a los 34 dpi, momento en que los síntomas resultaban evidentes.

Li y col. (1999) describieron la utilización de RAPDs y el desarrollo de un marcador SCAR específico para *V. dahliae*. Esta pareja de cebadores no amplificó DNA de ningún otro hongo, incluyendo patógenos emparentados como *V. albo-atrum*. Cebadores diseñados a partir de SCAR se han utilizado para la amplificación de DNA de distintos hongos y muestran ser particularmente útiles para diferenciar especies muy relacionadas o cuando es necesario identificar cepas específicas. Vandermark y Baker (2003) usaron cebadores diseñados a partir de un SCAR para monitorizar el crecimiento de *Phytophthora medicans* en plantas

de alfalfa susceptible y resistente. Es frecuente realizar una PCR anidada para llevar a cabo un diagnóstico adecuado (Hayden y col., 2004; Silvar y col., 2005b) e incluso el diseño de una qPCR anidada en tiempo real (Bonants y col., 2004). Ahora bien, la técnica de PCR anidada presenta un alto riesgo de detectar falsos positivos debido a la contaminación y, además, no resulta adecuada para un análisis cuantitativo.

En nuestro trabajo amplificamos DNA de *V. dahliae* en muestras de diferente origen con cebadores específicos diseñados a partir de una secuencia SCAR y se compararon con los resultados de amplificación obtenidos con cebadores específicos de secuencias de genes de defensa de pimiento y tomate.

La detección se realizó con SYBR Green I, un método sencillo para el control de la amplificación y cuantificación mediante PCR. La PCR basada en la amplificación de secuencias de genes de copia única supone una disminución en la sensibilidad comparado con la obtenida tras amplificación de genes de copia múltiple como, por ejemplo la amplificación de regiones ITS, pero la utilización de genes de copia única para planta y patógeno nos ofreció la posibilidad de desarrollar una medida del número de copias del genoma de *V. dahliae* que invaden la planta. En la bibliografía encontramos diversos trabajos en los que se utiliza la tecnología de PCR en tiempo real para la detección de patógenos fúngicos en planta (Böhm y col., 1999; Gachon y Saindreman, 2004; Hayden y col., 2004; Mercado-Blanco y col., 2003; Qi y Yang, 2002; Vandermark y Baker, 2003), agua de riego (Kong y col., 2003) o suelo (Van de Graaf y col., 2003). Por ejemplo, Van de Graaf y col. (2003) demostraron que el desarrollo de los ensayos de la PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Spongospora subterranea* podía detectar al patógeno en agua, suelo y tejidos de planta utilizando cebadores diseñados a partir de secuencias de las regiones ITS. La tecnología de la PCR en tiempo real se aplicó también para amplificar simultáneamente DNA de *Phaeocryptopus gaeumannii* y de abeto de Douglas y de ello derivó

Discusión

una medida relativa de la colonización del agente patógeno en el tejido del huésped (Winton y col., 2002).

A pesar de las informaciones previas (Barriuso y col., 1992), el cultivar Luesia resultó ser susceptible. No sólo mostró síntomas similares a los exhibidos por Padrón y PI201234 (Tabla IV.2), sino que además el análisis de la relación DNA hongo/ DNA planta en tallos infectados nos permitió agrupar estos tres cultivares en el mismo grupo de susceptibilidad (Figura IV.3). En raíces, SCM331 se comportaba como los cultivares Padrón y PI201234. Cuando se analizaron hipocotilos la relación DNA hongo/ DNA planta más alta del estudio se encontró en la variedad SCM331 a los 34 dpi (Figura IV.3). Al analizar esta relación en raíces, los valores máximos dentro de *C. annuum* se encontraron también en raíces del mismo cultivar y al mismo tiempo. Merece destacarse que SCM331 defolió después de la inoculación con el aislado VD53 de *V. dahliae* y que además, como en Luesia, el contenido del hongo fue mayor en hipocotilos que en raíces, lo que sugiere una relación entre la distribución del hongo dentro de la planta y los síntomas exhibidos. Nuestro análisis mostró que las diferencias en el resultado en la interacción de *V. dahliae*-pimiento dependieron del genotipo de la planta infectada.

El cultivar C118 de *C. chinense* estaba considerado como tolerante a *V. dahliae* en campo, aunque los resultados obtenidos después de la inoculación en laboratorio no fueron concluyentes (Gil Ortega y col., 1989). En nuestros experimentos, este cultivar presentó síntomas diferentes a los de los demás cultivares analizados, en particular un enanismo severo (Tabla IV.2). El análisis mediante PCR en tiempo real reveló la mayor concentración de DNA de *V. dahliae* del estudio en raíces de C118 en ambos tiempos de análisis. La relación de DNA después de la inoculación se incrementó con el tiempo del mismo modo que en el resto de los cultivares de pimiento analizados (Figura IV.3).

En resumen, hemos encontrado una clara correspondencia entre los síntomas mostrados por plantas infectadas con genotipos diferentes y el contenido de DNA fúngico. Las plantas de pimiento de los cultivares

Padrón, PI201234 y Luesia, que muestran síntomas más leves, presentan un bajo contenido de DNA de hongo. Por otro lado, plantas de los cultivares C118 y SCM331, que presentan síntomas más severos, contienen más DNA del patógeno.

Con respecto a *L. esculentum*, en el cultivar susceptible LA3030 la relación DNA hongo/ DNA planta se incrementó con el tiempo, a diferencia de lo que ocurre en el cultivar resistente, LA3038, en el que esta relación decreció con el tiempo (Tabla IV.4). Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de resistencia diferente del de “no huésped”, en donde no existe un intento de colonización por parte del patógeno. En nuestro estudio, el hongo penetraba en las raíces tanto de plantas resistentes como susceptibles. La relación DNA hongo/ DNA planta en raíces de LA3030 a 23 dpi fue 10 veces mayor que en LA3038, pero en la zona del cuello de raíz de plantas resistentes apenas fue detectado. Desde 23 dpi hasta 34 dpi, la relación de DNA de hongo a DNA de la planta se incrementaba 10 veces en la zona del cuello raíz de plantas susceptibles mientras que permanecía constante en raíces. La relación de DNA de hongo/ DNA planta en raíz y cuello raíz decreció en tomates resistentes a 34 dpi, lo que sugiere algún método de contención y/o eliminación del patógeno. Contrariamente a la interpretación común, el cuello de la raíz podría no ser el área de penetración primaria del hongo, al menos en tomate o, alternativamente, una respuesta de resistencia activa podría ser responsable de la hipertrofia del cuello raíz de la planta y como resultado, de la disminución en la relación DNA hongo vs. DNA planta.

Finalmente, verificamos la aplicación práctica del método de la qPCR en tiempo real. Para ello, se recogieron muestras de plantas de pimiento del cultivar Padrón, agua de riego y suelo en cinco explotaciones de Betanzos (B) y tres de Padrón (P) . Se escogieron invernaderos que no presentaban síntomas de enfermedad, así como otros que presentaban daños en diferente grado. Los resultados de la amplificación de las diferentes muestras con los cebadores específicos para *C. annuum* y *V. dahliae* se correspondieron con los síntomas observados. En las parcelas

Discusión

en donde se observaron síntomas de Verticilosis, P1, B1 y B4, se detectó *V. dahliae* en plantas individuales, en suelo y, a excepción de la parcela B4, en agua de riego. Además, en P2 y P3, donde los síntomas no eran claros, el hongo se detectó en planta, suelo y en el caso de la parcela P2 en agua. Las muestras de plantas recogidas en los invernaderos B2 y B3, que presentaban síntomas de enfermedad pero en las no se detectó al patógeno *V. dahliae*, resultaron positivas a la detección de *P. capsici*. Los síntomas que presentan las plantas afectadas por este patógeno son similares a los síntomas de Verticilosis, lo cual puede llevar a confusión (Silvar y col., 2005b). Finalmente, no fuimos capaces de detectar *V. dahliae* en las parcelas B2 y B3, donde los síntomas eran suaves, o en la parcela B5, donde no se observaron síntomas (Tabla IV.5).

La aplicación práctica del método parece clara ya que fue posible detectar al patógeno en planta, suelo y agua de riego antes de que aparecieran síntomas visibles de enfermedad.

Debido a la gran dificultad de erradicar *V. dahliae*, todas las líneas de acción deberían dirigirse hacia la prevención de la contaminación. En este sentido la qPCR en tiempo real ofrece la posibilidad de una rápida detección del patógeno en planta, suelo y agua de riego. En el momento en que exista la sospecha de infección por este patógeno debería considerarse la evaluación por PCR de la presencia de *V. dahliae* antes de realizar cualquier transporte de planta o material del terreno. Por otro lado, al no encontrar resistencia en plantas de pimiento, decidimos seguir con nuestro trabajo de caracterización de la respuesta de resistencia frente a este patógeno en plantas de tomate susceptible y resistente.

V.2.- La respuesta de resistencia a *V. dahliae* mediada por el gen *Ve* de tomate implica al H_2O_2 , la peroxidasa e induce la expresión específica de los genes *PAL*

Uno de los objetivos de nuestro estudio era el análisis de las posibles variaciones en el contenido en H_2O_2 y en las actividades enzimáticas POD y PAL que podrían tener lugar durante la interacción

tomate-*V.dahliae*. Ambas enzimas son elementos claves en el desarrollo de la resistencia contra patógenos (Madhaiyan y col., 2006). Su acción coordinada tiene como resultado cambios en las cantidades relativas de los compuestos fenilpropanoides, considerados en sí mismos como compuestos de defensa (Hano y col., 2006). Para analizar estos parámetros, se utilizaron dos cultivares de tomate que difieren en la presencia del gen *Ve*, que confiere resistencia a *Verticillium*.

V.2.1.- Contenido en H₂O₂

La producción de H₂O₂ es una de las señales de la bolsa oxidativa, uno de los eventos más rápidos asociados con la HR en las interacciones planta patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Lamb y Dixon, 1997). Después de la inoculación de plantas de tomate resistentes con *V. dahliae*, se observó un rápido incremento en el contenido de H₂O₂ en raíces (2 hpi). El contenido en H₂O₂ alcanzó un máximo a las 8 hpi y mostró una distribución bimodal, con un segundo aumento menor a las 48 hpi. También se encontró un ligero incremento en el contenido en H₂O₂ en raíces de plantas susceptibles, ligeramente retrasado respecto al observado en plantas resistentes y que alcanzaba un máximo a las 16 hpi (Fig. IV.4). Probablemente, el rápido incremento encontrado en raíces de plantas resistentes está relacionado con distintos mecanismos de defensa. El H₂O₂ actúa directamente como compuesto tóxico para microorganismos (Peng y Kúc, 1992), contribuye al reforzamiento de la pared celular en plantas (Bolwell y col., 1995) y es responsable de la peroxidación de lípidos y de la síntesis de ácido salicílico (Leon y col., 1995). Parece que participa como mecanismo en la transducción de señal que conduce a la expresión coordinada de diferentes genes implicados en la respuesta de defensa, como ocurre en la HR o en la síntesis de proteínas PR (Wu y col., 1997; Orozco-Cardenas y col., 2001). El segundo incremento en el contenido en H₂O₂ encontrado en raíces de plantas

Discusión

resistentes a las 48 hpi puede reflejar el comienzo de una respuesta sistémica, y coincide en el tiempo con la sucesión de eventos de la expresión sistémica de los genes *PR* y la de la acumulación del ácido salicílico en plantas de tomate (Hu y col., 2005).

V.2.2.- Estudio de la actividad peroxidasa

Cuando medimos los cambios en la actividad peroxidasa en raíces tras la inoculación con *V. dahliae*, encontramos un incremento en raíces de plantas resistentes inoculadas, detectable en las primeras muestras analizadas después de la interacción (2 hpi), que alcanzaba un máximo a las 24 hpi. A las 96 hpi, la actividad peroxidasa se iguala a la de las muestras control. Las variaciones observadas en la producción de H_2O_2 en raíces de plantas resistentes se vieron reflejadas en un incremento en la actividad peroxidasa. Por el contrario, no se detectaron cambios en la actividad peroxidasa en raíces de plantas susceptibles durante la infección (Figura IV.5), aunque en ambos casos los niveles de H_2O_2 alcanzados eran comparables. La actividad peroxidasa es resultado de la acción conjunta de un gran número de enzimas con funciones similares. Por ejemplo, se han encontrado al menos 73 peroxidases ácidas en el genoma de *Arabidopsis* (Tognoli y col., 2002). Probablemente la detoxificación de H_2O_2 se lleva a cabo mediante la acción simultánea de peroxidases y catalasas en raíces de plantas resistentes, mientras que la actividad catalasa podría ser predominante en raíces de plantas susceptible. La enzima catalasa posee una constante de Michaelis (K_M) extremadamente alta, y para su reacción requiere el acceso simultáneo de dos moléculas de H_2O_2 al sitio activo (Noctor y Foyer, 1998). En cualquier caso, la detoxificación de H_2O_2 es un mecanismo eficiente en ambas líneas de tomate y es necesario realizar un estudio más exhaustivo para explicar sus posibles diferencias.

V.2.2.1.- Implicación de la POD en la unión a pared celular de compuestos fenólicos

V.2.2.1.1.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre los compuestos fenólicos ligados a pared celular de plantas de tomate

Las peroxidasas contribuyen a la construcción de la pared celular. Entre sus funciones se incluye la intervención en el establecimiento de las posibles uniones covalentes intermoleculares de unión de los residuos de la tirosina de las extensinas y otras glicoproteínas de la pared celular con pares de ácidos hidroxicinámicos y ácido *p*-hidroxibenzoico unidos a pectinas o a algunos xilanos. Algunas peroxidasas están implicadas en la biosíntesis de ligninas, en el depósito de lignina unido a glicoproteínas de pared celular o en el proceso de suberización (García y col., 1991). También se ha implicado la implicación de peroxidasas en la formación de dímeros de compuestos fenilpropanoides usando mezclas equimolares de ácidos hidroxicinámicos, específicamente ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido cafeico (Arrieta-Baez y Stark, 2006). Zimmerlin y col. (1994) aislaron y caracterizaron una peroxidasa catiónica de *Phaseolus vulgaris* L. que estaba unida a pared celular y que era capaz de sintetizar ácido diferúlico *in vitro* con alta especificidad. Hemos evidencias de que la esterificación de compuestos fenólicos, como ácido ferúlico o ácido *p*-cumárico, a la pared celular es un acontecimiento común en la expresión de resistencia. La presencia de fenoles en la pared celular resulta en un incremento en su resistencia química contra enzimas fúngicas y también significa una barrera física que impide la penetración del hongo.

Mientras algunos fenólicos se forman constitutivamente y sirven como inhibidores de patógenos en resistencia de "no huésped" (Stoessl, 1983; Mole y Waterman, 1987a,b), otros se sintetizan *de novo* en respuesta a la infección fúngica y actúan como parte de una respuesta activa de defensa (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Los compuestos fenólicos antibióticos pueden unirse a proteínas *in vitro*, formando complejos solubles e insolubles (Hagerman y Robbins, 1987; Hagerman y Butler, 1980). Se piensa que esta interacción proteína-compuesto fenólico es en parte responsable de las funciones de los compuestos fenólicos como

Discusión

compuestos de defensa de las plantas (Coley, 1983).

Conociendo la implicación de las moléculas del metabolismo fenilpropanoide en la respuesta de defensa, medimos los compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se compararon las cantidades totales de compuestos fenólicos en plantas inoculadas y no inoculadas, y el único cambio detectado después de la inoculación con *V. dahliae* fue un ligero aumento a las 2 hpi en raíces de plantas resistentes inoculadas (Tabla IV.6). Para identificar posibles cambios en las cantidades relativas de compuestos fenólicos entre las muestras estudiadas, analizamos mediante HPLC la cantidad de compuestos fenólicos unidos a pared en estas muestras. Como resultado, se encontraron diferencias en las cantidades de ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzaldehido y vanillina.

En nuestro trabajo, encontramos un ligero incremento en la cantidad de ácido ferúlico en raíces de plantas resistentes inoculadas a las 2 hpi (Tabla IV.7). Además, encontramos diferencias en el contenido de ácido *p*-cumárico en raíces resistentes y susceptibles en estadios posteriores de la interacción. También se encontraron cambios en las cantidades de vanillina en plantas resistentes y de *p*-hidroxibenzaldehido en plantas inoculadas resistentes y no resistentes. Estos compuestos fenólicos están relacionados con la esterificación a pared celular, lo que aumenta la resistencia de la planta a enzimas fúngicas (Fry, 1987). El mayor cambio observado fue en el contenido en ácido *p*-cumárico (Tabla IV.8), del cual se detectó un contenido menor a las 2 hpi en raíces de plantas resistentes inoculadas respecto a su control, y un aumento entre las 16 y las 96 hpi. Este incremento coincidía con el máximo en actividad POD (Figura IV.5) en raíces de plantas resistentes inoculadas y puede estar relacionado con el descenso del incremento inicial en H₂O₂ observado al mismo tiempo en la raíz resistente inoculada. En estadios avanzados de la interacción (a las 48 y 96 hpi) también se detectó un aumento de ácido *p*-cumárico en las raíces susceptibles inoculadas. El ácido *p*-cumárico posee un importante papel en el mantenimiento de las paredes celulares de las plantas. Media

en el entrecruzamiento de ligninas a los polisacáridos en la pared de plantas de gramíneas (Pan y col., 1998).

En el caso del *p*-hidroxibenzaldehído (Tabla IV.10), se observó un incremento en las raíces susceptibles inoculadas que comenzaba a las 24 hpi y duraba al menos hasta las 192 hpi, coincidiendo con el segundo incremento en la actividad POD. Como en el caso del cumárico, se observó un aumento en raíces susceptibles a las 48 y 96 dpi. Finalmente, el contenido en vanillina (Tabla IV.9) se incrementó en plantas resistentes de los 96 hpi en adelante, momento en que la actividad POD era mayor en raíces de plantas resistentes que en susceptibles o en raíces de plantas control, no inoculadas, de ambas líneas (Figura IV.5).

V.2.2.1.2.- Cambios en la composición de las ligninas de raíces de plantas de tomate tras la inoculación *V. dahliae*

Los procesos de lignificación y el reforzamiento de la pared celular en general desempeñan un papel fundamental en la respuesta de las plantas ante la invasión por parte de hongos patógenos (Ride, 1983; Vance y col., 1980). Existe un gran número de trabajos en los cuales se detectan desde la formación de papilas lignificadas en los lugares de penetración del hongo hasta la lignificación como respuesta hipersensible en células invadidas (Berdmore y col., 1983).

Smit y Dubery (1997), trabajando con hipocotilos de algodón, pudieron observar cómo tras la exposición a un elicitador de *V. dahliae* tenía lugar un incremento en la síntesis y deposición de ligninas y polímeros similares. La fase de lignificación activa estaba precedida por un incremento de ciertas actividades como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y la de peroxidasas asociadas a la pared celular. Además estudiaron la respuesta de dos cultivares, uno resistente y otro susceptible a *V. dahliae*, observando que el cultivar resistente presentaba una respuesta más rápida e intensa que

Discusión

el susceptible. A partir de estos resultados, estos autores propusieron la existencia de una correlación directa entre la velocidad e intensidad de la acumulación de polímeros similares a la lignina y la tolerancia o resistencia ante *V. dahliae*. Por su parte Pomar y col. (2004) comprobaron cómo la inoculación de variedades de pimiento con diferente grado de resistencia a *V. dahliae*, provocaba, en todas ellas, un aumento significativo en la cantidad de ligninas.

En nuestro trabajo, la inoculación con *V. dahliae* provocó un aumento significativo en la cantidad total de ligninas de raíces, tanto en la línea susceptible LA 3030 como en la resistente LA 3038, aunque en esta última el aumento se detectaba ya a los 16 dpi y en la línea susceptible no se detectó hasta los 28 dpi. Aunque esta diferencia en la velocidad de respuesta puede ser importante en la expresión de resistencia y en consecuencia en el establecimiento o no de la enfermedad, el análisis de la composición monomérica y estructura de las ligninas nos da más información de cómo tiene lugar este papel defensivo de las ligninas. A este respecto, Pomar y col. (2004) observaron cómo los cambios mostrados por las ligninas de plantas de pimiento inoculadas con *V. dahliae*, en cuanto a su composición monomérica y el grado de entrecruzamiento, estaban íntimamente relacionados con el mantenimiento de la integridad del sistema fotosintético y en consecuencia con la tolerancia a la presencia del patógeno.

En el análisis de las ligninas de tomate llevado a cabo por tioacidolisis, destacan a primera vista los profundos cambios mostrados por éstas, tanto en raíces de la línea susceptible como de la resistente. Aunque en la cuantificación con bromuro de acetilo se detectaba un importante aumento de ligninas totales a los 16 dpi en las plantas inoculadas de la línea resistente (Tabla IV.11), este aumento no se vio reflejado en los valores obtenidos en la tioacidolisis (Tabla IV.13). Esto podría ser debido a un aumento de lignina en los núcleos de lignificación, que se caracterizan por ser una zona condensada rica en enlaces carbono-carbono, no susceptibles a la degradación por tioacidolisis. Este

tipo de lignificación podría ser análoga a la mostrada en las paredes primarias, donde la polimerización es rápida y rica en enlaces interunitarios β -5, β -1, β - β , 5-5 y 5-O-4. Este tipo de ligninas son ricas en grupos hidroxifenilo (H) y guayacilo (G), y pobres en grupos siringilo (S). Aunque este núcleo no es degradable por la tioacidólisis, sí se observa un aumento en la proporción de grupos G respecto a los S (Tabla IV.14), tanto en las plantas inoculadas susceptibles como en las resistentes. Este aumento en la proporción G/S es debido en realidad a una baja cantidad de unidades S a los 16 dpi. A los 28 dpi esta diferencia entre las plantas control y las inoculadas desaparecía, debido a una incorporación masiva de grupos siringilo (Tabla IV.14), grupos característicos de polimerizaciones lentas. La química de los radicales del alcohol sinapílico (Russel y col., 1996) predice que sus únicos modos de acoplamiento son los β - β y los β -O-4, ya que las estructuras de resonancia posibles son $R_{\alpha 4}$ y R_{β} . Como en el alcohol sinapílico a bajas concentraciones el modo de acoplamiento β - β está menos favorecido que el β -O-4 (Russel y col., 1996), casi todas las fuentes del alcohol sinapílico utilizadas para la biosíntesis de lignina están incorporadas principalmente en polímeros ricos en enlaces β -O-4. Teniendo esto en cuenta, la mayor incorporación de grupos siringilo observada a los 28 dpi en plantas inoculadas, debería reflejarse en una mayor proporción de enlaces β -O-4 y, en consecuencia, en una mayor presencia de la fase lineal de las ligninas respecto al total. Para comprobar este hecho se calculó la relación TIC/ μ g lignina (Tabla IV.14). Como se observa en esta tabla, ya a los 16 dpi en las plantas inoculadas de ambas líneas se producía un descenso en la proporción de fase lineal susceptible de ser degradada por tioacidólisis, y este descenso era mayor en la línea resistente. A los 28 dpi, la línea susceptible mantenía valores menores que su control, pero en la línea resistente se producía un aumento muy significativo en la cantidad

monolignol con la especie radical del fenólico en la posición O-4 (Durbeej y Eriksson, 2003). En otras palabras, estos radicales O-4 actuarían como punto de nucleación, en los cuales los radicales monolignoles se irían añadiendo en pasos sucesivos, haciendo de esta manera crecer la fase lineal de las ligninas (Figura IV.13).

Es destacable también el aumento en los grupos aldehído que mostraban por las plantas inoculadas, sobre todo en el coniferilaldehído β -O-4 en la línea resistente a los 28 dpi. La presencia de estos grupos carbonilo podría tener un efecto inhibitor sobre enzimas fúngicas, debido a que estos grupos funcionales pueden reaccionar con los grupos amino de las enzimas desactivándolas; además, estos aldehídos confieren a las ligninas un carácter más hidrofóbico, dificultando la acción de las enzimas celulolíticas (Sewalt y col., 1997).

En el caso del estudio de las ligninas mediante el método degradativo de la oxidación con nitrobenzeno, pudimos comprobar cómo a los 16 dpi se producía un aumento en las proporciones de grupos G respecto a los S (Tabla IV.15), hecho que ya se había observado en la fase lineal de las ligninas mediante tioacidolisis. Además, a los 28 dpi ambos cultivares aumentaban la proporción de grupos H en sus ligninas, presumiblemente tan sólo en el núcleo condensado, ya que en la tioacidolisis no se pudo detectar alcohol *p*-cumarílico en ninguna de las muestras.

Aunque los resultados obtenidos con la oxidación con nitrobenzeno, pueden darnos información directa sobre lo que sucede en el núcleo condensado de las ligninas, no hay que obviar la posibilidad de que parte de las unidades benzaldehído cuantificadas por este método no provinieran de la degradación de monolignoles sino de ácidos hidroxicinámicos unidos a la pared celular, ya que comparten esqueleto aromático con los monolignoles (Figura V.2).

Discusión

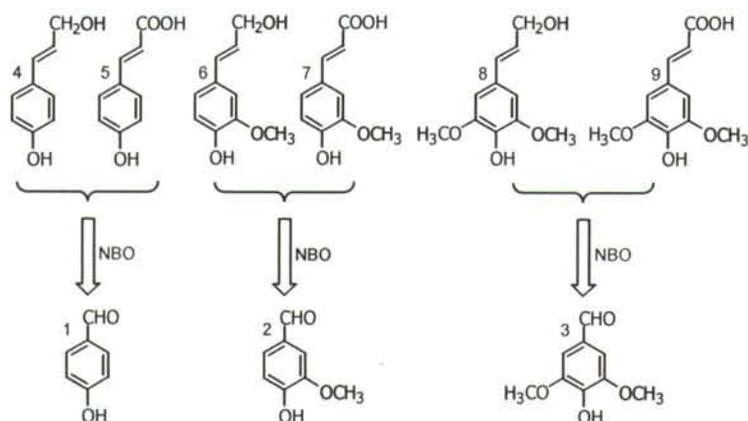


Figura V.2.- Esquema de la degradación con nitrobenzeno de monolignoles y ácidos hidroxicinámicos. (1) p-hidroxibenzaldehído, (2) vanillina, (3) siringaldehído, (4) alcohol cumarílico, (5) ácido p-cumárico, (6) alcohol coniferílico, (7) ácido ferúlico, (8) alcohol sinápico, (9) ácido sinápico.

En resumen, el análisis de las ligninas parece indicar que se produce un aumento en su síntesis en respuesta a la inoculación con *V. dahliae*. Este aumento es más rápido y mayor en la línea resistente, y parece constar de dos fases: en una primera se produce un acúmulo de ligninas con un alto grado de entrecruzamiento, probablemente ricas en grupos guayacilo e hidroxifenilo, y preferentemente en el núcleo condensado de las mismas. Este aumento viene acompañado por una deposición de unidades fenólicas que actuarían como puntos de iniciación. Estos puntos de iniciación permitirían, ya en una segunda fase más lenta, el crecimiento de las ligninas lineales, altamente polimerizadas y ricas en **V. dahliae** **Estudio de la fenilalanina amonio liasa**

En resumen, parece que existe una clara influencia de la infección de *V. dahliae*, en el metabolismo fenólico en tomate. Considerando el mecanismo esencial de la enzima PAL en esta ruta, decidimos determinar los posibles cambios en la actividad PAL a lo largo del proceso de infección y caracterizar las posibles diferencias en el patrón de expresión génica de los homólogos PAL en tomate. La enzima fenilalanina amonio liasa cataliza el primer paso en el metabolismo responsable de la ruta de síntesis de un conjunto imponente de compuestos basados en un esqueleto fenilpropanoide (Jones, 1984).

V.2.3.1.- Estudio de la actividad fenilalanina amonio liasa

Cuando se analizaron los cambios en la actividad PAL (Figura IV.9), encontramos un máximo de actividad en raíces de plantas resistentes inoculadas a los 8 hpi, con un segundo incremento en la actividad de menor intensidad entre los 96 hpi y las 192 hpi. En raíces de plantas susceptibles, se produjo un incremento en la actividad PAL entre las 48 hpi y 96 hpi. Tomados conjuntamente, estos resultados mostraron una coincidencia temporal entre el contenido en H₂O₂ y la actividad PAL en raíces de plantas resistentes.

Contrariamente a lo que se observó en raíces resistentes, el incremento en el contenido de H₂O₂ de raíces susceptibles no supuso un incremento en la actividad PAL hasta las 48 hpi (Figura IV.9). También parecía haber un retraso entre la producción de H₂O₂ (Figura IV.4) y la activación de los genes *PAL* en las raíces susceptibles comparadas con las resistentes.

V.2.3.2.- Estudio de los distintos homólogos *PAL*

Existen estudios contradictorios respecto a la activación de los genes *PAL* por H₂O₂, ya que la generación de H₂O₂ no indujo la expresión de genes *PAL* genes en cultivos celulares de judía (Levine y col., 1994), mientras que una concentración 5 mM de H₂O₂ indujo la expresión de genes *PAL* en cultivos celulares de *Arabidopsis* (Desikan y col., 1998). Nuestros resultados apoyan claramente el papel del H₂O₂ en el mecanismo de inducción de la expresión de los genes *PAL* en raíces de plantas de tomate resistentes, aunque este mecanismo no resultaba evidente en las plantas susceptibles.

PAL es un sistema multigénico compuesto de un número variable de genes altamente homólogos. Por ejemplo, se caracterizaron 5 homólogos en pino (Butland y col., 1998); y se encontraron 4 homólogos *PAL* en *A. thaliana* (Cochrane y col., 2004). Se decidió detectar, mediante RT-PCR, cambios en la expresión génica para identificar cuáles de los parálogos *PAL* están implicados en el incremento de la actividad enzimática

Discusión

correspondiente. Buscando en la base de datos de ESTs de tomate SolGenes, encontramos 6 secuencias diferentes, que se corresponden con al menos 6 homólogos diferentes *PAL* que difieren en su extremo 3' no codificante (Figura IV.10).

V.2.3.2.1.- Análisis de los distintos homólogos *PAL* mediante RT-PCR semicuantitativa

Utilizando la técnica de RT-PCR y electroforesis en geles de agarosa, fuimos capaces de detectar la expresión de seis genes *PAL* en raíces, cotiledones, hipocotilos, epicotilos, hojas y flores de tomate (Figura IV.12). Ahora bien, observamos algunas diferencias en sus niveles de expresión y, así, pudimos visualizar los productos de amplificación de *PAL 2*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 6* usando como molde 5 ng RNA total. En el caso de *PAL 5*, necesitamos una cantidad de al menos 200 ng RNA total para visualizar en los geles una banda de una intensidad similar y necesitamos 600 ng RNA total en el caso de *PAL 1*, independientemente del órgano analizado.

Para detectar si las diferencias en la actividad *PAL* en raíces de cultivares resistentes y susceptibles de tomate inoculadas con *V.dahliae* se debía a un incremento coordinado en la expresión de los distintos genes *PAL* o si existía una regulación diferencial para los distintos genes, decidimos seguir los cambios en la expresión de los parálogos *PAL* en raíces inoculadas mediante RT-PCR en tiempo real. Ésta es una técnica cuantitativa muy sensible, que puede detectar cambios ínfimos en la expresión de los transcritos. No se detectaron los productos de amplificación de *PAL 1* y *PAL 5* después de 30 ciclos de PCR a partir de cDNA de raíces, así que se decidió proseguir el estudio con el resto de los homólogos *PAL*. Esto se contradice con trabajos previos en los que se analizó la expresión de genes *PAL* de tomate (Lee y col., 1992). En este artículo, la mayor parte de la información sobre expresión se refería a *PAL 1* y *PAL 5*. El trabajo se realizó con RNA blots y, teniendo en cuenta

nuestros resultados, se tienen dudas sobre la especificidad de las sondas utilizadas por aquellos autores.

V.2.3.2.2.- Análisis de expresión de distintos homólogos *PAL* mediante RT-PCR en tiempo real

Para conocer si los niveles de expresión de los homólogos *PAL 2*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 6* de tomate eran semejantes entre sí, se analizaron muestras de ambas líneas, LA 3030 y LA 3038, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados mostraron ligeras diferencias en los valores C_t al analizar las muestras de raíces no inoculadas con los distintos cebadores de estos homólogos. Se midió el valor C_t de cada uno de los homólogos *PAL* respecto a los valores C_t obtenidos al analizar estas muestras con los cebadores diseñados para el gen de la β -tubulina, escogido como control constitutivo. El análisis de los resultados se realizó utilizando como referencia (valor = 1.0), el menor de estos valores, que correspondió al homólogo *PAL 2*, seguido de las *PAL 3* y *PAL 4*, que presentaban valores de expresión muy semejantes (Figura IV.13). Finalmente, el nivel de expresión más bajo en raíces de plantas de tomate fue presentado por el homólogo *PAL 6*; además, este es el único homólogo que presentaba diferencias en su expresión basal entre plantas LA 3038 y LA 3030, ya que el nivel de expresión en la línea LA 3038 es tres veces mayor que en la línea LA 3030.

V.2.3.2.3.- Efecto de la inoculación de plantas de tomate con *V. dahliae* sobre los distintos homólogos *PAL* mediante RT-PCR en tiempo real

Para conocer los cambios en la expresión de los genes *PAL*, se analizaron muestras de raíces de los cultivares de tomate resistente y susceptible a 0, 4, 8 y 48 hpi mediante RT-PCR en tiempo real. Nuestros resultados revelan un patrón de expresión diferente para los distintos homólogos *PAL* tras la inoculación.

La mayor parte del aumento de la expresión total de *PAL* en raíces resistentes en las primeras 4 horas después de que la inoculación provino

Discusión

de un incremento en la transcripción de *PAL 2* en los momentos iniciales de la interacción (Figura IV.14). Los niveles de expresión de este homólogo se restablecieron a las 8 hpi, momento en que se recuperaban los niveles iniciales. En este momento dos homólogos, *PAL 3* y *PAL 6*, se sobreexpresaron en raíces resistentes inoculadas. En el caso de *PAL3*, también se produjo un incremento en la expresión a las 48 hpi en raíces susceptibles, coincidiendo con el incremento en la actividad PAL en raíces susceptibles inoculadas (Figura IV.9). Sin descartar posibles cambios posttranscripcionales, la mayor parte del incremento en la actividad de PAL en raíces susceptibles infectadas parece provenir de un incremento en la expresión de *PAL 3*.

Respecto a la *PAL 6*, se produjo un incremento en su expresión a las 8 hpi (Figura IV.14), que, junto con el incremento en la expresión del parólogo *PAL 3*, podría explicar el máximo en la actividad PAL observada en el mismo momento en raíces resistentes inoculadas (Figura IV.9). Ahora bien, cuando se cuantificaban los cambios en la expresión de cada uno de los homólogos comparándolos con los controles, se observó que había un incremento de 9 veces en la expresión en *PAL 3*, mientras los incrementos en la expresión en *PAL 6* eran 60 veces mayores que en los controles. Da la impresión que este homólogo es el responsable del incremento en la actividad PAL que se detectó en raíces resistentes en 8 horas después de la inoculación de *V.dahliae*.

Aparte del aumento de expresión de la *PAL 3*, unas 4 veces mayor a las 48 hpi, no se detectó un cambio de expresión de los genes *PAL* en la interacción compatible. Es interesante que el único cambio que se observaba en la expresión *PAL* a las 48 hpi en interacciones incompatibles se correspondía con un homólogo diferente, *PAL6*, que presentaba un incremento 6 veces mayor comparado con el del control. Este cambio en la expresión podría explicar el segundo incremento encontrado en raíces resistentes a las 48 hpi (Figura IV.9) y puede reflejar el establecimiento de una respuesta sistémica.

No se conoce si existen diferencias en la función o afinidad de sustrato entre las diferentes isoformas de PAL en tomate. Los parámetros cinéticos de las isoformas AtPAL1, 2 y 4 de *Arabidopsis thaliana* indican que estos tres homólogos seguían una cinética estándar de Michaelis-Menten; con parámetros cinéticos calculados de K_M aparente, V_{max} y K_{cat} que variaban entre 64-71 μM , 5.5-10.5 $\text{pKat}/\mu\text{g}$ proteína y 1.8-3.2 s^{-1} , respectivamente. Se estimó, por el contrario, que AtPAL3 tenía una eficacia catalítica entre 500-1000 veces menor que las otras isoformas PAL, resultado de su mayor K_M (2.6 mM) y su bajo valor K_{cat} (0.1 s^{-1}) (Cochrane y col., 2004).

V.2.3.2.4.- Análisis evolutivo de los distintos homólogos PAL

Una vez caracterizados los cambios en la expresión de los homólogos PAL en tomate, decidimos analizar su relación estructural con los genes PAL de otras especies de plantas y, especialmente, compararlas con isoformas de función y relevancia biológica conocida de otras plantas (Tabla V.14). Las relaciones filogenéticas entre los diferentes genes PAL, se alinearon 48 secuencias de genes de diferentes especies de plantas de la base de datos del Centro de Información Biotecnológica del NIH (EE.UU.) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la base de datos del Instituto de Investigaciones Genómicas (TIGR) (<http://www.tigr.org/tdb/agi/>), hoy parte del J. Craig Venter Institute. Al provenir cuatro de las secuencias de tomate de cDNAs parciales, se seleccionaron 116 nucleótidos correspondiente a la región común para toda la PAL y se usaron para obtener un árbol filogenético. Esa secuencia estaba en el extremo 3' de la región codificante del gen.

Análisis preliminares de los alineamientos de las secuencias revelaron una alta homología, de modo que se decidió utilizar esta región de nucleótidos para la reconstitución filogenética. Las secuencias se agruparon en cuatro clusters principales. El resultado de la topología (Figura IV.15) agrupó en la rama A a la PAL 2 y PAL 6. Esta rama incluyó isoformas de plantas leñosas y homólogos de otras dicotiledóneas. Uno

Discusión

de los genes de esta rama, *PAL 1* de *Populus tremuloides* se expresa en células no lignificadas, caracterizadas por su acumulación de taninos condensados, mientras que su parálogo *PAL 2*, que se encuentra en esta rama A, aparece en estructuras lignificadas y en elementos conductores del xilema y floema, y su expresión decrece una vez concluye el proceso de lignificación (Kao y col., 2002). Osakabe y col. (1995) midieron los niveles de cuatro genes *PAL* en tallos de *Populus kitakamiensis* durante el desarrollo del xilema secundario y encontraron que el nivel más alto correspondía al transcrito *palg2b*, también agrupado en la rama A.

La rama B incluye los otros homólogos *PAL* de tomate (*PAL 1*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 5*) y también secuencias de plantas dicotiledóneas como *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*, *Solanum tuberosum*, *Capsicum chinense* y *Ipoema batatas*. *IPBPAL* de *I. batatas* se induce después de un daño mecánico (Tanaka y col., 1989), Tag 402 de *N. tabacum*, se ve inducida 4 veces a las 2 horas después del tratamiento con metil jasmonato y AJ539006 de tabaco es regulado positivamente por H₂O₂ (Vandenabeele y col. 2003). La expresión de *DcPAL1* en células en suspensión de zanahoria se inducía por un elicitor fúngico, radiación UV-B o por el efecto de la dilución (Maeda y col., 2005).

El agrupamiento de todos los parálogos de plantas como *Trifolium pratense* (rama A), *A. thaliana* (rama D) o las especies del monocotiledóneas (rama C) sugiere que eventos de duplicación y divergencia de genes *PAL* ocurrieron dentro de los diferentes linajes vegetales. Pero, por otra parte, la presencia de isoformas de tomate y de tabaco en grupos diferentes parece reflejar una duplicación antigua de los genes. Algunos parálogos de tomate (Figura IV.15) están agrupados con homólogos de otras especies que han sido relacionados con procesos de lignificación. Incrementos en la expresión de estos genes, sólo se encontraron en raíces de plantas de tomate resistentes inoculadas. El gen *PAL 3* (Figura IV.15), agrupado con isoformas de otras especies implicadas en procesos de resistencia a diferentes estreses, mostró un incremento en su expresión en ambas líneas de tomate inoculadas; ahora

bien, en el cultivar susceptible se produjo un incremento menor y más tardío que en plantas resistentes. La distribución de los homólogos *PAL* de tomate en dos grupos diferentes puede reflejar diferencias funcionales entre las isoformas, con una posible implicación de la *PAL 6* y, muy probablemente, de la *PAL 2* en procesos de lignificación y la participación de *PAL 1*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 5* en otros procesos biológicos. La generación de mutantes específicos *PAL* de tomate o la identificación a través de un cribado TILLING de plantas de tomate con alelos *PAL* defectuosos, conjuntamente con el análisis de su resistencia frente a patógenos, el contenido relativo de compuestos fenilpropanoides y la estructura de las paredes celulares pueden arrojar luz acerca de la implicación de las diferentes isoformas de *PAL* en la lignificación u otros mecanismos celulares.

V.3.- Estudio de la expresión de los distintos homólogos *PAL* en el tratamiento de cultivos celulares de tomate con distintos elicitores bióticos y abióticos

Con frecuencia se han usado cultivos de callos como sistemas modelo para estudiar los cambios temporales en el contenido de metabolitos y en la expresión enzimática durante el desarrollo vegetal (Franz y col., 1989; Krsnk-Rasol, 1991; Peskan y col., 1997). Los callos son una herramienta útil para el estudio de enzimas en diferentes compartimentos. A partir de callos es posible obtener suspensiones celulares. Todo estudio con suspensiones debe estar precedido por la obtención y caracterización de las mismas, para lo cual previamente es preciso optimizar la cantidad de células necesaria para iniciar la suspensión y el desarrollo de la misma.

El medio extracelular en el que crecen los cultivos celulares vegetales puede considerarse como un amplio espacio intercelular que forma un continuo con la pared de la célula vegetal (van Huystee y Tam, 1988). Por esta razón, las suspensiones celulares son un material adecuado para determinados tipos de estudios, como la obtención de

Discusión

enzimas implicadas en el metabolismo de la pared celular (Schnabelrauch y col., 1996; Melo y col., 1997; de Marco y col., 1999), ya que el espacio intercelular, en este caso el medio extracelular, se obtiene directamente mediante técnicas no destructivas.

El patrón de crecimiento de las suspensiones celulares de *L. esculentum* podría asimilarse a una curva de tipo sigmoideal (Falco y col., 1996; Mitchell y Cowan, 2003). La fase *lag* de retardo en el crecimiento se produce por la adaptación de las células a las nuevas condiciones. Esta fase suele existir en todos los cultivos, aunque la duración es variable dependiendo del tiempo que tardan las células en habituarse. A continuación se entra en la fase exponencial de crecimiento, en la que la división es activa y el crecimiento rápido. En el caso de cultivos de células vegetales, la fase exponencial es bastante larga (hasta 12 días post inicio de la suspensión). La curva termina con la fase estacionaria, en la que el empaquetamiento se mantiene más o menos constante. Nuestras suspensiones entraban en una dinámica de crecimiento más lento a partir del duodécimo día, aunque todavía aumentaba el empaquetamiento celular.

La última fase en una curva de crecimiento es la muerte celular, provocada por la escasez de nutrientes en el medio y la liberación al medio de metabolitos secundarios que pueden resultar tóxicos. Esta fase no se observó en las suspensiones de *L. esculentum*, probablemente porque el experimento era demasiado breve como para que se produjera la muerte celular.

En una suspensión celular, la tasa de crecimiento se puede medir determinando el número de células, el volumen de empaquetamiento celular y el peso fresco y seco (Collin y Edwards, 1998). El empaquetamiento celular (PCV) da una idea de la tasa de crecimiento de la suspensión (Falco y col., 1996; Gómez-Vásquez y col., 2004). Estos datos se ven apoyados por las medidas de conductividad, parámetro que indica la concentración de sales disueltas en la suspensión. Un descenso de la conductividad se relaciona con el consumo de nutrientes por parte

de las células en suspensión. Debe de estar en relación inversa con el empaquetamiento celular, puesto que si aumenta el número de células, éstas consumirán más nutrientes y harán descender la conductividad del medio. En las suspensiones de *L. esculentum* la conductividad descendía de manera significativa cuando aumentaba el PCV, como se vio durante el crecimiento exponencial hasta los 12 días (Figura IV.16). A continuación se entraba en un periodo en el que el crecimiento era muy reducido, y la conductividad aumentaba ligeramente.

Debido al metabolismo, las células producen sustancias que expulsan al medio extracelular. Estos metabolitos secundarios alteran el pH, y pueden alcalinizar o acidificar el medio. Los resultados muestran que el pH, que en un principio se había ajustado a 5,6 aumentaba durante el ensayo en 1,3 unidades. Esto podría indicar que las células de *L. esculentum* expulsan al medio metabolitos que alcalinizan el medio.

Otra de las ventajas de los cultivos es que su utilización nos permite controlar tanto el ambiente físico como el químico. Por eso poseen aplicaciones importantes en la investigación rutinaria. Además las suspensiones celulares pueden crecer en masa, mostrar una tasa de crecimiento rápida, y todas las células están uniformemente expuestas al medio que las rodea. Esto las hace especialmente útiles para estudios de estrés ambiental, tanto biótico como abiótico (Collin y Edwards, 1998).

En los últimos años han aumentado los estudios de estrés biótico mediante cultivos celulares. Por ejemplo, se ha estudiado la respuesta de defensa del tomate a la elicitación con *Cladosporium fulvum* (Honée y col., 1998); y se han utilizado en la caracterización del gen *LeMir* de tomate, inducido tras la infección con nematodos (Brenner y col., 1998). También los estudios con factores causantes de estrés abiótico son muy abundantes, abarcando, por ejemplo, estrés salino (Winicov y Bastola, 1999; Zhao y col., 2004), térmico (Park y col., 1996; Wang y Luthe, 2003) u oxidativo (Kawaoka y col., 2003; Laloi y col., 2004).

En todos los tratamientos a los que sometimos a las suspensiones celulares se analizaron diversos parámetros bioquímicos. Se midió el

Discusión

contenido en H_2O_2 en las células y en el medio extracelular, la actividad POD en el medio extracelular, y la actividad PAL y la expresión de cuatro de los homólogos que componen la familia génica *PAL* en las células.

Al añadir a las suspensiones de tomate una concentración 100 μM de H_2O_2 observamos un lógico aumento en el contenido de este compuesto a los 15 mpe en el fluido extracelular del cultivo (Figura IV.17A). Igualmente, se observó un aumento en el contenido en H_2O_2 en las células de cultivo a partir de los 15 mpe y hasta el final del periodo analizado (Figura IV.18.A). En el tratamiento en el que además se añadía una concentración 200 μM del antioxidante ácido ascórbico se produjo un aumento más tardío, a 40 mpe, en el medio extracelular, y ninguna variación en las células. La actividad de la enzima POD (Figura IV.19.A) en cultivos tratados con H_2O_2 presentó una curva bimodal, con máximos a los 20 mpe y 30 mpe, pero al añadir ascórbico la actividad de la enzima no varió en todo el tiempo analizado. La actividad de la enzima PAL (Figura IV.20.A) experimentó, en el tratamiento con H_2O_2 , un aumento a los 25 mpe y otro a las 40 mpe. En el tratamiento con H_2O_2 y ácido ascórbico, la actividad de la enzima PAL (Figura IV.e) presentó un único máximo a los 40 mpe, que coincidía con el segundo aumento en el tratamiento con H_2O_2 . El análisis de expresión de cuatro de los homólogos de la familia génica *PAL*, tanto en los tratamientos con H_2O_2 (Figura IV.21) y con H_2O_2 +ácido ascórbico (Figura IV.22) de cultivos celulares de tomate, mostró que en el primer caso son los homólogos *PAL2* y *PAL4* los probables responsables del aumento en la actividad de la enzima a los 40 mpe. Este resultado nos lleva a pensar que ambos homólogos pueden estar regulados por H_2O_2 . En el trabajo de Ashtamker y col (2007) se sugiere que determinadas ROS puede ser inductores directos de genes de defensa. En cambio, al añadir al medio de cultivo ácido ascórbico además de H_2O_2 , los homólogos que aumentaron su expresión a 40 mpe fueron la *PAL 3* y la *PAL 6*, lo que sugiere que pueden no estar regulados por H_2O_2 .

Encontramos en la bibliografía estudios que muestran que la radiación UV de onda corta estimula la síntesis y liberación al medio de

H₂O₂ en cultivos celulares de rosa (Huerta y Murphy, 1989). En nuestro trabajo observamos cómo tras el tratamiento de cultivos celulares de tomate con luz UV, el contenido en H₂O₂ extracelular aumentaba a partir de los 20 mpe y hasta los 40 mpe (Figura IV.17.B), mientras que el contenido en H₂O₂ en las células del cultivo presentaba un máximo a los 15 mpe, disminuyendo a partir de este momento hasta el final del periodo analizado (Figura IV.18.B). La actividad POD (Figura IV.19.B) experimentó un brusco descenso. El efecto del aumento en el contenido en H₂O₂ está asociado con la inhibición de la enzima POD, que está implicada en la síntesis de H₂O₂ en la pared celular (Murphy TM, 1990). Finalmente, el análisis de la actividad enzimática PAL mostró un aumento desde los 20 mpe hasta el final del periodo analizado (Figura IV.20.B). Este aumento de actividad se veía sostenido a los 20 mpe por el aumento de la expresión del homólogo *PAL 2* (Figura IV.23), que era inducido por H₂O₂, y por el aumento de *PAL 3* y *PAL 6* a los 30 mpe, coincidiendo con la inhibición de la expresión de *PAL 2*. Los homólogos *PAL 2* y *PAL 6* aparecían agrupados en el árbol filogenético junto con homólogos asociados a distintos estreses (Figura IV.15). El homólogo *PAL 3*, por su parte, estaba agrupado con homólogos de otras especies caracterizados en procesos de lignificación.

El tratamiento de cultivos celulares de *Rosa damascena* con un elicitor fúngico preparado a partir de *Phytophthora* sp. indujo la producción de H₂O₂, de forma similar a la observada cuando las células se trataban con radiación UV. Estos resultados se interpretan como un proceso de transporte iónico común estimulado mediante elicitores y luz UV por diferentes receptores (Arnott y Murphy, 1991). La razón de esta respuesta no se conoce, pero hay evidencias de que los flavonoides, que absorben eficazmente luz UV, protegen a las plantas de la radiación (Murphy y col., 1979). Cuando utilizamos micelio liofilizado de *F. oxysporum* como elicitor de cultivos de tomate de la línea LA 3038 que contiene el gen de resistencia a *Fusarium I*, observamos que el contenido en H₂O₂ extracelular (Figura IV.17.C) mostró un máximo a los 15 mpe. El contenido

Discusión

intracelular en H_2O_2 (Figura IV.18.C) presentó una curva bimodal, con máximos a los 35 mpe y 45 mpe. La actividad POD (Figura IV.19.C) también presentó una curva bimodal con un primer máximo a los 20 mpe, que aparecía retrasado respecto al contenido extracelular en H_2O_2 . El segundo aumento en actividad POD ocurría a los 35 mpe. Respecto a la actividad de la enzima PAL (Figura IV.20.C), también presentó una curva bimodal con máximos a los 15 mpe y a los 30 mpe. El primer máximo coincidía temporalmente con el máximo en el contenido en H_2O_2 extracelular y parece deberse al aumento de expresión del homólogo *PAL 2* (Figura IV.24), que es uno de los homólogos que se ven regulado por H_2O_2 . El segundo aumento en la actividad PAL, a 30 mpe, parece depender del aumento de expresión del homólogo *PAL 3*, uno de los homólogos que no está regulado por H_2O_2 y que aparece agrupado en el árbol filogenético con homólogos de otras especies implicados en procesos de lignificación. El aumento de la actividad enzimática POD a los 35 mpe se veía desfasado temporalmente respecto al segundo aumento en la actividad PAL. Es interesante destacar el descenso inicial en la expresión del homólogo *PAL4*.

En suspensiones celulares de *Manihot esculenta* tratadas con un glucano de la pared celular de levadura se observó un aumento de la bolsa oxidativa, medido como H_2O_2 , a los 2-3 minutos post elicitación (Gómez – Vásquez y col. 2004). La actividad PAL se indujo a las 15 horas post elicitación y fue precedida por la acumulación de mRNA *PAL* (8 horas post elicitación). En este mismo trabajo se midió la actividad de la enzima POD, que era inducida, con un aumento posterior al de la enzima PAL (48 horas post elicitación).

Finalmente, utilizamos como elicitor micelio liofilizado de *V. dahliae* sobre cultivos de tomate de la línea LA 3038, que contiene el gen de resistencia *Ve*, que confiere resistencia frente a este patógeno. El análisis del contenido en H_2O_2 (Figura IV.17.D) en el fluido extracelular aumentó desde las 0 mpe y hasta los 45 mpe, con un máximo a los 35 mpe. En cuanto al contenido en H_2O_2 en las células de cultivo (Figura IV.18.D) se

observó un único descenso a los 40 mpe. La actividad POD (Figura IV.19.D) aumentaba a partir de los 25 mpe y la actividad PAL (Figura IV.20.D) presentó una curva bimodal con máximos a los 25 mpe y a los 35 mpe. El homólogo *PAL 2* (Figura IV.25) parece ser el responsable del aumento en la actividad de la enzima a los 25 mpe, mientras los homólogos *PAL 3* y *PAL 6* podrían ser responsables del segundo aumento. La expresión del homólogo *PAL 4* permaneció estable durante los tiempos de análisis. Estos resultados coincidían con los obtenidos al analizar raíces de plantas intactas de tomate resistentes a *V. dahliae*, tras ser inoculados con este patógeno (Figura IV.10).

V.4.- Análisis de expresión diferencial en la interacción compatible e incompatible *L. esculentum*-*V. dahliae* mediante la técnica de SSH.

Se prepararon genotecas sustractivas a partir de raíces de plantas resistentes y susceptibles inoculadas. Como resultado, se obtuvo una genoteca cDNA altamente enriquecida en clones cuya expresión aumenta como resultado específico de la respuesta resistente. Dado que la velocidad con que se produce la respuesta resistente parece ser crucial para la interacción incompatible y para el establecimiento de una respuesta hipersensible, se decidió recoger las muestras a las dos horas tras la inoculación. Para minimizar todo efecto que no fuera debido a la inoculación con *V. dahliae*, las plantas se mantuvieron en condiciones controladas y la inoculación se llevó a cabo vertiendo directamente una suspensión de esporas del hongo sobre el suelo. Se buscó la identificación de genes, con intención de comprobar si los clones obtenidos se correspondían con los esperados en una respuesta resistente temprana. Efectivamente, entre los clones hallados aparecieron diferentes genes relacionados con el metabolismo y transducción de señal mediada por etileno. La implicación de esta hormona en la respuesta resistente es bien conocida, y la presencia de clones de distintos genes relacionados con su función parece confirmar la abundante presencia en la genoteca sustractiva de genes que intervienen en la respuesta temprana. Además de genes de receptores,

Discusión

también se identificaron genes responsables de la movilización de material vacuolar lo que, nuevamente, está en consonancia con funciones biológicas documentadas en relación con la interacción incompatible.

Conclusiones

VI.- Conclusiones

1. Se ha desarrollado un método rápido y fiable para la detección y cuantificación de *V. dahliae* en planta, agua de riego y suelo utilizando la técnica de qPCR en tiempo real.
2. La aplicación de este método a plantas de distintos cultivares de *C. annuum* (SCM331, Padrón, PI201234 y Luesia) y de *C. chinense* (C118), inoculados con *V. dahliae* han mostrado la existencia de una clara correspondencia entre la sintomatología mostrada por las plantas infectadas y su contenido en DNA fúngico.
3. La detección y cuantificación mediante qPCR en tiempo real de *V. dahliae* en dos líneas isogénicas de tomate mostró una disminución en la relación DNA hongo/DNA planta, en la línea que contiene el gen de resistencia *Ve*, a diferencia de lo que ocurre en el cultivar susceptible, en el cual la biomasa del hongo se incrementa con el tiempo.
4. Se observó una correspondencia temporal entre el aumento del contenido en H₂O₂, y el de las actividades enzimáticas PAL y POD como resultado de la interacción tomate-*V. dahliae* en raíces de tomate resistente.
5. El estudio mediante HPLC del contenido en fenoles ligados a pared celular reveló un aumento en el contenido en ácido *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzaldehído y vanillina como consecuencia de la inoculación con *V. dahliae*. El ácido *p*-cumárico media en procesos de entrecruzamiento de la pared celular uniendo polisacáridos con la lignina.
6. La cuantificación de ligninas en paredes celulares nos permitió detectar diferencias significativas entre plantas inoculadas de ambas líneas de tomate y plantas control. Los estudios degradativos realizados sobre estas ligninas permitieron comprobar que la inoculación con el hongo provocaba importantes cambios en su estructura y composición, incluyendo el aumento del número de puntos de nucleación. Estos cambios ocurrían en ambas líneas de tomate, pero eran más rápidos e intensos en la línea resistente.

7. El análisis por RT-PCR en tiempo real de la expresión de los homólogos *PAL* en las plantas de tomate inoculadas con *V. dahliae* mostró cambios importantes en sus niveles de expresión durante el transcurso de la infección. Estos cambios fueron especialmente acusados en la variedad resistente.
8. El estudio filogenético de los genes *PAL* de distintas especies vegetales permitió vislumbrar posibles funciones de cada uno de los homólogos de tomate. Este análisis sugirió la intervención de *PAL 2* y *PAL 6* en procesos de lignificación, y la probable implicación de *PAL 1*, *PAL 3*, *PAL 4* y *PAL 5* en otros mecanismos defensivos.
9. La expresión de los genes *PAL* de cultivos celulares de tomate tratados con un elicitador de *V. dahliae* presenta un patrón semejante al de raíces intactas. Además existen diferencias en la respuesta a *Fusarium* y *V. dahliae* en cultivos celulares de tomate resistentes a ambos patógenos, lo que sugiere que los mecanismos que subyacen a ambas resistencias podrían ser diferentes.
10. Las secuencias de clones de una genoteca sustractiva de raíces resistentes inoculadas indican la posible implicación de la hormona etileno en los mecanismos de resistencia a *V. dahliae*. Otras secuencias incluyen proteínas implicadas en la movilización desde y hacia la vacuola.

Bibliografía

VII.- Bibliografia

- Abeles FB, Biles CL** (1991) Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* **95**: 269-273
- Adam A, Farkas T, Somlyai G, Hevesi M, Kiraly Z** (1989) Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol Mol Plant Pathol* **34**: 13-26
- Ahl-Goy P, Signer H, Reist R, Aichholz R, Blum W, Schmidt E, Kessmann H** (1993) Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* × *Nicotiana debneyi*. *Planta* **191**: 200-206
- Alexandrov NN, Troukhan ME, Broker VV, Tatarinova T, Flavell RB, Feldman KA** (2006) Features of Arabidopsis genes and genome discovered using full-length cDNA. *Plant Mol Biol* **60**: 71-87
- Allan AC, Fluhr R** (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**: 1559-1572
- Apel K, Hirt H** (2004) Reaction oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Apostol I, Heinstein PF, Low PS** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol* **90**: 106-116
- Arnott T, Murphy TM** (1991) A comparasion of the effects of a fungal elicitor and ultraviolet radiation on ion transport and hydrogen peroxide synthesis by rose cells. *Environl Exp Bot* **31**: 209-216
- Arrieta-Baez D, Stark RE** (2006) Using trifluoroacetic acid to augment studies of potato suberin molecular structure. *J Agric Food Chem* **54**: 9636 -9641

- Arroyo R, Revilla MA** (1991) In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rep* **10**: 414-416
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Mol Biol* **50**: 601-639
- Asada K, Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: *Photoinhibition*. Kyle DJ, Osmond CB, Amtzen CJ, eds, pp 227-287. Elsevier, New York USA
- Ashtamker Ch , Kiss V, Sagi M, Davydov O, Fluhr R** (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced ROS production in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* **143**: 1817 - 1826
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 by *Phytophthora* elicitors – stimulated rose cells. *Plant Physiol* **107**: 1241-1247
- Bachem CWB, Oomen RJFJ, Visser RGF** (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep* **16**: 157-173
- Baier M, Dietz KJ** (1996) Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol Biol* **31**: 553-564
- Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C, Rolando C** (1993) Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* **32**: 789-793
- Baker CJ, Orlandi EW, Mock NM** (1993) Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol* **102**: 1341-1344
- Baker MA, Orlandi EW** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 299-321

- Bao W, O'Malley DN, Whetten R, Sederoff RR** (1993) A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* **260**: 672-674
- Barriuso J, Gil Ortega R, Palazón C** (1992) Influence of temperature on the expression of partial resistance in pepper after artificial inoculation with *Verticillium dahliae* Kleb. En: Proceedings of the VIII Meeting on Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant. pp 201-204. Rome, Italy
- Barriuso J, Palazón C, Gil Ortega R, Delgado I** (1989) Characterization of *Verticillium dahliae* Kleb. isolates on a set of *Capsicum* spp. *Capsicum Newsletter* **11**: 37-38
- Baudin M, Lepoivre P** (1984) Risques potentiels de transmissions de champignons phytopathogènes par les boues de dépollution. *Ann Gembloux* **90**: 183-191
- Beaudoin-Eagan LD, Thorpe TA** (1985) Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiol* **78**: 438-441
- Bellincampi D, Dipierro N, Salvi G, Cervone F, De Lorenzo G** (2000) Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol* **122**: 1379-1385
- Bell-Lelong DA, Cusumano JC, Meyer K, Chapple C** (1997) Cinnamate-4-hydroxylase expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* **113**: 729-738
- Berdmore J, Ride JP, Granger JW** (1983) Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Physiol Plant Pathol* **22**: 209-220
- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A, Plourde GL** (1999) Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* **121**: 135-145

- Bewley WF** (1922) "Sleepy disease" of the tomato. *Ann Appl Biol* **9**: 116-134
- Bhat RG, Smith RF, Koike ST, Wu BM, Subbarao KV** (2003) Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Dis* **87**: 789-797
- Bhatia P, Taylor WR, Greenber AH, Wright JA** (1994) Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem* **216**: 223-226
- Billa E, Tollier MT, Monties B** (1996) Characterization of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time. *J Sci Food Agric* **72**: 250-256
- Bishop CD** (1988) Pathogenesis in the fungal vascular wilts. En: *Experimental and conceptual plant pathology*, Vol. 2. Pathogenesis and host-parasite specificity. Singh RS, Singh US, Hess WM, Weber DJ, eds, pp 257-271. Gordon and Breach Science Publishers, New York USA
- Bittner-Eddy PD, Allen RL, Rehmany AP, Birch P, Beynon JL** (2003) Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* **4**: 501-507
- Blanco MA** (1996) Micosis vasculares. En: *Patología vegetal* Vol. 2. Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A, eds. pp. 913-938. Phytoma, Sociedad Española de Fitopatología, Valencia
- Böhm J, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, Oehlmann R, Obwald W** (1999) Real-time quantitative PCR. Determination in isolates spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in the respective host plants. *J Phytopathol* **147**: 409-416

- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res* **23**: 517-32
- Bonants PJM, van Gent-Pelzer MPE, Hooftman R, Cooke DEL, Guy DC, Duncan JM** (2004) A combination of baiting and different PCR formants, including measurement of real-time quantitative fluorescence for the detection of *Phytophthora fragaria* in Strawberry plant. *Eur J Plant Pathol* **110**: 689-702
- Bonifacio A** (1974) Seccume delle branche di olivo. *Inform Ortoflor* **15**: 7-8
- Bonifacio A, Parrini C** (1975) Presenza di *Verticillium dahliae* Kleb. in oliveti della Toscana. *Inform Fitopatol* **25**: 21-25
- Bosland PW, Lindsey DL** (1991) A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper, *Capsicum annuum*. *Plant Dis* **75**: 1048-1050
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inze D** (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* **10**: 1723-1732
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D** (1992) Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ** (1992) Elicitor and wound induced oxidative cross-linking of proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30
- Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I, Williamson VM** (1998) Characterization of *LeMir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol* **118**: 237-247
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C** (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**:1703–1712

- Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF, Dey PM** (1995) Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol* **109**: 1115-1123
- Bucciarelli B, Jung HG, Ostry ME, Anderson NA, Vance CP** (1998) Wound response characteristics as related to phenylpropanoid enzyme activity and lignin deposition in resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). *Can J Bot* **76**: 1282–1289
- Bustin SA** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-193
- Butland SL, Chow ML, Ellis BE** (1998) A diverse family of Phenylalanine ammonia lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Mol Biol* **37**: 15-24
- Cans Ch, Passer BJ, Shalak V, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N, Allanic D, Tufino R, Argentini M, Moras D, Fiucci G, Goud B, Mirande M, Masón R, Telerman A** (2003) Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci USA* **24**:1389-13897
- Castillo Ruiz RA, Herreram C, Ghislain M, Gebhardt C** (2005) Organization of phenylalanine ammonia lyase (PAL), acid PR-5 and osmotin-like (OSM) defence-response gene families in the potato genome. *Mol Gen Genom* **274**: 168-179
- Chappell J, Hahlbrock K, Boller T** (1984) Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase (*Phytophthora megasperma*). *Planta* **161**: 475–480
- Chapple CCS, Vogt T, Ellis BE, Somerville CR** (1992) An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4**: 1413-1424

- Chen Z, Malami J, Henning J, Conrath V, Sanchez Casas P, Silva M, Ricigliano J, Klessig DF** (1995) Induction, modification of the salicylic acid in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4134-4137
- Cho SK, Jeung JU, Kang KH, Shim KS, Jung KW, You MK, Ok SH, Chung YS, Hwang HG, Choi HC, Moon HP, Shin JS** (2004) Identification of genes induced in wound-treated wild rice (*Oryza minuta*). *Mol Cells* **17**: 230-236
- Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ** (2000) Response to *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol* **123**: 81-92
- Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG** (2004) The Arabidopsis Phenylalanine ammonia-lyase gene family: Kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* **65**: 1557-1564
- Coley PD** (1983) Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs* **53**: 209-233.
- Collen J, Ekdhal A, Abrahamsson K, Pedersen M** (1994) The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry* **36**: 1197-1202
- Collin HA, Edwards S** (1998) *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford UK
- Corchete MP, Diez JJ, Valle T** (1993) Phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Ulmus pumila* and *U. campestris* treated with spores of *Ceractocystic ulmi*. *Plant Cell Rep* **13**: 111-114
- Corpas FG, Barroso JB, del Río LA** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 145-150

- Dat J, Vandenaabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779-795
- Davies RR, Isaac I** (1958) Dissemination of *Verticillium albo-atrum* through the atmosphere. *Nature* **181**:649
- D'Cunha GB, Nair PM, Satyanarayan V** (1996) Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* **42**: 17-20
- De Lorenzo G, Castoria R, Cervone F** (1997) Fungal invasion enzymes and their inhibition. En: *The Mycota. Plant relationships Part. A Vol. 5*. Esser K, Lemke PA, eds, pp 61-83. Springer-Verlag Berlin
- De Marco A, Guzardi P, Jamet E** (1999) Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol* **120**: 371-381
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gutrella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247-1250
- Desikan R, Reynolds A, Hacock JT, Neill SJ** (1998) Harpin and hydrogen both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* **330**:115-120
- DeVay JE, Pullman GS** (1984) Epidemiology and ecology of diseases caused by *Verticillium* species, with emphasis on *Verticillium dahliae* of cotton. *Phytopathol Med* **23**: 95-108
- Dharmawardhana DP, Ellis BE, Carlson JE** (1995) A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol* **107**: 331-339
- Dhingra OD, Sinclair JB** (1995) *Basic plant pathology methods*. Ed. Lewis Publishers, Boca Raton.

- Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD** (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6025-6030
- Díaz J, Ros Barceló A, Merino de Cáceres F** (1997) Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. *New Phytol* **136**: 183-188
- Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, Edwards R** (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 258-266
- Dobinson KF** (1995) Genetic transformation of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Can J Bot* **73**: 710-715
- Doke N** (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplast upon the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressor of hypersensitivity. *Physiol Plant Pathol* **23**: 359-367
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio defence. *Gene* **179**: 45-51
- Doke N, Ohashi Y** (1988) Involvement of an $O_2^{\cdot -}$ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol* **32**: 163-175

- Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S** (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 646-655
- Durbeej B, Eriksson LA** (2003) Formation of β -O-4 lignin models— a theoretical study. *Holzforschung* **57**: 466-478
- Easton GD, Nagle ME, Bailey DL** (1969) A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation waste. *Phytopathology* **59**: 1171-1172
- Edwards K, Johnstone C, Thompson A** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Egea C, Sid Ahmed A, Candela M y Candela ME** (2001) Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *J Plant Physiol* **158**: 151-158
- El Ghaouth A, Wilson CL, Callahan AM** (2003) Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathology* **93**: 349-355
- El Modafar C, Tantaoui A, El Boustani E** (2000) Changes in cell wall-bound phenolic compounds and lignin in root of date palm cultivars differing in susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *J Phytopathol* **148**: 405–411
- Falco MC, Januzzi Mendes BM, Tulmann Neto A** (1996) Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plan regeneration. *R Bras Fisiol Veg* **8**: 1-6
- Fan XT, Mattheis JP, Roberts RG** (2000) Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. *Physiol Plantarum* **110**: 450–454

- Flocco CG, Álvarez MA, Giulietti AN** (1998) Peroxidase production *in vitro* by *Armoracia lapathifolia* (Horseradish)-transformed root cultures: effect of elicitation on level and profile of isoenzymes. *Biotechnol Appl Biochem* **28**: 33-38
- Folin O, Ciocalteu V** (1927) On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J Biol Chem* **27**: 627-650
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446
- Fradin EF, Thomma BPHJ** (2006) Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathol* **7**: 71-86
- Franke R, McMichael CM, Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Chapple C** (2000) Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J* **22**: 223-234
- Franz P, de Ruitger NCA, Schel JHN** (1989) Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus culture of maize (*Zea mays* L.) *Plant Cell Rep* **8**: 67-70
- Fritig B, Hirth L, Ourisson G** (1970) Biosynthesis of the coumarins: Scopoletin formation in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* **9**: 1963-1975
- Fry SC** (1983) Feruloyled pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta* **157**: 11-123.
- Fry SC** (1987) Intracellular feruloylation of pectic polysaccharides. *Planta* **171**: 205-211

- Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M** (2000) Arabidopsis ethylene-responsive elements binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *The Plant Cell* **12**: 393-404
- Fukasawa-Akada T, Kung SD, Watson JC** (1996) Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Mol Biol* **30**: 711-722
- Gacesa P, Hubble J** (1987) *Enzyme Technology*, Open University Press, Milton K, England UK
- Gachon C, Saindreman P** (2004) Real time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem* **42**: 367-371
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756
- Gaspar T** (1991) Vitrification in micropropagation. En: *Biotechnology in agriculture and forestry 17. High-tech and micropropagation I*. Bajaj YPS, eds, pp 116-126. Springer, Berlin Germany
- Gayoso C, Martínez de Ilárduya O, Pomar F, Merino F** (2007) Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* Kleb. in different Solanaceae cultivars. *Europ J Plant Pathol* (En prensa)
- Gentle A, Anastasopoulos F, McBrien NA** (2001) High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques* **31**: 502-508
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM** (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **6**: 995-1001
- Gil Ortega R, Palazón C, Zueco JC** (1991) Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. *Plant Breed* **107**: 50-55

- Gil Ortega R, Palazón C, Barriuso J** (1989) Búsqueda de resistencia a *Verticillium dahliae* en especies diferentes de *Capsicum annuum*. En: Actas de las VII Jornadas de Selección y Mejora de Plantas Hortícolas, pp 83-89 Badajoz, Spain
- Giovannoni J, Yen H, Shelton B, Miller S, Vrebalov J, Kannan P, Tieman D, Hackett R, Grierson D, Klee H** (1999) Genetic mapping of ripening and ethylene-related loci in tomato. *Theor Appl Genet* **98**:1005–1013
- Gómez – Vásquez R, Day R, Buschmann H, Randles S, Beeching JR, Cooper RM** (2004) Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidase in elicitor-challenged Cassava (*manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann Bot* **94**: 87-97
- Gómez Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, María A. PedreñoMA, Ros Barceló A** (2007) Structural motifs of syringyl peroxidases predate not only the gymnosperm–angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytol* **173**: 63-78
- González-Salán MM, Bosland PW** (1992) Sources of resistance to *Verticillium* wilt in *Capsicum*. *Euphytica* **59**: 49-53
- Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD** (1998) Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde. *J Sci Food Agric* **78**: 81-87
- Graf AB** (1992) *Hortica*. Ed. Roehrs Company. New Jersey USA
- Grant JJ, Loake GJ** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**: 21-29
- Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, Ausubel FM** (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**: 551-563

- Griffing LR, Fowke JC** (1985) Cytochemical localization of peroxidase in soybean suspension culture cells and protoplasts: intercellular vacuole differentiation and presence of peroxidase in coated vesicles and multivesicular bodies. *Protoplasma* **128**: 22-30
- Grisebach, H.** (1981) Lignins. En: *The Biochemistry of Plants*. Vol 7. Conn EE, eds, pp 457-478. Academic Press, New York USA
- Hagerman AE, Butler LG** (1980) Determination of protein in tannin-protein precipitates. *J Agric Food Chem* **28**: 944-947
- Hagerman AE, Robbins CT** (1987) Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *J Chem Ecol* **13**:1243-1259
- Hahlbrock K, Scheel D** (1989) Physiology and molecular biology and phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 347-369
- Hahn M, Deising H, Struck C, Mendgen K** (1997) Fungal morphogenesis and enzyme secretion during pathogenesis. En: *Resistance of crop plants against fungi*. Hartleb H, Heitefuss R, Hoppe HH, eds, pp 33-56. Gustav Fischer, Jena Germany
- Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier P, Stöcker R, Stenzel K** (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**:153-156.
- Halbrock K, Grisebach H** (1979) Enzymic control in the biosynthesis of lignins and flavonoids. *Annu Rev Plant Physiol* **30**: 105-130
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell* **8**: 1773-1791

- Hammond-Kosack KE, Silverman P, Raskin I, Jones JDG** (1996) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* induce changes in cell morphology, and the synthesis of ethylene and salicylic acid, in tomato plants carrying the corresponding Cf-disease resistance gene. *Plant Physiol* **110**: 1381-1394
- Han CU, Lee CH, Jang KS, Choi GJ, Lim HK, Kim JC, Ahn SN, Choi JE, Cha JS, Kim HT, Cho KY, Lee SW** (2004) Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Mol Cells* **17**: 462-468
- Hano C, Addi M, Bensaddek L, Cronier D, Baltora-Rosset S, Doussot J, Maury S, Mesnard F, Chabbert B, Hawkins S, Laine E, Lamblin F** (2006) Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* **223**: 975-989
- Hao Z, Charles DJ, Liangli Y, Simon JE** (1996) Purification and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* **43**: 735-739
- Hartley RD, Ford C W** (1989) Phenolic constituents of plant cell walls and biodegradability. En: *Plant Cell Wall Polymers Biogenesis and Biodegradation*. Lewis, NG, Paice, MG, eds, pp 137-145. American Chemical Society, Washington USA
- Hatfield RD** (1993) Cell wall polysaccharide interactions and degradability. En: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung HJ, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J. eds. pp 285-313. ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, USA
- Hayden KJ, Rizzo D, Tse J, Garbeloto M** (2004) Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California Forest using real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **94**: 1075-1083

- He XZ, Dixon RA** (2000) Genetic manipulation of isoflavone 7-O methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *Plant Cell* **12**:1689-702
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 984-994
- Hein I, Klein D, Lehner A, Bubert A, Brandl E, Wagner M** (2001) Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assays. *Res Microbiol* **152**: 37-46
- Heinz R, Lee SW, Saparno A, Nazar RN, Robb J** (1998) Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiol Mol Plant Pathol* **52**: 385-396
- Hepler PK, Rice RM, Terranova WA** (1972) Cytochemical localization of peroxidase in wound vessel members of *Coleus*. *Can J Bot* **50**: 977-983
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R** (1993) Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**: 1026–1030
- Hipskind JD, Paiva NL** (2000) Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 551–562.
- Honée G, Buitink J, Jabs T, de Kloe J, Sijbolts F, Apotheker M, Weide R, Sijen T, Stuiver M, de Wit PJGM** (1998) Induction of defense-related responses in Cf9 tomato cells by the AVR9 elicitor peptide of *Cladosporium fulvum* is developmentally regulated. *Plant Physiol* **117**: 809-820
- Howard RJ** (1985) Local and long-distance spread of *Verticillium* species causing wilt of alfalfa. *Can J Plant Pathol* **7**: 199-202

- Hu G, de Hart AKA, Li Y, Ustach C, Handley V, Navarre R, Hwang Ch, Aegerter BJ, Williamson VM, Baker B** (2005) *EDS1* in tomato is required for resistance mediated by TIR-class *R* genes and the receptor-like *R* gene *Ve*. *Plant J* **42**: 376–391
- Hu X, Nazar RN, Robb J** (1993) Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Physiol Mol Plant Pathol* **42**: 23-36
- Huerta AJ, Murphy TM** (1989) Effects of extracellular pH on UV-induced K^+ efflux from cultured rose cells. *Plant Physiol* **90**: 749-753.
- Huisman OC, Gerik JS** (1989) Dynamics of colonization of plant roots by *Verticillium dahliae* and other fungi. En: Vascular wilt diseases of plants. Basic studies and control. Tjamos, Beckman CH, eds, pp 1-17. Springer Verlag, Berlin Germany
- Ibrahimllari L** (1987) Some data on wilt organisms of pepper in the district of Tiranë. *Bul Shkencare Bujgësore* **26**: 94-100
- Ikegawa T, Mayama S, Nakayashiki H, Kato H** (1996) Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**: 245-255
- Isaac I** (1953) Studies on the interactions between species of *Verticillium*. *Ann Appl Biol* **40**: 623-629
- Jiang MY, Zhang JH** (2002) Involvement of a plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* **215**: 1022-1030
- Jiang Z-Y, Woollard ACS, Wolff SP** (1990) Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* **268**: 69-71

- Jiménez Díaz RM** (1996) Interacciones planta patógeno: mecanismos de infección, patogénesis, y resistencia. En: Patología vegetal Vol. 2. Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A, eds, pp 739-770. Phytoma, Sociedad Española de Fitopatología, Valencia
- Jiménez-Díaz RM, Millar RL** (1988) Sporulation on infected tissues, and presence of airborne *Verticillium albo-atrum* in alfalfa fields in New York. Plant Pathol **37**: 64-70
- Johnson DB, Moore WE, Zank LC** (1961) The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. Tappi **44**: 793-789.
- Jones DH** (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. Phytochemistry **23**:1349-1359
- Joo JH, Wang SY, Chen JG, Jones AM, Fedoroff** (2005) Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein α and β subunits in Arabidopsis oxidative stress response to ozone. Plant Cell **17**: 957-970
- Jordan JJ** (2000) Real-time detection of PCR products and microbiology. New Technologies for Life Sciences: A Trends Guide. pp 61-66 Elsevier, London UK
- Kang Z, Buchenauer H** (2000) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. Physiol Mol Plant Pathol **57**: 255–268
- Kao Y, Harding S, Tsai Ch** (2002) Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin, accumulating and lignifying cells of quaking aspen. Plant Physiol **130**: 796-807

- Kawaoka A, Matsunaga E, Endo S, Kondo S, Yoshida K, Shinmyo A, Ebinuma H** (2003) Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiol* **132**: 1177-1185
- Kawchuk LM, Haachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard R, Fischer R, Prüfer D** (2001) Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6511-6515
- Kendrick JB, Middleton JT** (1959) Influence of soil temperature and of strains of the pathogen on severity of *Verticillium* wilt of pepper. *Phytopathology* **49**: 23-38
- Kepler LD, Baker CJ** (1989) O_2^- -initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions. *Phytopathology* **79**: 555-562
- Kim H, Ralph J, Lu L, Pilate P, Leplé JC, Pollet B, Lapierre CB** (2002) Identification of the structure and origin of thioacidolysis marker compounds for cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in angiosperms. *J Biol Chem* **49**: 47412-47419
- Klein D** (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* **8**: 257-260
- Klein DK, Leutenegger CM, Bahula C, Gold P, Hofmann-Lehmann R, Salmons B, Lutz H, Gunzburg WH** (2001) Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**: 8-20
- Klisiewicz JM** (1975) Survival and dissemination of *Verticillium* in infected safflower seed. *Phytopathology* **65**: 696-699

- Klisiewicz JM** (1974) Role of infected safflower seed in survival and dissemination of *Verticillium dahliae*. *Annu Amer Phytopathol Soc* **1**: 37
- Kombrink E, Somssich IE** (1995) Defense responses of plants to pathogens. *Adv Bot Res* **21**:1-34.
- Kong P, Hong C, Jeffers SN, Richardson PA** (2003) A specie-specific polymerase chain reaction assay for a rapid detection of *Phytophthora nicotiana* in irrigation water. *Phytopathology* **93**: 822-831
- Kristensen BK, Bloch H, Rasmussen SK** (1999) Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiol* **120**: 501-512
- Krsnik-Rasol, M** (1991) Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int J Devel Biol* **35**: 259-263
- Kruijt M, de Kock MJD, de Wit PJGM** (2005) Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Mol Plant Pathol* **6**: 85-97
- Kumar S, Tamura K, Nei M** (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief Bioinform* **5**: 150-163
- Lagrimini LM** (1991) Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol* **96**: 577-583
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S** (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7542-7546
- Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S, Liu TY** (1997) Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol* **114**: 1187-1196

- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP** (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxina *h5* gene induction by oxidative stress and its W-Box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol* **134**: 1006-1016
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-257
- Lapierre CB, Pollet C, Rolando C** (1995) New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res Chem Intermed* **21**: 397-412
- Lee SW, Robb J, Nazar RN** (1992) Truncated phenylalanine ammonia lyase expression in tomato. *J Biol Chem* **15**: 11824-11830
- Legendré L, Rueter S, Heinstejn PF, Low PS** (1993) Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol* **102**: 233-240
- Lehtinen U** (1993) Plant cell wall degrading enzymes of *Septoria nodorum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **43**: 121-134
- Leon J, Lawton MA, Raskin I** (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **108**: 1673-1678
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martínez-Zapater JM** (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent mRNA. *Plant Physiol* **108**: 39-46
- Li J, Ou-Lee TA, Raba R, Amundson RG, Last RL** (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179

- Li KN, Rouse DI, Eyestone EJ, German TL** (1999) The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. *Mycol Res* **103**: 1361-1368
- Li L, Popko JL, Umezawa T, Chiang VL** (2000) 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem* **275**: 6537-6545
- Liang P, Pardee AB** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971
- Liu Ch, Muchal US, Raghothama KG** (1997) Differential expresión of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol Biol* **33**: 867-874
- Liu W, Saint DA** (2002) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assays based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* **302**: 52-59
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻[Delta Delta C(T)] Method *Methods*. **25**: 402-408
- Logemann E, Parniske M, Hahlbrock K** (1995) Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonialyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5905-5909
- Low PS, Merida JR** (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**: 533-542
- Lu G, Jantasuriyarat C, Zhou B, Wang GL** (2004) Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. *Theor Appl Genet* **108**: 525-534

- Lucas JA** (1998) Plant pathology and plant pathogens. Ed. Blackwell Science, Oxford.
- Maden S** (1987) Seed-borne fungal diseases of chick-pea in Turkey. *J Turk Phytopathol* **16**: 1-8
- Mäder M** (1992) Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. En: *Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects.*, Penel C, Gaspar T, Greppin H, eds, pp 37-46. Université de Genève Italy
- Madhaiyan M, Suresh Reddy BV, Anandham R, Senthilkumar M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Tongmin S** (2006) Plant growth-promoting methylobacterium induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Curr Microbiol* **53**: 270- 276
- Maeda K, Kimura S, Demura T, Takeda J, Ozeki Y** (2005) DcMYB1 acts as a transcriptional activator of the carrot phenylalanine ammonia-lyase gene (*DcPAL1*) in response to elicitor treatment, UV-B irradiation and the dilution effect. *Plant Mol Biol* **59**: 739-752
- Mahalingam R, Gómez-Buitrago AM, Eckardt N, Shah N, Guevara-García A, Day P, Raina R, Fedoroff NV** (2003) Characterizing the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. *Genome Biol* **4**: R20
- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb CJ** (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7802-7806
- Malinen E, Kassinen A, Rinttila T, Palva A** (2003) Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* **149**: 269-277

- MAPA 2003.** Anuario de estadística agroalimentaria 2002. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid
- Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Strauss DS** (1994) Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB J* **8**: 538-544
- Martin RR, James D, Levesque CA** (2000) Impact of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu Rev Phytopathol* **38**: 207-239
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**: 203–212
- Maurino VG, Esther Grube E, Zielinski J, Schild A, Fischer K, Ulf-Ingo Flügge U** (2006) Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase–ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**:1381-1393
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cell. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8271-8276
- McDougall GJ** (1992) Changes in cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry* **31**: 3385-3389
- McDowell JM, Woffendem BJ** (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotech* **21**: 178-183

- McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW** (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarization, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J* **17**: 523-534
- Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Champbell CA, Robbins MJ, Pangalos MN** (2000) The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* **98**: 9-20
- Melo NS, Larsen E, Welinder KG, Fevereiro PS** (1997) Characterization of two major cationic peroxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. *Plant Sci* **122**: 1-10
- Melouk HA, Horner CE** (1976) Recovery of *Verticillium dahliae* pathogenic to mints from castings of earthworms. *Proc Am Phytopathol Soc* **3**: 265
- Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Parrilla-Araujo S, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz** (2003) Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiol Mol Plant Pathol* **63**: 91-105
- Mitchell DI, Cowan AK** (2003) Mevastatin-induced inhibition of cell growth in avocado suspension cultures and reversal by isoprenoid compounds. *Afr J Biotechnol* **2**: 264-270
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mohan R, Bajar AM, Kolattukudy PE** (1993) Induction of a tomato anionic peroxidase gene (tap 1) by wounding in transgenic tobacco and activation of tap1/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol Biol* **12**: 341-354

- Mole S, Waterman PG** (1987a) A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia* **72**: 137-147
- Mole S, Waterman PG** (1987b) A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia* **72**: 148-156
- Mountain WB, Mckeen CD** (1960) Increase in the incidence of *Verticillium* wilt of eggplant in the presence of *Pratylenchus penetrans*. *Phytopathology* **50**: 647
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Murphy TM** (1990) Effect of broad-band ultraviolet and visible radiation on hydrogen peroxide formation by cultured rose cells. *Physiol Plant* **80**: 63-68
- Murphy TM, Hamilton C, Street HE** (1979) A strain of *Rosa damascene* cultured cells resistant to ultraviolet light. *Plant Physiol* **64**: 936-941
- Nazar RN, Hu X, Schmidt J, Culham D, Robb J** (1991) Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol* **39**: 1-11
- Nelson R** (1950) *Verticillium* wilt of peppermint. *Mich Agric Stat Tech Bull* **221**: 1-260
- Nicholson RL, Hammerschmidt R** (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **30**: 369-389
- Noctor G, Foyer C** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279

- Norusis MJ, SPSS Inc** (1990) SPSS advanced statistics user's guide. SSPS Inc, Chicago, IL, USA
- Novo M** (2004) Estrudio de la virulencia de distintos aislados de *Verticillium dahliae* Kleb y respuesta de plantas de *Capsicum annum* L. var *annum* ante la infección. Tesis doctoral. Universidad de La Coruña
- Novo M, Pomar F, Gayoso C, Merino F** (2006) Cellulase activity in isolates of *Verticillium dahliae* differing in aggressiveness. *Plant Dis* **90**: 155-160
- Nuez F, Gil Ortega R, Costa J** (1996) El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Ed. Mundi Prensa, Madrid
- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K** (1997) Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol* **38**: 1118–1126
- Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179–191
- Osakabe K, Koyama H, Kawai S, Katayama Y, Morohoshi N** (1994) Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus kitakammiensis*. *Plant Sci* **103**: 167-175
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chang VL** (1999) Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8955-8960

- Osakabe Y, Osakabe K, Kawai S, Katayama Y, Morohoshi N** (1995) Characterization of the structure and determination of mRNA levels of the phenylalanine ammonia-lyase gene family from *Populus kitakamiensis*. *Plant Mol Biol* **28**: 1133-1141
- Palazón C, Gil R, Palazón I** (1978) La "tristeza o seca del pimiento. Estado actual del problema. *ITEA* **32**: 56-62
- Palazón C, Palazón I** (1989) Estudios epidemiológicos sobre la "tristeza" del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro Bol San Veg Plagas **15**: 233-262
- Pallas JA, Paiva NL, Lamb CJ, Dixon RA** (1996) Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection to tobacco mosaic virus. *Plant J* **10**:281-293
- Palloix A, Pochard E, Phaly P, Daubèze AM** (1990) Recurrent selection for resistance to *Verticillium dahliae* in pepper. *Euphytica* **47**: 79-89
- Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, Dewar RL, Planta A** (2003) New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assays with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* **41**: 4531-4536
- Pan GX, Bolton JL, Leary GJ** (1998) Determination of ferulic and *p*-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. *J Agric Food Chem* **46**: 5283 -5288
- Paris N, Rogers SW, Jiang L, Kirsch T, Beepers L Phillips TE, Rogers JC** (1997) Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol* **115**: 29-39

- Park CI, Kim WG** (1986) Fungi detected in the seeds of vegetable crops imported from Japan. *Korean J Mycol* **14**: 89-91
- Park SY, Shivaji R, Krans JV, Luthe DS** (1996) Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. *Plant Physiol* **111**: 515-524
- Parker ML, Waldron KW** (1995) Texture of chinese water chestnut: involvement of cell wall phenolics. *J Sci Food Agric* **68**: 337-346
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Rep* **24**: 255-265
- Pegg GF** (1974) *Verticillium* diseases. *Rev Plant Pathol* **53**: 157-182
- Pegg GF** (1985) Life in a black hole: the micro-environment of the vascular pathogen. *Trans Br Mycol Soc* **85**: 1-20
- Pegg GF, Brady BL** (2002) *Verticillium* wilts. CABI Publishing. UK
- Peng M, Kuc J** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* **82**: 696-699
- Peskan T, Pedreño MA, Krsnik-Rasol M, Muñoz R** (1997) Subcellular localisation and polymorphism of peroxidase in horseradish tumour and teratoma tissue. *Biol Plant* **39**: 575-582
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **9**: 29-45
- Platt HW, Mahuku GS, Maxwell P, MacLean V** (2000) Detection techniques for research on *Verticillium* species in potato soils. En: *Advances in Verticillium research and disease management*. Tjamos EC, Rowe RC, Heale JB, Fravel DR, eds, pp 140-143. APS Press, Saint Paul, MN, USA
- Polle A, Otter T, Seifert F** (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.) *Plant Physiol* **106**: 53-60

- Pomar F, Bernal MA, Collar J, Díaz J, Caramelo C, Gayoso C, Novo M, Prego C, Saavedra A, Silvar C, Merino F** (2001) A survey of "tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. *Capsicum & Eggplant News* **20**: 90-93
- Pomar F, Merino F, Ros Barceló A** (2002) O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* **220**: 17-28
- Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F, Ros Barceló A** (2004) Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytol* **163**: 111-123
- Popushoi IS, Kulik MF** (1976) Apricot wilt. *Zashchista Rastenii* **7**: 95-104
- Powelson RL** (1970) Significance of population level of *Verticillium* in soil. En: Root diseases and soil-borne pathogens. Second International symposium on factors determining the behavior of plant pathogens in soil. Tousson TA, Bega RV, Nelson PE, eds, pp. 31-33. Imperial College, London. University of California Press, Berkely, California
- Qi M, Yang Y** (2002) Quantification of *Magnaporthe grisea* during infection of rice plants using real-time polymerase chain reaction and Northern blot/phosphoimaging analyses. *Phytopathology* **92**: 870-876.
- Qu ZL, Wang HY, Xia GX** (2005) *GbHb1*: a nonsymbiotic hemoglobin gene of cotton responsive to infection by *Verticillium dahliae*. *Biochim Biophys Acta* **1730**: 103-113
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H, Valpuesta V** (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* **122**: 1119-1127

- Ralph J, Hatfield RD, Quideae S, Helm RF, Grabber JH, Jung HJG** (1994) Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J Am Chem Soc* **116**: 9448-9456
- Rasmussen RP** (2001) Quantification on the LightCycler. En: Rapid cycler real-time PCR, Methods and Applications. Meuer S, Wittwer CT, Nakagawara K, eds, pp 21-34. Springer Press, Heidelberg Germany
- Razdan MK** (1993) An Introduction to Plant Tissue Cultura. Intercept. CABI publishing, Andover, Hampshire, UK
- Renew S, Heyno E, Schopfer P, Liskay A** (2005) Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and *Arabidopsis* seedlings by spin trapping electron paramagnetic spectroscopy. *Plant J* **44**: 342-347
- Resende MLV, Flood J, Cooper YRM** (1995) Effect of method of inoculation, inoculum density and seedling age at inoculation on the expression of resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Pathol* **44**: 374-383
- Ride JP** (1983) Cell walls and other structure barriers in defense. En: Biochemical Plant Pathology. Callow JA, eds, pp 215-236. John Wiley & Sons Ltd, Chichester UK
- Ron M, Avni A** (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**: 1604-1615
- Ros Barceló A** (2005) Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* **220**: 747-756
- Ros Barceló A, Morales M Pedreño MA** (1997) Lignin and Lignan Biosynthesis. Lewis NG, Sarkanen S, eds, ACS Symp. Series Am Chem Soc. Washington, DC

- Ros Barceló A, Pomar F** (2001) Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Z. elegans* hypocotyls. *Phytochemistry (Plant Cell Wall Biopolymers – Special Issue)* **57**: 1105-1113
- Ros Barceló A, Pomar F, Pedreño MA** (2000) Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Z. elegans* xylem. *Aust J Plant Phys* **27**: 1101-1107
- Rozen S, Skaletsky HJ** (2000) Primer-3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Krawetz S, Misener S, eds, pp 365-386 Humana Press, Totowa, NJ, USA
- Russell WR, Forrester AR, Chesson A, Burkitt MJ** (1996) Oxidative coupling during lignin polymerisation is determined by unpaired electron delocalisation within parent phenylpropanoid radicals. *Arch Biochem Biophys* **332**:357-366
- Ryan CA** (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* **1477**:112–121
- Saavedra AM, Díaz J, Merino F** (2003) Virulence of different isolates causing *Verticillium* wilt of pepper in the Padron region. *Spanish J Agric Res* **1**: 53-57
- Sackston WE** (1980) Some factors influencing infection of sunflower seed by *Verticillium dahliae*. *Can J Plant Pathol* **2**: 209-212
- Sackston WE** (1983) Sunflower diseases, with special reference to tropical and sub-tropical areas. Garcia de Orta, *Estudios Agronómicos* **10**: 105-112
- Sadras VO, Quiroz F, Echarte L, Escande A, Pereyra VR** (2000) Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. *Ann Bot* **86**:1007-1015

- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R** (2004) Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* **16**: 616-628
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the *gp91phox* NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**: 1281-1290
- Sagi M, Fluhr R** (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* **141**: 336-340
- Sakakibara A** (1980) A structural model of softwood lignin. *Wood Sci Technol* **14**: 89-100
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York
- Sarma AD, Sreelakshimi Y, Sharma R** (1998) Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry* **49**: 2233-2243
- Sato Y, Sugiyama M, Komamine A, Fukuda H** (1995) Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultures *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta* **196**: 141-147
- Schäfer W** (1994) Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 461-477
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW** (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* **258**: 194-204

- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lamport DTA** (1996) Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* **9**: 477-489
- Schnathorst WC** (1981) Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. En: Fungal wilt diseases of plants. Mace ME, Bell AA, Beckman CH, eds, pp 81-111. Academic Press, New York USA
- Sewalt V, Glasser WG, Beauchemin KA** (1997) Lignin impact on fiber degradation 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. *J Agric Food Chem* **45**: 1823-1828
- Shadle GL, Wesley SV, Korth KL, Chen F, Lamb C, Dixon RA** (2003) Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* **64**: 153-61
- Shena L, Nigro F, Ipolito A, Gallitelli D** (2004) Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Europ J Plant Pathol* **110**: 893-908
- Sheppard JW, Needham SN** (1980) *Verticillium* wilt of alfalfa in Canada: occurrence of seed-borne inoculum. *Can J Plant Pathol* **2**: 159-162
- Silvar C, Díaz J, Merino F** (2005a) Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. *Phytopathology* **95**: 1423-1429
- Silvar C, Duncan JM, Cooke DEL, Williams NA, Díaz J, Merino F** (2005b) Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *Eur J Plant Pathol* **112**: 43-52
- Singleton VL, Rossi JA** (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* **16**: 144-158

- Smit F, Dubery IA** (1997) Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry* **44**: 811-815
- Smith AF** (1994) The tomato in America : early history, culture, and cookery. University of South Carolina Press, Columbia, S.C, USA
- Smith CG, Rodgers MW, Zimmerlin A, Fernandino D, Bolwell GP** (1994) Tissue and subcellular immunolocalization of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Planta* **192**: 155-164
- Snyder WC, Wilhelm S** (1962) Seed transmission of *Verticillium* wilt of spinach. *Phytopathology* **52**: 365
- Steinitz B, Küsek M, Tabib Y, Paran I, Zelcer A** (2003) Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cellular Devel Biol Plant* **39**: 296-303
- Stoessl A** (1983) Secondary plant metabolites in preinfectious and postinfectious resistance. En: The dynamics of host defense. Bailey JA, Deverall BJ, eds, pp 71-122. Academic Press, London, UK
- Sutherlaine MW** (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* **39**: 79-93
- Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE, Staskawicz BJ** (1999) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14153-14158
- Tanaka Y, Matsuoka M, Yamamoto N, Ohashi Y, Kano-Murakami Y, Ozeki Y** (1989) Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant Physiol* **90**: 1403-1407

- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4158-4163
- Theillin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennem G, Grisar T, Igout A, Heinen E** (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**: 291-295
- Thomma BPHJ, Penninckx IAMA, Broekaert WF, Cammue BPA** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* **13**: 63-68
- Thomma BPHJ, Van Esse HP, Crous PW, De Wit PJGM** (2005) *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Mol Plant Pathol* **6**: 379-393.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG** (1997) The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Acid Nucleic Res* **24**: 4876-4882
- Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW** (2003) Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* **31**: 121
- Tjamos EC, Tsougriani H** (1990) Formation of *Verticillium dahliae* microsclerotia in partially disintegrated leaves on *Verticillium* affected olive trees. *Proceedings of the Fifth International Verticillium Symposium*. Leningrad, p. 20
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P** (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**: 129-138
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (2002) *Arabidopsis gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 517-522

- Van de Graaf P, Lees AK, Cullen DW, Duncan JM** (2003) Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissues samples using real-time PCR. *Eur J Plant Pathol* **151**: 577-583
- Van der Spek J** (1973) Seed transmission of *Verticillium dahliae*. 25th International Symposium on Phytopharmacy and Phytiatry. 8th May, 1973. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent* **38**: 1427-1434
- Van Huystee RB, Tam ASK** (1988) Peptides released by cultured peanut cells during growth. *J Plant Physiol* **133**: 645-647
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT** (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **25**: 363-379
- Vandenabeele S, Van der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M, Inzé D, Van Breusegem F** (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 16113-16118
- Vandermark GJ, Baker BM** (2003) Quantifying *Phytophthora medicans* in susceptible and resistant alfalfa with a real-time fluorescent PCR. *J Phytopathol* **151**: 577-583
- Veena, Jiang H, Doerge RW, Gelvin SB** (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J* **35**: 219-236
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW** (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-487
- Volossiuk T, Robb EJ, Nazar RN** (1995) Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3972-3976

- Von Ahsen N, Schutz E, Armstrong VW, Oellerich M** (1999) Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* **45**: 649-696
- Von Roepenack-Lahaye E, Newman MA, Schornack S, Mammond-Kosack KE, Lahaye T, Jones JDG, Daniels MJ, Dow M** (2003) p-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogen. *J Biol Chem* **278**: 43373-43383
- Vranova E, Atichartpongkul S, Villarroel R, Van Montagu M, Inze D, Van Champ W** (2002) Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci USA* **99**: 10870-10875
- Vurro M, Ellis BE** (1997) Effecto of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar. *Plant Sci* **126**: 29-38
- Wang D, Luthe DS** (2003) Heat sensitivity in a bentgrass variant failure to accumulate a chloroplast heat shock protein isoform implicated in heat tolerance. *Plant Physiol* **133**: 319-327
- Wang T, Brown MJ** (1999) mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal Biochem* **269**: 189-201
- Wilhelm, S** (1950) Vertical distribution of *Verticillium albo-atrum* in soils. *Phytopathology* **40**: 368-376
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816

- Winer J, Jung CK, Shakel I, Williams PM** (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**: 41-49
- Winicov I, Bastola DR** (1999) Transgenic overexpression of the transcription factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol* **120**: 473-480
- Winton LM, Stone JK, Watrud L, Hansen EM** (2002) Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* **92**: 112-116
- Wolff SP** (1994) Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* **233**: 182-189
- Woodward S** (1992) Responses of gymnosperm bark tissues to fungal infections. En: Defense mechanisms of woody plant against fungi. Blanchette RA, Biggs AR, eds, pp: 62-75. Springer, Berlin Heidelberg, New York USA
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Leon J, Fitzsimmons KC, Levine EB, Raskin I, Shah DM** (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol* **115**: 427-435
- Yamamoto N, Tsugane T, Watanabe M, Yano K, Maeda F, Kuwata Ch, Torki M, Ban Y, Nishimura S, Shibata D** (2005) Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Ton and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene* **356**: 127-134
- Zhang J, Snyder SH** (1992) Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9382-9385

Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol* **134**: 849-857

Zimmerlin A, Wojtaszek P, Bolwell GP (1994) Synthesis of dehydrogenation polymers of ferulic acid with high specificity by a purified cell-wall peroxidase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biochem J* **299**: 747-753



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA
ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E
ECOLOGÍA
ÁREA DE FISIOLOXÍA VEXETAL