



Análisis de la señalización mediada por la pared celular y el estrés oxidativo en la interacción planta-patógeno



Trabajo realizado por Jaime López Cruz en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València y en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, Octubre de 2017.



CARMEN GONZÁLEZ BOSCH, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia

CERTIFICA que la presente Tesis Doctoral titulada “Análisis de la señalización mediada por la pared celular y el estrés oxidativo en la interacción planta-patógeno” ha sido realizada por el Licenciado en Biología, Jaime López Cruz, bajo mi dirección en mi laboratorio del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, situado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) y que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en el programa de Biomedicina y Biotecnología por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Paterna (Valencia), a 16 de Octubre de 2017.

Fdo: Carmen González Bosch



The twelve keys of Basil Valentine, 1599.

“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía” Frankenstein. Mary Shelley

Agradecimientos

Hace unos años, dirigiéndome hacia una clase en la Facultad de Biología observé varios carteles pegados en las puertas de los dos edificios de Biológicas, pero uno situado en un acceso de la ya extinta aula 300 me llamó la atención. En dicho cartel se anunciaba la posibilidad de colaborar en varios laboratorios del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, con el fin de ampliar los conocimientos de los estudiantes. Después de pensarlo unos días, me puse en contacto con la Dra. Carmen González Bosch por interesarme su grupo de investigación y me citó en su despacho del laboratorio 304 del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Tras una distendida conversación y una visita guiada al laboratorio y presentaciones varias, no tenía muy claro qué podía aportar yo a este laboratorio, sin embargo, un par de días después me atreví a embarcarme en esta aventura con la que llevo ya muchos años, primero como estudiante colaborador y de Máster y luego como personal investigador. Quiero darle las gracias a la Dra. Carmen González Bosch por haberme dado la oportunidad de estar en este laboratorio, que ya es como mi segunda casa, donde he aprendido muchas técnicas (y lo que queda por aprender), un lugar donde he crecido como persona y como profesional. Me has enseñado a tener una mente más abierta y positiva, a pesar de las dificultades. Gracias por confiar en mí para desarrollar diversos trabajos que han dado lugar a resultados y publicaciones interesantes, tus consejos han sido muy valiosos. Solo puedo decirte gracias, gracias y gracias.

No me puedo olvidar de Mariola y de Ivan (Spaghetti), que han sido como hermanos para mí. Mariola, alias “Tomato wars”, me has enseñado tantas cosas y tu humor andaluz ha sido fundamental para mantener la alegría en este laboratorio. Ivan, tú también me has enseñado muchas cosas y truquillos de laboratorio, tu humor italiano, a ser perseverante cuando alguna cepa crecía cuando le daba la gana, o cuando las cosas eran difíciles. Solo puedo decirte gracias a los dos y, aunque no estais desde hace tiempo en el laboratorio y se os echa en falta, siempre habéis estado presentes.

También quiero darle las gracias a Carlos, un gran compañero y amigo. Hemos compartido tantas cosas en este laboratorio.... ¿Quién nos iba a decir que íbamos a terminar haciendo un doctorado? ¡También se te echa de menos!

A Emma, de la Universidad Jaume I de Castellón, por ayudarme con las muestras de hormonas y de calosa ¡qué haríamos sin ti! Gracias por todo.

A Pepe del servicio de microscopia, que nos ha ayudado y aconsejado en todo momento y por habernos conseguido un filtro de calosa, tu ayuda ha sido inestimable, muchas gracias por todo.

Que puedo decir de Oscar, nuestro adorable “Troll Face”. ¡Anda que no cuetas de criar, tio!, eres un amigo y un gran compañero, una persona brillante, aunque a veces he tenido que ejercer de hermano mayor.... Cuantas risas nos hemos pegado en el laboratorio, nos hemos ayudado siempre y eso no tiene precio. ¿Te acuerdas de esas tardes en las que hacíamos el tonto emulando el programa “El mundo de Beakman” con nuestros experimentos locos? El ambiente que hemos creado en el laboratorio tu y yo ha permitido que los estudiantes que han venido se lo hayan pasado genial y hayan aprendido mucho y tú tienes mucha “culpa” de eso. No creo que exista en el mundo un laboratorio como el 304, donde el ambiente ha sido maravilloso y con gente con una calidad humana extraordinaria con la que he podido compartir momentos especiales.

Tampoco me puedo olvidar de nuestros queridos estudiantes Alejo (nuestro xiquet de Ayora), Paula y Mónica, que nos han enseñado también, nos hemos reído y nos han aguantado. Vuestra presencia ha sido clave para mantener el dinamismo de este laboratorio. ¡Gracias por existir!

Quiero dar las gracias especialmente a mi familia, a quien dedico este trabajo. Sin vuestro apoyo incondicional no hubiera podido continuar. El camino es largo, pero con vosotros a mi lado nunca será difícil continuar y nunca podré terminar de daros las gracias. Mamá, donde quiera que estés, siempre estarás conmigo, siempre presente todos los días de mi vida. Tampoco me olvido de mi sobrino Álvaro, ¡la alegría de la casa! Y como no, tengo que dar las gracias a mis plantitas de Arabidopsis y de tomate, así como a las cepas de *Pseudomonas* y de *Botrytis*, que sin ellos no hubiera podido hacer este trabajo, a pesar de que me han dado la lata en algunos momentos.

En fin, la vida da muchas vueltas y seguro que algunos nos encontramos en algún punto del camino, ¡gracias a todos!

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
• La interacción planta-patógeno.....	1
• Los patógenos de las plantas.....	1
• <i>Pseudomonas syringae</i> . Descripción.....	3
• <i>Botrytis cinerea</i> . Descripción.....	6
• Mecanismos constitutivos e inducibles de las plantas.....	11
• El reconocimiento del patógeno.....	11
• La respuesta temprana de la planta frente a patógenos.....	15
• Producción del estallido oxidativo y mantenimiento del balance redox en la planta.....	17
• Participación del patógeno en el estrés oxidativo.....	22
• La señalización hormonal en las respuestas de las plantas.....	25
• Respuestas de defensa de la planta mediadas por metabolitos secundarios y proteínas PR.....	35
• La respuesta sistémica inducida.....	37
• Respuestas de las plantas mediante inductores.....	39
• El papel de la pared celular en la interacción planta-patógeno.....	40
OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
• Genotipos y cultivo de plantas.....	53
• Microorganismos.....	54
• Infecciones en planta: <i>P. syringae</i> y <i>B. cinerea</i>	54
• Análisis de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en planta.....	56
• Análisis de la acumulación de ROS en micelio fresco y en hifas de <i>B. cinerea</i> ...	57
• Análisis de la deposición de calosa.....	59
• Aplicación de agentes antioxidantes en el inóculo de <i>B. cinerea</i>	59

• Análisis de la acumulación de hormonas y metabolitos secundarios.....	60
• Análisis de la expresión génica por RT-qPCR.....	60
• Análisis estadísticos.....	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
• CAPÍTULO I: Análisis funcional de la endo-1,4- β -glucanasa Korrigan 1 en la interacción <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>P. syringae</i>	65
• CAPÍTULO II: Estudio del papel del estrés oxidativo en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>S. lycopersicum</i> cv. Ailsa Craig en ausencia de la superóxido dismutasa de Cu-Zn BCSOD de <i>B. cinerea</i> (BcSOD1).....	83
• CAPÍTULO III: Estudio del papel del estrés oxidativo en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>S. lycopersicum</i> cv. Ailsa Craig en ausencia de las diferentes subunidades del complejo NADPH oxidasa (Nox) de <i>B. cinerea</i>	109
CONCLUSIONES.....	135
RESUMEN.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXOS.....	179

Índice de figuras y tablas

Figura I. Imágenes representativas de la morfología de <i>P. syringae</i> y las lesiones que produce en plantas.....	3
Figura II. Imágenes representativas de la morfología de <i>B. cinerea</i> y las lesiones que produce en plantas.....	6
Figura III. Esquema del ciclo biológico de <i>B. cinerea</i>	7
Figura IV. Esquema ilustrativo del modelo de Zig-zag con las respuestas de las plantas frente a insectos, herbívoros y patógenos.....	14
Figura V. Esquema ilustrativo de los efectos de los diferentes niveles de ROS en la regulación de procesos celulares.....	19
Figura VI. Esquema representativo de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), Ascorbato-Glutatión peroxidasa (APX/GPX) y catalasa (CAT) en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en planta.....	20
Figura VII. Esquema representativo de la localización de los diferentes componentes del complejo superóxido dismutasa (SOD) en células vegetales.....	21
Figura VIII. Esquema de la producción ROS en la interacción planta-hongo necrótrofo.....	23
Figura IX. Modelo esquemático comparativo entre el complejo NOX2 de mamíferos y el complejo Nox de hongos.....	24
Figura X. Modelo esquemático de la localización del complejo NOX en <i>B. cinerea</i>	24
Figura XI. Modelos de la implicación hormonal en la interacción planta-patógeno.....	26
Figura XII. Modelo esquemático de las respuestas inducidas por la planta tras la percepción de patógenos, daño o elicitores químicos y su relación con el sistema inmune de la planta.....	39
Figura XIII. Esquema representativo de la organización de los diferentes componentes de la pared celular vegetal.....	41
Figura 1 (A-B). Evaluación del fenotipo y crecimiento bacteriano en plantas de <i>A. thaliana</i> Ws y <i>kor1-1</i> infectadas con <i>Pst</i>	70
Figura 2 (A-E). Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de <i>A. thaliana</i> Ws y <i>kor1-1</i> infectadas con <i>Pst</i>	72
Figura 3 (A-F). Expresión relativa de los genes <i>LOX3</i> , <i>PDF1.2</i> , <i>VSP1</i> , <i>ACC</i> , <i>ICS1</i> y <i>PR1</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> Ws y <i>kor1-1</i> infectadas con <i>Pst</i> a las 6 y 20 hpi.....	73

Figura 4 (A-B). Acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plantas de <i>A. thaliana</i> Ws y <i>kor1-1</i> control e infectadas con <i>Pst</i>	74
Figura 5 (A-B). Deposición de calosa en plantas de <i>A. thaliana</i> Ws y <i>kor1-1</i> control e infectadas con <i>Pst</i> 24 hpi.....	75
Figura 6. Crecimiento bacteriano en plantas de <i>A. thaliana</i> Ws y <i>kor1-1</i> infectadas con <i>Pst</i> y <i>cmaA</i> (Cor-) 72 hpi.....	76
Figura 7 (A-D). Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de <i>A. thaliana</i> Ws y <i>kor1-1</i> infectadas con el mutante <i>cmaA</i> (Cor-).....	77
Figura 8. Modelo explicativo de la implicación de la EG KOR1 en la interacción planta-patógeno.....	81
Figura 9 (A-D). Fenotipo de infección en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (cepa WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	88
Figura 10 (A-F). Acumulación de H_2O_2 y O_2^- en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	90
Figura 11 (A-B). Presencia de H_2O_2 y de O_2^- en <i>B. cinerea in vitro</i>	91
Figura 12 (A-B). Influencia de los antioxidantes ácido ascórbico (AA) y ditiotreitól (DTT) en plantas de <i>Arabidopsis</i> inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	92
Figura 13 (A-C). Acumulación de H_2O_2 y de O_2^- a 72 hpi en presencia de AA en plantas de <i>Arabidopsis</i> inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	93
Figura 14 (A-D). Deposición de calosa y expresión relativa de <i>PMR4</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	94
Figura 15 (A-D). Deposición de calosa y expresión relativa de <i>PMR4</i> en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	95
Figura 16 (A-G). Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	97
Figura 17 (A-G). Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	98
Figura 18 (A-J). Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	99
Figura 19 (A-H). Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de <i>B. cinerea</i>	100

Figura 20 (A-B). Plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	114
Figura 21 (A-B). Deposición de calosa en plantas de Arabidopsis y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	116
Figura 22 (A-B). Expresión del gen <i>PMR4</i> y <i>PR2</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> N700000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	117
Figura 23. Deposición de calosa a 48-72 hpi en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 inoculadas con B05.10 (WT) y el mutante $\Delta bcnoxB$ de <i>B. cinerea</i>	118
Figura 24 (A-B). Expresión del gen <i>PMR4</i> y <i>PR2</i> en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	119
Figura 25 (A-I). Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	120
Figura 26 (A-G). Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	123
Figura 27 (A-D). Acumulación de H_2O_2 y de O_2^- en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	124
Figura 28 (A-B). Influencia del antioxidante ácido ascórbico (AA) en el fenotipo de infección en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	125
Figura 29 (A-B). Influencia del AA en la deposición de calosa en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i>	126
Figura 30 (A-D). Influencia del AA en la acumulación de H_2O_2 y de O_2^- en plantas de <i>A. thaliana</i> N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de <i>B. cinerea</i> a 72 hpi.....	127
Tabla 1. Secuencia de los oligos usados en esta Tesis para los análisis de genes por RT-qPCR.....	61
Tabla 2. Balance global de las respuestas en plantas de Arabidopsis y tomate frente a los mutantes $\Delta bcnox$ con respecto a la cepa B05.10 (WT).....	128

Índice de anexos

- Anexo 1.** Imágenes representativas del fenotipo de infección en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcno x$ de *B. cinerea* a diferentes tiempos..... **181**
- Anexo 2.** Plantas de Arabidopsis y de tomate inoculadas con los mutantes de complementación de los mutantes $\Delta bcno x$ y B05.10 de *B. cinerea* a 72 hpi..... **182**
- Anexo 3.** Acumulación de H_2O_2 y de O_2^- en plantas de Arabidopsis y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes de complementación $\Delta bcno x$ de *B. cinerea* 72 hpi..... **183**
- Anexo 4.** Influencia de los antioxidantes AA y DTT en plantas de Arabidopsis (izquierda) y de tomate (derecha) inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcno x$ de *B. cinerea*..... **184**

Algunas abreviaturas utilizadas en la redacción de esta Tesis:

Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato DC3000
HR	Respuesta hipersensible
ABA	Ácido abscísico
JA	Ácido jasmónico
SA	Ácido salicílico
ET	Etileno
OPDA	12-oxo-phytodienoic acid (ácido 12-oxo-fitodienoico)
hpi	Horas post-inoculación
PDA	Agar de caldo de patata dextrosado
EG	Endoglucanasa
ON	Óxido nítrico
SOD	Superóxido dismutasa
Nox	NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa
mM	Milimolar
DAB	3,3'-diaminobencidina
NBT	Nitroblue tetrazolium (Nitroazul de tetrazolio)
AA	Ácido ascórbico
DTT	Dithiotreitol (Ditiotreitol)
DPI	Diphenyleneiodonium (Difeniliodonio)

Introducción

INTRODUCCIÓN

La interacción planta-patógeno

Las plantas son susceptibles de sufrir diferentes tipos de estreses, tanto abióticos como bióticos. Centrándonos en este último tipo de estrés, las plantas pueden ser atacadas por bacterias, hongos, virus, amén de insectos y herbívoros. En esta situación, la planta presenta mecanismos de defensa eficientes y, en muchos casos, el éxito de la infección no culmina con la muerte de la planta.

Los microorganismos patógenos pueden ser virulentos (producen enfermedad) o avirulentos (no produce enfermedad). Podemos definir la virulencia como un grado de patogenicidad, es decir, la habilidad del patógeno para superar la resistencia del hospedador, pudiéndose establecer diferentes tipos de interacciones entre ellos. Se dice que una interacción es compatible cuando se da entre un patógeno virulento y un hospedador susceptible, mientras que una interacción incompatible se define como aquella en la que el hospedador es resistente y el patógeno avirulento (Collinge y col., 2001). También puede ocurrir que la interacción sea compatible, pero la planta no presente los síntomas de la enfermedad, a pesar de existir una infección en los tejidos de la misma. Esta situación se denomina tolerancia y se produce cuando la planta es capaz de limitar los procesos bioquímicos requeridos para el desarrollo de los síntomas.

Los patógenos de las plantas

Podemos definir como fitopatógeno a aquel organismo que para completar su ciclo vital necesita desarrollarse dentro de la planta, generando un estrés biótico que es perjudicial para la misma.

Muchos microorganismos completan su ciclo vital en la superficie de la hoja, pero los patógenos deben invadirla internamente para multiplicarse (Baker y col., 2010) a través de estomas y heridas, o por medio de enzimas líticas que libera el patógeno para degradar la pared celular de la planta (Agrios, 2005).

Al proceso de infección, colonización y reproducción del patógeno se le denomina patogénesis. En base al tipo de nutrición y crecimiento podemos clasificar a los patógenos en biótros, necrótros y hemibiótros.

Se consideran patógenos biótrofos aquellos que se caracterizan por realizar su función biológica manteniendo los tejidos del hospedador vivos. Además, son capaces de producir moléculas supresoras para eludir las respuestas defensivas de las plantas y, así, poder aprovechar sus nutrientes.

Los patógenos necrótrofos son aquellos que secretan enzimas y toxinas que degradan células vegetales y se alimentan de los nutrientes que se liberan durante el proceso necrótico (Colmenares y col., 2002).

La mayoría de los patógenos se pueden englobar dentro de la biotrofia o de la necrotrofia, en función de su ciclo celular. Como ejemplos de biótrofos podemos mencionar las bacterias del género *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, los hongos del género *Peronospora*, *Erysiphe* y *Microbotryum* y todos los virus vegetales, que precisan del metabolismo vegetal para su reproducción. Como ejemplos de necrotrofia podemos citar las bacterias del género *Erwinia* y *Ralstonia*, así como los hongos del género *Pythium*, *Alternaria*, *Leptosphaeria* y *Botrytis*, éste último objeto de estudio en esta Tesis.

Por otra parte, existen patógenos que se pueden comportar como biótrofos y necrótrofos, dependiendo de la fase en la que se encuentre su ciclo vital. Este tipo de patógenos se denominan hemibiótrofos. Un ejemplo es la bacteria *Pseudomonas syringae* (también objeto de estudio en esta Tesis), que en general se había considerado como biótrofa, pero actualmente se considera hemibiótrofa (Block y Alfano, 2011). Una vez que penetra en la planta y se multiplica en los espacios intercelulares, convive con el hospedador comportándose como un biótrofo en las fases iniciales, pero en un estado avanzado de la infección se comporta como un necrótrofo, produciendo clorosis y necrosis en la planta.

Pseudomonas syringae

Pseudomonas syringae es una bacteria gram-negativa aerobia con forma de bastón, que se moviliza utilizando un flagelo polar. Como se ha mencionado con anterioridad, se trata de una bacteria hemibiótrofa y actualmente están descritos cerca de 60 patovares, definidos por caracteres patogénicos (Baltrus y col., 2017). *Pseudomonas syringae* pv tomato (*Pst*) es el agente causal de lo que se conoce como “mancha bacteriana del tomate”, aunque es capaz de infectar otras variedades vegetales. Cuando infecta produce canchales, marchitez, manchas foliares, lesiones necróticas y clorosis, afectando hojas, tallos y frutos (Figura I). Después de saltar las barreras físicas y conseguir entrar en la planta, es capaz de multiplicarse en el espacio apoplástico, cuyo componente principal es la pared celular, rodeada por el fluido apoplástico que contiene metabolitos, proteínas e iones inorgánicos, que constituyen la principal fuente de nutrientes para este patógeno (Preston, 2017).

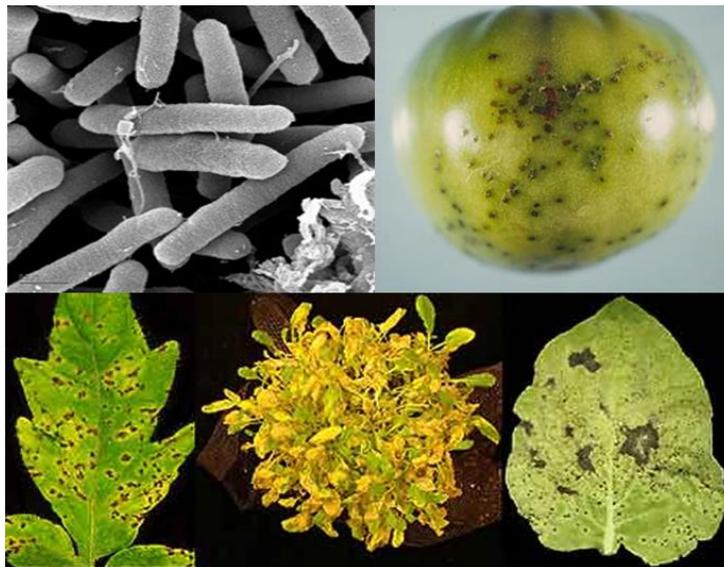


Figura I. Imágenes representativas de la morfología de *P. syringae* y las lesiones que produce en plantas infectadas.

Como se ha mencionado anteriormente, los hemibiótrofos mantienen vivos los tejidos del hospedador en los estadios iniciales de su ciclo vital. El ataque a los componentes esenciales de la inmunidad de la planta constituye una de las principales estrategias de *P. syringae* para llevar a cabo la infección. Durante la misma, se ven afectados diferentes procesos defensivos de la planta como la HR (Hypersensitive Response; respuesta

hipersensible) las rutas de señalización mediadas por el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA) y el ácido abscísico (ABA); las modificaciones de la pared celular y la expresión de genes de defensa (Abramovitch y Martin, 2004; Thilmony y col., 2006). *P. syringae* dispone de diversos mecanismos implicados en virulencia, como la secreción de enzimas degradadoras de pared celular o la producción de fitotoxinas. Los efectos de la producción de estas últimas son variados, alterando el metabolismo de lípidos y azúcares, la síntesis de proteínas y las rutas de señalización hormonal (Geng y col., 2014). Precisamente la acumulación de fitohormonas juega un papel importante en diversos procesos fisiológicos y celulares, incluyendo las respuestas de defensa de las plantas (Bari y Jones 2009; Katagiri y Tsuda 2010). *P. syringae* puede entrar en la planta a través de aberturas naturales o heridas y, una vez en el apoplasto, es capaz de liberar cerca de 30 efectores proteicos usando un sistema de secreción de tipo III (T3SS) que, junto con la fitotoxina coronatina, constituyen los mecanismos de virulencia más importantes de este patógeno (Velásquez y col., 2017). Los efectores proteicos secretados por el T3SS se denominan TTEs (Type three effectors; efectores de tipo III) y muchos de ellos actúan suprimiendo las defensas de las plantas, para favorecer la colonización de la bacteria. En cambio, otros efectores tendrían un papel en la adquisición de nutrientes y en el establecimiento de un ambiente favorable para la replicación de la bacteria (Macho y Zipfel, 2015; Rufián y col., 2016). El sistema de secreción de tipo III está codificado por los genes *HRP* y *HRC*, y es necesario para disparar la HR en plantas que no son huésped y para la patogénesis en sus huéspedes (Alfano y Collmer, 1996). En general, los efectores contribuyen a la virulencia combatiendo las defensas de la planta y controlando la muerte celular, asociada con los síntomas característicos de esta enfermedad.

El otro mecanismo de virulencia importante, mencionado previamente, es la producción de la fitotoxina coronatina, que actúa como análogo estructural del JA. Es producida por diversos patovares de *P. syringae* como *alisalensis*, *atropurpurea*, *maculicola*, entre otros (Brooks y col., 2004; Geng y col., 2014), siendo una toxina no específica de huésped. Su función es inducir una cascada de señales dependientes de JA, activando la respuesta a herida, a insectos herbívoros y a necrótrofos. Clásicamente se ha considerado que el JA es un inhibidor de la ruta del SA, por lo que la coronatina contribuye a la manipulación de la maquinaria defensiva de la planta impidiendo el

cierre estomático y así facilitar la entrada de la bacteria, promoviendo su crecimiento, además de contribuir a los síntomas de clorosis de la planta (Tsai y col., 2011; Geng y col., 2014). El ABA también juega un papel importante en la patogénesis de *P. syringae*, ya que una activación temprana de esta ruta facilita la inhibición de la ruta del SA y las respuestas de defensa asociadas, como la muerte celular y la liberación de compuestos antimicrobianos (de Torres y col., 2009).

Un paso crítico para el inicio de la infección por parte de la bacteria es su capacidad para entrar en espacios intercelulares. Los estomas de la planta son aberturas naturales que puede aprovechar el patógeno para entrar y su cierre es una estrategia importante en la planta para evitar la invasión. La coronatina parece tener un papel en la regulación del cierre estomático inhibiendo el efecto del ABA, promoviendo así la apertura de los estomas para facilitar la entrada de la bacteria (Melotto y col., 2006).

Para que se establezca una población bacteriana competente para colonizar el tejido de la planta es fundamental la supervivencia de la bacteria en el apoplasto. Como se ha mencionado antes, este espacio contiene metabolitos, proteínas e iones que puede utilizar la bacteria para nutrirse, pero además existen sustancias antimicrobianas capaces de inhibir su crecimiento, como las fitoalexinas, que juegan un papel importante en la protección de la planta frente a patógenos (Dixon y col., 2001). *Pseudomonas* ha desarrollado estrategias para contrarrestar el efecto de estas sustancias antimicrobianas, como las bombas de extrusión y algunos mecanismos específicos de resistencia (Alvarez-Ortega y col., 2013).

Por lo tanto, la capacidad de manipulación y modulación de los mecanismos de defensa de las plantas por parte de la bacteria son necesarias para su patogenicidad, lo que ha suscitado un gran interés a lo largo de los años.

Botrytis cinerea

Botrytis cinerea es un hongo necrótrofo patógeno de plantas muy común en la naturaleza. Pertenece al filum *Ascomycota*, clase *Leotiomycetes*, orden *Helotiales* y familia *Sclerotiniaceae*. Es capaz de infectar más de 200 especies vegetales, causando un gran daño económico en la producción y almacenamiento de los cultivos. La amplia variedad de síntomas en los diferentes tejidos de la planta sugiere que *B. cinerea* posee un amplio abanico de estrategias para invadir a su hospedador (Zhang y van Kan, 2013). Es el agente causal de un moho grisáceo llamado “podredumbre gris”, una enfermedad muy común en el mundo agrícola, que conlleva enormes pérdidas económicas (Figura II).



Figura II. Imágenes representativas de la morfología de *B. cinerea* y las lesiones que produce en plantas infectadas.

Este hongo presenta tanto fase sexual como asexual. En la fase sexual se le conoce como *Botryotinia fuckeliana* y produce ascosporas como medio de propagación, que son unas estructuras originadas por meiosis en el interior de las hifas. En la fase asexual se le conoce como *Botrytis cinerea* y su replicación tiene lugar mediante la liberación de conidiosporas (Figura III).

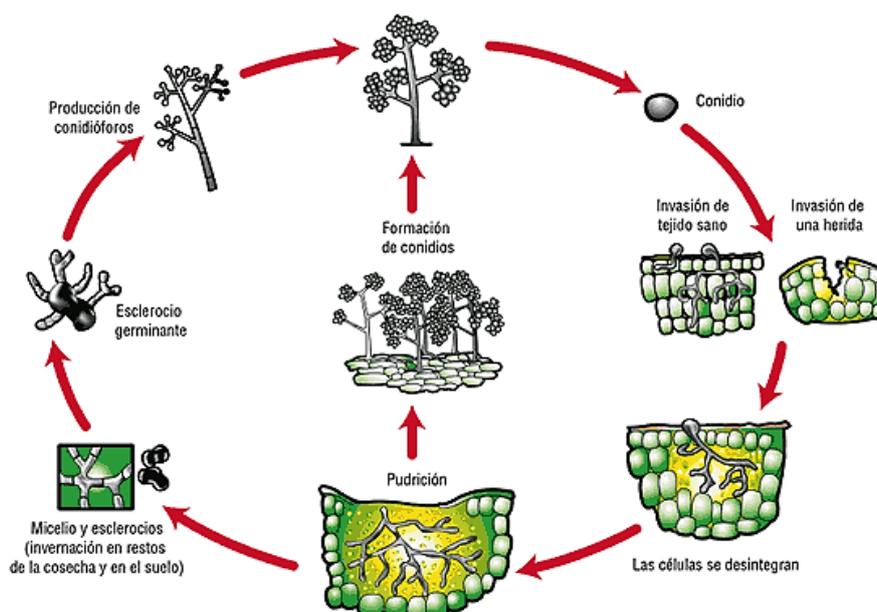


Figura III. Esquema del ciclo biológico de *B. cinerea*. Esquema de los diferentes estados de desarrollo durante la infección de *B. cinerea* en plantas. Figura modificada y adaptada de Agrios, 2005.

Los conidios son esporas asexuales especializadas que se liberan a través de los conidióforos (una estructura que se localiza en el extremo de las hifas) y que pueden ser dispersadas por el viento. Una vez que las esporas llegan a la superficie del hospedador comienza el ciclo infeccioso. Éste consta de las siguientes fases: adhesión y germinación; penetración en el tejido del hospedador; formación de la lesión primaria; expansión y producción de una nueva generación de esporas.

Cuando las esporas se depositan en la superficie de la hoja deben penetrar la capa superficial de la misma, que está cubierta de ceras y cutina. Las esporas germinan y desarrollan el apresorio, una estructura que se diferencia cuando el patógeno se halla sobre la superficie del tejido vegetal para formar una especie de estaca, pie o gancho penetrador, que perfora la cutícula.

El mecanismo de penetración del apresorio en *B. cinerea* no está del todo claro. En otros hongos necrótrofos como *Magnaporthe grisea*, agente causante de la piricularia, el mecanismo consiste en ejercer una presión mecánica sobre el tejido del huésped, que se desarrolla gracias a la elevada presión osmótica generada en el apresorio, como consecuencia de la acumulación de glicerol (de Jong y col., 1997). Probablemente este mecanismo no es el utilizado por *B. cinerea*, ya que no existe un septo o membrana que

separe el apresorio del tubo germinativo, que sería necesario para mantener los altos niveles de presión osmótica en esta estructura. Las esporas germinadas de *B. cinerea* contienen melanina (Doss y col., 2003), aunque no se alcanzan las concentraciones necesarias para crear una presión osmótica suficiente, como ocurre en *M. grisea*. A pesar de todo, la estructura que genera *B. cinerea* sobre la superficie foliar se sigue considerando un apresorio, porque la penetración requiere una proteína asociada a la membrana, BcPLS1 (Gourgues y col., 2004; Siegmund y col., 2013), que es homóloga de una proteína esencial para la penetración en *M. grisea* (Clergeot y col., 2001). Probablemente el apresorio de *B. cinerea* secreta enzimas que degraden la pared de la superficie foliar, es decir, cutinasas y lipasas. La secuencia del genoma de *B. cinerea* parece contener, al menos, seis cutinasas y una docena de lipasas (Williamson y col., 2007; Amselem y col., 2011). Una vez perforada la cutícula, la estructura de penetración crece en la pared anticlinal de la célula epidérmica subyacente. Esta pared es rica en pectinas, celulosas y hemicelulosas, por lo que esta fase de invasión necesita la acción de pectinasas, pectin metilesterasas, celulasas y hemicelulasas (Kars y col., 2005). Una vez que *B. cinerea* ha entrado en la planta, posee diversas herramientas para provocar la muerte celular del tejido vegetal, como por ejemplo la producción de compuestos con actividad fitotóxica, la inducción del estallido oxidativo, la producción de óxido nítrico (ON) y de ácido oxálico (AO). Entre los compuestos fitotóxicos producidos por *B. cinerea* destaca el botcinólido, una lactona altamente sustituida (Tani y col., 2006) y el botridial, un sesquiterpeno bicíclico (Colmenares y col., 2002), que parece estar relacionado con la activación de la muerte celular programada (Rossi y col., 2011). La delección de uno de los genes de la ruta biosintética del botridial provocó una severa reducción de la virulencia en una cepa de *B. cinerea* (Siewers y col., 2005), aunque no con otras cepas, indicando que unas podrían depender estrictamente del botridial, mientras que otras producirían otras toxinas, como los botcinólidos (Collado y col., 2007; Moraga y col., 2016).

Las proteínas extracelulares también pueden inducir las defensas de las plantas, como BcNEP1 y BcNEP2 de *B. cinerea*, que pertenecen a la familia NPLs (Nep1-like proteins). Se ha descrito que esta familia induce la deposición de calosa, la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de etileno, y la inducción de genes de respuestas de defensa (Cuesta-Arenas y col., 2010). También se ha descrito una glicoproteína

denominada BcIEB1 abundante en el secretoma de *B. cinerea*, que guardaría relación con la virulencia de este hongo (Fernández-Acero y col., 2010). Recientemente se le ha asignado un papel como elicitor de las defensas de las plantas mediante un reconocimiento de tipo PAMP (patrones moleculares de reconocimiento a patógenos) (González y col., 2017).

El denominado “estallido oxidativo” se produce en muchas interacciones planta-patógeno durante la HR y consiste en una liberación masiva de ROS, que promueven la muerte celular y confieren resistencia frente a patógenos biótrosos. Lógicamente, en el caso de un necrótrofo la muerte celular de la planta, en cierta medida, es beneficiosa para el patógeno (Govrin y Levine, 2000). De hecho, *B. cinerea* produce activamente un estrés oxidativo durante la penetración de la cutícula y la formación de la lesión primaria (Williamson y col., 2007). En la infección de hojas de tomate se ha descrito una gran acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tanto en la membrana plasmática de las células vegetales, como en la vaina extracelular que cubre la superficie de la hifa (Schouten y col., 2002). Esto, además, conduce a la acumulación de radicales libres, culminando con la peroxidación lipídica y el agotamiento de antioxidantes (Muckenschnabel y col., 2002). Todos estos procesos oxidativos provocan un desequilibrio masivo del estado redox dentro y alrededor del tejido infectado, promoviendo el avance de la enfermedad (Lyon y col., 2007). En los últimos años se ha descrito que el gen *bcsod1*, que codifica la superóxido dismutasa Cu-ZnSOD, secretada por *B. cinerea*, se expresa desde el inicio de la infección. La delección de *bcsod1* ($\Delta bcsod1$) reduce la virulencia en muchos huéspedes (Rolke y col., 2004). En una parte de esta Tesis se ha estudiado la respuesta de plantas de *Arabidopsis* y de tomate frente a este mutante de *B. cinerea* (López-Cruz y col., 2017) En la interacción planta-patógeno se producen ROS, tanto por parte de la planta, como por parte del hongo, pero actualmente se desconoce cuál es la función exacta de las mismas.

B. cinerea también produce ON para favorecer la muerte celular y el avance de la infección (Conrath y col., 2004). El ON es producido por el hongo desde la fase de germinación y difunde al medio extracelular. El tratamiento con ON exógeno induce su producción por parte de la planta, sugiriendo una interrelación entre las rutas de generación de este metabolito por parte del patógeno y del huésped. Se ha propuesto

un umbral de ON que podría incrementar, o reducir, la defensa de la planta frente a hongos necrótrofos (Turrión-Gómez y Benito, 2011).

Por otra parte, el AO (un ácido dicarboxílico) es beneficioso para los hongos necrótrofos, dada su capacidad acidificante, secuestrante y estimulante del estallido oxidativo. En el primer caso, facilitaría la actividad de las enzimas degradativas implicadas en el proceso de infección, como pectinasas, proteinasas y lacasas, que son activas a pH ácido (Manteau y col., 2003; ten Have y col., 2010; Hahn y col., 2014). En el segundo caso, el oxalato es capaz de quelar los iones calcio embebidos en la estructura de las pectinas, sobre todo cuando éstas están parcialmente degradadas por las pectinasas. Al secuestrar el calcio se abre la estructura tipo “caja de huevos” de la pectina y se facilita su degradación (Prins y col., 2000). Por último, puede estimular el estallido oxidativo y la muerte celular programada (Kim y col., 2008). El AO es esencial para la patogénesis de *Sclerotinia sclerotiorum* (un hongo necrótrofo cercano a *B. cinerea*), sin embargo, aunque en *B. cinerea* podría ser un factor de virulencia, no tiene un papel claro (Hahn y col., 2014). Los mutantes deficientes en AO tienen una virulencia reducida, que puede variar en función del pH del tejido hospedador. Se ha visto que en *S. sclerotiorum* la virulencia viene mediada principalmente por AO, mientras que en *B. cinerea* se ha observado la presencia de otros ácidos como el citrato y el succinato durante la infección en plantas de girasol, lo que sugiere una diferencia en la regulación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en ambos hongos (Mbengue y col., 2016).

Durante mucho tiempo se ha considerado que los hongos necrótrofos se limitaban a producir la muerte celular (necrosis) mediante la liberación de toxinas y enzimas líticas. Sin embargo, gracias a numerosos estudios, como los descritos anteriormente, en la actualidad se sabe que la interacción es mucho más compleja y requiere una manipulación activa de las respuestas de la planta por parte del patógeno. Existen estudios que indican que *B. cinerea* necesita activar la HR de la planta y provocar la muerte celular programada para poder invadir los tejidos muertos (Williamson y col., 2007). En otros estudios se ha descrito que el hongo libera un exopolisacárido que actúa como un elicitor de la ruta del SA, con el fin de activar la HR e inhibir las respuestas específicas contra necrótrofos, mediadas principalmente por la ruta del JA (El Oirdi y col., 2011).

Mecanismos constitutivos e inducibles de las plantas

Cuando el microorganismo patógeno entra en contacto con la planta ésta es capaz de poner en marcha diferentes mecanismos de defensa, cuyo objetivo es detener, aminorar o contrarrestar la infección provocada por el mismo. Podemos clasificar los mecanismos de defensa de las plantas en constitutivos e inducibles. Los constitutivos son aquellos que proporcionan resistencia frente al microorganismo patógeno. Distinguimos dos tipos: Las barreras estructurales, o mecanismos de defensa físicos y los mecanismos de defensa químicos. Los primeros consisten en la deposición de lignina como refuerzo de los tejidos que sufren daño físico y la formación de papilas en las células de la epidermis, que están compuestas por calosa (β -1,3-glucano), que evitan la penetración del patógeno (Skalamera y col., 1997). Los mecanismos constitutivos químicos se basan en la acumulación de compuestos procedentes del metabolismo secundario (fitoanticipinas) y de proteínas antimicrobianas.

Los mecanismos constitutivos dificultan la progresión del patógeno en la planta y forman parte de la denominada resistencia inespecífica (Dodds y Rathjen, 2010). Estas barreras pueden ser superadas por el microorganismo patógeno, invadiendo la planta. Para ello produce y secreta elicitores que, a su vez, activan las defensas inducibles de la planta para tratar de contener al patógeno. Entre éstas defensas inducibles destacan la HR y la síntesis de proteínas relacionadas con la resistencia a patógenos (proteínas PR). Así pues, los mecanismos inducibles conllevan una percepción específica del ataque del patógeno y conducen, a veces, al establecimiento en la planta de un estado de resistencia de amplio espectro, que la protege de subsiguientes infecciones y que recibe el nombre de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Kamatham y col., 2016).

El reconocimiento del patógeno

Algunos mecanismos de reconocimiento constituyen un modelo simple, en el que un receptor de la planta interacciona directamente con moléculas del patógeno. Es decir, los patógenos liberan moléculas efectoras y factores de virulencia para incrementar su virulencia que interaccionan con la planta. Ésta, a su vez, depende de la inmunidad innata de cada célula y de señales sistémicas procedentes de los sitios de infección. Este modelo incluye la interacción entre efectores de los patógenos y las proteínas PR de la

planta. Se ha propuesto que muchas proteínas PR podrían ser activadas indirectamente por efectores codificados por el patógeno (Jones y Dangl, 2006) y no mediante un reconocimiento directo, como el propuesto inicialmente por la hipótesis gen a gen (Flor, 1971). Esta hipótesis, conocida como “Hipótesis del guardián”, supone que las proteínas PR reconocen indirectamente los efectores derivados del patógeno, a través de las perturbaciones que causan en la planta (Ade y col., 2007).

En general, las plantas responden a la infección utilizando un sistema inmune de dos tipos. El primero reconoce y responde a moléculas presentes en diversas clases de microbios, algunos de ellos no patogénicos. El segundo responde a factores de virulencia de forma directa o indirecta, a través de sus efectos sobre la planta.

En el primer caso se utilizan receptores transmembrana de reconocimiento de patrones (PRRs), que responden a patrones moleculares asociados a microbios no patógenos (MAMPs), a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que activan la señalización inmune de la planta sin tener en cuenta el estilo de vida del patógeno (Laluk y Meginste, 2010; Newman y col., 2013 Wiesel y col., 2014).

Los MAMPs/DAMPs son reconocidos por los PRRs, cuya activación dispara la respuesta defensiva, tanto en el caso de la resistencia de tipo gen a gen, como en la resistencia basal. Ésta se define como una resistencia activada por patógenos virulentos en huéspedes susceptibles, pero con menor velocidad y reducida amplitud (Tao y col., 2003; Jones y Dangl, 2006; Abuqamar y col., 2017). La naturaleza de estos MAMPs es muy diversa, siendo habitualmente moléculas esenciales para la vida del microbio, aunque no jueguen necesariamente un papel en su patogenicidad. Algunos ejemplos son componentes estructurales de la pared celular y de la membrana de algunos hongos, como el ergosterol, la quitina y los β -glucanos. También lo son los lipopolisacáridos de las membranas celulares de las bacterias Gram-negativas (LPS), o la flagelina de los órganos de motilidad de las bacterias (Zipfel y Felix, 2005). Tras la infección con *B. cinerea* la quitina es reconocida por los receptores de la membrana plasmática CERK1/LysM RLK1 (chitin elicitor receptor kinase1/Lysin motif receptor-like kinase1) y LYM2 (LysM domain-containing glycosylphosphatidylinositolanchored protein 2) (Faulkner y col., 2013). Las respuestas que desencadena el reconocimiento mediado por MAMPs son muy rápidas e incluyen la activación de flujos iónicos a través de la

membrana plasmática, la generación de ROS, ON y etileno, así como la deposición de calosa y de compuestos antimicrobianos (Zipfel y Felix, 2005). La señalización mediada por MAMPs utiliza, al menos, dos cascadas de MAP quinasas diferentes (Shen y col., 2007; Suarez-Rodriguez y col., 2007) y se inducen genes importantes, tanto para la defensa en plantas que no son huésped, como para la defensa basal. Su reconocimiento, por lo tanto, parece un mecanismo muy importante para la defensa preventiva y las respuestas una vez que el patógeno ha invadido la planta (Zipfel y col., 2004; Lipka y col., 2005).

Los DAMPs son elicitores endógenos liberados desde los tejidos de las plantas durante la infección del patógeno, o durante un estrés abiótico (de Lorenzo y col., 2011).

Un tipo de DAMPs son los oligogalacturónidos (OGs), que son liberados por la pared celular de la planta tras la infección de *B. cinerea*, contribuyendo a la defensa frente a este patógeno (Ferrari y col., 2013). Los DAMPs son reconocidos por el receptor de la pared celular kinasa 1 (WAK1), cuya sobreexpresión en Arabidopsis mejora la resistencia frente a *B. cinerea* (Brutus y col., 2010).

El segundo mecanismo que responde a la infección utilizando el sistema inmune de la planta actúa en el interior de la célula, utilizando receptores de la superfamilia NLR codificados por la mayoría de genes R. Su nombre procede de sus dominios característicos: Nucleotide binding domain (NBD) y leucine-rich repeat (LRR). El nombre NLR hace referencia a su denominación original “Nod-like receptors”, que actualmente se aplica en animales, mientras que en plantas se ha consensuado la denominación NBD-LRR (Hamada y col., 2013). La resistencia mediada por estas proteínas tiene en cuenta el estilo de vida del patógeno y, clásicamente, se considera efectiva contra patógenos biótrofos o hemibiótrofos, pero no contra patógenos que matan las células durante su colonización (Glazebrook, 2005). Sin embargo, hay evidencias de que algunos componentes de esta clase de proteínas pueden conferir resistencia frente a necrótrofos (Staal y col., 2008; Laluk y Mengiste, 2010). Por lo tanto, las proteínas NBD-LRR juegan un papel importante en la defensa inmune de las plantas, pudiendo su ausencia, o incorrecta funcionalidad, causar fallos en la misma (Jones y col., 2016).

Los datos obtenidos sobre el sistema inmune de las plantas se pueden representar en el denominado “modelo del zig-zag” (Jones y Dangl, 2006), aunque recientemente se

defiende un modelo más dinámico (Wiesel y col., 2014). En la figura IV se resume dicho modelo:

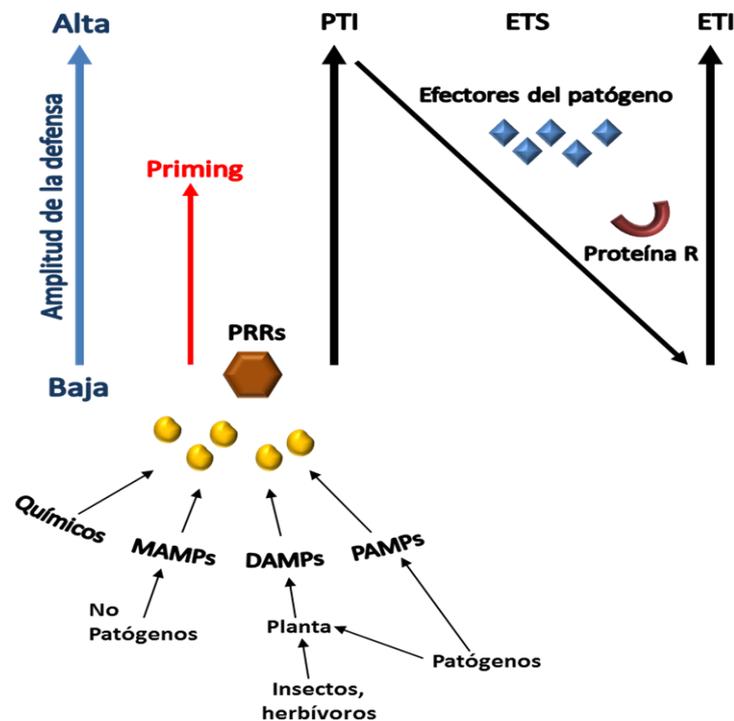


Figura IV. Esquema ilustrativo del modelo de Zig-zag. Elicitores químicos, Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) derivado de microbios no patógenos, Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) derivado de patógenos y Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) que son producidos por la planta tras el contacto con insectos, herbívoros o ataque de patógeno vía PRRs. PTI: Inmunidad inducida por elicitores químicos/ MAMPs/DAMPs/PAMPs. ETS: Susceptibilidad inducida por efectores. ETI: Inmunidad inducida por efectores mediada por genes R. Figura adaptada de Wiesel y col., 2014.

Los MAMPs (o PAMPs), DAMPs y/o elicitores químicos son reconocidos por los PRRs, activándose la respuesta defensiva de la planta como consecuencia de su percepción (Mackey y McFall, 2006; Wiesel y col., 2014). Centrándonos en los patógenos, se ha establecido que la respuesta de la planta tendría dos vías principales. La primera se denomina PTI (PAMPs-Triggered Immunity; inmunidad provocada por PAMPs), basada en un reconocimiento de patrones moleculares endémicos durante la invasión del patógeno, que activan respuestas de la defensa basal del hospedador. Cuando el patógeno libera proteínas efectoras, denominadas ETS (effector-triggered susceptibility; susceptibilidad provocada por efectores), se produce una interferencia con la PTI y se desencadena una susceptibilidad frente al patógeno (Thomma y col., 2011). En bacterias se liberan efectores proteicos TTEs mediante un sistema de secreción de tipo III para

suprimir la respuesta PTI. Se reconfigura el metabolismo de la planta para proveer de nutrientes al patógeno y favorecer así su multiplicación (Abramovitch y Martin, 2004; Alfano y Collmer, 2004). Los TTEs promueven la patogenicidad modificando el balance de hormonas en el hospedador y, en otros casos, el patógeno sintetiza moléculas que mimetizan fitohormonas como la coronatina (mencionada anteriormente). En la activación de la PTI las plantas acumulan ROS, produciéndose un segundo estallido oxidativo, estimulando las rutas de SA, JA y ABA y la deposición de calosa (Pastor y col., 2013).

La segunda vía se denomina ETI (Effector-Triggered Immunity; inmunidad provocada por efectores), que consiste en una respuesta tardía del hospedador a la supresión de las defensas basales. Un efector específico es reconocido directa, o indirectamente, por una de las proteínas NBD-LRR, dando lugar a la inmunidad desencadenada por efector o ETI (Dodds y Rathjen, 2010; Bernoux y col., 2011). La selección natural contribuye a que los patógenos eviten la ETI, deshaciéndose o diversificando el gen efector reconocido, o adquiriendo nuevos efectores que suprimen la ETI. La selección natural también ha dado lugar a nuevas especificidades de los genes R, de manera que pueda volver a producirse la ETI. La respuesta ETI puede ser suprimida por el patógeno mediante otros efectores alternativos, que no son reconocidos por las proteínas R.

ETI generalmente incluye la activación de la HR que lleva, en último término, a una muerte celular programada efectiva contra biótrosfos al restringir el acceso al agua y a los nutrientes, además de activar la ruta de señalización del SA, siendo efectiva contra especies concretas de biótrosfos (Abramovitch y col., 2006). En ausencia de un patógeno adaptado puede llevar a un efecto de tipo priming, que genera una respuesta rápida y fuerte tras el ataque (Wiesel y col., 2014).

La respuesta temprana de la planta frente a patógenos

Cuando tiene lugar la interacción la planta reconoce al patógeno y se desencadena una serie de cambios en las células vegetales. Estos incluyen: la activación de la ruta del SA; la activación de protein-quinazas; la reprogramación transcripcional; la producción rápida y transitoria de ROS y ON (Turrión-Gómez y Benito, 2011); así como un cambio de pH en el apoplasto hacia la alcalinidad, como resultado de un influjo de calcio y

protones y un eflujo de potasio, actuando AMPc como señal secundaria entre varias rutas de respuesta de las plantas frente a patógenos (Bolwell y col., 2002). La rapidez e intensidad de la activación de esa cascada de reacciones es lo que marca el éxito de la resistencia.

Durante la interacción con el patógeno se produce un estallido oxidativo que consiste en la producción de ROS. En las plantas, las ROS se producen en diferentes localizaciones de la célula, como el apoplasto y el cloroplasto, jugando un papel esencial en la interacción planta-patógeno, ya que son necesarias para la activación de otras respuestas defensivas (Mittler y col., 2011).

Los compuestos oxidantes se forman a partir del oxígeno dando especies químicas parcialmente reducidas, como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el radical superóxido (O_2^-), que constituyen las ROS primarias. A partir de éstas, se forman otros radicales como el hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) u otros compuestos oxidantes como el H_2O_2 .

Las enzimas NADPH oxidasas, amino oxidasas y peroxidasas de la pared celular tienen como función producir ROS implicadas en la muerte celular programada y en la defensa contra patógenos. Por una parte, actúan como señalizadoras del estrés, constituyendo segundos mensajeros que activan una cascada de protein-quinasas (MAPKs) que a su vez activan factores de transcripción en el núcleo, que regulan la expresión de genes de defensa (Marschall y Tudzynski, 2016a).

Por otra parte, las ROS causan la muerte celular, mencionada previamente, que tiene un efecto antimicrobiano sobre diversos patógenos (Kotchoni y Gachomo, 2006).

La señalización mediante MAPKs está implicada en el crecimiento y desarrollo vegetal, así como en la respuesta frente a estreses bióticos y abióticos (Liu y He, 2016). Las cascadas de MAPKs consisten en tres módulos: MAPKKK-MAPKK-MAPK. Comienzan con una fosforilación secuencial desde MAPKKKs, hasta la activación terminal de MAPKs. En plantas, las MAPKKs pueden actuar a distintos niveles, ya que una MAPKK puede activar a más de una MAPK, permitiendo una respuesta más flexible a múltiples estreses (Frederickson y Loake, 2014). En *Arabidopsis* se ha descrito que MPK3, MPK4, y MPK6 están implicadas en las respuestas frente a patógenos y algunos estudios en *Arabidopsis* indican que la activación de AtMPK3/AtMPK6 podría estar desacoplada de la producción de ROS mediada por PAMPs en la respuesta PTI (Liu y He, 2016). Se ha observado que la unión de flg22, un polipéptido sintético de 22 aminoácidos que se corresponde con el

epítopo altamente conservado de la flagelina de *Pseudomonas* (Liu y He, 2016), induce la activación de MAPKs que, a su vez, activan factores de transcripción de la familia WRKY. Los estudios revelaron que la sobreexpresión de la fosfatasa AP2C1 puede defosforilar e inactivar a AtMPK3, AtMPK6 e incluso a AtMPK4 a tiempo corto en respuesta a flg22. Además, estos datos demostraron que a tiempo corto en la respuesta PTI, la activación de AtMPK3/AtMPK6 mediada por PAMPs puede ocurrir de forma independiente a la producción de ROS mediada por la AtRBOHD (Liu y He, 2016), una NADPH oxidasa de plantas que describiremos más adelante.

Se ha observado que los hongos filamentosos también presentan los tres módulos de MAPKs descritos anteriormente, jugando papeles cruciales en procesos de desarrollo y en varios aspectos de la infección en la planta (Hahn y col., 2014). En *B. cinerea* existen tres rutas diferentes de MAPKs que son responsables de una disminución en la regulación de diferentes funciones: BcBmp1 (MAPK requerida para patogénesis) tiene un impacto en la formación de conidios y esclerotia, contribuyendo al crecimiento y patogenicidad del hongo; Bmp3 regula la integridad de la pared celular y BcSak1, que es sensible al estrés osmótico y oxidativo (Marschall y Tudzynsky, 2016c).

Producción del estallido oxidativo y mantenimiento del balance redox en la planta

En situaciones de estrés uno de los complejos enzimáticos productores de ROS es el complejo NADPH oxidasa (Nox). El NADPH citosólico dona electrones al O_2 extracelular, que es reducido a O_2^- vía FAD. El O_2^- se dismuta a H_2O_2 mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Marino y col., 2012; Liu y He, 2016).

Durante muchos años el complejo Nox de células fagocíticas de animales constituía el sistema mejor caracterizado en la generación de ROS. En animales, este complejo está formado por 7 miembros: Nox1-5, DUOX1 y DUOX2 y para la completa activación es necesaria la presencia de reguladores citosólicos como p67phox, p40phox, p47phox y la pequeña GTPasa Rac. La cantidad, estructura y composición del complejo Nox difiere en otros organismos (Dirschnabel y col., 2014; Marschall y Tudzynski, 2016a).

En plantas, los Nox son conocidos como RBOHs (respiratory burst oxidative homologues; homólogos del estallido oxidativo respiratorio), que son homólogos de la subunidad gp91phox de mamíferos (Sagi y col., 2006). En *Arabidopsis* se han descrito 10 miembros

que tienen sitios de unión al FAD y al NADPH en el extremo C-terminal, 6 dominios transmembrana y un dominio oxidasa. Además, tienen dominios de unión a calcio en el extremo N-terminal, sugiriendo que el calcio tendría un papel clave en su regulación (Marino y col., 2012; Kadota y col., 2015). Se han descrito pequeñas GTPasas como OSRac1, que podrían activar la actividad NADPH oxidasa durante la interacción planta-patógeno (Jiménez-Quesada y col., 2016). Se han realizado numerosos estudios sobre el papel de los RBOHs en plantas, que demuestran que utilizan diferentes tipos en diversos procesos biológicos. Por ejemplo, RBOHH y RBOHJ están implicados en el desarrollo del tubo polínico y RBOHB en la maduración de las semillas. RBOHF participa en la regulación de la HR, mientras que RBOHD es el que más se expresa y juega un papel crucial en el control de la muerte celular, en la lignificación de la pared celular en respuesta a daño y en la señalización sistémica de respuestas a estrés biótico y abiótico (Torres y Dangl, 2005; Kadota y col., 2015).

La producción de ROS durante el estallido oxidativo es dependiente de RBOH, asociada con el reconocimiento del patógeno ligado a la percepción de MAMPs/PAMPs/DAMPs y durante la HR (Marino y col., 2012). El polipéptido fgl22 provoca la producción de ROS dependiente de RBOHD durante la respuesta PTI y las plantas deficientes en la actividad RBOH eran más resistentes a *B. cinerea* y *A. brassicicola* (Marino y col., 2012; Kadota y col., 2015; Liu y He, 2016). Las ROS producidas por los RBOHs, además de actuar como compuestos tóxicos son moléculas esenciales en las rutas de señalización en las respuestas de defensa de las plantas. Se pueden producir interacciones entre esta señalización de ROS y otros reguladores de las defensas de la planta. Por ejemplo, la regulación de los niveles de ROS y ON son necesarios para producir la HR y ambos están mediados por ABA para que tenga lugar el cierre estomático (Torres y Dangl, 2005). Además, se ha sugerido que las ROS actúan sinérgicamente con el SA para el establecimiento de la SAR, donde los RBOHs estarían implicados (Marino y col., 2012). La aplicación exógena de SA, MeJA y coronatina induce la producción de ROS dependiente de RBOHD (Liu y He, 2016).

Durante el estrés oxidativo se ponen en marcha mecanismos de detoxificación de estas ROS (Mittler, 2011). Las plantas presentan sistemas enzimáticos para la eliminación de las ROS como la SOD, la ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT). Las reacciones

que se generan durante la actuación de estas enzimas producen en último término O_2 y H_2O_2 , que son inocuos para la planta (Benavides y col., 2009).

La SOD tiene como función realizar la dismutación del O_2^- hasta H_2O_2 , que es liberado al citosol en el ciclo Ascorbato-Glutatión. En este ciclo, que opera en el cloroplasto y en el citosol, tiene lugar la reducción de H_2O_2 a H_2O mediante la APX usando el ascorbato como donador de electrones. El ascorbato oxidado se recupera mediante la enzima deshidroascorbato reductasa que utiliza glutatión, como donador de electrones. Finalmente, el glutatión oxidado se reduce mediante la enzima glutatión reductasa usando NADPH como donador de electrones. Por lo tanto, se produce un flujo de electrones cíclico que va desde NADPH hasta H_2O_2 , donde el ascorbato actuaría como cofactor en plantas para las peroxidases, siendo importante en la eliminación química de las ROS (Noctor y col., 2017). La CAT realizaría la misma función que la SOD, pero en peroxisomas (de Gara y col, 2003). En la figura V se muestra un esquema de la participación de estas enzimas en la detoxificación de las ROS.

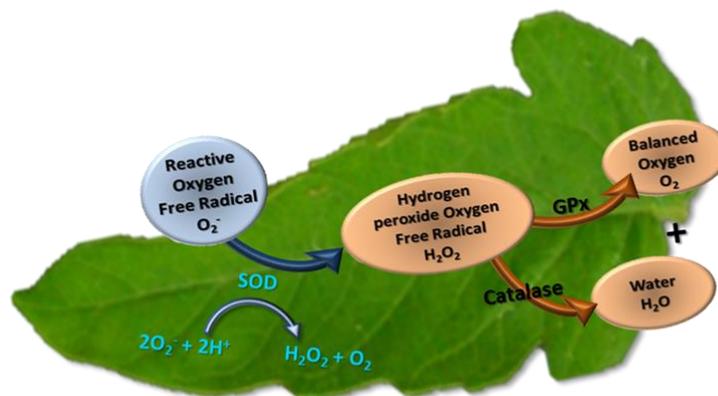


Figura V. Esquema representativo de la actuación de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), Ascorbato-Glutatión peroxidasa (APX/GPX) y catalasa (CAT) en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en planta.

Como la producción de O_2^- tiene lugar en diferentes localizaciones de la célula, no es una sorpresa que la enzima SOD esté distribuida en diferentes compartimentos subcelulares como en las mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, además de estar presente en el citosol y en la pared celular (Greene, 2002). En la figura VI se presenta un esquema de la localización de SOD.

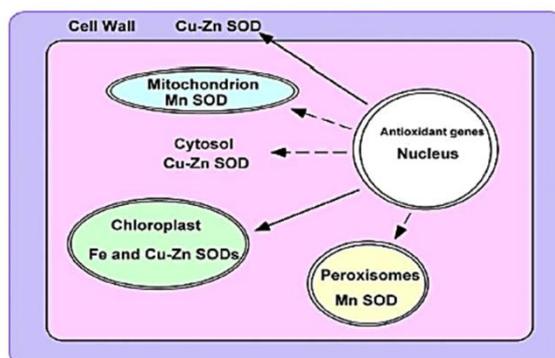


Figura VI. Esquema representativo de la localización de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en células vegetales. Figura extraída de Grene, 2002.

SOD se puede clasificar en tres grupos dependiendo del metal cofactor que emplean estas enzimas: FeSOD, que utiliza el hierro como cofactor y se localizaría en los cloroplastos; MnSOD, utiliza el manganeso y se localiza en peroxisomas y mitocondrias y el Cu-ZnSOD que usa tanto el cobre como el zinc como cofactores y estaría presente en cloroplastos, en el citosol y en la pared celular (Grene, 2002; Moore y col., 2002; Ribera-Fonseca y col., 2013). La SOD también está presente en microorganismos patógenos, utilizando como cofactores principales Mn y Cu/Zn, aunque también pueden utilizar Fe (Moore y col., 2002; Landis y col., 2005; García y col., 2017). Evolutivamente hablando, la existencia de diferentes requerimientos en metales como cofactores de SOD puede deberse a la diferente disponibilidad de los compuestos metálicos en transición soluble en la biosfera, en relación con el contenido en O_2 en la atmósfera en diferentes eras geológicas (Grene, 2002).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios tratando de mejorar la tolerancia de las plantas a diversos estreses mediante la introducción de genes *SOD* en plantas transgénicas. La sobreexpresión de Mn-SOD en plantas de pera y *Arabidopsis* les confiere tolerancia a estrés hídrico y salino, mientras que la sobreexpresión de Fe/Cu-Zn-SOD en otras plantas transgénicas confiere tolerancia a diversos estreses oxidativos (Kaouthar y col., 2016).

El control de la concentración de ROS se realiza mediante compuestos y sistemas enzimáticos antioxidantes. Por una parte, se controlan los niveles de ROS para la señalización y, por otra parte, se desintoxica el exceso de ROS producidas durante la situación de estrés (Mittler, 2011). La eliminación de ROS en las plantas se lleva a cabo

mediante enzimas como SOD, APX y CAT (como se ha mencionado anteriormente), así como a través de la quelación y secuestro de iones metálicos que disminuye o previene la formación de radicales $\text{OH}\cdot$. La función de algunos sistemas enzimáticos antioxidantes puede no ser solo mantener niveles bajos de ROS, sino que permiten a la célula que detecte y señalice la disponibilidad alterada de ROS y las perturbaciones redox (Noctor y col., 2017).

La célula mantiene niveles bajos de ROS (niveles basales no tóxicos) y cualquier desviación de este balance puede ser utilizado para la señalización mediante ROS. Unos niveles altos de ROS no implican necesariamente una muerte celular debida a un daño oxidativo, sino que podría ser el resultado de una señalización de ROS que provoca una muerte celular fisiológica mediada por una ruta genética programada (Mittler, 2017).

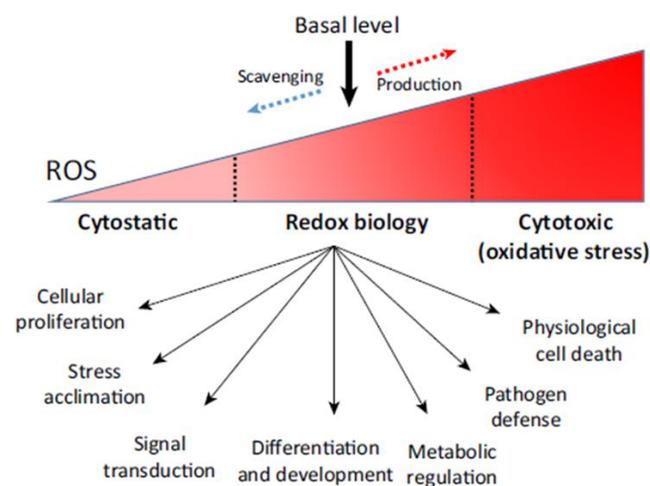


Figura VII. Esquema ilustrativo de los efectos de los diferentes niveles de ROS en la regulación de procesos celulares. Figura extraída de Mittler, 2017.

Por lo tanto, mantener unos niveles basales por encima del nivel citostático, pero por debajo del citotóxico, permite la regulación de diversos procesos esenciales para la vida. La amplitud de las señales ROS tienen pues unas limitaciones. No deben exceder los niveles citotóxicos, ni caer por debajo de los niveles citostáticos (Figura VII). Las respuestas a patógenos, o señalización sistémica rápida en forma de ondas ROS, resulta en la activación de RBOHs y la acumulación de altos niveles de ROS en el apoplasto (Mittler, 2017).

Actualmente, el concepto dominante es que la señalización redox se basa en la existencia de un balance entre ROS y antioxidante, que cambia para que se acumulen ROS, bien por un aumento en su producción o por una disminución de la capacidad antioxidante. El modelo actual se basa en que los antioxidantes actúan como procesadores de ROS y mediadores de la señalización, permitiendo diferentes opciones para la transducción de la señal. La pérdida de uno de los componentes antioxidantes permitiría la señalización a través de otras vías. Existe, por tanto, una interacción entre ROS y antioxidantes, donde las ROS tienen funciones señalizadoras, como la modulación de la síntesis de hormonas y rutas de señalización (Noctor y col., 2017).

Participación del patógeno en el estallido oxidativo

En general, se considera que los niveles de H₂O₂ son perjudiciales para patógenos biótrosos, limitando su proliferación. Sin embargo, se ha puesto en evidencia que los hongos necrótrosos son capaces de regular los niveles generados de H₂O₂ en su propio beneficio para favorecer su proliferación y el desarrollo de la enfermedad (Heller y Tudzynski, 2011; Mittler y col., 2011). Estos hongos disponen de mecanismos para protegerse de las ROS generadas, que al mismo tiempo modulan la respuesta de la planta (Figura VIII).

Tanto la planta como el patógeno (especialmente necrótrofo) contribuyen a la generación de un ambiente oxidativo en la interacción y, bajo determinadas condiciones, algunos patógenos como *B. cinerea* son capaces de aprovechar ese ambiente en su propio beneficio. La presencia de ROS está relacionada con el comienzo de la HR, cuyo objetivo principal es actuar contra los patógenos biótrosos, limitándoles la disponibilidad de agua y de nutrientes. Los patógenos necrótrosos como *B. cinerea* aprovechan esta respuesta para aumentar la superficie de la zona de necrosis y continuar el avance de la infección (Govrin y Levine, 2000). *B. cinerea* no solo se aprovecha de la HR, sino que la activa específicamente mediante la liberación de una serie de efectores y moléculas como el botridial (Rossi y col., 2011).

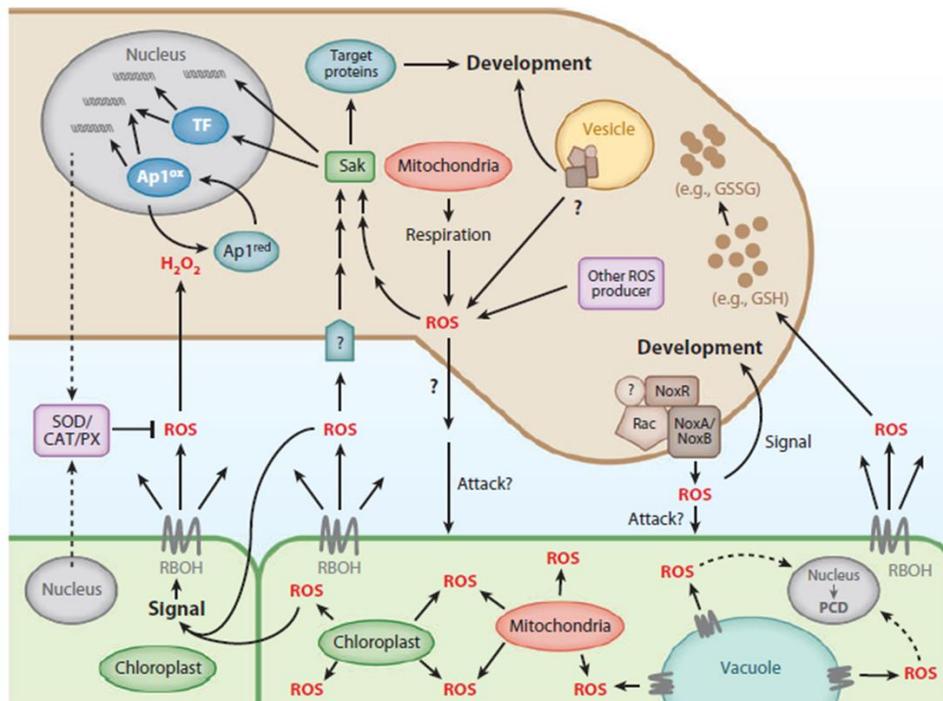


Figura VIII. Esquema de la producción ROS en la interacción planta-hongo necrótrofo. RBOH: Oxidasa homóloga del estallido oxidativo de la planta. El complejo Nox del patógeno produce ROS que sirven de moléculas señalizadoras. SOD: Superóxido dismutasa; CAT: Catalasa; PX: Peroxidasa; Ap1: Factor de transcripción; Sak: MAP quinasa activada por estrés; GSH/GSSG: Sistema de óxido-reducción del glutatión; TF: Factores de transcripción; PCD: Muerte celular programada. Figura de Heller y Tudzynski, 2011.

Los patógenos también tienen sistemas para la producción y detoxificación de ROS. El complejo Nox también se ha descrito en hongos y, como se ha mencionado antes, la cantidad, estructura y composición difiere entre organismos. Se han establecido algunas homologías del complejo Nox entre animales y hongos. Por ejemplo, en la mayoría de los hongos se han encontrado dos isoformas homólogas a la subunidad gp91phox de mamíferos, denominadas NoxA y NoxB (Scott, 2015). NoxA estaría implicada en la colonización y expansión de algunas especies fúngicas, además de estar implicada en el desarrollo de cuerpos fructíferos, la formación de esclerocios, el desarrollo del apresorio, el crecimiento de hifas y en la fusión de tubos de anastomosis conidial (CATs). La subunidad NoxB estaría implicada en la penetración en el hospedador (Scott, 2015). La GTPasa RAC también estaría presente y una subunidad homóloga a p67phox de animales, denominada NoxR, que regularía las subunidades NoxA y NoxB (Siegmund y col., 2013; Scott, 2015). En la figura IX se representa un esquema comparativo entre el complejo Nox de animales y de hongos.

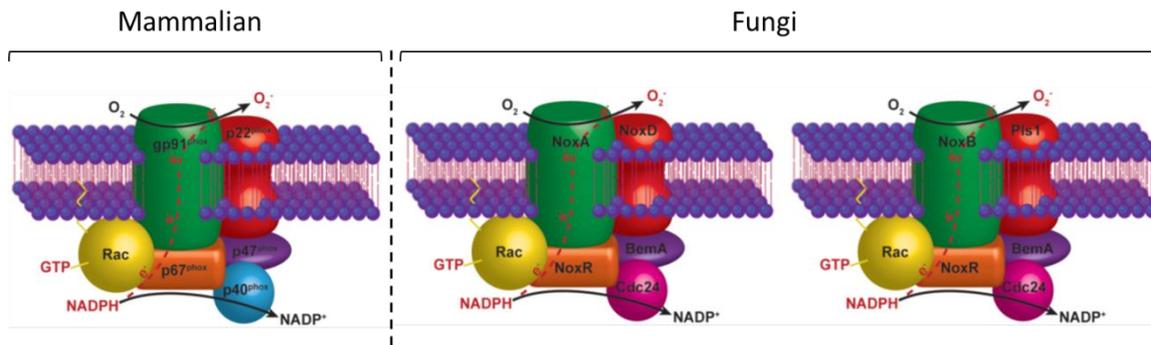


Figura IX. Modelo esquemático comparativo entre el complejo NOX2 de mamíferos y el complejo Nox de hongos. Figura de Scott, 2015.

Se ha descrito una tercera isoforma en diversas especies como *Fusarium spp.*, *M. oryzae*, *Podospora anserina* y *Aspergillus terreus*, denominada NoxC, que tiene un dominio de unión a calcio en el extremo N-terminal homólogo a NOX5 de mamíferos y a los NOX de plantas (Siegmund y col., 2013; Marschall y tudzynski, 2016a). Recientemente se ha descrito una cuarta isoforma denominada NoxD en *Podospora anserina* y *B. cinerea*, que actuaría como adaptador proteico asociado con la subunidad NoxA, participando la formación de unas estructuras en forma de almohadillas denominadas “ICs” (infection cushions, almohadillas de infección), cuya función sería facilitar la penetración del hongo (Siegmund y col., 2015; Marschall y Tudzynski, 2017). En la figura X se representa de manera esquemática la localización de las diferentes subunidades del complejo NOX de *B. cinerea*.

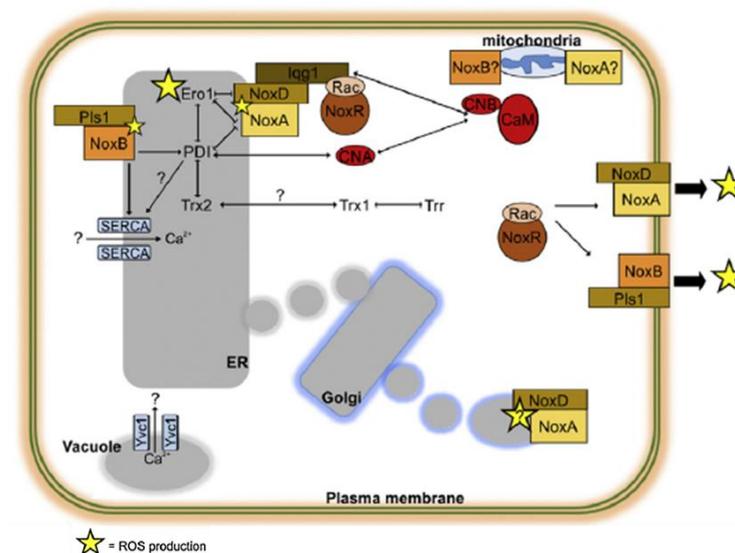


Figura X. Modelo esquemático de la localización del complejo NOX en *B. cinerea*. Trx = tioredoxina, Trr = tioredoxin reductasa, CaM = calmodulina, CNA = calcineurina, CNB = calcineurinB. Figura de Marschall y Tudzynski, 2016a.

Estudios recientes con el mutante *bcpdi1* de *B. cinerea*, deficiente en la enzima PDI (protein disulfide isomerase; proteína disulfuro isomerasa), indican que esta proteína es esencial para la mayoría de los procesos de desarrollo del hongo y guarda relación con calcio y la señalización ROS. Su función podría estar afectada por su estado de fosforilación, que es necesario para el mantenimiento de la homeóstasis redox y la transmisión de señales (Marschall y Tudzynski, 2017). Una producción anómala de ICs provoca defectos en la infección en el tejido hospedador. Los mutantes *bcpdi1* no eran capaces de producir ICs normales como la cepa silvestre, generando hifas retorcidas que no estaban dirigidas hacia la zona de infección (Marschall y Tudzynski, 2017).

Por otra parte, la proteína tetraspanina pls1 (homóloga de p22phox en mamíferos), estaría asociada con la subunidad NoxB en la fase de penetración de *Colletotrichum lindemuthianum* y *B. cinerea* en el hospedador (Siegmund y col., 2013).

La SOD también se ha descrito en microorganismos patógenos. Rolke y colaboradores (2004) realizaron un análisis funcional del gen *bcsod1*, que codifica la enzima Cu-ZnSOD en *B. cinerea*. Tras obtener un mutante deficiente en esta enzima, observaron que presentaba una virulencia reducida en hojas de plantas de judía, llegando a la conclusión de que era esencial para la patogénesis de *B. cinerea*. Parecía estar implicada en la detoxificación intracelular de O_2^- , debido a que su ausencia incrementaba sus niveles intracelulares, al no poder convertirlo en H_2O_2 .

En la presente Tesis se dedica un capítulo al análisis de las respuestas de defensa en plantas de *Arabidopsis* y de tomate frente al mutante $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*, deficiente en la enzima Cu-ZnSOD y otro en respuesta a mutantes del complejo Nox de *B. cinerea*. Los resultados obtenidos amplían la información existente sobre el papel de estos complejos enzimáticos en la interacción planta-patógeno.

La señalización hormonal en las respuestas de las plantas

Las interacciones planta patógeno son rápidas y dinámicas, con una lucha constante entre hospedador y patógeno por modificar rutas de señalización y metabolismo a favor de la defensa o de la enfermedad. Una estrategia es el reclutamiento de fitohormonas para respuestas de defensa (Truman y col., 2010). Varias fitohormonas regulan distintas

rutas de señalización, pero estas rutas no funcionan de manera independiente, sino que interactúan en varios puntos conformando una compleja red de señalización.

A raíz de numerosos estudios llevados a cabo en estos últimos años, ha emergido un nuevo modelo para la interacción planta-patógeno, en el que la red de interacciones entre las diferentes rutas de señalización es mucho más compleja e incluye casi todas las hormonas implicadas en procesos de desarrollo, e incluso influye en el estilo de vida del patógeno y la genética de la planta huésped (Robert-Seilaniantz y col., 2011). En la figura XI se presenta un esquema de la implicación de diferentes hormonas en la interacción planta-patógeno:

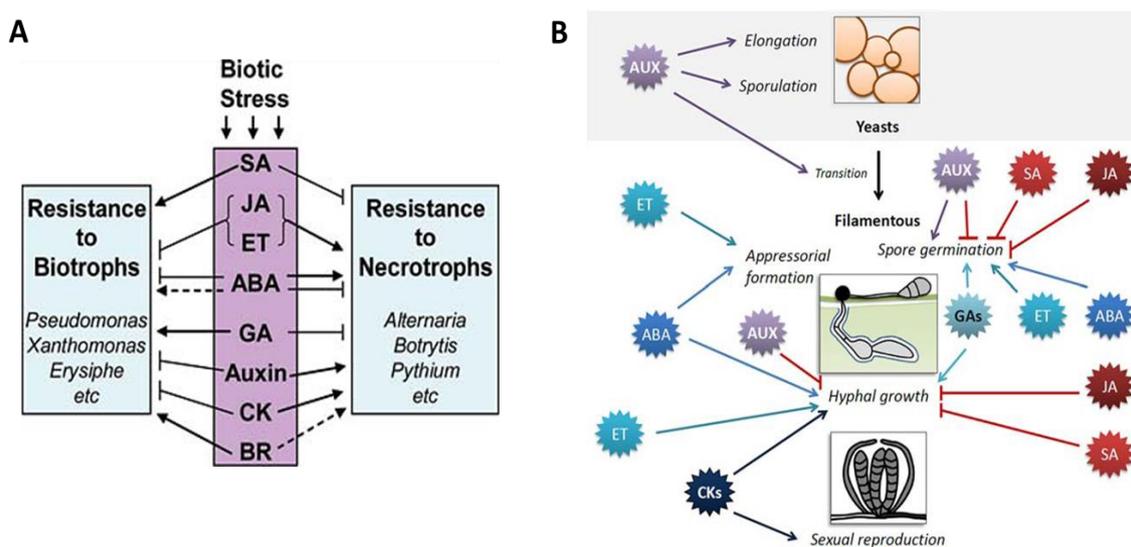


Figura XI. Modelos de la implicación hormonal en la interacción planta-patógeno. (A) Modelo representativo de la participación de fitohormonas frente a patógenos biotróficos y necrótropos. (B) Esquema representativo de las interacciones hormonales de la planta en el desarrollo fúngico durante la infección. SA: Ácido salicílico, JA: Ácido jasmónico, ET: Etileno, ABA: Ácido abscísico, GA: Ácido giberélico, AUX: Auxinas, CK: Citoquininas, BR: Brasinosteroides. Figura XI-A extraída de Bari y Jones, 2009; figura XI-B extraída de Chanclud y Morel, 2016.

A continuación, se describen las principales rutas de señalización que están implicadas en las respuestas de defensa de las plantas.

Ruta mediada por ácido salicílico

El SA es una fitohormona de composición fenólica muy común en las plantas que interviene en numerosos procesos biológicos, como el crecimiento vegetativo o la etapa de floración y también se ha descrito que juega un papel crucial en las respuestas de

defensa de la planta (Dempsey y col., 1999). Tras el ataque de ciertos patógenos se produce la HR y se induce la activación de la ruta del SA. La muerte celular de tejidos vegetales promueve la producción de SA y viceversa (Durrant y Dong, 2004). El SA se acumula activando varios genes que codifican presuntos efectores de defensa, incluyendo *PR1* (pathogenesis-related 1) (Delaney y col., 1994; Tornero y col., 1997). Muchos de estos genes PR son utilizados como marcadores de esta ruta de señalización. El SA es también necesario para una rápida activación de las defensas mediadas por diferentes genes R, para la inducción de las defensas locales y para el establecimiento de la SAR (Kamatham y col., 2016).

La biosíntesis del SA está mediada por dos rutas alternativas. La primera es la denominada ruta de la fenilalanina amonio liasa (PAL), y la segunda la ruta de la isocorismato sintasa 1 (ICS1) (Wildermuth y col., 2001; Dempsey y Klessig, 2012). Se ha postulado que la ruta PAL tiene lugar principalmente en las células de la zona de infección, donde se activa la muerte celular programada, mientras que la ruta ICS1 se activaría en las células adyacentes y distales, con el objetivo de activar la SAR (Ferrari y col., 2003).

Aunque la contribución relativa de ambas vías varía en diversas especies vegetales, en *Arabidopsis* se ha visto que la mayoría de SA inducido por patógeno procede de la vía ICS1 (Gao y col., 2015).

En los últimos años se ha descrito que, en algunas infecciones, como las del viroide *citrus exocortis* (CEVd) y el virus del mosaico de tabaco (TMV) en plantas de tomate, y se produce una interacción compatible no necrotizante, en la que se acumula SA y ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), un derivado metabólico inmediato del SA, que se ha asociado a interacciones compatibles en las que no se produce HR y que podría actuar de manera complementaria (Bellés y col., 2006). Por otra parte, el metil-salicílico (Me-SA) se ha propuesto como la posible señal móvil para la inducción de la SAR (Forouhar y col., 2005). La proteína oligomérica NPR1 (non-expressor of PR Gene 1) es necesaria para la expresión de genes de defensa y además controla la expresión de factores de transcripción, como los WRKY, que son necesarios para la reprogramación transcripcional mediada por SA (Tada y col., 2008; Pajerowska-Mukhtar y col., 2012).

El SA puede unirse a NPR1 induciendo su activación, regulando sus niveles nucleares mediante su degradación y fosforilación en el proteasoma, por lo que los niveles de SA pueden ser indicativos del estado redox de la célula (Wu y col., 2012; Pajerowska-Mukhtar y col., 2013; Herrera-Vasquez y col., 2015). Por otra parte, NPR1 puede ser regulado por ON mediante una S-nitrosilación, que favorece la producción de oligómeros de NPR1 (Yu y col., 2014).

Ruta mediada por ácido jasmónico

En la ruta de las oxilipinas (compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados), parte de los ácidos grasos oxidados se convierten en la oxilipina OPDA (ácido 12-oxo-fitodienoico), esencial en las respuestas de defensa de las plantas (Stintzi y col., 2001). El OPDA es transportado a los peroxisomas, donde mediante sucesivas β -oxidaciones, se produce la fitohormona ácido jasmónico (JA) (Satoh y col., 2014). El JA está implicado en varios aspectos de la biología de las plantas y está presente en respuestas a estreses bióticos y abióticos (Wasternack y col., 2012). En los últimos años se ha descrito que el JA es el producto final de la ruta y la forma bioactiva de la hormona, pero la actividad biológica se extiende a varios metabolitos y conjugados del JA (Bosch y col., 2014). Jasmónico-isoleucina (JA-Ile) es la molécula bioactiva que regula las respuestas frente a estreses bióticos y abióticos (Bosch y col., 2014; Scalschi y col., 2015). Su formación está catalizada por la enzima aminoácido sintetasa JAR1 (JASMONATE RESISTANT1; Jasmonato Resistente1), en una reacción dependiente de ATP (Westfall y col., 2012). El fenotipo que presentan los mutantes *jar1* indica que la actividad JAR1 y la conjugación de JA con Ile son necesarias para muchos de los procesos regulados por los jasmonatos, como la resistencia frente a ciertos patógenos (Staswick y Tiryaki, 2004).

La activación de la ruta de señalización dependiente de JA se produce a través de un incremento de su síntesis en respuesta al ataque de patógenos, o del daño mecánico, con la consecuente expresión de efectores de defensa (Wasternack y Hause, 2013). Clásicamente se considera que el JA, junto con el ET, activan las respuestas frente al estrés oxidativo, a la herida, al ataque de insectos y de microorganismos necrótrofos (Truman y col., 2007; Attaran y col., 2009). La ruta del JA/ET, y la consiguiente respuesta a herida y a necrótrofos, se ha considerado antagonista de la ruta del SA, más específica

de la respuesta frente a biótrofos (Glazebrook, 2005). Generalmente las alteraciones genéticas que implican una mayor acumulación de SA, también implican una menor respuesta a JA (Petersen y col., 2000; Robert-Seilaniantz y col., 2011). Actualmente, se considera que la respuesta final de la planta depende de la fina regulación del equilibrio hormonal global, tanto de los umbrales alcanzados, como de la cinética de acumulación de cada molécula (Robert-Seilaniantz y col., 2011). Por ejemplo, un aumento temprano y local de la concentración de JA se ha relacionado con la activación de la SAR, una respuesta que normalmente está asociada con la ruta del SA (Truman y col., 2006).

La unidad central de regulación de la ruta del JA es el complejo co-receptor formado por COI1 (*coronatine insensitive 1*) y JAZ (*jasmonate ZIM-domain*). COI es el receptor de JA-Ile, que tras su unión media la degradación de los represores de JAZ mediante el proteasoma 26S, activándose factores de transcripción, que permiten la expresión de genes dependientes de JA (Kazan y Manners, 2012; Park y col., 2013).

Como se ha mencionado antes, OPDA es el precursor del JA que juega un papel importante en los mecanismos de defensa de la planta, de manera independiente a JA/JA-Ile (Stintzi y col., 2001; Park y col., 2013). El OPDA mantiene la resistencia de las plantas de *Arabidopsis* frente a herbívoros y patógenos en ausencia de la ruta mediada por JA/JA-Ile (Escalante-Pérez y col., 2011; Stotz y col., 2011).

Por último, cabe recordar que algunos patógenos son capaces de producir compuestos análogos de las hormonas para alterar este fino equilibrio y aprovecharse de las relaciones antagónicas entre las distintas rutas. Un buen ejemplo es la producción de coronatina (mencionado anteriormente), un análogo estructural de JA-Ile que producen algunas cepas de la bacteria *P. syringae* para incrementar su proliferación (Tsai y col., 2011; Geng y col., 2014).

Ruta mediada por etileno

La síntesis de ET y la señalización dependiente del mismo tienen lugar a través de una ruta muy conservada en el mundo vegetal. El ET actúa como modulador de las respuestas de defensa de la planta frente a estreses bióticos y abióticos (Shakeel y col., 2013).

El ET se sintetiza a partir de la metionina, que es convertida a S-adenosil-metionina por medio de la ADS (S-AdoMet sintasa). La S-adenosil-metionina es convertida en 5'-metiltioadenosina por la enzima ACC sintasa (ACS) y a través del ciclo de Yang, vuelve a producir metionina y ácido 1-aminociclopropano (ACC), un ácido carboxílico precursor del etileno. El ACC es oxidado por la ACC oxidasa (ACO) dando lugar a etileno, cianuro y dióxido de carbono.

Estudios de análisis filogenéticos y de caracterización estructural realizados en *Arabidopsis* evidencian la existencia de genes que codifican 5 receptores de ET divididos en dos subfamilias: Subfamilia 1 (ETR1 y ERS1) y la subfamilia 2 (ETR2, ERS2 y EIN4), todos con un dominio de actividad quinasa (Stepanova y Alonso, 2009; Shakeel y col., 2013). El papel del ET en la respuesta de defensa de la planta ha sido motivo de controversia a lo largo de los años, pero actualmente se acepta la idea de que puede regular el desarrollo de los síntomas de la enfermedad de manera positiva o negativa, dependiendo de la interacción planta-patógeno (van Loon y col., 2006).

En algunos estudios se observó que cuando el ET es aplicado antes de la inoculación con el patógeno no tiene un efecto claro, o bien reduce el avance de la infección, mientras que si las plantas son tratadas después, los síntomas de la infección se aceleran (van Loon y col., 2006). Posiblemente la cantidad de ET necesaria para el establecimiento y regulación de las respuestas defensivas apropiadas es variable, lo que puede haber promovido la evolución de los patógenos en función del nivel de ET con el que pueden alterar la respuesta de la planta en su beneficio (Adie y col., 2007).

Como se ha mencionado con anterioridad, muchas de las interferencias entre la ruta del SA con las de JA y ET consisten en una represión mutua (Glazebrook y col., 2003), como por ejemplo, la sobreexpresión de *ERF1* en *Arabidopsis*, que incrementa la resistencia mediada por ET a *B. cinerea*, pero reduce la resistencia mediada por SA frente a *P. syringae* (Berrocal-Lobo y col., 2002). En general, se considera que el ET juega un papel importante en la resistencia a la enfermedad, dependiendo de la especie vegetal provocando respuestas negativas y/o positivas en la respuesta de defensa de la planta frente a *B. cinerea* (Son y col., 2012).

Ruta mediada por ácido abscísico

El ABA interviene en numerosos procesos que tienen lugar en la planta, como el desarrollo vegetativo, la dormición de semillas, la apertura de los estomas (Audenaert y col., 2002), pero también está presente en las respuestas frente a estreses abióticos y bióticos (Adie y col., 2007). En plantas, el ABA deriva de carotenoides vía escisión oxidativa, siendo el precursor directo ABA-aldehído. En hongos existe una ruta de síntesis de ABA directa, siendo el 1,4'-trans-diol de ABA el precursor directo en *B. cinerea* (Kettner y Dörffling, 1995). Cada vez existen más evidencias de que puede jugar un papel crucial en las interacciones planta-patógeno (de Torres-Zabala y col., 2009; Abuqamar y col., 2017). Su efecto sobre los distintos tipos de interacciones es un tema controvertido, ya que se han descrito casos en los que actúa como un regulador negativo de la resistencia (Mauch-Mani y Mauch, 2005; Asselbergh y col., 2007) y en otros casos ejerce de regulador positivo (Adie y col., 2007). Mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la síntesis de ABA resultaron más susceptibles a la infección con *P. syringae*, probablemente por no ser capaces de provocar el cierre estomático e impedir la entrada de la bacteria (Adie y col., 2007). En otro estudio en plantas de *Arabidopsis* deficientes en la síntesis de ABA se observó que eran susceptibles frente a los hongos necrótrofos *Pythium irregulare* y *A. brassicicola* (Adie y col., 2007; Flors y col., 2008). Esto sugiere que el ABA actúa en este caso como regulador positivo en las respuestas de defensa de la planta frente a estos patógenos. Sin embargo, una aplicación exógena de ABA incrementa su susceptibilidad frente a *B. cinerea*, teniendo una regulación negativa frente a este hongo necrótrofo (Audenaert y col., 2002). Otro efecto negativo es la producción de coronatina por *P. syringae* mediada por ABA, que reprime el cierre de los estomas para facilitar la entrada de la bacteria (Melotto y col., 2006). Algunos autores han descrito que el mutante de tomate *sitiens*, deficiente en la producción de ABA, así como los mutantes de la ruta de biosíntesis en *Arabidopsis* con (*aa3-2* y *aba2-12*) y el mutante insensible a ABA *abi4* son más resistentes a *B. cinerea* (L'Haridon y col., 2011; Lai y col., 2014). Además, los mutantes de ABA de *Arabidopsis* mostraron mayor susceptibilidad frente a *P. irregulare* y a *Alternaria solani* (Adie y col., 2007). El ABA participa en las respuestas de defensa relacionadas con las alteraciones de la pared

celular (Hernández-Blanco y col., 2007), haciendo más compleja todavía su implicación en los procesos de defensa de la planta.

Por otra parte, el ABA puede interferir con las rutas del SA, JA y ET y viceversa (Robert-Seilaniantz y col., 2011). El ABA suprime la acumulación de SA y de lignina en la interacción *Arabidopsis-P. syringae* (Mohr y Cahill, 2007). La sobreexpresión de ERF1 y ORA59, factores de transcripción en plantas de *Arabidopsis*, aumenta la resistencia frente a *B. cinerea* (Lorenzo y col., 2003). También se ha descrito que el ABA promueve la susceptibilidad frente a *B. cinerea* reduciendo la expresión de genes implicados en la ruta del JA/ET, como por ejemplo *PDF1.2*. La supresión del gen *PDF1.2* no puede revertirse tras el tratamiento con JA y ET, poniendo de manifiesto la antagónica interacción entre ABA y JA/ET (Anderson y col., 2004).

Ruta mediada por auxinas

Las auxinas están implicadas en diversos procesos del crecimiento y desarrollo vegetal. La auxina mejor caracterizada es el ácido indolacético (IAA), que está implicado en procesos de desarrollo de la planta y en estreses bióticos y abióticos (González-Lamothe y col., 2012). La acumulación de IAA está finamente regulada por su síntesis, transporte y degradación vía rutas oxidativas (Normanly, 2010). La activación de la señalización por auxinas reprime la síntesis de SA y su ruta de señalización (Robert-Seilaniantz y col., 2011). Navarro y colaboradores (2006) demostraron que la inducción de la señalización por auxinas hacía a las plantas más susceptibles a *P. syringae* y al atenuar esa señalización por silenciamiento de los receptores de auxinas, aumentaba la resistencia. Además, el tratamiento con auxinas sintéticas incrementaba los síntomas cloróticos, aunque no afectaba el crecimiento bacteriano. Se ha descrito también que *P. syringae* produce auxinas para promover su proliferación, convirtiendo el indol acetonitrilo de la planta en ácido IAA, mediante una nitrilasa (Howden y col., 2009). González-Lamothe y colaboradores (2012) confirmaron que *P. syringae* y *B. cinerea* podían secuestrar auxinas del metabolismo de *Arabidopsis*, generándose una acumulación del conjugado IAA-aspartato, que promueve el crecimiento y desarrollo del patógeno en la planta mediante la regulación de genes de virulencia. Por otra parte, el tratamiento con SA promueve la estabilización de las proteínas auxinas/ácido indolacético (AUX/IAA), que regulan negativamente la señalización por auxinas (Wang y col., 2007).

Rutas mediadas por citoquininas

La síntesis de citoquininas (CKs) tiene lugar mediante la ruta de la isopentenil transferasa (IPT), que transfiere la cadena isopentenil del metil-eritritol fosfato (MEP) hasta el sustrato de adenosina fosfato. Posteriormente, las CKs son activadas por las enzimas llamadas “Lonely Guy” (LOG) (Chanclud y Morel, 2016). Las CKs pueden clasificarse como isoprenoides o aromáticas, dependiendo de si tienen una cadena isoprenoide o aromática en el extremo N⁶-terminal. Se considera que las CKs isoprenoides son las que predominan en plantas (Albrecht y Argueso, 2017). La señal de transducción de CKs en planta utiliza un sistema de fosforilación de dos componentes, una ruta de señalización comúnmente utilizada por hongos y bacterias para percibir y responder a señales medioambientales (Hwang y col., 2012). El papel de las CKs en la defensa de las plantas muestra similitudes con el de las auxinas (Robert-Seilaniantz y col., 2007). Ambas hormonas son producidas por patógenos biótrofos y están asociadas con la supresión de la HR (Robert-Seilaniantz y col., 2011). Muchos hongos patógenos biótrofos, como *Cladosporium fulvum*, *Blumeria graminis*, *Pyrenopeziza brassicae* y *Venturia inaequalis* producen CKs, pero su producción y secreción depende del estilo de vida del patógeno. Sin embargo, no se conocen hongos necrótrofos que las produzcan (Walters y McRoberts, 2006; Chanclud y Morel, 2016). Las CKs están implicadas en enfermedades causadas por patógenos que inducen la formación de tumores en el hospedador. Unos niveles moderados de CKs favorece unas condiciones de desarrollo para patógenos biótrofos, mientras que niveles altos activan la inmunidad primaria de la planta mediante la ruta dependiente de SA (Miller y col., 2017). Mediante análisis de microarrays se ha demostrado que *Plasmodiophora brassicae* reprime la ruta de degradación de CKs e induce la expresión de los receptores de estas hormonas y que la sobreexpresión de la citoquinina oxidasa confería resistencia a la planta frente a dicho patógeno (Siemens y col., 2006). Otro estudio demostró que las citoquininas pueden promover la resistencia a biótrofos induciendo la ruta de señalización del SA a través de NPR1 (Choi y col., 2010).

Rutas mediadas por giberelinas

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas constituidas por diterpenos tetracíclicos que participan en diferentes procesos vegetativos y se consideran reguladoras de respuestas medioambientales frente a estreses bióticos y abióticos (Colebrook y col., 2014). Las GAs, parecen tener un efecto opuesto al de las auxinas y las citoquininas en la defensa de la planta. Las GAs promueven el crecimiento de la planta mediante la degradación de las proteínas DELLA, que son represores del crecimiento de la planta (Harberd, 2003). En este caso, el efecto sobre la resistencia también depende del estilo de vida del patógeno. Navarro y colaboradores (2008) demostraron que la pérdida de función de las proteínas DELLA por mutación incrementa la resistencia de la planta a *P. syringae*, mediante la potenciación de las rutas de defensa dependientes de SA. Por otra parte, estos mismos mutantes son susceptibles a *A. brassicicola*, sugiriendo que las proteínas DELLA promueven la resistencia frente a necrótrofos y la susceptibilidad frente a biótrosos, en parte, mediante la regulación del equilibrio entre las respuestas dependientes de SA, JA y ET (Navarro y col., 2008). Los estudios realizados hasta el momento hacen pensar que las GAs no tienen un papel claro en la señalización de la respuesta inmune de la planta, ya que en algunos casos puede contribuir al desarrollo de la infección y en otros casos pueden ser requeridas para las respuestas de defensa de la planta.

Rutas mediadas por brasinosteroides

Los brasinosteroides (BRs) pertenecen a la clase de hormonas esteroidales polihidroxiladas, que juegan un papel importante en diversos procesos de desarrollo de la planta, pero también regulan positivamente respuestas de defensa frente a hongos, bacterias y virus patógenos (de Bruyne y col., 2014; Song y col., 2017). El tratamiento con BRs en tabaco y en arroz induce resistencia frente a varios biótrosos, independientemente de la señalización mediada por SA (Nakashita y col., 2003). Se ha descrito que los BRs median en la respuesta a estreses abióticos a través de NPR1 (Divi y col., 2010). Sin embargo, no siempre existe un efecto positivo de los BRs en defensa. El hongo *Pythium graminicola* es capaz de secuestrar BRs para promover la infección, explotándolos como factores de virulencia y así, alterar la resistencia de las plantas (de

Vleeschauwer y col., 2012). Por otra parte, se ha propuesto que la acción de los BRs podría residir en una compleja interacción con otras hormonas de la planta (Krishna, 2003; Nafisi y col., 2015). También se ha observado una alta resistencia frente a *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis* sobreexpresando la HMG-S (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa), una enzima implicada en la ruta del mevalonato citosólico, que es importante para proveer de precursores de diversos isoprenoides, como los BRs (Wang y col., 2012).

Los datos que se han obtenido a lo largo de los años demuestran la importancia de la homeóstasis de los BRs en el establecimiento de la inmunidad de la planta.

Respuestas de defensa de la planta mediadas por metabolitos secundarios y proteínas PR

Las rutas de señalización promueven, en última instancia, varios mecanismos de defensa que incluyen el reforzamiento de las paredes celulares, la síntesis de proteínas relacionadas con la defensa y una gran variedad de metabolitos secundarios. Globalmente las plantas producen más de 100.000 productos de bajo peso molecular, que se diferencian de los metabolitos primarios en que no son esenciales para la vida de la planta (Dixon, 2001).

Desde el punto de vista de la resistencia a patógenos, estos compuestos son clasificados como fitoanticipinas, las cuales son producidas de manera constitutiva o como fitoalexinas, cuya acumulación es inducible, de manera que su concentración en los tejidos aumenta súbitamente en respuesta a patógenos o a tratamientos químicos (Dixon, 2001). Algunos compuestos pueden ser considerados fitoanticipinas en unas especies y al mismo tiempo, fitoalexinas en otras. Las fitoalexinas son compuestos de diversa naturaleza, incluyendo terpenoides, glicoesteroides y alcaloides, entre otros. Como ejemplo podemos destacar la camalexina, implicada en la resistencia frente a diversos patógenos, puesto que los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en su síntesis (phytoalexin deficient, *pad*) son más susceptibles a dichos patógenos. Algunos de ellos son más susceptibles a *B. cinerea* y otros no (Ferrari y col., 2003). Otro ejemplo de fitoalexina es el resveratrol, sintetizado por diversas plantas, incluyendo la vid (Pedras y Ahiahonu, 2005). El resveratrol es el compuesto estilbénico mayoritario identificado en

los tejidos de la uva tras la infección por *B. cinerea* y se ha demostrado que se induce su acumulación como respuesta a la infección (Urena y col., 2003). La resistencia de la uva a la penetración de *B. cinerea* parece ser debida, en parte, a la rápida producción de resveratrol y compuestos derivados del mismo.

Las fitoanticipinas son compuestos glicosilados con actividad antimicrobiana de amplio espectro, entre los que destaca la α -tomatina, que es el componente mayoritario de las saponinas en tomate y que forma complejos con los esteroides de la membrana fúngica, provocando la formación de poros y, por tanto, la pérdida de la integridad de la membrana (Ito y col., 2007). Los ácidos fenólicos son componentes importantes del sistema defensivo de las plantas y forman parte de las fitoanticipinas. Muestran diversidad estructural, pero se caracterizan por poseer anillos aromáticos hidroxilados. Además, se ha comprobado su acción biocida *in vitro* contra bacterias, levaduras y hongos (Rivera-Carriles y col., 2005; Lee y col., 2005). En algunos casos se han correlacionado los cambios en el contenido y en el perfil de los ácidos fenólicos en el fruto con la susceptibilidad a patógenos. Por ejemplo, en la fresa los compuestos fenólicos disminuyen con la maduración, lo que se correlaciona con un aumento de la susceptibilidad a *B. cinerea* (Terry y col., 2004). Otro ejemplo es el ácido cafeico, cuyo contenido se correlaciona con la resistencia de diferentes clones de cebada al ataque por patógenos (Harrison y col., 2003). Otros compuestos que protegen a las plantas son las oxilipinas (mencionadas con anterioridad), que presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, siendo una respuesta universal de las plantas al ataque por patógenos (Prost y col., 2005).

La mayoría de las proteínas implicadas en la defensa son PRs, aunque pueden desempeñar otras funciones (van Loon y col., 2006). Algunas PRs son producidas bajo condiciones fisiológicas específicas, acumulándose en hojas senescentes, incluso cuando empieza la clorosis y también en frutos en maduración (Buchanan-Wollaston y col., 2003). A lo largo de la evolución se han diversificado tanto (se han llegado a clasificar en 17 familias), que además de formar parte de la defensa frente a un patógeno, también parece que median en otros procesos de la fisiología vegetal (Sels y col., 2008). La infección por *B. cinerea* induce la acumulación de algunas de estas proteínas (Sels y col., 2008), y la sobreexpresión en la planta de algunas de estas

proteínas, incrementan la resistencia, como es el caso de las 1,3- β -glucanasas (van Baarlen y col., 2004).

Algunas PRs se han clasificado en una familia por homología de secuencia, aunque pueden tener diferentes propiedades y diferir sustancialmente en su actividad biológica, como por ejemplo la proteína PR1. En tabaco se han descrito PR1-a, PR1-b y PR1-c, que son ácidas y extracelulares. Sin embargo, en tomate sus ortólogos más próximos son proteínas básicas (van Loon y col., 1994).

La mayoría de las PRs poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos *in vitro*, pero cuando son expresadas en plantas sólo reducen un número limitado de enfermedades, dependiendo de la naturaleza de la proteína, de la especie de la planta y del patógeno implicado. Otros ejemplos de PRs que participan durante la interacción planta-patógeno son la familia de las PR2, que son β -1,3-endoglucanasas, y las familias PR3, PR4, PR8 y PR11, que son quitinasas y podrían actuar contra hongos patógenos. Los miembros de la familia PR8 también poseen actividad lisozima, pudiendo actuar contra bacterias, mientras que las defensinas (PR12) tienen una amplia actividad antibacteriana y antifúngica (Thomma y col., 2002; Lay y Anderson, 2005).

Tras el ataque por el patógeno se ha visto que las distintas hormonas interfieren en la expresión de muchas PRs. Por ejemplo, hay PRs que son inducibles por JA/ET y su incidencia puede ser regulada por ABA (Audenaert y col., 2002; Mauch-Mani y Mauch, 2005; van Loon, 2006).

La respuesta sistémica inducida

Aparte de las respuestas de defensa basal, cuando las plantas entran en contacto con el patógeno, las lesiones producidas pueden resultar en la inducción de la resistencia local adquirida (LAR) pero, además, activarían un tipo de respuesta defensiva frente a posibles ataques futuros en otras partes de la planta, alejadas de la zona de infección. Esta respuesta inducida no requiere la activación de genes de resistencia específicos contra el patógeno y se desarrolla mediante la activación de mecanismos generales de defensa.

Podemos distinguir varios tipos de resistencia inducida. La SAR, se produce tras el ataque por un patógeno avirulento que estimula la HR, mediada por la respuesta PTI, de manera

que el patógeno no es capaz de invadir la planta (Kamatham y col., 2016). Cuando se activa la SAR, una interacción normalmente compatible puede convertirse en incompatible (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). En general, se considera que la SAR es un mecanismo efectivo frente a hongos biótrofos y bacterias, pero no contra hongos necrótrofos como *B. cinerea* y *Alternaria alternata* (Ryals y col., 1996; Metraux y col., 2002). La SAR está mediada por el SA, ya que su acumulación es el primer evento que se observa en su desarrollo a nivel local y sistémico, aunque se ha demostrado que el JA puede jugar un papel importante en su establecimiento (Truman y col., 2007). También se han identificado nuevos metabolitos que la inducen como el ácido azelaico y el ácido benzoilo salicílico (Kamatham y col., 2016; Singh y col., 2017).

Otro tipo de resistencia inducida es la denominada resistencia sistémica inducida (ISR, Induced Systemic Resistance). Está producida por bacterias no patógenas, como las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas. La ISR es efectiva frente a hongos, bacterias, virus, herbívoros e insectos y se caracteriza por su dependencia de JA y ET (Pietersen y van Loon, 1999; Ahn y col., 2007; Pangesti y col., 2016). En muchos casos la ISR está asociada con el *priming*, del que hablaremos más adelante, que permite activar con más rapidez y eficacia los mecanismos de defensa tras el ataque del patógeno como el estallido oxidativo, el refuerzo de la pared celular, la acumulación de enzimas relacionadas con la defensa y la producción de metabolitos secundarios (Nie y col., 2017).

La resistencia inducida por herida (WIR, Wound-Induced Resistance) sería otro tipo de resistencia sistémica, que está asociada al daño producido por insectos y herbívoros (Gatehouse y col., 2002) y que puede aumentar la resistencia frente a un amplio espectro de patógenos, como *B. cinerea* (Beneloujaephajri y col., 2013). Chassot y colaboradores (2008) observaron una mayor protección frente a *B. cinerea* en hojas de *Arabidopsis* previamente heridas. También se ha descrito que el oxalato producido por *B. cinerea* interfiere en la concentración de calcio, que actuaría como mensajero temprano para la inducción de la WIR frente a este hongo (Beneloujaephajri y col., 2013).

Así pues, la resistencia inducida es un mecanismo efectivo, un estado de mejora de la capacidad de defensa que permite a la planta resistir a ataques futuros por patógenos.

En la figura XII se muestra un esquema representativo de las respuestas de defensa tras la percepción por patógenos o elicitores químicos.

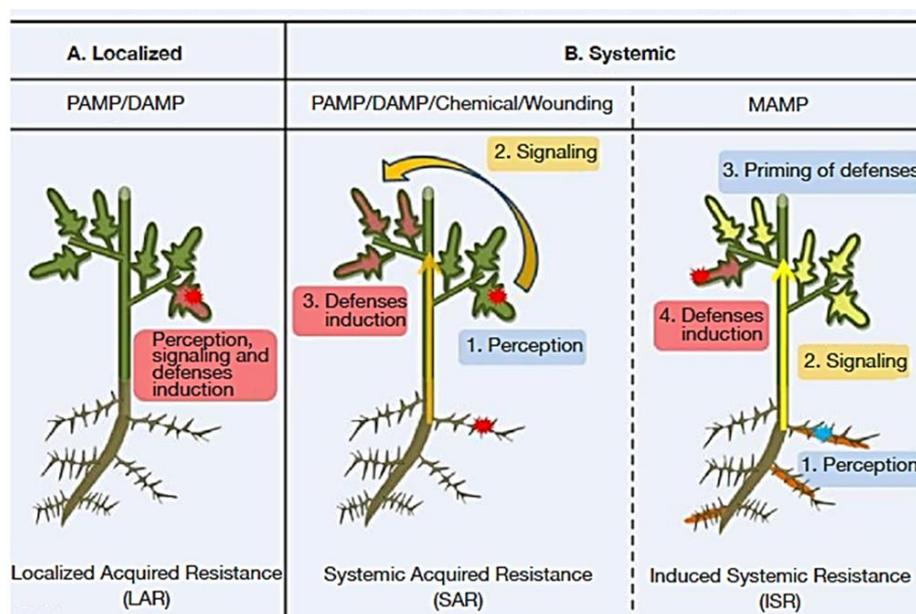


Figura XII. Modelo esquemático de las respuestas inducidas por la planta tras la percepción de patógenos, daño o elicitores químicos y su relación con el sistema inmune de la planta. PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern; patrones moleculares asociados a patógenos), MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern; patrones moleculares asociados a microbios), DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern; patrones moleculares asociados a daño). Figura extraída de Henry y col., 2012.

Respuestas de las plantas mediante inductores

La resistencia inducida (IR, Induced Resistance) juega un papel importante en la protección de la planta frente a un amplio espectro de patógenos y no solo se activa por estímulos biológicos, sino que puede generarse mediante el tratamiento con compuestos denominados inductores de defensa. Algunos de los inductores sintéticos mejor caracterizados son el ácido 2,6-dicloro isonicotínico (INA), el ácido benzo-(1,2,3)thiadiazole-7-carbotionico S-metil éster (BTH) y el ácido β -aminobutírico (BABA) (Oostendorp y col., 2001; Flors y col., 2008; Conrath, 2011; Martínez-Aguilar y col., 2016). El BTH es efectivo contra *B. cinerea* y BABA puede inducir resistencia frente a un amplio espectro de patógenos necrótros y biótrosos en *A. thaliana*, además de actuar mediante un mecanismo de *priming* (Vicedo y col., 2009; Mauch-Mani y Mauch, 2005). El *priming* permite a las plantas responder a bajos niveles de un estímulo biótico o abiótico de manera rápida y fuerte, lo que está relacionado con el desarrollo de una

inmunidad local y sistémica, así como con la tolerancia a estrés (Conrath y col., 2015). Nuestro grupo de investigación demostró la eficacia del tratamiento con ácido hexanoico (Hx) como inductor de defensa (Aranega y col., 2014). Este compuesto natural incrementa la resistencia de plantas de tomate y *Arabidopsis* frente a *B. cinerea* y *P. syringae* (Leyva y col., 2008; Vicedo y col., 2009; Kravchuk y col., 2011). Finiti y colaboradores (2014) determinaron que en las plantas de tomate tratadas con Hx se potenciaba la respuesta basal frente a *B. cinerea*, destacando un incremento en los mecanismos de control del ambiente oxidativo. El tratamiento con inductores para potenciar la resistencia de la planta frente a patógenos difiere de la visión tradicional, que se fundamenta en el uso de productos químicos, que en muchos casos son tóxicos. La utilización de compuestos naturales como el Hx constituye pues una alternativa interesante para la protección de las plantas frente a enfermedades.

El papel de la pared celular en la interacción planta-patógeno

La pared celular de las plantas juega un papel fundamental en diversos procesos como el crecimiento vegetativo, la resistencia mecánica, la comunicación intercelular, la defensa frente a patógenos y las interacciones con el medio externo (Cosgrove, 2005; Hamann, 2012). El papel de la pared celular vegetal en la invasión de patógenos es especialmente importante porque una rotura de su matriz favorece la colonización del patógeno, aunque constituye un reservorio de señales y de compuestos antimicrobianos que son liberados durante la degradación de la pared celular (Miedes y col., 2014). La alteración de la integridad de la pared celular vegetal puede ser percibida por un sistema de monitorización, asociado con los DAMPs liberados tras la alteración, que inician respuestas compensatorias para restaurar la pared. Este sistema de monitorización funciona incluso durante la infección por patógenos que modifican la pared para favorecer su colonización (Hamann, 2015).

La pared celular primaria se sintetiza durante la expansión celular en el desarrollo vegetativo de la planta y está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa, pectinas, proteínas estructurales y enzimas (Miedes y col., 2014). La pared celular secundaria es sintetizada en células especializadas y contiene los mismos polisacáridos que la primaria, pero presenta un mayor porcentaje de celulosa altamente cristalina y

polímeros como el xilano y la lignina, que le confieren dureza y resistencia. Así pues, la celulosa es el componente principal de la pared celular primaria y secundaria (Figura XIII).

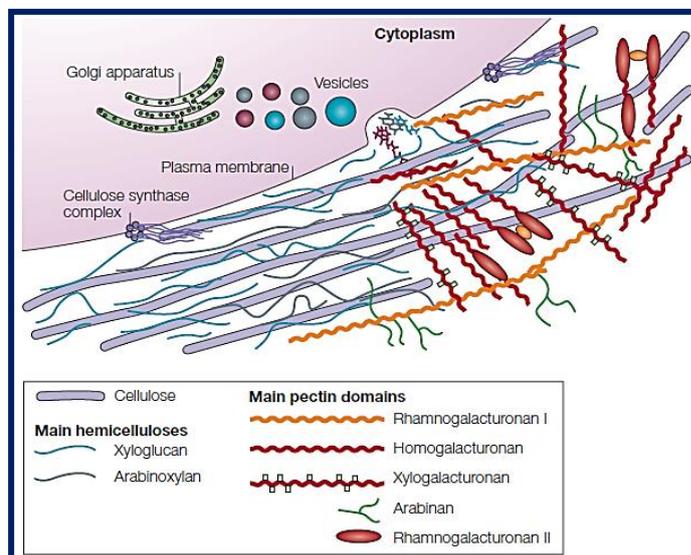


Figura XIII. Esquema representativo de la organización de los diferentes componentes de la pared celular vegetal. Figura extraída de Cosgrove, 2005.

Las diferentes subunidades del complejo celulosa sintasa (CESA) son necesarias para la formación de la pared celular secundaria. Se han descrito en *Arabidopsis* mutantes deficientes en diversas subunidades CESA que muestran una mayor resistencia frente a numerosos patógenos, entre ellos, *P. syringae* y *B. cinerea* (Miedes y col., 2014). La subunidad CESA3 estaría implicada en la producción de lignina para reforzar la pared celular (Hamann, 2015).

Las cadenas de celulosa se organizan en fibrillas y éstas, a su vez, se organizan en capas que rodean la célula. Cada fibrilla está compuesta de 30-36 cadenas de celulosa unidas entre ellas por puentes de hidrógeno para formar un material cristalino e insoluble. Estas fibrillas están interconectadas mediante moléculas de hemicelulosa de alto peso molecular (principalmente xiloglucano y arabinoxilano), que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y están embebidas en una matriz de pectina (Cosgrove, 2005; Vorwerk y col., 2004). Esta red de polisacáridos de alto peso molecular, que están entrelazados por enlaces iónicos y covalentes, constituye una estructura resistente frente a la penetración. En esta compleja red de polisacáridos se localizan una gran

cantidad de proteínas y enzimas que contribuyen a la definición de arquitectura de la pared celular, participando además en diversos procesos dinámicos como la expansión celular, maduración o la señalización de respuestas a estreses.

En determinados procesos vegetativos como la señalización, la maduración o la expansión celular es necesario que se lleve a cabo la degradación de los polisacáridos de la pared celular. Este proceso depende de la participación de muchas enzimas que se pueden clasificar en dos grupos: exopolisacaridasas y endopolisacaridasas (Fry, 2004). Las exopolisacaridasas actúan sobre los oligosacáridos y los polisacáridos desde los extremos no reductores o desde los grupos laterales, liberando monosacáridos y disacáridos. En cambio, las endopolisacaridasas hidrolizan enlaces en cualquier posición de la cadena. Estas enzimas se localizan en la pared celular y en la membrana plasmática, y, además, pueden participar en procesos metabólicos de ensamblaje de la pared y en procesos catabólicos de desestructuración de la misma (Molhoj y col., 2002). En *Arabidopsis* y en tomate, el conjunto de las exo y endopolisacaridasas descritas forman parte de la superfamilia de las transglicosidasas y de las glicosil hidrolasas (GH).

En *Arabidopsis*, la familia de las GH está dividida en subfamilias que están numeradas en función de las afinidades de secuencia (Henrissat y col., 2001). Las Glucanasas se pueden clasificar en tres grandes grupos: Las 1,4- β -glucanasas, las 1,3- β -glucanasas y las 1,4-1,3- β -glucanasas (Molhoj y col., 2002; Minic y col., 2006; Urbanowick y col., 2007b). Las Endo-1,4- β -glucanasas (EGs) se conocen también como “celulasas” y pertenecen a la familia 9 de las GH y en *Arabidopsis* está constituida por 25 miembros que comparten el mismo dominio catalítico en el extremo C-terminal. En tomate, las EGs constituyen una familia de 8 miembros divergentes que también comparten dominios catalíticos (Libertini y col., 2004). En general, las 1,4- β -glucanasas son capaces de hidrolizar el enlace β -1,4 entre dos residuos de glucosa y tienen especificidad por la celulosa soluble no cristalina y sus derivados, como la carboximetil-celulosa, xilanos, 1,3-1,4- β -glucanos y glucomananos (Molhoj y col., 2001; Libertini y col., 2004; Urbanowicz y col., 2007). Aunque no hay mucha información sobre el papel de las EGs en el desarrollo de la planta, parece ser que su actividad está asociada mayoritariamente con las modificaciones que tienen lugar en los xiloglucanos de la pared celular (Cosgrove, 2005). En la presente Tesis se dedica un capítulo a la endo-1,4- β -glucanasa Korrigan 1 (KOR1), perteneciente a la familia 9 de las GH. KOR1 estaría implicada en la biosíntesis de celulosa. Estudios

realizados previamente con el mutante de inserción *kor1-1* de *Arabidopsis*, que presenta un fenotipo enano, indican que KOR1 es necesaria para el ensamblaje normal y la elongación de la pared celular (Nicol y col., 1998). Por otra parte, se ha descrito que PttCel9A1 (ortólogo de KOR1 en *Populus trichocarpa*) disminuye la cristalinidad de la celulosa (Takahashi y col., 2009). Estudios recientes apoyan la existencia de una interacción entre KOR1 y proteínas CESA que confirma la participación de KOR1 en la síntesis de celulosa, así como en el tráfico intracelular de las proteínas CESA en la pared celular primaria (Mansoori y col., 2014).

Cuando el patógeno llega a la planta, la primera barrera que se encuentra es la pared celular. El daño en el tejido vegetal se reduce si la penetración del patógeno resulta fallida y la planta puede activar respuestas defensivas eficaces, pero la pared celular no solo constituye una barrera estructural, sino que también actúa como defensa activa contra el avance del patógeno. Se podría decir que la pared celular tendría una función dual, ya que constituye un reservorio dinámico de proteínas antimicrobianas y de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de muchos patógenos (Thomma y col., 2002; Miedes y col., 2014) y, además, las células refuerzan la pared celular en la zona adyacente del sitio de penetración para frenar el avance del patógeno. En el lugar de la penetración se forma una estructura denominada papila que ejerce de barrera física en donde se acumulan intermediarios de ROS, como el H₂O₂, polisacáridos como la lignina y varios compuestos fenólicos como los ácidos cafeico y ferúlico (Soylu y col., 2005). Esta respuesta local va acompañada de un aumento en enzimas hidrolíticas y de proteínas con propiedades antifúngicas (Ryals y col., 1996). La deposición de polisacáridos resistentes a la acción de las enzimas hidrolíticas que producen los propios patógenos constituye un mecanismo efectivo de defensa para la planta y se considera que esta pueda ser la principal función biológica de la papila, formada principalmente por calosa (Smart y col., 1986).

La acumulación de calosa es una estrategia importante de la planta para la formación de la papila, ya que impide la entrada de diversos patógenos biótrofos, aunque también se ha descrito en patógenos necrótrofos como *A. brassicicola* en *A. thaliana*. También se ha descrito su acumulación como mecanismo de defensa en tomate frente a *B. cinerea* (Flors y col., 2007; Voigt, 2014).

La calosa es un polisacárido formado por residuos de glucosa unidos por enlaces 1,3- β -D que se deposita entre la membrana plasmática y la cara interna de la pared celular primaria y su acumulación puede formar parte de la HR (Donofrio y Delaney, 2001; Dong y col., 2008; Hamann, 2015). NPR1 y los factores de transcripción WRKY podrían mediar la inducción de genes del complejo calosa sintasa (Dong y col., 2008). La calosa se considera un factor en la regulación de la permeabilidad de los plasmodesmos, unos canales transmembrana que interconectan el citoplasma, la membrana plasmática y el retículo endoplásmico de células vegetales contiguas (Zavaliev y col., 2011; De Storme y Geelen, 2014). La acumulación de calosa a nivel de plasmodesmos regula la apertura de estos canales para controlar el transporte célula a célula de macromoléculas. Una disminución en la deposición de calosa relaja la apertura de estos canales favoreciendo el tráfico molecular. Se ha observado en varias especies que el flujo de calcio en el lumen causa una rápida acumulación de calosa, mientras que su degradación se ha relacionado con niveles bajos de calcio. Estudios de deposición de calosa en plantas mutantes sugieren un mecanismo diferente de acumulación de calosa a nivel de plasmodesmos que en la papila (Zavaliev y col., 2011). Por otra parte, se ha sugerido una migración de fibrillas de calosa a la pared celular que impermeabiliza sus poros en la zona de infección para restringir la entrada de enzimas secretadas por patógenos que degradan la pared celular (Jin y Mackey, 2017).

La deposición de calosa en el sitio de infección obstaculiza la expansión de varios patógenos como *P. cucumerina* o *A. brassicicola* en *Arabidopsis* (Ton y Mauch-Mani, 2004; Flors y col., 2005). Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la deposición de calosa también obstaculiza el avance de *B. cinerea* en *Arabidopsis* y tomate (Flors y col., 2007; Finiti y col., 2014; López-Cruz y col., 2017). Otros autores han descrito que la deposición de calosa es efectiva en tomate frente a la infección del virus del mosaico del pepino CMV (Xu y col., 2003) y frente a *P. syringae* (Tang y col., 1999). En *Arabidopsis*, la deposición de calosa se considera un biomarcador de la activación de la respuesta PTI, que se pone en marcha tras el reconocimiento de los MAMPs (Hauck y col., 2003). Por lo tanto, la deposición de calosa constituye un mecanismo eficaz y juega un papel importante en la respuesta de la planta.

En los últimos años se han realizado estudios que indican que la pared celular de la planta presenta propiedades señalizadoras implicadas en la coordinación del

crecimiento y desarrollo vegetativo, así como en la protección frente a patógenos. Se ha demostrado que en determinadas circunstancias las células de la planta perciben cambios en la composición de la pared y responden activando rutas de señalización. Por ello, la pared celular podría actuar como un sensor mediante el cual, se podrían coordinar de manera eficaz diversas respuestas de la planta (Vorwerk y col., 2004; Hückelhoven y col., 2007).

Se han identificado fragmentos derivados de los polisacáridos de la pared celular fúngicos y de la planta capaces de activar respuestas de defensa. Estos oligosacáridos se pueden clasificar en tres grandes grupos: quitinas, glucanos fúngicos y oligosacáridos derivados de los polisacáridos de la pared celular de la planta (Ramonell y col., 2002). Entre éstos últimos se encuentran los oligogalacturónidos OGs, que son los mejor caracterizados (Ridley y col., 2001). Los OGs proceden de la degradación de pectinas mediante enzimas hidrolíticas, como las poligalacturonasas (PGs) y las pectin metilesterasas (PMEs), que son secretadas por el patógeno o por la planta. Se ha descrito que los OGs están relacionados con rutas de señalización que, no solo regulan el desarrollo y crecimiento vegetativo de la planta, sino que además pueden activar respuestas de defensa (Vorwerk y col., 2004). Los OGs liberados por la degradación de pectinas son capaces de inducir la acumulación de fitoalexinas, la síntesis de quitinasas y glucanasas y generar estrés oxidativo (Ferrari y col., 2007; Galletti y col., 2008). El tratamiento con OGs en *Arabidopsis* puede inducir la resistencia frente a *B. cinerea* activando la síntesis de camalexina, de manera independiente a las rutas de SA, JA y ET (Ferrari y col., 2007).

La composición de la pared celular vegetal varía de un tipo celular a otro y entre las diferentes especies (Vorwerk y col., 2004). Muchas de las bacterias fitopatógenas colonizan los espacios extracelulares fuera de la pared celular en lugar de invadir las células vegetales y como se ha mencionado con anterioridad, algunas cepas del género *Pseudomonas* presentan un sistema de secreción de tipo III (T3SS), el cual, traslada efectores proteicos al interior de la célula infectada. Estos efectores son capaces de alterar procesos celulares de la planta para desactivar las defensas y así conseguir una infección más efectiva. Por lo tanto, se producen cambios en la pared celular de la planta y se genera, entre otras cosas, la papila (Bestwick, 1995). La formación de la papila obstaculiza el avance del patógeno haciendo que la pared celular de la planta sea más

difícil de penetrar. Estudios previos en nuestro grupo de investigación demostraron la conexión de la actividad de las EGs y las respuestas de las plantas a diversos estreses. Las plantas de tomate transgénicas con la expresión anulada de las EGs TomCel1 y TomCel2, mostraron mayor resistencia frente a *B. cinerea* y *P. syringae* (Flors y col., 2007). La ausencia de diferentes EGs en plantas mutantes de *Arabidopsis*, especialmente el mutante de inserción *kor1-1* (deficiente en la EG KOR1), mostró mayor resistencia frente a *B. cinerea* (Finiti y col., 2013). Por otra parte, *B. cinerea* posee al menos 6 genes que codifican PGs cuya expresión es dependiente del tipo de planta y de las condiciones de incubación (ten Have y col., 2001). La delección de dos de ellos supone una reducción significativa de la virulencia en muchas plantas huésped (Kars y col., 2005). Las PME (mencionadas con anterioridad) facilitan la acción de las PGs, jugando un papel importante en el avance del hongo, especialmente en tejidos vegetales ricos en pectinas con alto grado de metilación, como las hojas (van Kan, 2006). Lionetti y colaboradores (2007) demostraron que la expresión de inhibidores de PME endógenas en plantas de *Arabidopsis* confirió mayor resistencia a *B. cinerea*, sin que se viera afectada la PME del hongo. Así pues, el grado de esterificación de las pectinas de la pared celular de la planta puede ser un factor limitante para el crecimiento de *B. cinerea*.

Estudios recientes demuestran que la aplicación de calcio exógeno estabiliza la pared celular de la planta y la protege de enzimas de degradación de la pared, teniendo el calcio un efecto directo sobre las pectinasas y sobre la pared celular de *B. cinerea* (Sasanuma y Suzuki, 2016). Además, estos autores encontraron una relación positiva entre la actividad β -glucosidasa y la patogenicidad de *B. cinerea* en frutos de manzana. La presencia de calcio estimulaba la producción activa de β -glucosidasa y el exceso extracelular de esta enzima podría desencadenar la producción de fitoalexinas, aumentando la resistencia frente a *B. cinerea*. Por lo tanto, las observaciones descritas anteriormente apoyan la idea de que la actividad metabólica de la pared celular de la planta está íntimamente implicada en la interacción planta-patógeno, además de constituir una barrera física.

Objetivos

Antecedentes

A lo largo de los años se ha intentado dilucidar los mecanismos empleados por las plantas para defenderse de diversos estreses, como los producidos por patógenos.

En la presente Tesis se pretende realizar una caracterización del papel jugado por distintas rutas de señalización en las respuestas de defensa de las plantas frente a patógenos, mediante dos aproximaciones: La primera consiste en un estudio del papel que juega la Endo-1,4- β -Glucanasa (EG) KOR1 (que se requiere para la producción de celulosa) en las respuestas de las plantas, infectando plantas de *A. thaliana* defectivas en esta enzima (mutante de inserción *kor1-1*) y su cultivar silvestre Wasselewskija (Ws) con la bacteria hemibiotrofa *P. syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst*). En estudios previos se demostró que la ausencia de ciertas endoglucanasas alteraba la resistencia frente a *B. cinerea* y *P. syringae* en tomate y en *A. thaliana*, afectando a la deposición de calosa y a las rutas de señalización de hormonas implicadas en la defensa (Flors y col., 2007; Finiti y col., 2013). En concreto, las plantas *kor1-1* fueron mas resistentes a *B. cinerea*, pudiendo constituir factores de susceptibilidad frente a dicho necrótrofo (Finiti y col., 2013).

La otra aproximación consiste en el estudio del papel de la señalización redox en las respuestas de las plantas. Para ello se aborda el estudio de plantas de *A. thaliana* y de tomate (*S. lycopersicum*) infectadas con mutantes de *B. cinerea* deficientes en actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo redox del hongo. Se analiza el impacto producido en las respuestas de defensa en plantas infectadas con el mutante *Δbcso1*, que carece de la enzima superóxido dismutasa Cu-ZnSOD, cuya función es catalizar la dismutación de O_2^- a H_2O_2 . Estudios previos en este mutante demostraron una reducción de su virulencia en plantas de judías (Rolke y col., 2004; Patel y col., 2008). Por otra parte, se estudian las respuestas de defensa tras la infección con mutantes de *B. cinerea* deficientes en las diferentes subunidades del complejo enzimático NADPH oxidasa (Nox): *ΔbcnoxA*, *ΔbcnoxB*, *ΔbcnoxAB* y *ΔbcnoxR*. Este complejo constituye una de las principales fuentes de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estudios previos demostraron que los Nox contribuyen a la homeóstasis redox y a la virulencia del hongo, donde cada subunidad desempeña una función distinta (Segmüller y col., 2008; Tudzynski y col., 2012; Siegmund y col., 2013, 2015).

Los objetivos específicos que se han planteado en la presente Tesis doctoral son:

1.- Análisis funcional de la endoglucanasa KOR1 en la interacción *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae*.

- Estudio de las respuestas de defensa en plantas de *A. thaliana* en ausencia de la Endo-1,4- β -Glucanasa (EG) KOR1 frente a la bacteria hemibiótrofa *P. syringae*.
- Estudio de la posible relación existente entre las respuestas del mutante de inserción de *A. thaliana kor1-1* y el factor de virulencia coronatina mediante la infección con el mutante deficiente en la producción de coronatina *CmaA* (COR⁻) de *P. syringae*.

2.- Análisis del papel desempeñado por el estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana* y de *S. lycopersicum* frente a *B. cinerea*.

- Análisis de las respuestas a estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana* y de tomate (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig) frente al mutante $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*, deficiente en la actividad Cu-ZnSOD de la enzima superóxido dismutasa.
- Análisis de las respuestas a estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana* y de tomate (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig) en ausencia de las diferentes subunidades del complejo Nox de *B. cinerea*.

Materiales y métodos

Genotipos:

Para el análisis de endo-1,4- β -glucanasas (EGs) se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* del mutante de inserción *kor1-1* (At5g49720; NASC ID: N298) y su cultivar silvestre Wasselewskija (Ws), cedidas por la Dra. Samantha Vernettes (INRA, Francia). El mutante *kor1-1* es defectivo en la EG KOR1, esencial para la síntesis de celulosa. Presenta fenotipo enano con hipocotilo corto y de superficie foliar irregular (Nicol y col., 1998).

Para el estudio del estrés oxidativo en las respuestas de defensa de la planta frente a patógenos se emplearon plantas de *A. thaliana* N70000 (cepa WT) y plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cultivar (cv) Ailsa Craig. El ecotipo N70000 fue obtenido del NASC [European Arabidopsis Stock centre (www.arabidopsis.com)].

Cultivo de plantas

Las semillas de *Arabidopsis* se hidrataron previamente en agua destilada y se incubaron en una cámara a 4°C, en oscuridad, durante 48 h para estimular su germinación. Una vez germinadas, las plántulas se trasplantaron de forma individual en discos de turba prensada previamente hidratados (www.jiffy.com) de volumen aproximado de 60mL y se continuó su incubación en la cámara de cultivo durante cuatro semanas más a 23°C/día y 19°C/noche, con 8 h de luz diarias y 70% de humedad relativa para su uso en ensayos de laboratorio.

Las semillas de tomate *Solanum lycopersicum* cv Ailsa Craig se sembraron en semilleros y se dejaron crecer hasta la cuarta semana de desarrollo para su uso en ensayos de laboratorio.

Las plantas de tomate destinadas a la producción de semillas y posterior uso se cultivaron en invernadero y se trasplantaron individualmente en macetas de turba de unos 150 mL hasta completar su desarrollo para la extracción de semillas a partir de los frutos generados. Las semillas de *Arabidopsis* destinadas para el mismo fin se cultivaron en cámaras de cultivo en el laboratorio. Para los ensayos experimentales en el laboratorio se emplearon plantas de *Arabidopsis* y de tomate de cuatro semanas de desarrollo.

Microorganismos patógenos

Las bacterias utilizadas en esta Tesis fueron *Pseudomonas syringae* patovar (pv) *Tomato* DC3000 (*Pst*) cedida por el Dr. Murray Grant (*University of Exeter, UK*) y el mutante de *P. syringae* *CmaA* (*cor*⁻) cedido por la Dra. Loredana Scalschi (*Universidad Jaime I de Castellón, España*). Los cultivos se realizaron en medio líquido LB Broth (Lennox) (Condalab, 1231), así como en placas de LB-Agar (Sigma, L2897) con rifampicina y Kanamicina (50µg/mL) a 29°C.

El hongo necrótrofo utilizado en este estudio fue *Botrytis cinerea* B05.10 (cepa WT) y los mutantes obtenidos a partir de dicha cepa: $\Delta bcsod1$, mutante deficiente en la enzima superóxido dismutasa Cu-ZnSOD y los mutantes deficientes en las diferentes subunidades descritas del complejo enzimático NADPH oxidasa: $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxB$, $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoxR$. Las cepas fúngicas utilizadas en esta Tesis fueron cedidas por el Dr. Paul Tudzynski (*University of Munster, Germany*). Las cepas $\Delta bcsod1$ y $\Delta bcnoxB$ crecieron en presencia de higromicina (70 µg/mL), las cepas $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxR$ crecieron en presencia de nourseotricina (70 µg/mL) y la cepa $\Delta bcnoxAB$ creció en presencia de ambos antibióticos a una concentración de 70 µg/mL. Para el cultivo de las cepas de *B. cinerea* se sembraron esporas procedentes de un stock en medio PDA (potato dextrose agar, Scharlau Microbiology, 01-483-500) enriquecido con un 10% (p/v) de hojas de tomate homogeneizadas y un 5% de sacarosa (Labkem, SUCR-00A). Las placas se incubaron durante 7 días a 16°C en oscuridad con ciclos de 15 minutos de luz UV-A (350-400 nm) cada 3 horas.

Todos los cultivos provienen de un stock de glicerizados al 25 % preparados a partir de un cultivo inicial.

Infecciones en planta

Infección con *Pseudomonas syringae*

Para los ensayos con la bacteria *P. syringae* y el mutante *CmaA* (*cor*⁻) en plantas de *A. thaliana* WS y *kor1-1* se realizaron dos pequeños cortes, uno a cada lado del envés de la hoja a infectar. Posteriormente, se inoculó la suspensión bacteriana por infiltración a través de los cortes con una jeringa de 1 mL sin aguja en cuatro hojas por planta, tal y

como se describe en de Torres y col., (2003). Se infiltraron aproximadamente 250 μL de la suspensión bacteriana. Para los experimentos de evaluación del fenotipo se utilizó una suspensión bacteriana de 10^6 CFU/mL (OD600 = 0,002) en agua estéril. Para el análisis de población (crecimiento bacteriano) se utilizó una suspensión de 10^5 CFU/mL (OD600 = 0,0002) y para los experimentos de análisis de hormonas, genes y detección de calosa y especies reactivas del oxígeno (ROS) (con DAB) se inocularon las plantas con una suspensión bacteriana de concentración 0.5×10^8 CFU/mL (OD600 = 0.1). Las plantas infectadas se incubaron en una cámara de cultivo al 70% de humedad relativa (HR). Para el análisis de fenotipo se inocularon 4 hojas por planta y genotipo, por infiltración, tal como se ha descrito. Las plantas se incubaron en una cámara de cultivo con 70% de HR y 72 horas post-inoculación (hpi) se visualizaron los síntomas. Para determinar el crecimiento bacteriano se procesaron 3 discos de hoja de 5 mm de diámetro por planta, 72 hpi. El tejido se destruyó mediante un Fastprep-24 (MP Biomedicals), introduciendo una bolita de acero, previamente esterilizada, en cada tubo eppendorf con 3 discos de hoja y 1 mL de agua destilada estéril, agitando a velocidad alta durante 50 s. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas a partir del extracto obtenido y se sembraron 5 gotas de 10 μL de cada dilución ($0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$) en placas petri con LB-Agar y con los antibióticos Rifampicina y Kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ciclohexamida (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El recuento de las colonias crecidas en las gotas se realizó teniendo en cuenta aquellas diluciones que presentaban 10-60 colonias visibles tras 48 h de incubación a 29°C. Se realizaron 3 réplicas de los experimentos con un mínimo de 6 plantas por genotipo y condición, con resultados similares.

Infección con *Botrytis cinerea*

Se trata de un hongo necrótrofo que produce la podredumbre gris, manchas foliares, áreas necróticas y ahogamiento de las plántulas. Para la infección con *B. cinerea* y sus mutantes, se extrajeron esporas por rascado de un cultivo en placa de 7 días tal y como está descrito en Leyva y col., (2008). La extracción de esporas de las diferentes cepas de *Botrytis* se llevó a cabo mediante el rascado de la superficie del cultivo en placa con 10 mL de una solución de Tween-20 al 0,02% (v/v) (Sigma-Aldrich, P1379). La suspensión de esporas obtenida fue recogida con una pipeta Pasteur desechable estéril y depositada en un Corning de 15 mL. Tras un ligero vorteo manual, la suspensión fue

filtrada a través de algodón estéril y depositada en un nuevo corning de 15 mL y se centrifugó a 4.750 r.p.m. durante 8 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento de esporas fue resuspendido en 1 mL de agua estéril y se lavó mediante centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de esporas se resuspendió en 1 mL de medio Gamborg B5 (Sigma-Aldrich, G5893) al 50% (v/v) suplementado con glucosa 10 mM y KH_2PO_4 10 mM. Posteriormente se realizaron las diluciones oportunas para el recuento de esporas en el microscopio mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Para las infecciones en plantas de Arabidopsis, la suspensión de esporas se ajustó a una concentración de 10^5 conidios/mL y para las infecciones en plantas de tomate, la suspensión de esporas se ajustó a una concentración de $0,5 \cdot 10^5$ conidios/mL, debido a su mayor susceptibilidad frente a este patógeno. Previamente a la inoculación, la suspensión de esporas se incubó en agitación durante 2 horas. Tanto las plantas de Arabidopsis como las de tomate se inocularon con dos gotas de 5 μL de la suspensión de esporas con la concentración adecuada en cuatro hojas por planta de Arabidopsis y en los folíolos de la cuarta y quinta hoja en las plantas de tomate. Posteriormente las plantas inoculadas se introdujeron en cajas transparentes cerradas en una cámara de cultivo a 23°C durante el día y 19°C durante la noche con un fotoperiodo de 10 horas de luz diarias y un 70% de humedad relativa (HR). Los síntomas de infección se evaluaron mediante la medición del área de necrosis generada en el punto de inoculación con un pie de rey digital a diferentes tiempos (48, 72 y 96 hpi). Los datos obtenidos se ajustaron a la fórmula del área de una elipse ($\text{Área} = \pi \cdot r_1 \cdot r_2$). Se realizaron 3 réplicas biológicas de los experimentos con un mínimo de 6 plantas por genotipo y condición, con resultados similares.

Análisis de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en planta

Las hojas inoculadas con *Pseudomonas* y las hojas control (sin inocular) se incubaron con una solución del colorante 3,3'-Diaminobencidina (DAB, Sigma-aldrich D8001-5G) (1 mg/mL) como mínimo durante 8 horas en oscuridad. Dicho colorante es específico para evidenciar la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formado por la degradación de la especie reactiva del oxígeno primaria ion superóxido (O_2^-), reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa, dando una coloración marrón-rojiza en la zona de

infección. Para las infecciones con *Botrytis* se incubaron las hojas tanto de Arabidopsis como de tomate en la solución de DAB como se ha descrito antes y para evidenciar la presencia de O_2^- , se incubaron las hojas infectadas y control en una solución de Nitroblue tetrazolium chloride (NBT, Sigma-Aldrich N6639-1G) (0,5 mg/mL) durante 2-4 horas. La presencia de O_2^- se evidencia por una coloración azulada por la formación de formazán. Posteriormente se retiraron los correspondientes colorantes, que fueron sustituidos por etanol cosmético 96^o para eliminar la clorofila y restos de colorante. Para la observación y fotografía en microscopio de la acumulación de O_2^- y H_2O_2 en las muestras inoculadas con *Botrytis* se retiró el etanol con la clorofila para dejar visible la tinción y se hidrataron las hojas con agua destilada durante 20 minutos para su posterior montaje en portaobjetos. Se fotografió la acumulación de O_2^- y H_2O_2 en la zona de inoculación mediante una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon eclipse 90i). Para la observación de la acumulación de H_2O_2 en las muestras inoculadas con *Pseudomonas*, las hojas se digitalizaron con la ayuda de un escáner. La cuantificación de la acumulación de ambos compuestos se realizó mediante el software Gimp 2.6 (<http://www.gimp.org>). Los datos están expresados como el número de píxeles marrones por millón de píxeles (para H_2O_2) y como el número de píxeles azules por millón de píxeles (para O_2^-). Se realizaron 3 réplicas biológicas con un mínimo de 6 plantas por genotipo y condición con resultados similares.

Acumulación de ROS en micelio fresco y en hifas de *B. cinerea*

Para la observación de la presencia de H_2O_2 en placas multipocillo a partir de micelio fresco se sembraron pequeños plags (pequeños fragmentos de medio PDA con micelio de las cepas fúngicas B05.10 y $\Delta bcsod1$ (crecidas durante 7 días en las condiciones mencionadas con anterioridad) en el centro de cada placa Petri sobre un disco de celofán transparente. Dichos discos se recortaron a medida para placas Petri, se limpiaron con etanol 96^o y se apilaron entre sí con cuadrados de papel whatman recortados a medida para separar los discos, se empaquetaron en papel de aluminio y se autoclavaron. En campana de flujo de aire laminar para evitar contaminaciones, con unas pinzas flameadas se colocó un disco de celofán en el interior de cada placa Petri con PDA enriquecido con hojas de tomate y sacarosa 0,5% y se depositó el plag en el

centro. Las placas se incubaron durante tres días en las condiciones que se mencionó con anterioridad. Transcurridos tres días las placas presentan un micelio joven blanquecino que se raspa cuidadosamente con una espátula esteril y 1 mL de agua destilada estéril para evitar romper el disco de celofán y obtener con más facilidad el micelio fresco. Se deposita aproximadamente 25 mg de micelio fresco de cada cepa fúngica en los pocillos de una placa multipocillos (Sarstedt, 83.3922) (3 réplicas por cada cepa fúngica) y se le añade a cada pocillo 1 mL de solución de DAB. Para el control negativo se añade a un pocillo vacío 1 mL de DAB suplementado con 1 μL de H_2O_2 (30%), para el control positivo se añade a un pocillo vacío 1 mL de DAB suplementado con 1 μL de H_2O_2 (30%) y 2 μL de horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, P8375). La placa se cubre con papel de aluminio y se incuba a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente se observa la presencia de H_2O_2 : Una coloración marrón rojiza indica mayor presencia de H_2O_2 , mientras que una coloración anaranjada o amarilla indica menor presencia. En el control negativo no se observa coloración alguna y en el control positivo se observa un precipitado marrón. Para la observación de la presencia de O_2^- en hifas de las cepas fúngicas utilizadas en esta Tesis, se depositaron 20 μL de una suspensión de cada cepa con una concentración de 10^5 esporas/mL sobre un portaobjetos (3 gotas de 20 μL de cada cepa por portaobjetos). Los portaobjetos se depositan en cajitas de plástico herméticas sobre papel húmedo y se incuban durante la noche en una cámara de cultivo para plantas para germinar. Al día siguiente las muestras fueron teñidas con 20 μL de NBT (0.05% w/v) y se monitorizaron y fotografiaron con el microscopio 2 horas después de teñir. Como control negativo, algunas muestras se suplementaron con 20 μL de DPI 50 μM (Diphenyleneiodonium chloride, Sigma D2926) 30 minutos antes de teñir con NBT. El compuesto DPI es un inhibidor de las enzimas NADPH oxidasas, por lo que no se produce O_2^- y no se observa coloración alguna en las hifas de las esporas germinadas. Las muestras teñidas que no se suplementaron con DPI mostraron una coloración azul oscuro por la producción de formazán, evidenciando la presencia de O_2^- con una intensidad de color que varía en función de la mayor o menor presencia de dicha especie reactiva del oxígeno en las cepas analizadas.

Efecto de la aplicación de agentes antioxidantes en plantas infectadas con *B. cinerea*

Para evaluar la importancia de la presencia de ROS en la infección de *Botrytis* en plantas de *Arabidopsis* y tomate se utilizaron dos agentes antioxidantes: Ácido ascórbico (Sigma, A7506-25G) con una concentración de 5 mM en ambas plantas y ditiotreitól (DTT; Invitrogen kit, 18080-044) a una concentración de 750 μ M en el caso de *Arabidopsis* y de 2 mM en el caso de tomate. Las soluciones de antioxidantes se co-inocularon con una suspensión de conidias de 10^5 esporas/mL de las diferentes cepas fúngicas empleadas en este trabajo como se ha descrito con anterioridad en las plantas y 72 hpi se observaron los síntomas. Posteriormente se midieron los halos de necrosis observados con el pie de rey y se tomaron muestras, que se tiñeron con DAB y NBT y se analizaron del mismo modo en que se ha descrito anteriormente. Se realizaron 3 réplicas biológicas con al menos 6 plantas por genotipo y condición con resultados similares.

Deposición de calosa

El análisis de deposición de calosa en plantas de *Arabidopsis* y tomate se llevó a cabo en hojas recogidas 72 hpi con *P. siringae* y *B. cinerea*. Las hojas se incubaron en etanol cosmético 96^o (v/v) durante varios días hasta quedar completamente decoloradas. Pasado este tiempo, el etanol es retirado y las hojas se lavaron durante 40 minutos en tampón fosfato 0,07 M (pH=7). Las muestras inoculadas con *Botrytis* se incubaron durante 12 minutos en el mismo tampón conteniendo calcofluor al 0,025% (p/v) (Sigma, F3543) y azul de anilina al 0,01% (p/v) (Sigma, M6900) para eliminar restos de calcofluor. Posteriormente, se sustituye el azul de anilina al 0,01% por azul de anilina al 0,1% (p/v) y se incuba durante la noche. Al día siguiente las muestras se lavaron brevemente con azul de anilina al 0,01% y se montaron sobre portaobjetos de vidrio para su observación en microscopio. Para observar la deposición de calosa se utilizó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i) con filtro UV (BP, 340-380 nm; LP 425 nm) equipado con una cámara digital. Para las muestras inoculadas con *Pseudomonas* se fotografiaron diferentes zonas de cada hoja donde se había depositado la calosa mientras que en las muestras inoculadas con *Botrytis* se fotografió la zona de inoculación, que es donde se producía la mayor acumulación de calosa, delimitando la infección. La cuantificación de

la deposición de calosa se realizó mediante el análisis de imagen de las fotografías utilizando el software Gimp 2.6. La intensidad de calosa se expresó como el número de píxeles fluorescentes por millón de píxeles. Se realizaron 3 réplicas biológicas con al menos 6 plantas por genotipo y condición con resultados similares.

Análisis de la acumulación de hormonas y metabolitos secundarios

Para la extracción y cuantificación de hormonas se aplicó el protocolo descrito en Vicedo y col., (2009), utilizando un equipo HPLC Waters Alliance 2690 (Milford) con una columna de fase reversa de nucleosil-ODS (100mm x 2mm i.d.; 5µm). El HPLC se acopló a un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo-hexapolo-cuadrupolo Quatro LC (micromass). Los datos cuantitativos de los estándares de calibrado y de las muestras vegetales se procesaron mediante el programa Masslynx NT versión 3.4 (micromass). Se realizaron 3 réplicas biológicas con 18 plantas por genotipo y condición en el caso de las plantas inoculadas con *P. syringae* y 12 y 8 plantas (Arabidopsis y tomate, respectivamente) por genotipo y condición en el caso de las plantas inoculadas con *B. cinerea*, con resultados similares.

Análisis de la expresión génica por RT-qPCR

El análisis de la expresión de los genes se llevó a cabo en muestras de hojas recogidas a varios tiempos tras la inoculación con *P. syringae*, o *B. cinerea*. Para Arabidopsis-*P. syringae*, se recogieron las hojas infiltradas a 6 y 20 hpi. Para Arabidopsis/tomate-*B. cinerea*, se muestrearon las hojas infectadas a 24, 48 y 72 hpi. En las infecciones tomate-*B. cinerea* se muestrearon los folíolos de la tercera y cuarta hoja de cada planta. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido, se pulverizaron con un mortero y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA. El RNA total de Arabidopsis y de tomate se aisló mediante el kit "NucleoSpin RNA Plant" (Macherey-Nagel GmbH & Co.). La cuantificación del RNA se realizó por espectroscopía (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA) y se almacenó a -80°C. La obtención de cDNA por retrotranscripción (RT) a partir de 2 µg de las muestras de RNA se llevó a cabo mediante el kit Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa se realizó en el

termociclador LightCycler480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), usando el kit SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Europe). Las secuencias de los primers directo (forward) y reverso (reverse) se utilizaron a una concentración final de 0,8 µM, en un volumen final de reacción de 10 µL. Los primers se diseñaron mediante el programa “Primer Express” y la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias de los primers utilizados en esta Tesis se muestran en la tabla 1.

	Gene	Code	Forward primer	Reverse primer
<i>A. thaliana</i>	<i>EIF4A1</i>	AT3G13920	AACGCGTTTTCTCTCAGCCT	GCTTGAATCTCCAAACTCGG
	<i>Actin2</i>	AT3G18780	TGGTCGTACAACCGGTATTGTG	ATGGCATGAGGAAGAGAGAAACC
	<i>ICS1</i>	AT1G74710	CTTCCGTGACCTTGATCTTTCT	CAGCGATCTTGCCATTAGGATC
	<i>PR1</i>	AT2G14610	GGCTAACTACAACCTACGCTGCGA	TCACTTTGGCACATCCGAGTC
	<i>PDF1.2</i>	AT5G44420	GCCAAACATGGATCATGCAAC	TGTAACAACAACGGGAAAATAAACATT
	<i>VSP1</i>	AT5G24780	TTTTACGCCAAAGGACTTGC	ATCCCGATTCCAAGAGGTT
	<i>Lox3</i>	AT1G17420	TCTCCGTACAACAAGCGTTGG	GCGTCCGTCTAGCGCATTAAAT
	<i>ACC</i>	AT4G11280	TTACGGTGAAGCCTTGGA	CGTACCAAGCGGGTTTGAAG
	<i>GST6</i>	AT1G02930	AAGCCGCCTTCTGTGTTTTG	ATCTTCTCACCACCACCCAC
	<i>WRKY33</i>	AT2G38470	GTGGGAGTGAACCTGAAGCA	TGCACTACGATTCTCGGCTC
	<i>WRKY53</i>	AT4G23810	CCATCAGTTTTGCGGCCTTT	GCGAATACGTCTTTGCAGGAA
	<i>PR2</i>	AT3G57260	GCAATGCAGAACATCGAGAA	TCATCCCTGAACCTTCTTG
	<i>HSP17.4</i>	At3G46230	GGAAAGTAAAGGCGAGTATGGAGAAT	TTAACCAGAGATATCAACGGACTTG
	<i>HsfA2</i>	At2G26150	TAATGGTCTGAACAGCTTTGTGGT	TCCCATCTATCTGGATCAATCTTTC
<i>PMR4</i>	AT4G03550	GGACGGCATTTCATAGATTGAAGC	ACCGTCACATCCAGGAATTCT	
<i>S. lycopersicum</i>	<i>EF1-α</i>	SGN-U593800	GACAGGGCCTTCAGGTAAGGA	GGGTATTGAGCAAGGTCTC
	<i>PR1</i>	SGN-U212922	CCGTGCAATTGTGGGTGT	GAGTTGCGCCAGACTACTTGAGT
	<i>LOXD</i>	SGN-U37840	CACCTAAGCCATTGCCATTG	CCAGTTACCAGTGGCACAACA
	<i>DES</i>	SGN-U214318	CCGATTCTGTGAAATCCAGG	GAACCAAGCATCTTACCTTGG
	<i>GST</i>	SGN-U226166	AGACAATATCGGATTCGTTGACG	AGTACAGAGTACAACCCCGG
	<i>WRKY33</i>	SGN-U214599	AGATCCAACCACCAATCACCC	GGCTTGAATTGTTTGTGTGC
	<i>WRKY53</i>	SGN-U214107	ACCCAGCAGCATGTCATTCT	GACGGTGAATAGCCGCTACCT
	<i>PR2</i>	SGN-U215659	ATGGGCTGAAGGATCAGTTG	GACTCTTCTTGAACCTTTGTTGG
	<i>HsfA2</i>	Sl08g062960	GATCTGGTGCTTGCAATTGAA	TGGGGTTCATCGTTAGTCTC
	<i>PMR4</i>	Solyc07g053980	GCCGGCGGCGAGACAAGTTT	CAGCGCCAGCCAGTCAAGCA

Tabla 1. Secuencia de los primers usados en esta Tesis para los análisis por RT-qPCR.

La secuencia de los ciclos de PCR se programó según las instrucciones del fabricante del kit, usando como temperatura de hibridación 60°C para todos los genes. La expresión génica diferencial se determinó por cuantificación relativa. Para los experimentos con plantas de *Arabidopsis* *Ws* y *kor1-1* inoculadas con *P. syringae*, el gen *Actin2* se utilizó para normalizar los valores de expresión. Para los experimentos en plantas de *Arabidopsis* N70000 y de tomate inoculadas con *B. cinerea*, se utilizaron los genes *EIF4A1* y *EF1-α* (respectivamente) para normalizar los valores de expresión. Para cada gen se calculó la eficiencia real de la reacción de amplificación (E), de acuerdo con la ecuación: $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$ (Pfaffl, 2001). En los experimentos con plantas de *Arabidopsis*

Ws y *kor1-1* inoculadas con *P. syringae*, la expresión relativa de los genes se calculó usando la fórmula: $100 \times E^{\Delta Ct}$ (Beno-Moualem y col., 2004), siendo Ct el ciclo en el que empieza la zona exponencial de la curva de fluorescencia, calculada mediante el programa por el método de la segunda derivada. ΔCt se calculó como (Control Ct) – (Infectado Ct). En los experimentos con plantas de Arabidopsis N70000 y de tomate inoculadas con *B. cinerea*, la expresión relativa de los genes se calculó usando el método de $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001), calculando la diferencia entre los Cts del gen de referencia y los Cts del gen problema. Todos los datos se muestran en escala logarítmica en base 2. Para cada experimento se realizaron 3 réplicas biológicas con al menos 6 plantas por genotipo y condición, con resultados similares.

Análisis estadísticos

Para los experimentos realizados en plantas de Arabidopsis inoculadas con *P. syringae* y las plantas de Arabidopsis y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*, el tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un test-*t* de Student, desapareado, de dos colas, comparando las medias de muestras independientes a través de la desviación estándar (DS). Para los experimentos realizados en plantas de Arabidopsis y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*, las diferencias entre cepas a cada tiempo se calcularon mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de 2 vías y de una vía, cuando solo se ha considerado un factor. En todos los casos se ha considerado como significativo, aquellos valores con un valor de *p* (*p*-valor) menor o igual a 0.05, que se corresponde con un intervalo de confianza del 95%, usando la prueba LSD (least significant difference) de Fisher. Los datos mostrados de todos los experimentos realizados para la elaboración de la presente Tesis representan la media de 3 réplicas biológicas con al menos 6 plantas por genotipo y condición con resultados similares.

Resultados y discusión

CAPÍTULO I

Análisis funcional de la endo-1,4- β -glucanasa Korrigan 1 en la interacción *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae*

Absence of endo-1,4- β -glucanase KOR1 alters the Jasmonate-dependent defence response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*

Jaime López-Cruz, Ivan Finiti, Emma Fernández-Crespo, Oscar Crespo-Salvador, Pilar García-Agustín, Carmen González-Bosch.

Publicado en *Journal of Plant Physiology* 171 (2014) 1524–1532.

INTRODUCCIÓN

Cuando el patógeno entra en contacto con la planta encuentra barreras estructurales, como la pared celular y la cutícula, y diversos compuestos antimicrobianos que son cruciales para limitar las infecciones (Hückelhoven, 2007; Dodds y Rathjen, 2010).

Tras el reconocimiento del patógeno, la planta activa mecanismos de defensa. La pared celular provee de defensas activas y está implicada en múltiples rutas de señalización para detener al patógeno. Las células vegetales pueden percibir elicitores y cambios en la composición de la pared celular, proporcionando un mecanismo de detección a través del cual se pueden coordinar varias respuestas (Pilling y Höfte, 2003; Vorwerk y col., 2004). Al romper la pared, el patógeno activa respuestas tempranas que pueden detener o limitar su avance (Cantu y col., 2008a, b). Un aspecto notable de las respuestas de defensa de las plantas es el estallido oxidativo, que acompaña a la HR y otros mecanismos de resistencia. Se produce una liberación masiva de ROS, que resulta en la acumulación de radicales como OH⁻ y otros compuestos oxidantes como H₂O₂, lo que debería limitar el avance del patógeno (de Gara y col., 2003). Dependiendo de la concentración, las ROS pueden ser tóxicas o beneficiosas, actuando como señales de estrés (Asselbergh y col., 2008).

Las hormonas vegetales están implicadas en la señalización y coordinación de estas respuestas a través de vías que forman una compleja red de señalización, que finalmente determina el resultado de la infección. Clásicamente, se considera que la resistencia contra los patógenos necrótrofos requiere la activación de la ruta del ácido jasmónico (JA), mientras que la ruta de señalización del ácido salicílico (SA) se activa principalmente frente a patógenos biótrosos. Además, el SA puede antagonizar al JA, y viceversa (Glazebrook, 2005). Los patógenos pueden manipular la señalización de las hormonas vegetales para contrarrestar las respuestas de defensa y para acceder a los nutrientes. *P. syringae* produce coronatina, una toxina que mimetiza a la hormona jasmónico isoleucina (JA-Ile) para facilitar la invasión, la proliferación en el apoplasto y el desarrollo de síntomas de la enfermedad (Tsai y col., 2011; Geng y col., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la pared celular de la planta está implicada en múltiples rutas de señalización, incluyendo la percepción de patógenos. Además, el área adyacente al sitio de penetración del patógeno puede reforzarse para formar una papila,

cuyo componente principal es la calosa (Smart y col., 1986). La calosa es un polisacárido formado por residuos de glucosa, unidos por enlaces 1,3- β -D, que se deposita entre la membrana plasmática y la cara interna de la pared celular primaria. Su acumulación puede formar parte de la HR que se genera frente al ataque de los patógenos (Dong y col., 2008; Hamann, 2015). Estudios previos en nuestro grupo de investigación han demostrado que la deposición de calosa obstaculiza el avance de *B. cinerea* en *Arabidopsis* y tomate (Flors y col., 2007; Finiti y col., 2014). Aunque la calosa no es eficaz contra todos los patógenos, su deposición se considera un marcador de la activación de las respuestas de defensa (Hauck y col., 2003).

En los últimos años, se ha sugerido que las enzimas de síntesis de pared celular asociadas con el crecimiento y el desarrollo están estrechamente relacionadas con la susceptibilidad, o resistencia, de las plantas. Estudios previos en nuestro grupo identificaron el papel de las endo-1,4- β -glucanasas (EGs) en la defensa de las plantas de tomate y de *Arabidopsis* (Real y col., 2004; Flors y col., 2007, Finiti y col., 2013). Estas EGs son enzimas hidrolíticas de la pared celular que pertenecen a la familia glicosilhidrolasa 9 (GH9), una de las familias GH más grandes (Henrissat y col., 2001). Se comprobó que la ausencia de las EGs altera la deposición de calosa, así como las rutas de señalización de hormonas implicadas en la defensa (Flors y col., 2007; Finiti y col., 2013). También se demostró que algunas EGs pueden constituir factores de susceptibilidad en la infección de *P. syringae*, en tomate y en *Arabidopsis*.

En este capítulo se han analizado las respuestas de defensa de las plantas en ausencia de la EG Korrigan 1 (KOR1) frente a patógenos biótrosos. Estudios previos realizados con este mutante demostraron que resulta más resistente frente al hongo necrótrofo *B. cinerea* (Finiti y col., 2013).

El objetivo del trabajo realizado en este capítulo I reside en el estudio de la influencia de la ausencia de la EG KOR1 en la interacción planta-patógeno, usando plantas de *A. thaliana* defectivas en dicha EG (mutante de inserción *kor1-1*) y su cultivar silvestre Wasselewskija (Ws), infectadas con la bacteria hemibiótrofa *P. syringae* pv. Tomato DC3000 (*Pst*). Para ello se han analizado los principales mecanismos de respuesta de las plantas, incluyendo la acumulación de calosa, la señalización hormonal, la expresión de genes marcadores y el análisis de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

RESULTADOS

La ausencia de la endoglucanasa KOR1 aumenta la susceptibilidad de plantas de *Arabidopsis* frente a *P. syringae*

Para comprobar el efecto de la ausencia de la EG KOR1 en términos de resistencia-susceptibilidad frente a un patógeno, se realizó en primer lugar un análisis del fenotipo de infección en plantas de *Arabidopsis* mutantes *kor1-1*, con respecto a su cultivar silvestre *Ws*. Se utilizaron plantas de 4 semanas de crecimiento y se inocularon 4 hojas por planta, por infiltración con jeringa sin aguja, con una concentración de 10^6 UFC/mL (OD600 = 0.002) de la cepa bacteriana *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst*). A las 72 horas post-inoculación (hpi) se observaron claros síntomas provocados por la bacteria.

Las hojas infectadas de *Ws* presentaban síntomas leves de clorosis, mientras que las hojas infectadas del mutante *kor1-1* presentaban síntomas de clorosis, zonas necróticas y una deformación de la superficie foliar (Fig. 1A). Posteriormente se analizó el crecimiento de la bacteria en plantas de ambos cultivares inoculadas con la cepa *Pst*, como se ha descrito anteriormente, con una concentración de 10^5 UFC/mL (OD600 = 0.0002). Este sistema de recuento es el más utilizado por otros autores, ya que se obtienen resultados reproducibles.

Los resultados obtenidos del recuento bacteriano (Fig. 1A-B) demostraron que los síntomas observados se correlacionaban con el crecimiento bacteriano en las plantas *kor1-1* y *Ws*. Esto sugiere que la ausencia de la EG KOR1 aumenta la susceptibilidad de las plantas de *Arabidopsis* frente a *Pst*, promoviendo su crecimiento. Es posible que la ausencia de la EG KOR 1 pueda interferir en las respuestas de la planta frente a la bacteria.

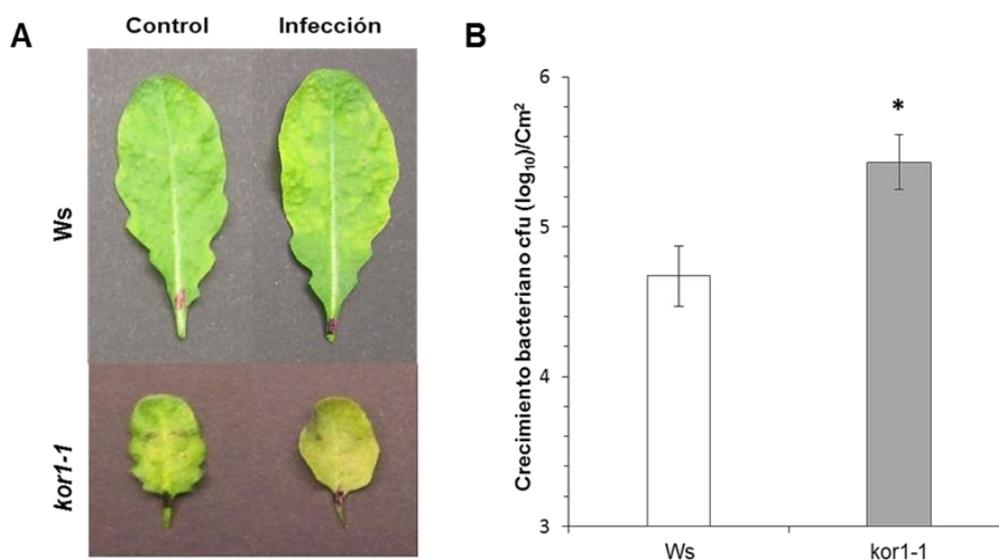


Figura 1. Evaluación del fenotipo y crecimiento bacteriano en plantas de *A. thaliana* Ws y *kor1-1* infectadas con *Pst*. (A) Imágenes representativas de los síntomas en plantas control e infectadas a las 72 h. (B) Crecimiento bacteriano en plantas Ws y *kor1-1* 72 hpi. El recuento de colonias se realizó procesando tres discos de tejido fresco por planta. Los datos se representan en escala logarítmica (Log10) e indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=6). El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al cultivar silvestre (Ws) ($p < 0.05$, Test-t).

Cambios en la acumulación de metabolitos y en la expresión de genes en plantas *kor1-1* infectadas con *Pst*

Se analizó la acumulación de las principales hormonas vegetales y algunos compuestos fenólicos, implicados en la respuesta a la infección mediada por *Pst*, en plantas de *Arabidopsis* Ws y *kor1-1*, mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas. El análisis consistió en la determinación simultánea, en la misma muestra, de los siguientes compuestos: JA, JA-Ile, SA, ácido ferúlico y ácido cafeico. La acumulación de estos compuestos se realizó a 0, 6 y 20 hpi.

Se observó una acumulación significativa de JA y SA a tiempo 0 hpi (sin infección) en las plantas *kor1-1*, en comparación con las plantas Ws (Figura 2A, C). El contenido de SA aumentó ligeramente en plantas *kor1-1* infectadas con *Pst*. Es interesante que estas plantas presentaron un aumento significativo de JA, y de su conjugado JA-Ile, a las 6 y 20 hpi, comparado con las plantas Ws (Figura 2A, B). Estos datos indican que la ausencia de la EG KOR1 afecta a la ruta de señalización del JA antes y después de la infección con *Pst*, lo cual beneficia la colonización de la bacteria. Este mismo efecto se ha observado

en plantas *kor1-1* infectadas con *B. cinerea* en la ruta de señalización de JA pero, en ese caso, estaba asociado con un aumento de la resistencia frente a este hongo necrótrofo (Finiti y col., 2013).

Por otra parte, las plantas *kor1-1* mostraron un alto contenido de ácido cafeico, que disminuyó hasta alcanzar los niveles de la planta Ws en la respuesta temprana frente a *Pst* (Figura 2D). Sin embargo, se observó una acumulación baja de ácido ferúlico en las plantas de *kor1-1* infectadas con *Pst*, en comparación con las plantas Ws (Figura 2E). Los ácidos cafeico y ferúlico son precursores de la lignina y, además, son componentes de la papila (Bestwick y col., 1998; Soylyu y col., 2005; Vicedo y col., 2009).

Por lo tanto, estos resultados indican que la ausencia de KOR1 altera diferentes componentes de la barrera defensiva que interfiere con el patógeno y, en este caso, contribuye a un aumento de la susceptibilidad frente a *Pst*.

Para verificar la conexión entre la ausencia de la EG KOR1 y la activación temprana de la ruta del JA, se analizó mediante RT-qPCR la expresión del gen de biosíntesis de JA (*LOX3*), el gen regulado por la ruta JA/ET (*PDF1.2*) y el gen regulado por la del JA (*VSP1*) en plantas control (no infectadas) e inoculadas con *Pst*, a 6 y 20 hpi. En las plantas *kor1-1* control, la expresión de *LOX3* fue mayor que en las plantas Ws (Figura 3A). Tras la infección con *Pst*, las plantas *kor1-1* mostraron un incremento en la expresión de *LOX3* en comparación con las plantas Ws, 20 h después de la inoculación. Destaca el hecho de que la expresión de *PDF1.2* fue mayor en ausencia de KOR1 a las 6 hpi, comparada con las plantas Ws (Figura 3B). Estos datos confirman la activación temprana de la respuesta dependiente de JA en las plantas *kor1-1*. Por otra parte, no se observaron cambios en la expresión de *VSP1* en las plantas *kor1-1* control e infectadas, en comparación con las plantas Ws (Figura 3C).

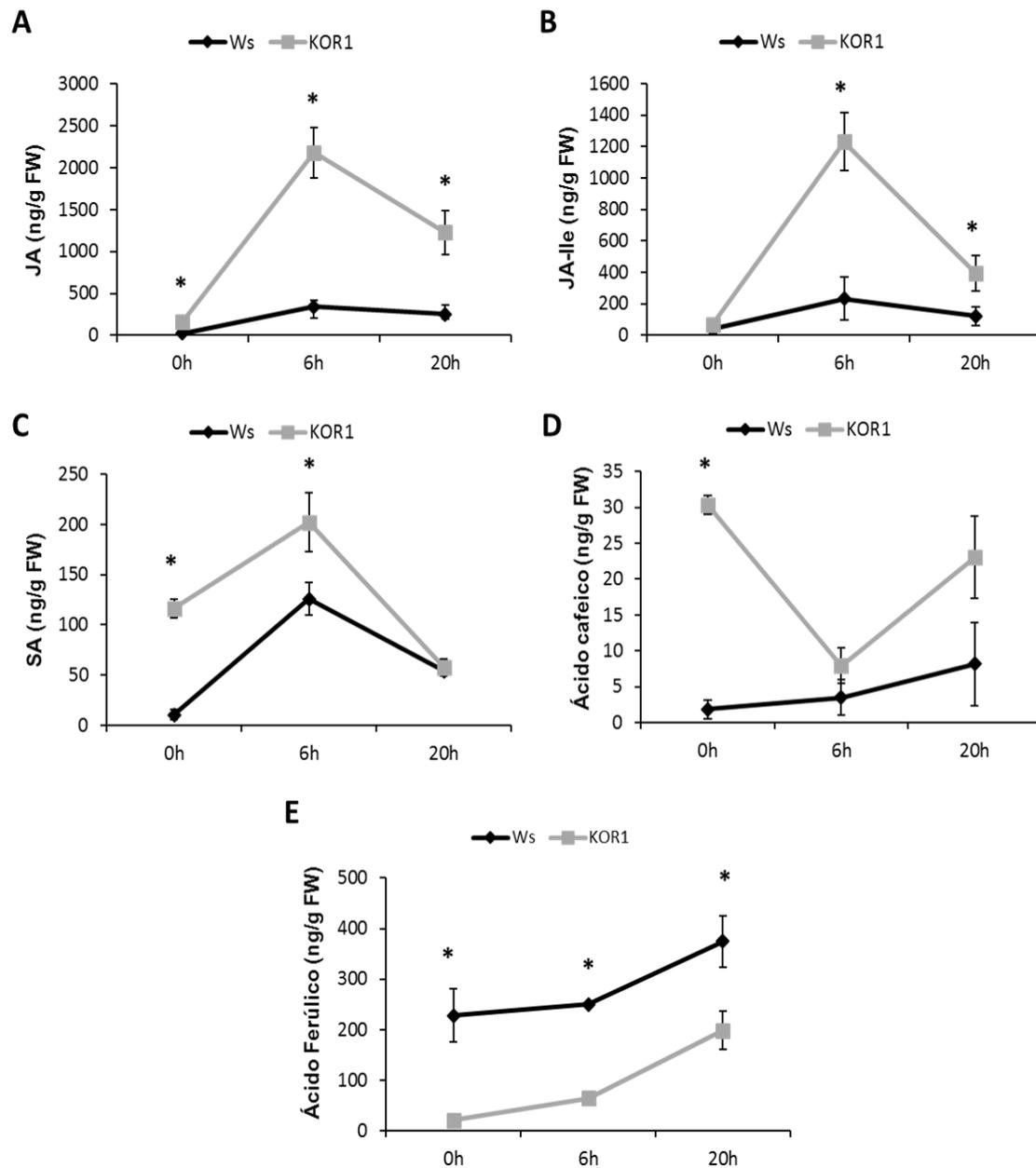


Figura 2. Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de *A. thaliana* Ws y *kor1-1* infectadas con *Pst.* (A-E) Representación gráfica de la acumulación de JA, JA-Ile, SA, ácido cafeico y ácido ferúlico a 0, 6 y 20 hpi. La acumulación de hormonas y metabolitos secundarios se determinó mediante HPLC-MS. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=24). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre Ws y *kor1-1* a cada tiempo ($p < 0.05$, LSD Test).

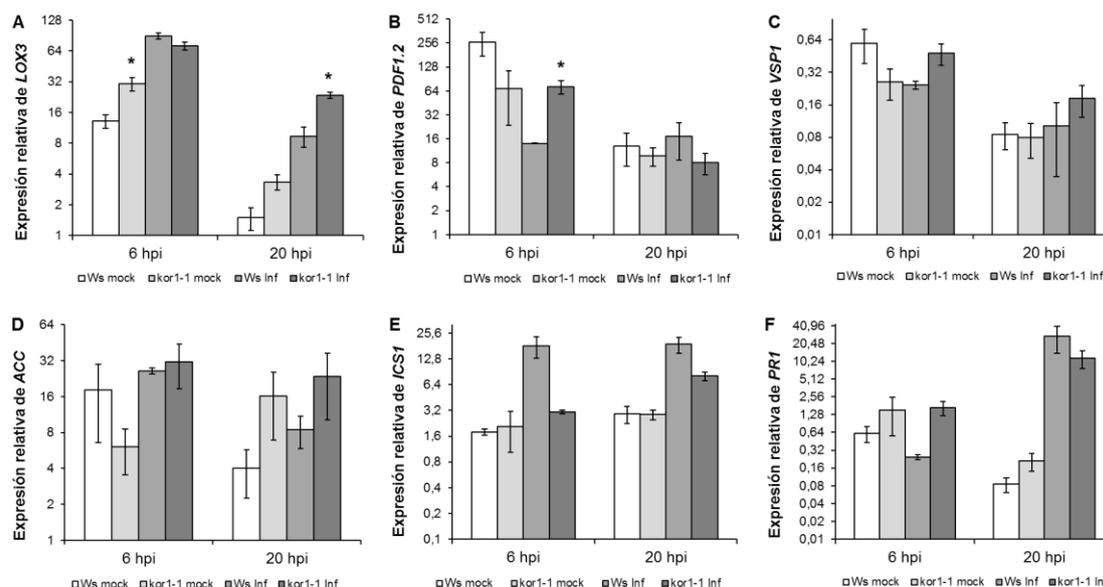


Figura 3. Expresión relativa de los genes *LOX3*, *PDF1.2*, *VSP1*, *ACC*, *ICS1* y *PR1* en plantas de *A. thaliana* Ws y *kor1-1* infectadas con *Pst* a las 6 y 20 hpi (A-F). Se utilizó *Actina2* como estándar interno. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=24). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre Ws y *kor1-1* a cada tiempo ($p < 0.05$, Test-t).

También se analizaron otros genes de interés, como el gen de biosíntesis de etileno (*ACC*), el gen de biosíntesis de SA (*ICS1*) y el gen regulado por SA (*PR1*). Los genes *ACC* e *ICS1* no mostraron cambios significativos en plantas *kor1-1* control e infectadas, comparado con las plantas Ws (Figura 3D, E). Así pues, el incremento de SA observado durante el análisis hormonal en plantas de *kor1-1* tras la infección con *Pst* puede ser debido a fuentes alternativas de esta hormona. La expresión de *PR1* no cambió significativamente en plantas de *kor1-1*, control e infectadas, en comparación con las plantas Ws (Figura 3F). Estos resultados indican que la ruta dependiente de SA no estaría activada en ausencia de la EG KOR1.

Alteración de la acumulación de peróxido de hidrógeno y de la deposición de calosa en plantas *kor1-1* infectadas con *Pst*

El H_2O_2 es una molécula señal de estrés bien establecida, además de otras ROS (de Gara y col., 2003). Se analizó el efecto de la ausencia de la EG KOR1 en la acumulación de H_2O_2 tras la infección con *Pst*. La visualización y cuantificación de H_2O_2 se realizó mediante la

tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB) tal y como está descrito en materiales y métodos. Las plantas *Ws* mostraron depósitos marrones localizados, que son indicativos de la acumulación de H_2O_2 en hojas infectadas con *Pst* (Figura 4A). Las plantas *kor1-1* infectadas mostraron un incremento en la acumulación de H_2O_2 y de forma dispersa en comparación con las plantas *Ws*, evidenciado por una distribución de la tinción a lo largo de la hoja (Figura 4B).

Este resultado refleja la pérdida de la capacidad defensiva de la planta para restringir el avance del patógeno por acumulación de ROS. La alteración en el estallido oxidativo generado en las plantas *kor1-1* podría dificultar la activación de defensas efectivas contra biótropos. Alternativamente, el desequilibrio hormonal en ausencia de la EG KOR1 que lleva a un aumento de la susceptibilidad alteraría el estallido oxidativo, que sería incapaz de prevenir la proliferación bacteriana.

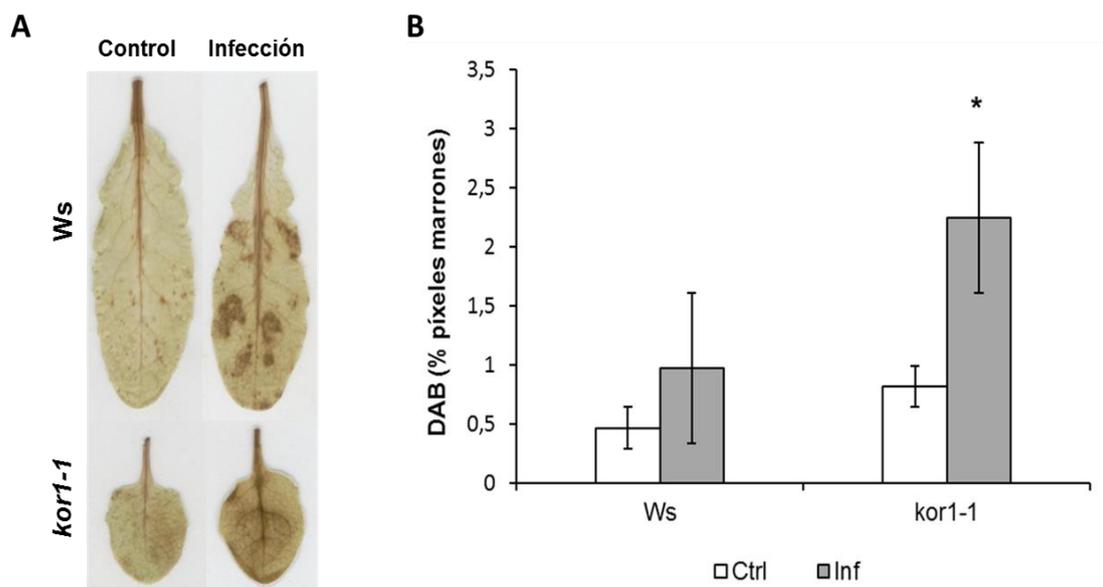


Figura 4. Acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plantas de *A. thaliana* *Ws* y *kor1-1* control e infectadas con *Pst*. El H_2O_2 fue visualizado mediante la tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB). (A) Imágenes representativas de la acumulación de H_2O_2 24 hpi. (B) Cuantificación de la acumulación de H_2O_2 mediante análisis digital de imagen. Se calculó el promedio de píxeles marrones por millón de píxeles de seis fotografías por planta. a las 6 y 20 hpi (A-E). Los datos mostrados representan la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Los asteriscos indica una diferencia estadísticamente significativa entre *Ws* y *kor1-1* a cada tiempo ($p < 0.05$, LSD Test).

El polisacárido calosa está considerado como un buen marcador de respuesta a estrés en *Arabidopsis* y puede constituir una barrera física efectiva contra los patógenos (Ellinger y col., 2013). Para determinar el efecto de la deposición de calosa en ausencia de la EG KOR1, se llevaron a cabo análisis histológicos mediante la tinción con azul de anilina en hojas de plantas control e infectadas con *Pst* de *Ws* y *kor1-1*. Como se puede observar en la Figura 5 A-B, las plantas *kor1-1* infectadas mostraron una mayor deposición de calosa coincidiendo con su mayor susceptibilidad en comparación con las plantas *Ws* en respuesta a la infección.

Este resultado refleja que la deposición de calosa no es efectiva frente a este patógeno, como ya describieron anteriormente otros autores (Nishimura y col., 2003; Forcat y col., 2010).

Por otra parte, se ha descrito la inducción a nivel transcripcional de la calosa en plantas *kor1-1* en respuesta a *B. cinerea*, pero en ese caso, asociada a una mayor resistencia frente a este patógeno necrótrofo (Finiti y col., 2013).

Esto apoya la idea de que la ausencia de la EG KOR1 altera muchos parámetros de respuesta a estrés, lo que produce diferentes resultados dependiendo del patógeno.

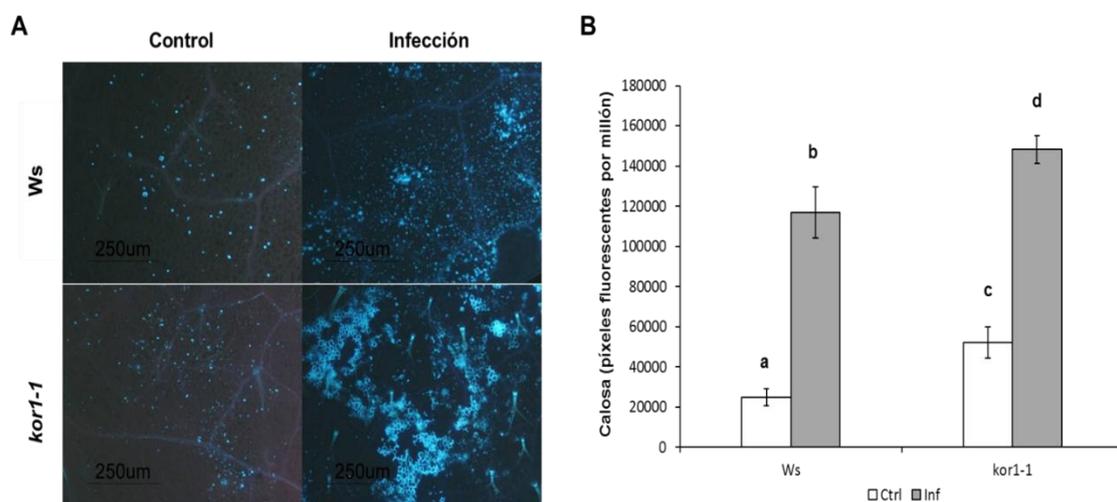


Figura 5. Deposición de calosa en plantas de *A. thaliana* *Ws* y *kor1-1* control e infectadas con *Pst* 24 hpi. La calosa se visualizó mediante la tinción con azul de anilina. (A) Imágenes representativas de la acumulación de calosa. (B) Cuantificación de la deposición de calosa mediante análisis digital de imagen, analizando el número de píxeles fluorescentes por millón de píxeles. Las barras representan la media de dos experimentos independientes \pm SD (n=18) con resultados similares. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre *Ws* y *kor1-1* ($p < 0.05$, LSD Test).

El aumento de la susceptibilidad de plantas carentes de KOR1 frente a *P. syringae* es independiente de coronatina

Las plantas WS y *kor1-1* fueron inoculadas por infiltración mediante jeringa con la cepa de *P. syringae cmaA* (*cor*⁻), deficiente en coronatina. Tras la infección, el mutante *cmaA* mostró un crecimiento bacteriano bajo en las plantas WS en comparación con el mismo cultivo vegetal infectado con *Pst*, como cabía esperar (Figura 6).

Sin embargo, las plantas *kor1-1* no mostraron una reducción del crecimiento bacteriano en ausencia de coronatina e incluso el mutante *cmaA* tuvo un crecimiento significativamente mayor que las plantas WS a las 72 hpi, revelando que la ausencia de la EG KOR1 en la defensa de la planta es independiente de la producción de la toxina coronatina.

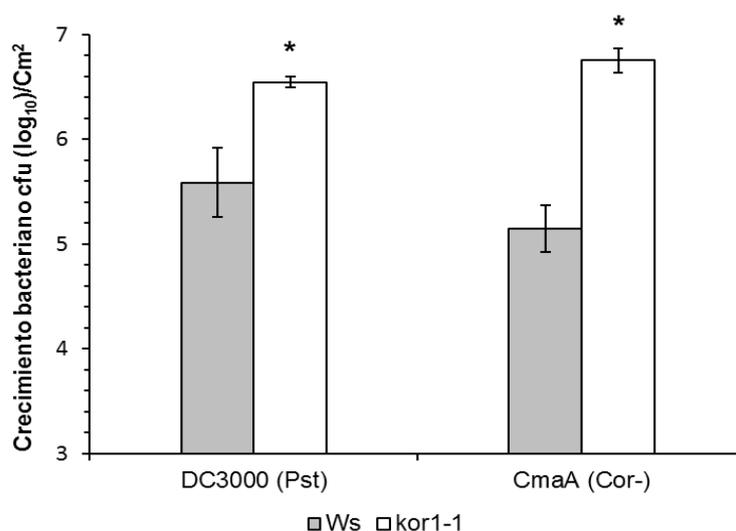


Figura 6. Crecimiento bacteriano en plantas de *A. thaliana* WS y *kor1-1* infectadas con *Pst* y *cmaA* (*Cor*⁻) 72 hpi. El recuento de colonias se realizó procesando tres discos de tejido fresco por planta. Los datos se representan en escala logarítmica (Log₁₀) e indican la media de 3 experimentos independientes ± SD (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos ($p < 0.05$, Test-t).

En estas mismas condiciones, el análisis hormonal en plantas inoculadas con el mutante *cmaA* mostró una acumulación de SA a las 20 hpi en las plantas WS y *kor1-1* que no fue observada en ambas plantas inoculadas con la cepa *Pst* (Figura 7). Este resultado refleja la conocida interferencia negativa de la coronatina con la acumulación de SA (ver Figura 2). También se observó un aumento significativo de JA, JA-Ile y ácido ferúlico en las plantas *kor1-1* a las 6 hpi, comparado con las plantas WS cuando fueron inoculadas con

ambas cepas (Figuras 2 y 7). Por lo tanto, estas alteraciones metabólicas están asociadas con la ausencia de la EG KOR1, independientemente de la presencia de la toxina coronatina.

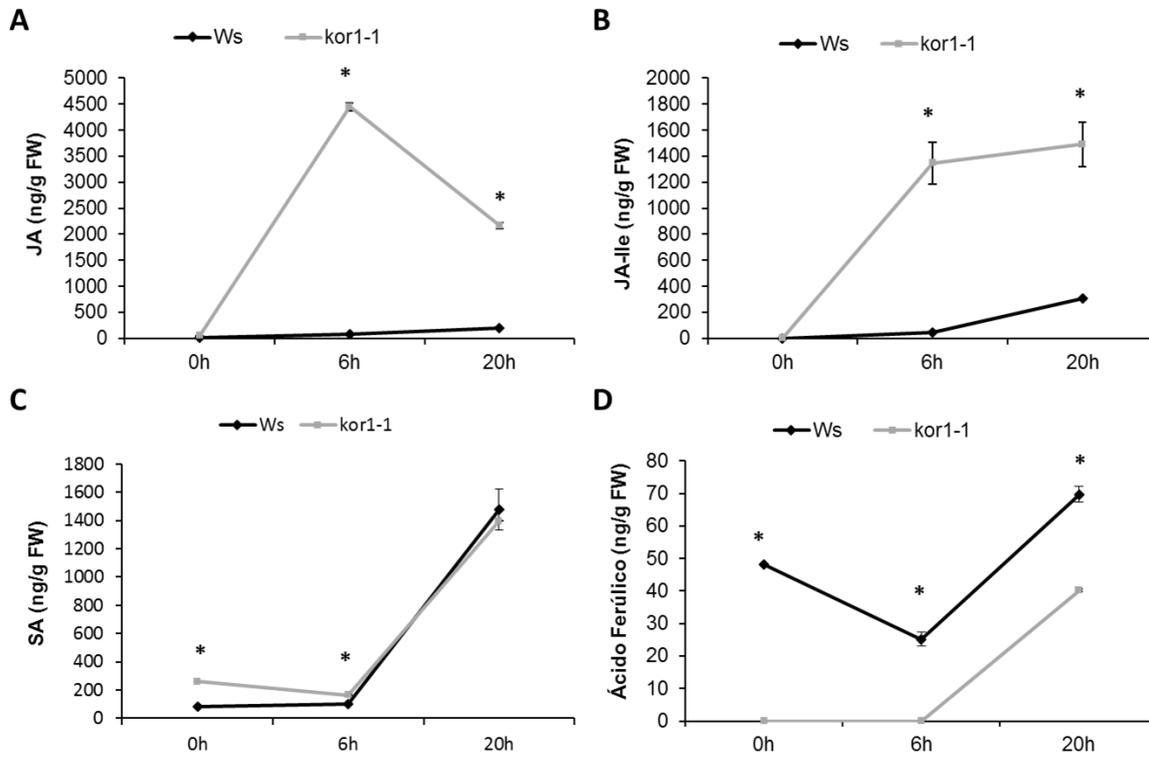


Figura 7. Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de *A. thaliana* Ws y *kor1-1* infectadas con el mutante *cmA*A (Cor). (A-D) Representación gráfica de la acumulación de JA, JA-Ile, SA y ácido ferúlico a 0, 6 y 20 hpi. La acumulación de hormonas y metabolitos secundarios se determinó mediante HPLC-MS. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=24). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre Ws y *kor1-1* a cada tiempo ($p < 0.05$, LSD Test).

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha estudiado la influencia de la ausencia de la Endo-1,4- β -Glucanasa (EG) KOR1 en la interacción planta-patógeno utilizando como plantas modelo: *A. Thaliana* Wassilewskija (Ws, cultivar silvestre) y el mutante de inserción *kor1-1*, que carece de la EG KOR1 y como organismo patógeno, la bacteria hemibiótrofa *P. syringae* pv tomato DC3000 (*Pst*).

En este trabajo hemos podido observar que las plantas Ws y *kor1-1* presentan un fenotipo de infección diferente en respuesta a *Pst*. Cuando la bacteria penetra al interior de la planta, se multiplica por medio de factores de virulencia, incluyendo fitotoxinas (por ejemplo, la coronatina) y proteínas efectoras liberadas al interior de las células hospedadoras por el sistema de secreción de tipo III, permitiendo la colonización de la bacteria y favoreciendo el desarrollo de los síntomas de las enfermedades (Velásquez y col., 2017). El análisis de fenotipo realizado en este trabajo en ambos genotipos de plantas revela la aparición de lesiones cloróticas, pero de una forma más acusada en las plantas *kor1-1*, además de observarse zonas necróticas y deformación de la superficie foliar en este mutante. Además, se comprobó que el crecimiento bacteriano era mayor en el mutante *kor1-1* con respecto a Ws, evidenciado mediante el recuento de colonias realizado posteriormente a la infección con *Pst*. Estos resultados sugieren que el mutante *kor1-1* es más susceptible que Ws a la infección provocada por *Pst*. En estudios previos en nuestro grupo de investigación se observó el efecto contrario cuando se infectaban las plantas con el hongo necrótrofo *B. cinerea*, ya que las plantas mutantes *kor1-1* eran más resistentes que las plantas Ws (Finiti y col., 2013). El resultado obtenido en esta Tesis confirma la conexión de esta EG con las respuestas de defensa de las plantas, influyendo en la infección de forma diferente dependiendo del ciclo vital del patógeno y de la estrategia utilizada por el mismo para la colonización y la expansión. Tras el ataque del patógeno se produce un estallido oxidativo donde se generan ROS. El análisis de la acumulación de H_2O_2 reveló que las plantas de *Arabidopsis* control presentaban poca o ninguna acumulación de H_2O_2 , como cabía esperar.

En las plantas infectadas, el genotipo *kor1-1* presenta mayor acumulación de H₂O₂ con respecto a las plantas Ws, evidenciado por una mayor intensidad del colorante DAB expresado en porcentaje de píxeles marrones con respecto al total a diferencia de Ws, que presenta menor intensidad, debido a una menor acumulación de H₂O₂. Estos datos muestran que las plantas de *Arabidopsis kor1-1* producen un mayor estrés oxidativo que el cultivar Ws como respuesta asociada al daño producido por la bacteria. Por otra parte, se estudió la deposición de calosa en respuesta a *Pst*. Aunque no constituye un mecanismo efectivo frente a *Pst* en *Arabidopsis*, se considera un biomarcador de la activación de respuestas de la planta a estreses (Hauck y col., 2003). Los resultados obtenidos en plantas de *kor1-1* y Ws infectadas con *Pst* muestran que el mutante *kor1-1* presenta mayor acumulación de calosa que Ws y que no se deposita de forma local, sino que aparece dispersa en la hoja. La mayor acumulación de calosa en *kor1-1* infectado no sería efectiva para la contención de la infección, dada la susceptibilidad de este mutante frente a la bacteria, pero actuaría como un indicador de la respuesta de la planta al estrés generado. El hecho de que no se observaran diferencias en la acumulación de calosa en las plantas control apoyaría la hipótesis de la actuación del fenómeno de *priming* en este mecanismo defensivo, que es potenciado tras el ataque por el patógeno. Datos previos mostraron que el mutante *kor1-1* acumuló más calosa en respuesta a *B. cinerea*, pero en ese caso, estaba asociado con un incremento en la resistencia frente al hongo. Esto sugiere que KOR1 actúa como regulador negativo de este mecanismo de defensa, considerado como un marcador de la activación de la defensa basal (Clay y col., 2009).

Los resultados obtenidos sugerían que la ausencia de KOR1 podía alterar las propiedades de la pared celular, pudiendo interferir de manera directa o indirecta en las rutas de señalización de la planta. Así pues, se llevó a cabo un estudio de la acumulación de las principales fitohormonas y metabolitos secundarios, así como de la expresión de genes implicados en estas rutas tras la infección con el patógeno. Está descrito que el SA, el JA y el ET participan en la regulación de las respuestas de las plantas y que las rutas de señalización entre SA y JA/ET son antagónicas, aunque puede haber una sinergia dependiendo de las concentraciones relativas de estas fitohormonas (Truman y col., 2010). Tras la infección, las plantas *Kor1-1* mostraron una alta acumulación de JA y JA-Ile, así como del transcrito *LOX3* (JA). Este resultado se correlacionaría con la alta

susceptibilidad del mutante *kor1-1* frente a *Pst*, si consideramos que una activación temprana de la ruta del JA beneficia a la bacteria en la entrada y colonización, asociado con la supresión de la ruta del SA (Zaho y col., 2003; Geng y col., 2012). La inducción temprana del gen *PDF1.2* (JA/ET) en plantas *kor1-1* infectadas confirma la activación de la ruta del JA. Por otra parte, la infección con el mutante de *P. syringae* deficiente en coronatina *CmaA* (*Cor*⁻) mostró una mayor susceptibilidad de las plantas *kor1-1* y una alteración en el balance hormonal independiente de coronatina. Por tanto, los cambios producidos por la ausencia de la EG KOR1 interfieren en la ruta de señalización del JA, pudiendo tener un efecto de *priming* en las respuestas mediadas por JA, además de influir en el refuerzo de la pared celular de la planta en respuesta a *P. syringae*, permitiendo la colonización y expansión de la bacteria. No se observaron diferencias significativas en los genes *ICS1* y *PR1* (SA), a pesar del aumento de acumulación de SA en las plantas *kor1-1* control e infectadas con respecto a las plantas Ws, por lo que la ruta dependiente de SA no estaría activada en ausencia de KOR1. La acumulación temprana de SA observada en las plantas *kor1-1* infectadas puede provenir de otra fuente, apoyando una compleja interacción entre las rutas del JA y del SA. El análisis hormonal también reveló que las plantas *kor1-1* infectadas presentaban un bajo contenido basal de ácido ferúlico, un componente de la papila, que está constituida principalmente por calosa. Este resultado sugiere una alteración en la papila que estaría relacionada con la alta susceptibilidad de las plantas *kor1-1* frente a *P. syringae*. La desregulación de calosa observada por la ausencia de la EG KOR1 puede interferir de manera indirecta en el balance hormonal tal y como se ha descrito en otros trabajos, apoyando una conexión entre la ruta de señalización del SA y la deposición de calosa (Nishimura y col., 2003; Forcat y col., 2010).

Los resultados descritos en el capítulo I indican que la ausencia de la EG KOR1 produce cambios significativos en los mecanismos de defensa de *A. thaliana* frente a la bacteria hemibiótrofa *P. syringae*, demostrando una correlación entre las rutas de señalización necesarias para la activación de las respuestas de defensa de la planta y esta EG, tal y como se comprobó en estudios previos frente al hongo necrótrofo *B. cinerea* (Finiti y col., 2013). En este capítulo de la Tesis se ha observado la alteración en la acumulación de ROS, en la deposición de calosa, en el balance hormonal y en la expresión de genes implicados en las rutas de señalización hormonal, debido a la interferencia generada por

la ausencia de KOR1, posiblemente por un efecto de *priming* mediado por JA y la deposición de calosa. La ausencia de KOR1 produce una serie de cambios en las respuestas de defensa que beneficiarían a la planta frente a patógenos necrótrofos, pero no serían eficientes frente a *P. syringae*. Estos cambios repercutirían en la estructura de la pared celular, cuyos sensores podrían percibir la ausencia de esta EG y establecer una señal de alarma. Esta teoría nos llevó a proponer un modelo que explicaría la situación observada en la interacción *A. thaliana*-*P. syringae*, junto con los datos obtenidos en estudios previos. (Figura 8).

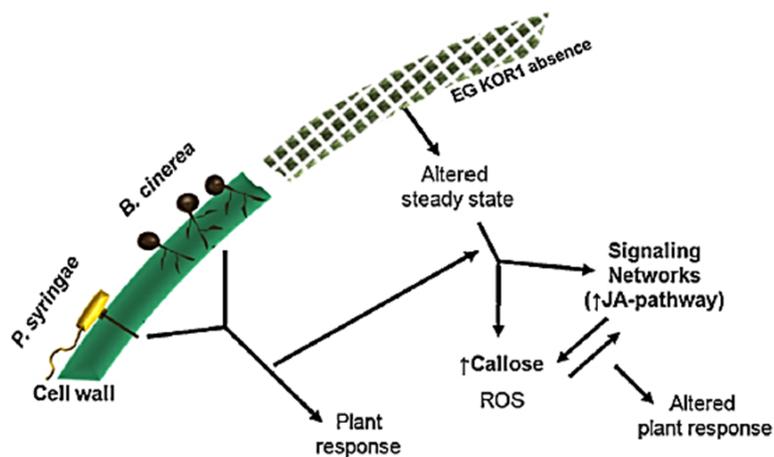


Figura 8. Modelo explicativo de la implicación de la EG KOR1 en la interacción planta-patógeno. En el margen izquierdo se representa la respuesta de la planta frente a patógenos en condiciones normales, a la derecha, se representa la alteración de la respuesta de la planta en ausencia de KOR1, basado en los resultados expuestos en el capítulo I de esta Tesis y en datos previos (Finiti y col., 2013).

La ausencia de la EG KOR1 produciría una alteración en la pared celular de la planta, donde se generaría un estado de pre-alarma. Se activaría la ruta de señalización de JA, acompañada de la deposición de calosa y una alteración en la acumulación de ROS, produciendo una alteración general de las respuestas de la planta, poniendo de manifiesto la compleja red de señalización implicada en la defensa de la planta.

CAPÍTULO II

Estudio del papel del estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig en ausencia de la superóxido dismutasa de Cu-Zn BCSOD1 de *B. cinerea*

Absence of Cu–Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways

Jaime López-Cruz, Óscar Crespo-Salvador, Emma Fernández-Crespo, Pilar García-Agustín and Carmen González-Bosch

Publicado en *Molecular Plant Pathology* (2017) 16-31. doi: 10.1111/mpp.12370.

INTRODUCCIÓN

En el medio ambiente las plantas pueden sufrir la invasión de un amplio espectro de patógenos. Cuando ocurre la interacción, se activan sus rutas de señalización para activar las respuestas de defensa y limitar la expansión de los patógenos. Las respuestas de defensa de las plantas incluyen el estallido oxidativo, un evento temprano considerado como el mayor elemento de la resistencia en las enfermedades de las plantas (Govrin y Levine, 2000), que está asociado con otros mecanismos de resistencia. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se liberan y conducen a la acumulación de radicales dañinos, como oxígeno singlete, hidroxilo (OH[·]) y otros compuestos oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que ayudan a limitar el avance del patógeno (de Gara y col., 2003). Estas moléculas también pueden actuar como señalizadoras de estrés y provocar la muerte celular programada (Asselbergh y col., 2008). Las fitohormonas también juegan un papel clave en las respuestas de las plantas frente al ataque de los patógenos, mediante la señalización y coordinación de rutas, pero estas rutas forman parte de una red compleja que es difícil de interpretar. El SA, el JA y el ET juegan un papel importante en las respuestas de defensa contra los fitopatógenos. La ruta de señalización del SA se activa principalmente contra patógenos biótrophos, mientras que las rutas de señalización del JA y del ET están asociadas con la resistencia contra patógenos necrótrofos (Beckers y Spoel, 2006; Zimmerli y col., 2004). Sin embargo, el SA puede antagonizar la señalización del JA, y viceversa (Glazebrook, 2005), y el balance entre estas y otras hormonas determina finalmente el resultado de la infección (Caarls y col., 2015; Grant y col., 2009). El patógeno también puede manipular la señalización hormonal, pero el hospedador puede atenuar esta manipulación. Así pues, el cruce entre estas rutas genera respuestas variables, de acuerdo con el patógeno que produce la infección (Glazebrook, 2005; Pieterse y col., 2009; Robert-Seilaniantz y col., 2011). En la infección, el sitio de penetración del patógeno refuerza la formación de la papila, cuyo componente principal es calosa (Smart y col., 1986). La calosa es un polímero de residuos de glucosa unido por enlaces 1,3-β-D, que es depositado entre la membrana plasmática y la cara interna de la pared celular primaria. Su acumulación se produce contra el ataque de algunos patógenos y forma parte de la HR (Donofrio y Delaney, 2001; Ryals y col., 1996).

La formación de la papila es una respuesta temprana, previa a otras respuestas que pueden requerir la activación transcripcional de genes implicados en rutas de señalización complejas (Voigt, 2014). Aunque la calosa no es efectiva contra todos los patógenos, su deposición se considera un marcador de la activación de las respuestas de defensa (Hauck y col., 2003). El hongo necrótrofo *B. cinerea*, responsable del moho grisáceo, causa la muerte celular de su hospedador para ayudar a su colonización. A diferencia de otros hongos patógenos de plantas *B. cinerea* puede entrar directamente en tejidos sanos y producir zonas de lesiones necróticas, que se desarrollan rápidamente en todo el tejido si las defensas de las plantas son débiles (Williamson y col., 2007). La acumulación de calosa puede dificultar la expansión de *B. cinerea* en tomate y *Arabidopsis* (Finiti y col., 2013; Flors y col., 2007), pero el patógeno puede explotar el antagonismo entre SA y JA como una estrategia para causar el desarrollo de la enfermedad (El Oirdi y col., 2011). *B. cinerea* también contribuye al estallido oxidativo en la infección y requiere respuestas de las plantas para lograr una patogenicidad completa (Heller y Tudzynski, 2011). Esto ha sido demostrado en plantas de *Arabidopsis* que carecían de HR, donde la virulencia de *B. cinerea* disminuyó (Govrin y Levine, 2000). Sin embargo, la contribución en la producción de ROS por parte de las plantas y de los patógenos sigue sin estar clara. Las ROS son perjudiciales para el patógeno, pero también juegan un papel en el proceso de diferenciación en este hongo patógeno (Viefhues y col., 2014).

B. cinerea, al igual que otros patógenos, posee múltiples enzimas que están involucradas en los sistemas de generación de ROS. Uno de ellos es la superóxido dismutasa (SOD), que pertenece a una familia de enzimas que neutralizan los efectos ROS catalizando la conversión de O_2^- en H_2O_2 . El mutante $\Delta bcsod1$ es deficiente en un gen que codifica la Cu-Zn SOD de *B. cinerea* (Rolke y col., 2004). El tamaño de las lesiones necróticas producidas por esta cepa es reducido en hojas de judías en comparación con la cepa silvestre (WT) (Patel y col., 2008; Rolke y col., 2004). En este trabajo, caracterizamos el fenotipo de infección del mutante $\Delta bcsod1$ en plantas de *Arabidopsis* y de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) en comparación con la cepa B05.10 (WT). Nuestros resultados muestran que la ausencia de *bcsod1* reduce la infectividad del hongo en comparación con la cepa WT, en ambos cultivos. Durante la infección, la acumulación de O_2^- aumenta y la de H_2O_2 disminuye. El desequilibrio observado en la

acumulación de ROS está asociado con un incremento en la deposición de calosa inducida por el patógeno y con cambios en el balance hormonal y en la expresión de genes. El aumento en ambos cultivos de la acumulación del ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) y los genes que lo regulan, es interesante, confirmando su papel en las respuestas de la planta frente a los patógenos. La expresión diferencial de los genes implicados en señalización, defensa y respuesta a estrés oxidativo demuestra que las plantas perciben cambios en el ambiente ROS, activando respuestas que reducen la susceptibilidad de la planta.

RESULTADOS

El mutante $\Delta bcsod1$ presenta una virulencia reducida en plantas de *Arabidopsis* y tomate

Las plantas de *A. thaliana* fueron inoculadas con una suspensión de 10^5 esporas/mL de las cepas B05.10 (cepa silvestre, WT) y $\Delta bcsod1$, tal y como está descrito en materiales y métodos. Se realizó una cinética de infección determinando el área de lesión necrótica a 48, 72 y 96 h post-inoculación (hpi). El mutante $\Delta bcsod1$ mostró una virulencia reducida en comparación con las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con la cepa WT (Figura 9A, B).

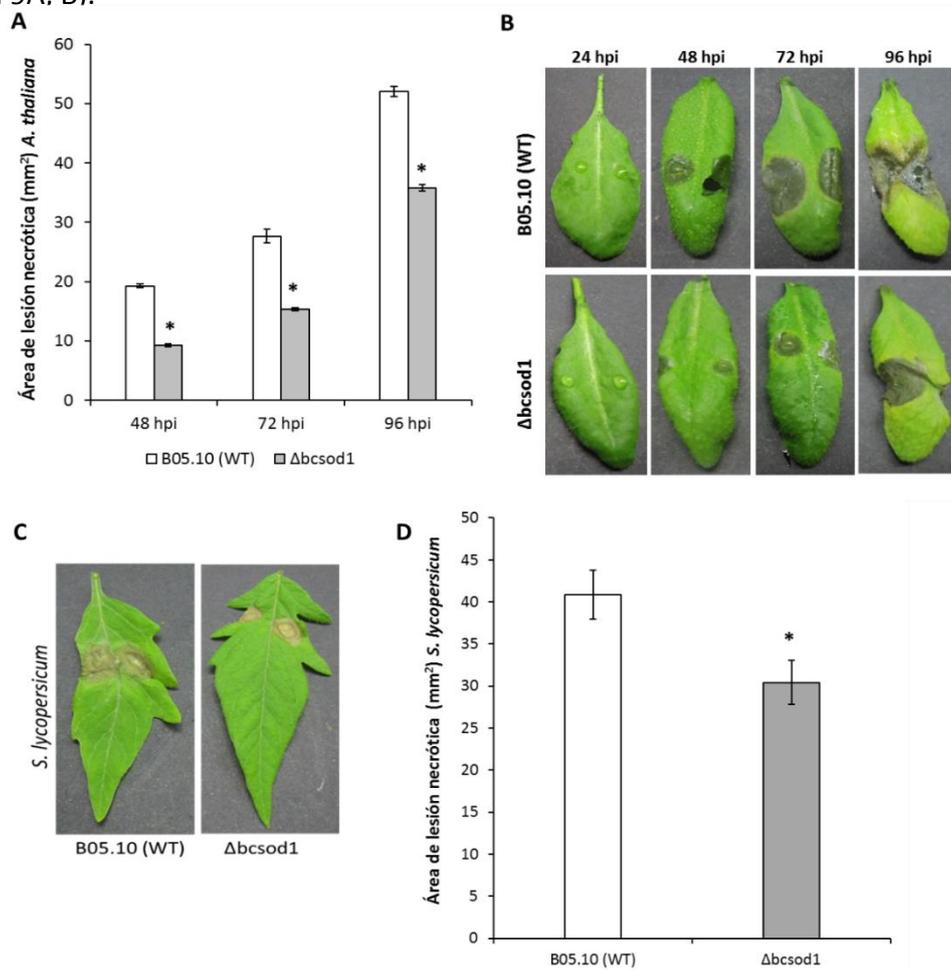


Figura 9. Fenotipo de infección en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. (A) Cuantificación del área de lesión necrótica medida a 48, 72 y 96 hpi en hojas de *A. thaliana* N70000. (B) Imágenes representativas de los síntomas provocados por B05.10 y $\Delta bcsod1$ a 24, 48, 72 y 96 hpi en hojas de *A. thaliana* N70000. (C) Imágenes representativas de los síntomas provocados por ambas cepas fúngicas a 72 hpi en hojas de tomate. (D) Cuantificación del área de lesión necrótica medida a 72 hpi en hojas de tomate. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Test-t).

Por otra parte, las plantas de tomate fueron inoculadas del mismo modo con ambas cepas fúngicas, pero con una suspensión de $5 \cdot 10^4$ esporas/mL, debido a su mayor susceptibilidad comparada con las plantas de Arabidopsis. A las 72 hpi se pudo observar una reducción significativa de la virulencia del mutante $\Delta bcsod1$ en las plantas de tomate, como ocurrió en las plantas de Arabidopsis (Figura 9C, D).

La ausencia de *bcsod1* altera la acumulación de ROS en plantas de Arabidopsis y tomate

Se estudió el efecto de la infección con el mutante $\Delta bcsod1$ en la producción de ROS en plantas de Arabidopsis y de tomate mediante el análisis de la acumulación de H_2O_2 y O_2^- mediante tinción con DAB y NBT, respectivamente. Las plantas de Arabidopsis inoculadas con la cepa WT (B05.10) mostraron manchas marrones alrededor del área de infección, principalmente en el núcleo central de la infección donde se concentra mayoritariamente el micelio, lo que es indicativo de la acumulación de H_2O_2 . Las plantas infectadas con el mutante $\Delta bcsod1$ presentaban una acumulación de H_2O_2 más reducida en ambas localizaciones (Figura 10A). La cinética de ROS estudiada a 24, 48 y 72 hpi en las plantas de Arabidopsis denotó un aumento de la acumulación de H_2O_2 a medida que progresa la infección de ambas cepas fúngicas, aunque en el caso del mutante $\Delta bcsod1$ es menor en comparación con la cepa WT (Figura 10B).

El análisis de la acumulación de O_2^- reveló depósitos azules, principalmente en el área central de la infección en las plantas de Arabidopsis inoculadas con ambas cepas, aunque las plantas inoculadas con la cepa mutante mostraron un aumento significativo de la acumulación de superóxido, en comparación con las plantas inoculadas con B05.10 a 24, 48 y 72 hpi (Figura 10C, D).

Por otra parte, las plantas de tomate inoculadas con B05.10 y $\Delta bcsod1$ mostraron un perfil de acumulación de ROS similar al observado en plantas de Arabidopsis. Las plantas inoculadas con la cepa WT mostraron a las 72 hpi un aumento significativo en la acumulación de H_2O_2 , mientras que la acumulación de O_2^- se redujo significativamente (Figura 10E, F). En cambio, las plantas de tomate inoculadas con el mutante mostraron una reducción de H_2O_2 y un aumento significativo de O_2^- (Figura 10E, F). Estos resultados indican que la ausencia de la enzima SOD fúngica altera el ambiente oxidativo en plantas

de Arabidopsis y de tomate, asociado con una reducción de la virulencia del mutante *Δbcsod1*.

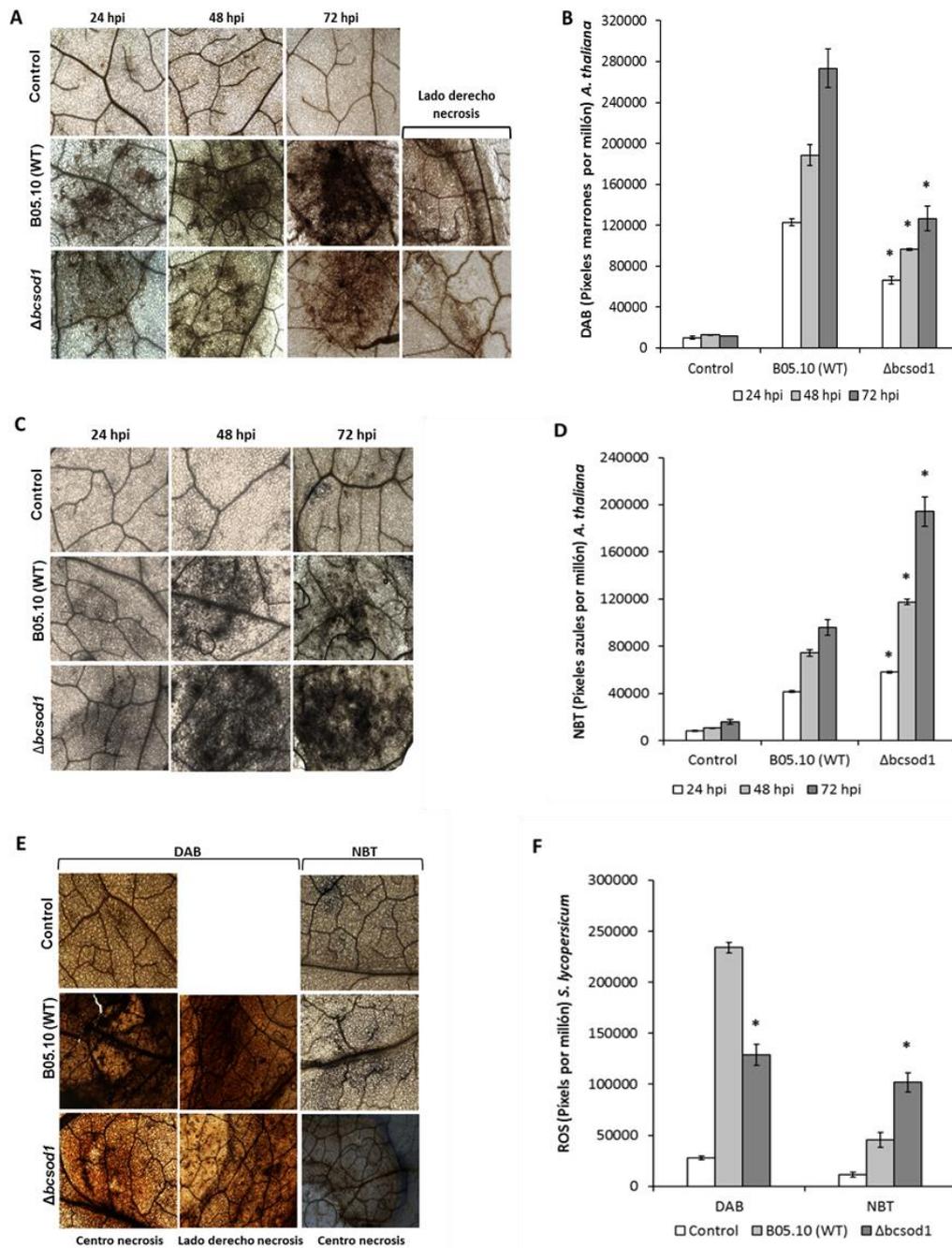


Figura 10. Acumulación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de superóxido (O₂⁻) en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y *Δbcsod1*. (A, B) Imágenes representativas y cuantificación mediante análisis digital de imagen de la acumulación de H₂O₂ mediante tinción con DAB en hojas de Arabidopsis a 24, 48 y 72 hpi. (C, D) Imágenes representativas y cuantificación mediante análisis digital de imagen de la acumulación de O₂⁻ mediante tinción con NBT en hojas de Arabidopsis a 24, 48 y 72 hpi. (E, F) Imágenes representativas y cuantificación mediante análisis digital de imagen de la acumulación de H₂O₂ y de O₂⁻ a 72 hpi en hojas de tomate. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes ± SD (n=18). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p* < 0.05, Test-*t*).

Debido a que *B. cinerea* y la planta hospedadora producen activamente ROS durante la interacción planta-patógeno, se decidió examinar *in vitro* la posible alteración en el estrés oxidativo interno del hongo mutante $\Delta bcsod1$, que pudiera reducir su virulencia y contribuir al desequilibrio ROS observado en las plantas infectadas. Los tests *in vitro* revelaron una reducción de H_2O_2 , evidenciada por una coloración menos intensa y un aumento de O_2^- en la cepa mutante $\Delta bcsod1$, asociado con una mayor acumulación de formazán en las hifas de la cepa mutante, en comparación con la cepa WT (Figura 11A, B). La adición de DPI (difeniliodonio), un inhibidor de flavocitocromos, como las NADPH oxidasas, produjo la ausencia de tinción en las hifas de *B. cinerea*, lo que sugiere que el O_2^- es generado enzimáticamente por flavoenzimas (Figura 11B).

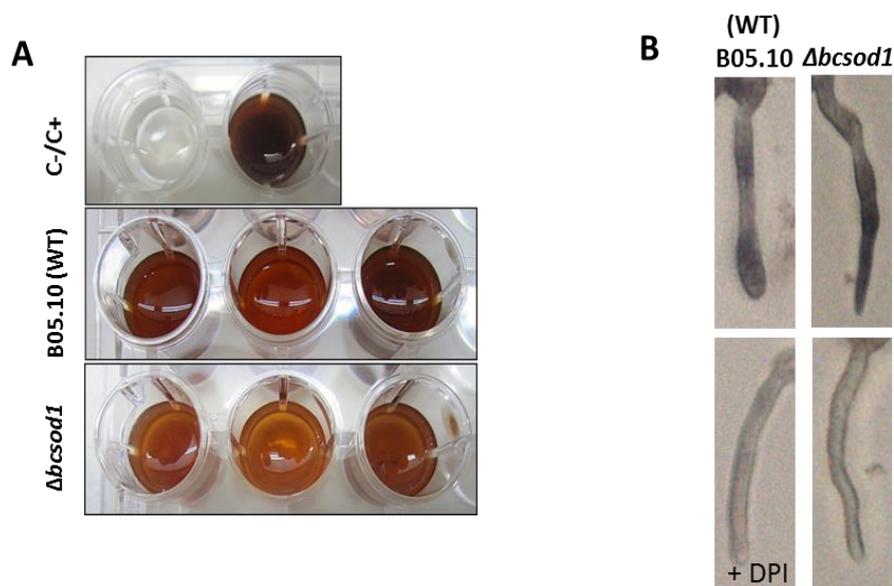


Figura 11. Presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de superóxido (O_2^-) *in vitro*. (A) Test 3,3'-diaminobencidina (DAB) en una placa multipocillo para determinar la presencia de H_2O_2 en las cepas B05.10 y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. Se pesaron 25 mg de micelio fresco, a los que se añadieron 1 mL de DAB. La placa se incubó en oscuridad toda la noche. C+, control positivo, DAB + 1 μ L de H_2O_2 + 1 μ L de horseradish peroxidase; C-, control negativo, DAB + 1 μ L de H_2O_2 . (B) Detección de superóxido en las hifas de esporas germinadas de las cepas B05.10 y $\Delta bcsod1$ (suspensión de 10^5 esporas/mL) mediante tinción con NBT. Como control negativo, se añadieron 50 μ M de DPI previamente a la tinción con NBT. Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes con resultados similares.

Para examinar si la producción alterada de ROS del mutante $\Delta bcsod1$ es responsable de su incapacidad para infectar, se realizó otro test de patogenicidad añadiendo como agentes antioxidantes ácido ascórbico (AA) y ditioneitol (DTT). Esta aproximación experimental ya demostró el papel del sistema tioredoxina en la patogénesis de *B. cinerea* (Viefhues y col., 2014). La adición de AA a la suspensión de conidias antes de la inoculación disminuyó el grado de infección de B05.10, como se esperaba, pero no se recuperó el fenotipo de infección tras la inoculación con el mutante $\Delta bcsod1$, que infectó incluso menos que la cepa WT tras la aplicación de AA (Figura 12A, B). Bajo estas condiciones, la acumulación de las ROS se redujo significativamente tanto en respuesta al WT como a $\Delta bcsod1$, lo que sugiere su contribución al proceso infeccioso. La ausencia de infección en presencia de DTT confirma que las ROS son cruciales en esta interacción planta-patógeno (Figura 12B).

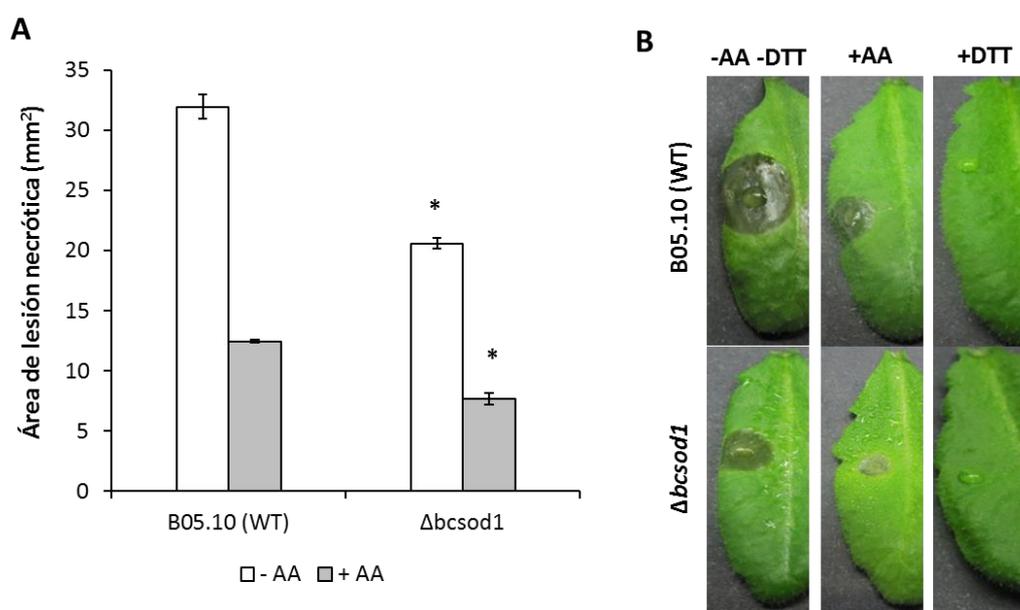


Figura 12. Influencia de los antioxidantes ácido ascórbico (AA) y ditioneitol (DTT) en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. (A) Cuantificación del área de lesión necrótica medida a 72 hpi en hojas de *Arabidopsis* en presencia de AA. La suspensión de esporas para la inoculación fue de 10^5 esporas/mL y fue suplementada con 5 g/L de AA antes de la inoculación. (B) Imágenes representativas de los síntomas provocados por B05.10 y $\Delta bcsod1$ a 72 hpi en hojas de *Arabidopsis* en presencia de AA y DTT. La suspensión de esporas fue de 10^5 esporas/mL y fue suplementada por 750 μ M de DTT antes de la inoculación. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Test-t).

Incluso en un ambiente oxidativo reducido por el ascorbato, la infección con el mutante $\Delta bcsod1$ sigue produciendo un desequilibrio ROS en comparación con B05.10, con un aumento significativo en la acumulación de O_2^- y una reducción de H_2O_2 (Figura 13A-C).

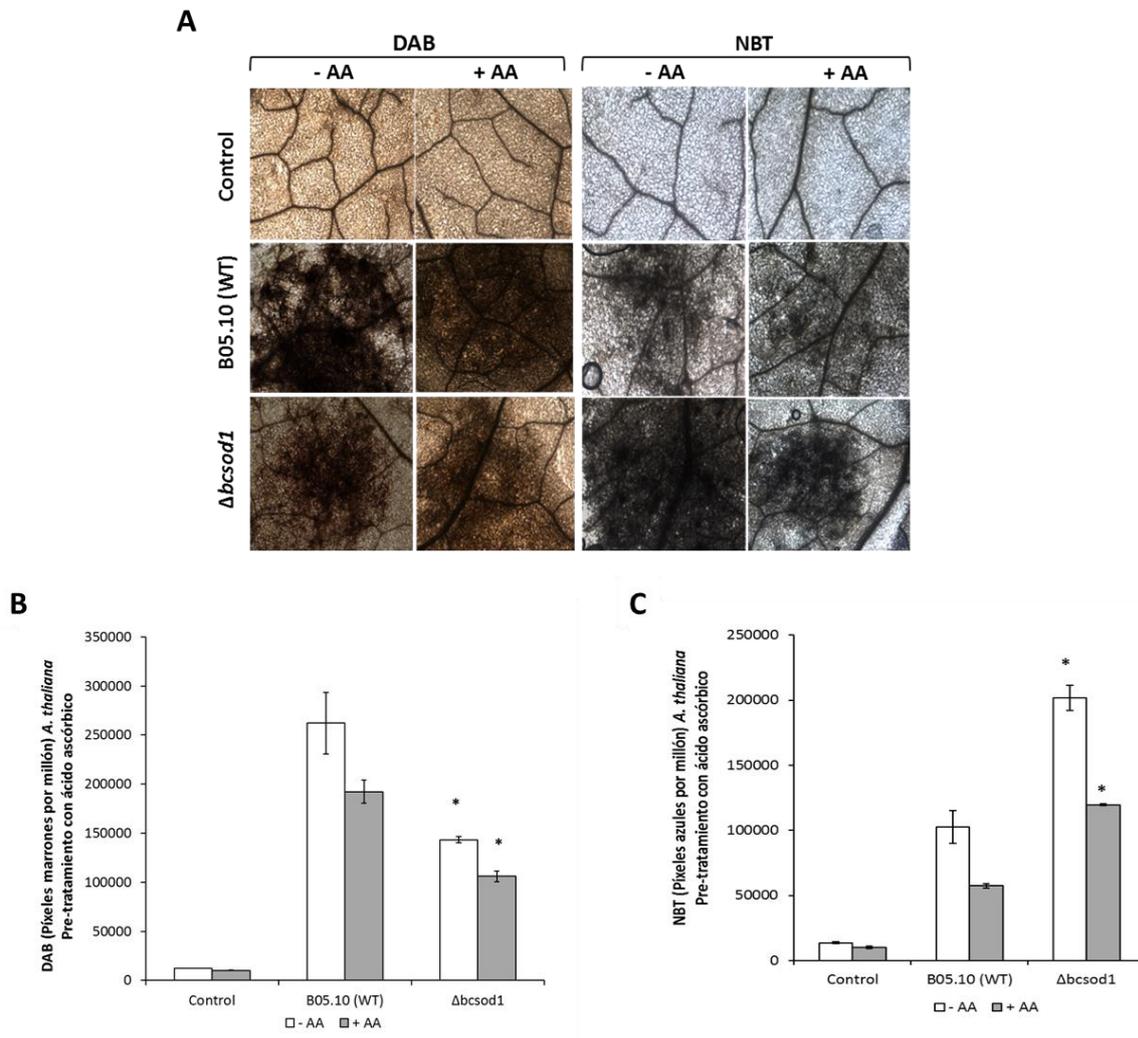


Figura 13. Acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de superóxido (O_2^-) a 72 hpi en presencia de ácido ascórbico (AA) en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. (A) Imágenes representativas de la acumulación de H_2O_2 y de O_2^- a 72 hpi mediante la tinción con DAB y NBT, respectivamente. (B, C) Cuantificación de la acumulación de H_2O_2 y de O_2^- en hojas de *Arabidopsis* a 72 hpi mediante análisis digital de imagen. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD ($n=18$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Test- t).

La ausencia de *bcsod1* altera la deposición de calosa en plantas de *Arabidopsis* y tomate

La calosa es un polisacárido considerado como un buen biomarcador de respuestas a estrés y como barrera física frente a patógenos, como se ha descrito anteriormente (Hauck y col., 2003; Vicedo y col., 2009; Ellinger y col., 2013). La tinción con azul de anilina mostró un incremento significativo en la acumulación de calosa en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con $\Delta bcsod1$ a 72 hpi, en comparación con las plantas inoculadas con B05.10 (WT) (Figura 14A). La mayor parte de los depósitos de calosa se observaron en el núcleo de la infección, rodeados por una capa de calosa en el borde del área de la lesión necrótica (Figura 14B-C). Es interesante que se observó un incremento de calosa en el borde, e incluso en el centro de la infección, 72 h tras la inoculación con $\Delta bcsod1$ en comparación con B05.10 (Figura 14A-C).

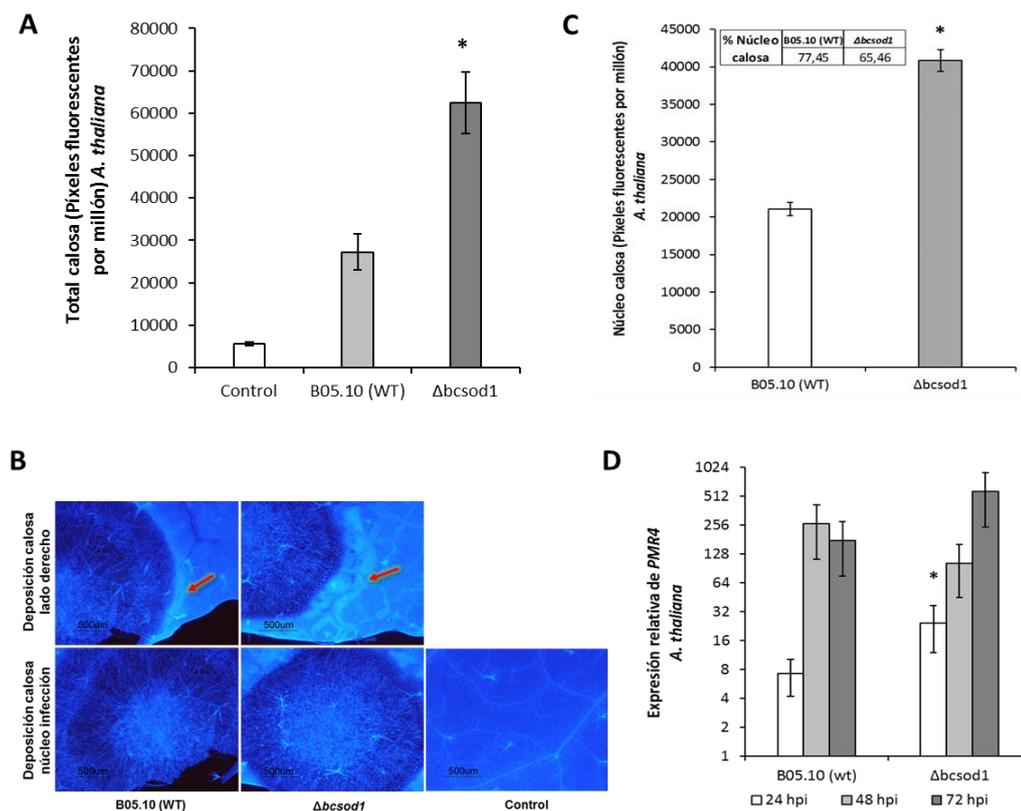


Figura 14. Deposición de calosa y expresión relativa de *PMR4* en plantas de *A. thaliana* N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. (A) Cuantificación de calosa visualizada mediante la tinción de azul de anilina a 72 hpi en hojas de *Arabidopsis* mediante la determinación del número de píxeles fluorescentes por millón. (B) Imágenes representativas de la deposición de calosa en el área de infección a 72 hpi en hojas de *Arabidopsis*. (C) Deposición de calosa en el núcleo de infección en hojas de *Arabidopsis*. La tabla situada en la gráfica C, representa el porcentaje de calosa en el núcleo de infección con respecto a la deposición total. (D) Expresión relativa del gen de síntesis de calosa, *PMR4* a 24, 48 y 72 hpi en plantas de *Arabidopsis*. *EIF4A1* fue usado como estándar interno. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Test-t).

Las plantas de tomate inoculadas con $\Delta bcsod1$ también mostraron un incremento significativo de calosa, comparado con las plantas inoculadas con la cepa WT (Figura 15A). Se observaron depósitos de calosa en la región central tras la infección con ambas cepas fúngicas, donde se acumula la mayor parte de este polisacárido (Figura 15B-C). En el caso de la cepa mutante $\Delta bcsod1$, el núcleo de infección estaba delimitado por una capa punteada de calosa en lugar de la capa observada en las plantas infectadas con la cepa WT (Figura 15B).

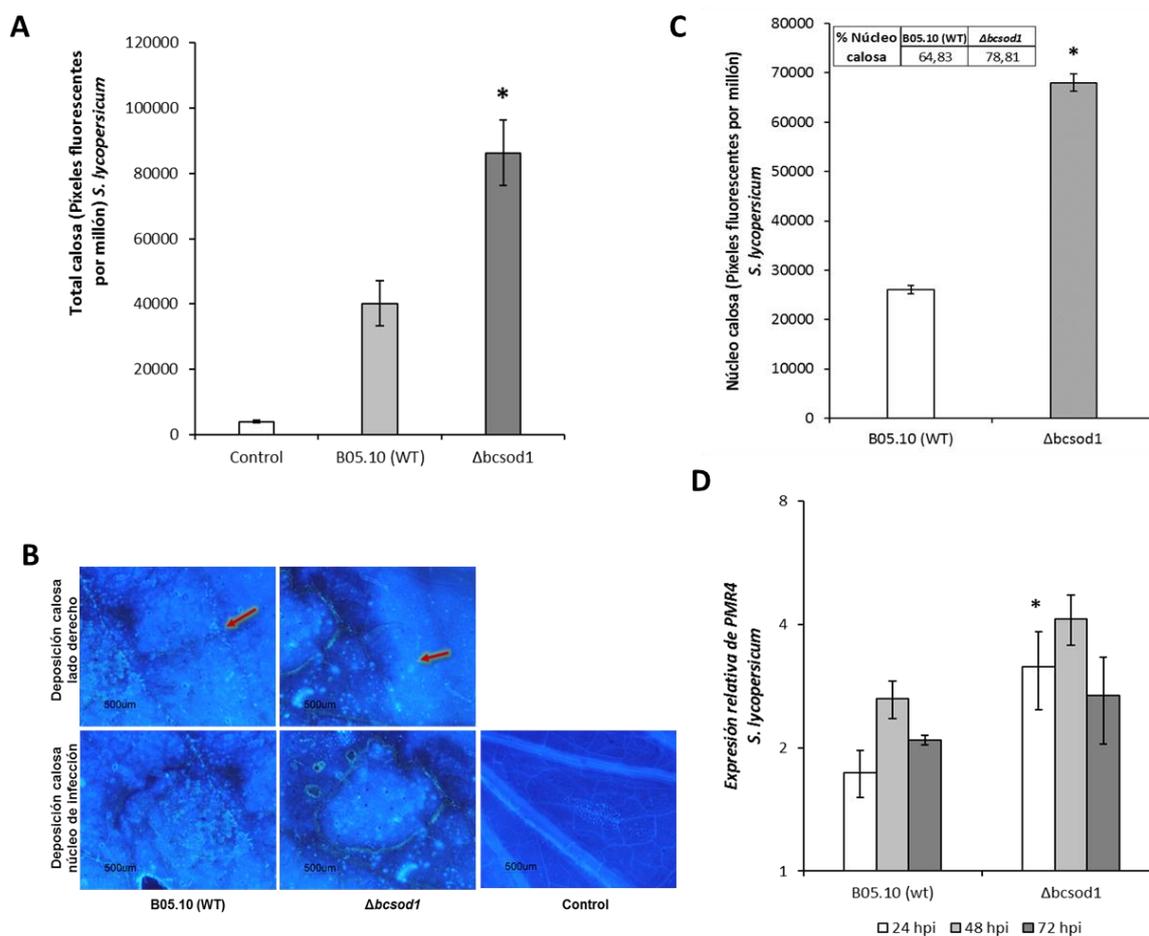


Figura 15. Deposición de calosa y expresión relativa de *PMR4* en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. (A) Cuantificación de calosa visualizada mediante la tinción de azul de anilina a 72 hpi en hojas de tomate mediante la determinación del número de píxeles fluorescentes por millón. (B) Imágenes representativas de la deposición de calosa en el área de infección a 72 hpi en hojas de tomate. (C) Deposición de calosa en el núcleo de infección en hojas de tomate. La tabla situada en la gráfica C, representa el porcentaje de calosa en el núcleo de infección con respecto a la deposición total. (D) Expresión relativa del gen de síntesis de calosa, *PMR4* a 24, 48 y 72 hpi en plantas de tomate. *EF1- α* fue usado como estándar interno. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Test-t).

Los diferentes patrones observados en la deposición de calosa en ambos cultivos pueden estar relacionados con la mayor susceptibilidad de las plantas de tomate frente a la cepa WT.

Para verificar la conexión entre la ausencia de *bcsod1* y el metabolismo de calosa, se analizó la expresión relativa del gen de síntesis de calosa *PMR4*, mediante RT-qPCR. En plantas de *Arabidopsis* y de tomate, los niveles de expresión de *PMR4* se indujeron significativamente tras la infección con B05.10 a todos los tiempos analizados. Tras la inoculación con la cepa mutante $\Delta bcsod1$, la expresión de *PMR4* se indujo de manera temprana (24 hpi) en ambos cultivos (Figuras 14D y 15D).

Cambios en la acumulación de metabolitos y en la expresión de genes en plantas de *Arabidopsis* y de tomate inoculadas con $\Delta bcsod1$

Para determinar el impacto de la ausencia de *bcsod1* en la respuesta basal de la planta, se analizó la acumulación de las principales fitohormonas y compuestos fenólicos en plantas de *Arabidopsis* y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$. (Figuras 16 y 17). El análisis hormonal se llevó a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas y consistió en la determinación simultánea, en la misma muestra a 0, 24, 48 y 72 hpi de los siguientes compuestos: áABA, SA, JA, JA-Ile, la oxilipina OPDA y los ácidos cafeico y ferúlico.

En plantas de *Arabidopsis*, el contenido de JA-Ile aumentó a las 48 hpi tras la infección con $\Delta bcsod1$, comparado con las plantas inoculadas con B05.10 (Figura 16). Estas plantas presentaban, además, un aumento significativo de ABA y OPDA a las 72 hpi, junto con una disminución del contenido de SA libre, comparado con la cepa WT (Figura 16). Es interesante que el ácido cafeico se acumuló rápidamente (24 hpi) tras la infección con el mutante $\Delta bcsod1$ y permaneció estable hasta las 72 hpi (Figura 16). Este ácido es precursor de la lignina y es un componente de la papila (Soylu y col., 2005; Vicedo y col., 2009).

Las plantas de tomate inoculadas con $\Delta bcsod1$ mostraron una alteración similar en la acumulación de hormonas y metabolitos secundarios, con algunas diferencias (Figura 17). Como en *Arabidopsis*, el contenido de OPDA y ABA aumentó significativamente a 72 hpi y la cantidad de SA disminuyó en este mismo tiempo. Sin embargo, el contenido de JA-Ile permaneció sin cambios, mientras que el incremento de ácido ferúlico se retrasó en comparación con las plantas de tomate inoculadas con B05.10 (Figura 17).

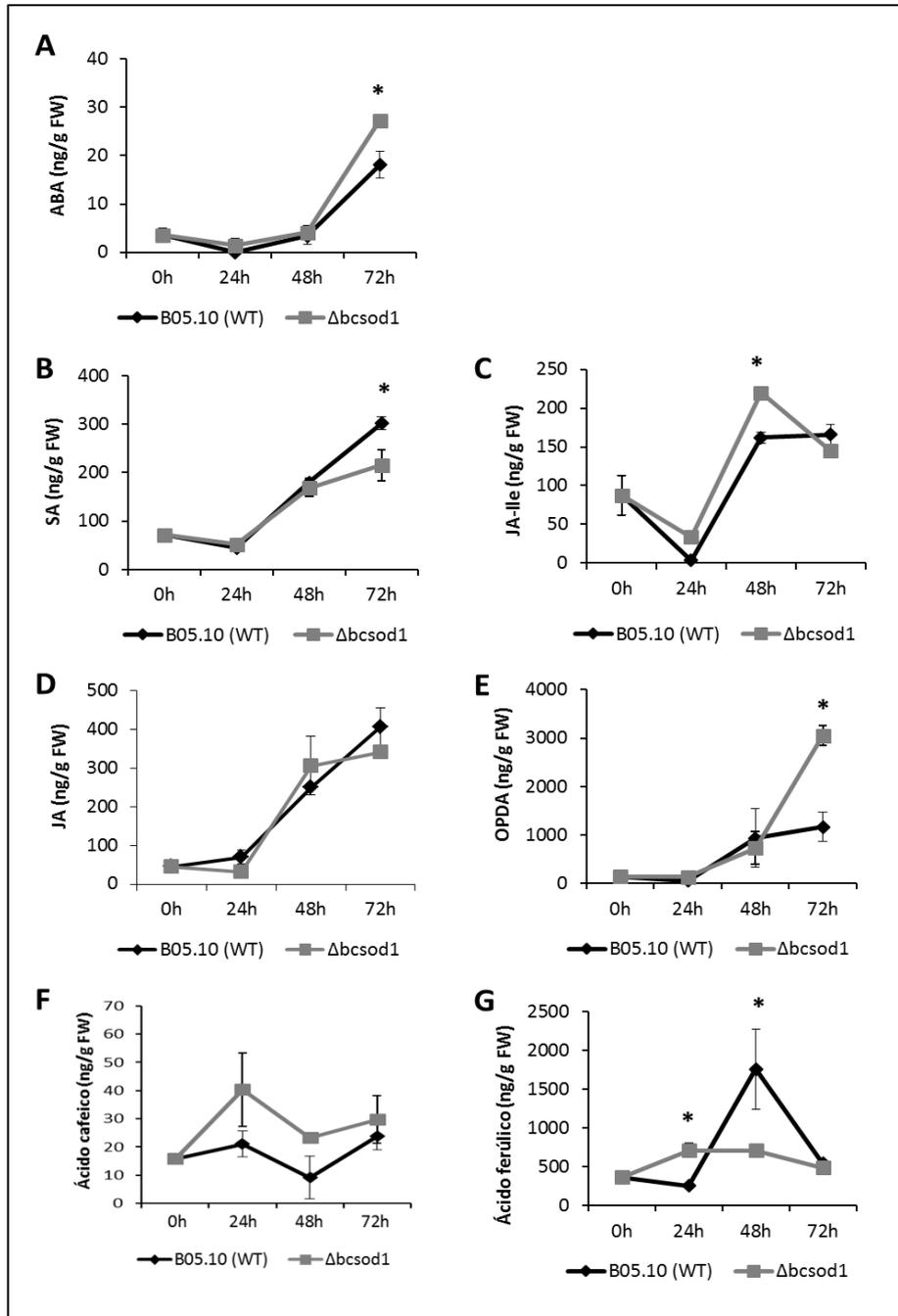


Figura 16. Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de *A. thaliana* N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. (A-G) Ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), jasmónico-isoleucina (JA-Ile), ácido jasmónico (JA), ácido 12-oxophytodienoico (OPDA), ácido cafeico y ácido ferúlico, determinados mediante HPLC-MS en hojas recolectadas a 0, 24, 48 y 72 hpi. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=12). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Test-t).

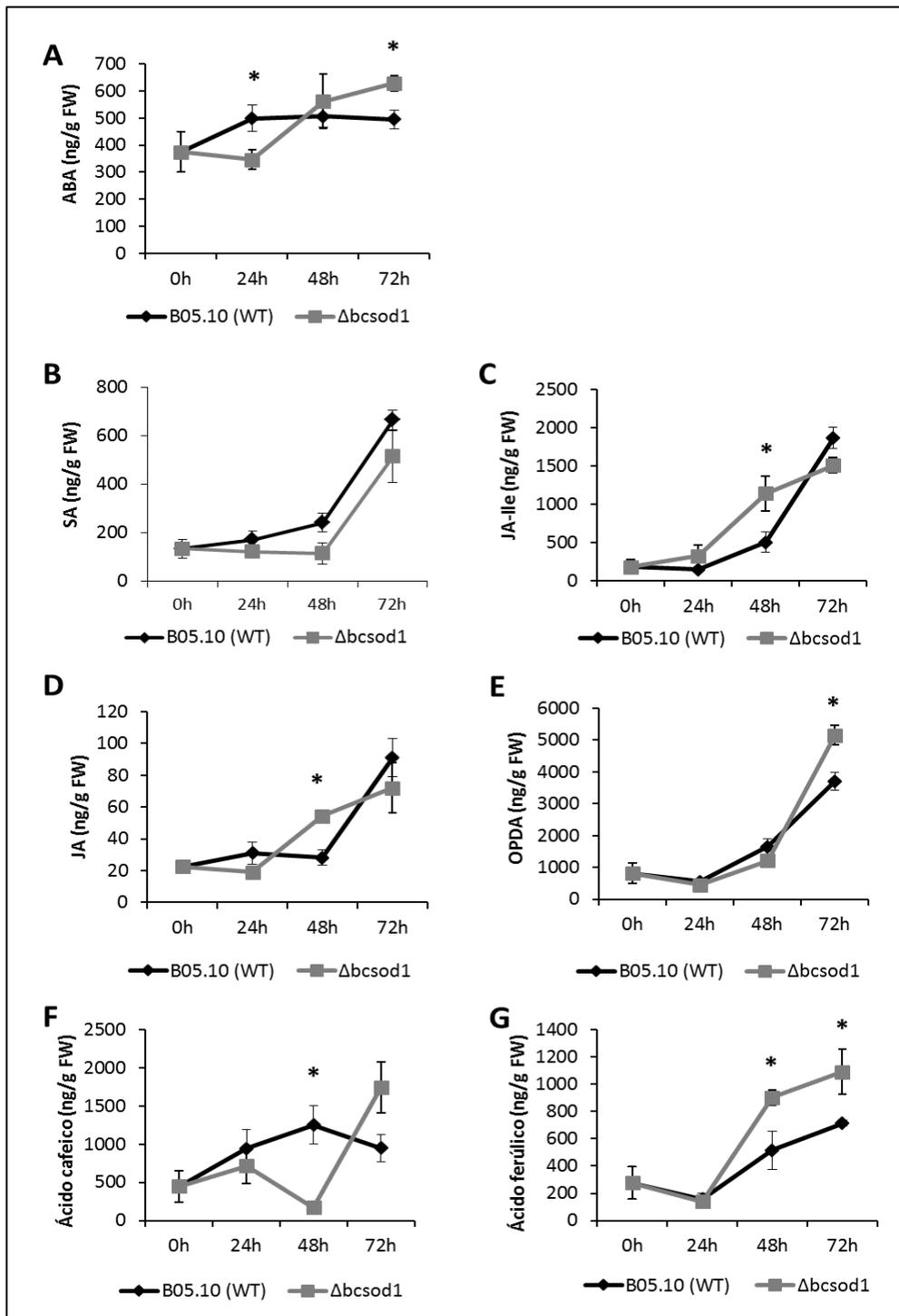


Figura 17. Acumulación de hormonas y metabolitos secundarios en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. (A-G) Ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), jasmónico-isoleucina (JA-Ile), ácido jasmónico (JA), ácido 12-oxophytodienoico (OPDA), ácido cafeico y ácido ferúlico, determinados mediante HPLC-MS en hojas recolectadas a 0, 24, 48 y 72 hpi. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=12). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas infectadas con B05.10 y $\Delta bcsod1$ a cada tiempo ($p < 0.05$, Test-t).

Para verificar la conexión entre la ausencia de *bcsod1* y la activación de las rutas de señalización, se analizó la expresión de genes marcadores de SA (*ICS1*, *PR1*, *PR2*), JA/ET (*PDF1.2*), JA (*VSP1*) y OPDA (*HSP17.4*, *HsfA2*), mediante RT-qPCR en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con B05.10 y $\Delta bcsod1$ a 24, 48 y 72 hpi (Figura 18).

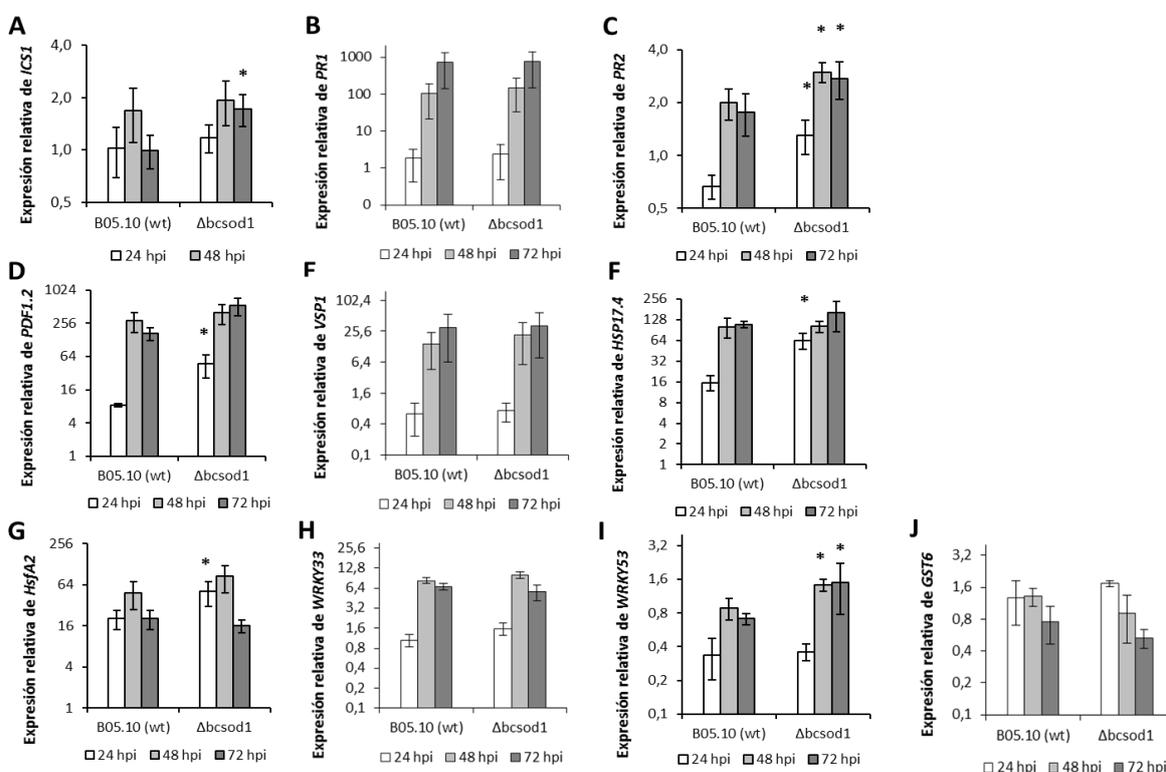


Figura 18. Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana* N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. La expresión relativa de los genes *ICS1*, *PR1*, *PR2*, *PDF1.2*, *VSP1*, *HSP17.4*, *HsfA2*, *WRKY33*, *WRKY53* y *GST6* se determinó mediante RT-qPCR a 24, 48 y 72 hpi (A-J). *EIF4A1* fue usado como estándar interno. Los datos mostrados se expresan en Log₂. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas infectadas con B05.10 y $\Delta bcsod1$ a cada tiempo ($p < 0.05$, Test-t).

Como era de esperar, la infección con B05.10 aumentó significativamente la expresión de *PDF1.2*, un gen marcador de resistencia frente a necrótrofos en todos los tiempos medidos. La infección con la cepa $\Delta bcsod1$ incrementó la expresión de *PDF1.2* a 24 hpi con respecto al WT (Figura 18), que se correlacionó con la activación de la ruta de señalización de JA y la reducida virulencia del mutante. También se observó un marcado aumento en la acumulación de OPDA tras la infección con $\Delta bcsod1$, asociado con la inducción temprana (24 hpi) de los dos genes reguladores de esta oxilipina: *HSP17.4* y *HsfA2* (Masuda y col., 2014; Sham y col., 2014) (Fig. 7). La expresión de *ICS1* aumentó

ligeramente a 72 hpi en las plantas inoculadas con el mutante, comparado con la cepa WT, a pesar de la ligera reducción de SA libre observada. Las plantas inoculadas con el WT mostraron una inducción significativa en la expresión de *PR1*, similar a las plantas inoculadas con $\Delta bcsod1$ (Figura 18). Sin embargo, la expresión de *PR2* aumentó en las plantas inoculadas con el mutante a 24, 48 y 72 hpi, en comparación con la cepa WT (Figura 18).

Por otra parte, se analizó a 24, 48 y 72 hpi la expresión de genes marcadores de SA (*PR1*, *PR2*), JA (*LoxD*), otras oxilipinas (*DES*) y OPDA (*HsfA2*) en plantas de tomate inoculadas con las mismas cepas (Figura 19).

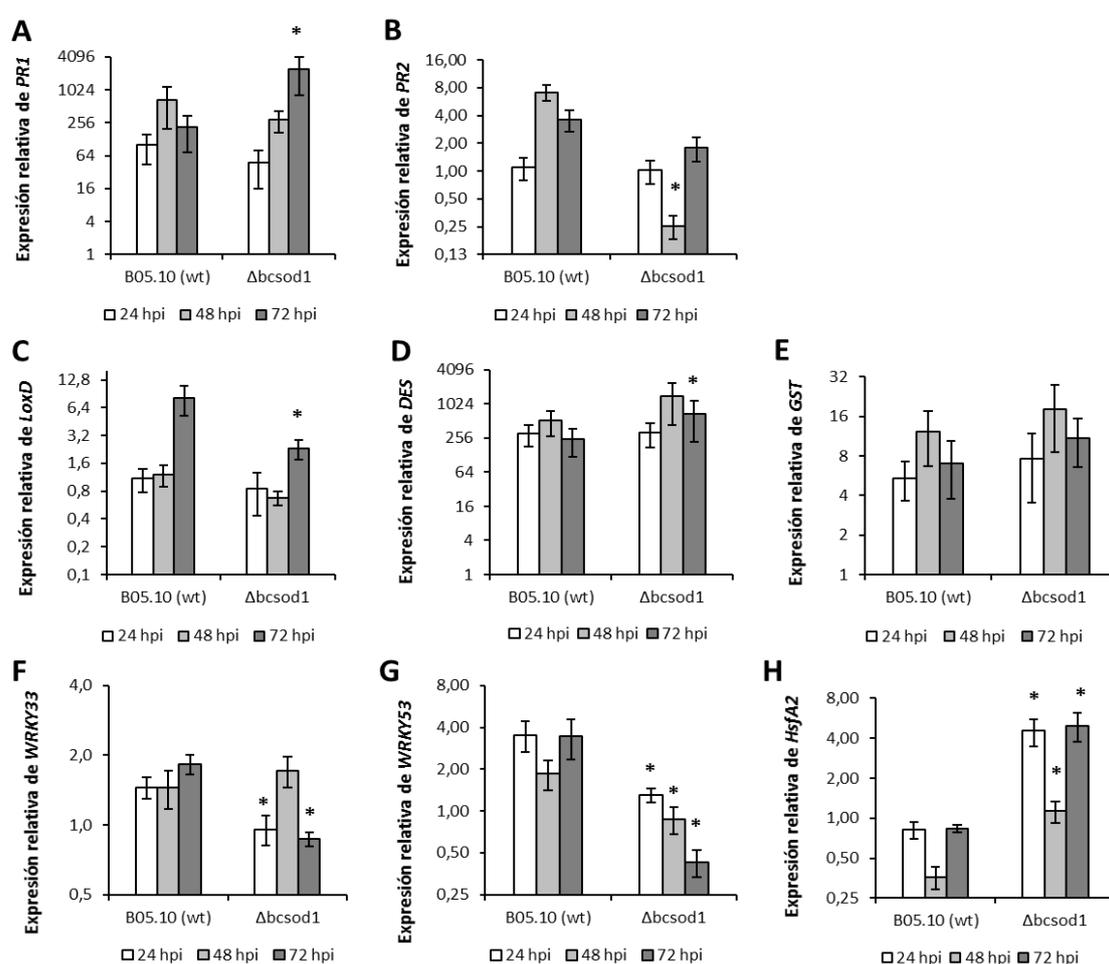


Figura 19. Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea*. La expresión relativa de los genes *PR1*, *PR2*, *LoxD*, *DES*, *GST*, *WRKY33*, *WRKY53* y *HsfA2* se determinó mediante RT-qPCR a 24, 48 y 72 hpi (A-H). *EF1- α* fue usado como estándar interno. Los datos mostrados se expresan en Log₂. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas infectadas con B05.10 y $\Delta bcsod1$ a cada tiempo ($p < 0.05$, Test-t).

La ausencia de *bcsod1* redujo significativamente la expresión de *LoxD* a 72 hpi, pero incrementó la expresión de *DES* en ese mismo tiempo, el cual, está implicado en la síntesis de otras oxilipinas (Itoh y Howe, 2001). La expresión del gen marcador de OPDA en tomate *HsfA2* aumentó en todos los tiempos medidos en las plantas inoculadas con $\Delta bcsod1$, comparado con las plantas inoculadas con la cepa WT (Figura 19). Estos cambios a nivel transcripcional se correlacionan con la acumulación significativa de OPDA y la inalterada acumulación de JA-Ile tras la infección con $\Delta bcsod1$. En plantas de tomate la expresión de *PR1* aumentó significativamente en respuesta a la cepa WT de *B. cinerea*, como se describió previamente (Vicedo y col., 2009; Finiti y col., 2014) y se incrementó a 72 hpi en respuesta a $\Delta bcsod1$ (Figura 19). En cambio, la expresión de *PR2* disminuyó ligeramente en respuesta a $\Delta bcsod1$, lo que indica que la ruta dependiente de SA está alterada en plantas de tomate tras la infección con la cepa mutante, aunque no cambie la acumulación de SA libre.

Adicionalmente, se analizaron genes marcadores de estrés oxidativo. No se observaron cambios significativos en la expresión de los genes *GST*, que están relacionados con las respuestas al estrés oxidativo, tras la infección con B05.10 y $\Delta bcsod1$ en ambos cultivos (Figuras 18 y 19).

Por otro lado, los genes *WRKY33* y *WRKY53*, que codifican factores de transcripción regulados por estrés oxidativo, mostraron una expresión diferencial en plantas inoculadas con el mutante $\Delta bcsod1$. La expresión de *WRKY53* aumentó significativamente a 48 y 72 hpi en plantas de *Arabidopsis* con respecto al WT, mientras que la de *WRKY33* no cambió en este cultivo (Figura 18). En plantas de tomate, la expresión de ambos genes se redujo significativamente tras la infección con $\Delta bcsod1$, comparado con las plantas de tomate inoculadas con B05.10 (Figura 19).

DISCUSIÓN

En este capítulo de la presente Tesis se han estudiado las respuestas de plantas de *A. thaliana* y de *S. lycopersicum* infectadas con las cepas del hongo necrótrofo *B. cinerea* B05.10 (WT) y el mutante $\Delta bcsod1$, que carece de la enzima superóxido dismutasa Cu-ZnSOD. Como se ha comentado anteriormente, en la interacción planta-patógeno se genera un estallido oxidativo. Tanto la planta como el patógeno producen ROS, aunque todavía no está claro cuál es la contribución de cada uno de ellos. Las ROS actúan como moléculas señalizadoras de la planta y juegan un papel en la protección. Sin embargo, este ambiente oxidativo puede ser utilizado por patógenos necrótrofos como *B. cinerea* en su propio beneficio (Williamson y col., 2007; Temme y Tudzynski, 2009; Finiti y col., 2014). Los acontecimientos oxidativos que se producen tras el ataque producen un desequilibrio redox en la zona de infección que pueden facilitar el avance de la enfermedad (Lyon y col., 2007). En el presente trabajo se ha demostrado que el mutante $\Delta bcsod1$ presenta una virulencia significativamente reducida tanto en plantas de tomate como de *Arabidopsis*, respecto a la cepa WT. La cinética de infección en plantas de *Arabidopsis* demuestra un claro retraso en la formación de lesiones primarias y la consiguiente expansión del hongo en ausencia de esta actividad superóxido dismutasa. Estudios previos realizados con este mutante revelaron una virulencia reducida en plantas de judía (Rolke y col., 2004; Patel y col., 2008). Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que BCSOD1 es necesaria para la completa patogenicidad del hongo, constituyendo un factor de virulencia. El análisis de la acumulación de ROS mediante la tinción específica con los colorantes DAB y NBT, para visualizar la acumulación de H_2O_2 y O_2^- , respectivamente, reveló que en plantas de *Arabidopsis* la cepa WT acumula mayor cantidad de H_2O_2 , evidenciado por la aparición de grumos de color marrón intenso, principalmente en el núcleo de la infección donde se concentra la mayor parte del micelio. Sin embargo, las plantas infectadas con el mutante $\Delta bcsod1$ presentaban una menor acumulación de H_2O_2 con respecto a la cepa WT. El análisis de la acumulación de O_2^- reveló que la cepa WT acumulaba menor cantidad de O_2^- , principalmente en el núcleo de la infección, mientras que el mutante $\Delta bcsod1$ presentaba una mayor acumulación en la misma zona, evidenciado por la aparición de grumos de color azul grisáceo. Las plantas de tomate inoculadas con ambas cepas

mostraron una acumulación similar de estas ROS. Estos resultados demuestran que la ausencia de esta SOD altera el ambiente oxidativo en plantas de tomate y *Arabidopsis*, asociado con la capacidad de infección del hongo. Esta situación puede deberse a la incapacidad del mutante $\Delta bcsod1$ para detoxificar las ROS endógenas o las ROS generadas por la planta tras el ataque del patógeno. El estudio *in vitro* de la producción de H_2O_2 en ambas cepas de *B. cinerea* demostró una alteración de ROS interna en el mutante $\Delta bcsod1$, ya que la cepa WT presentaba una mayor presencia de H_2O_2 , evidenciada por una coloración rojiza intensa, mientras que $\Delta bcsod1$ presentaba una menor cantidad, evidenciado por una coloración anaranjada. La acumulación de O_2^- en las hifas del hongo mostró una alteración similar, observándose una mayor deposición de formazán en las hifas de $\Delta bcsod1$ con respecto a la cepa B05.10. La adición de agentes antioxidantes como el ácido ascórbico y el ditiotreitolo en el inóculo para infectar plantas de *Arabidopsis* no mostró una restauración del fenotipo de infección con ambas cepas fúngicas, siendo incluso menor en la infección con $\Delta bcsod1$. Un resultado similar de la alteración ROS interna ha sido observado en otros mutantes de *B. cinerea* (Marschall y Tudzynski, 2014; Schumacher y col., 2014; Viefhues y col., 2014). Los resultados obtenidos indican que BCSOD1 no es necesaria para hacer frente al estrés oxidativo que se produce durante la interacción planta-patógeno, por lo que BCSOD1 puede tener otro papel durante esta interacción. La baja capacidad de infección del hongo en presencia de antioxidantes apoya la idea de que un hongo necrótrofo como *B. cinerea* depende de manera directa o indirecta de la producción de ROS, y que puede aprovechar este ambiente oxidativo en su propio beneficio para poder colonizar el tejido de la planta y expandirse después. El balance O_2^- / H_2O_2 observado contribuye a unos niveles de H_2O_2 que dañan a la planta, reduciendo sus respuestas de defensa y aumentando la susceptibilidad frente al hongo. El balance O_2^- / H_2O_2 generado durante la infección con el mutante $\Delta bcsod1$ contribuye a unos niveles de H_2O_2 que le permiten a la planta desplegar una respuesta más eficiente, aumentando la resistencia frente al hongo. Por lo tanto, podemos decir que BCSOD1 constituye un factor de virulencia. En trabajos previos en nuestro grupo de investigación hemos podido ver también una correlación entre la acumulación de H_2O_2 y la susceptibilidad frente a *B. cinerea*, esto refleja la importancia de establecer un control de los niveles de ROS en respuesta a estreses bióticos (Finiti y col., 2014; Angulo y col., 2015). Sin embargo, no solo los niveles de ROS

son importantes para establecer una respuesta efectiva frente a patógenos, las plantas ponen en juego otros mecanismos de protección como la deposición de calosa.

Los resultados obtenidos muestran que, tras la infección con el mutante *Δbcsod1* en plantas de *Arabidopsis* y de tomate, se produce una mayor acumulación de calosa en el núcleo de la infección con respecto a la cepa WT, que depende a nivel transcripcional de la calosa sintasa. Estos datos indican una correlación entre los cambios en el balance redox y el metabolismo de la calosa. Esta conexión ha sido observada en otros trabajos, donde la presencia de O_2^- y oxígeno singlete inducían una acumulación de calosa mayor que la de H_2O_2 (Vellosillo y col., 2010). En nuestro grupo de investigación ya se había sugerido la importancia de la deposición de calosa en respuesta frente a *B. cinerea* (Flors y col., 2007; Vicedo y col., 2009; Finiti y col., 2013). Naumann y col. (2013) observaron que una mayor acumulación de calosa en el núcleo de infección en plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes del gen de calosa sintasa (*PMR4*) infectadas con *Golovinomyces cichoracearum* y *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*, aumentaba la resistencia frente a estos patógenos. En nuestro caso, hemos podido ver una inducción temprana del gen *PMR4* en plantas de *Arabidopsis* y de tomate en ausencia de *bcsod1*, donde se podía ver una mayor acumulación de calosa. Recientemente se ha propuesto que la calosa, por sí misma, puede actuar de forma antagónica a la ruta de señalización del SA, donde el gen *PR2* puede actuar como modulador de las respuestas de defensa dependientes de SA y en la deposición de calosa (Oide y col., 2013). El trabajo de estos autores mostró una relación entre la ruta de señalización de ABA, la deposición de calosa y la regulación de *PR2*. El ABA promueve la deposición de calosa mediante la represión de *PR2* en plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Leptosphaeria maculans* y *P. syringae*. En nuestro patosistema, la calosa actuaría de manera antagónica a la ruta de señalización del SA, y la diferente regulación de *PR2* observada entre las plantas de *Arabidopsis* y de tomate podría explicar el diferente patrón de deposición de calosa en el borde de la infección en respuesta a *Δbcsod1*. Este hecho puede estar relacionado con la alta susceptibilidad observada en plantas de tomate frente a B05.10, en comparación con las plantas de *Arabidopsis*.

En este capítulo también se han estudiado las rutas de señalización de las principales fitohormonas y metabolitos secundarios en plantas de *Arabidopsis* y de tomate, en

respuesta a la infección con *Δbcsod1*. Los resultados demuestran una alteración de la señalización hormonal implicada en las respuestas de defensa en ausencia de BCSOD1. En plantas de *Arabidopsis* se observó una activación de las rutas de OPDA y JA-Ille. La oxilipina OPDA actúa de manera independiente a la ruta del JA en el mantenimiento del balance redox en respuesta a estreses (Park y col., 2013). Se ha descrito que el gen *HSP17.4* se induce tras la infección con *B. cinerea* y está asociado con el OPDA y el estrés oxidativo en *Arabidopsis* (Sham y col., 2014). En tomate, se ha demostrado la acumulación de OPDA y la implicación de otras oxilipinas en la protección de las plantas frente a estrés oxidativo, como se ha descrito en Angulo y col. (2015). En esta Tesis se ha comprobado que tanto el gen *HSP17.4* en *Arabidopsis* y el gen *HsfA2* en tomate y *Arabidopsis* presentaban una gran inducción temprana en ausencia de *Δbcsod1*, en comparación con las plantas infectadas con la cepa WT. La señalización mediada por OPDA y la deposición de calosa juegan un papel importante en la respuesta de la planta frente a *B. cinerea*. El silenciamiento de *OPR3* en plantas de tomate demostró el importante papel del OPDA en la defensa basal frente a este hongo necrótrofo (Scalschi y col., 2015). Sin embargo, en *Arabidopsis* existe una controversia en relación con el papel del OPDA en la resistencia frente a *Alternaria brassicicola* en ausencia de JA, porque las condiciones experimentales pueden enmascarar la posible contribución del OPDA a la resistencia frente al patógeno (Stintzi y col., 2001; Schillmiller y col., 2007). Nuestros resultados apoyan el papel de esta oxilipina en la defensa frente a *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis* y de tomate. Además, la ruta de señalización del SA estaba activada en ambas plantas tras la infección con *Δbcsod1*, comparado con la cepa WT. Este resultado apoya la idea de que la efectividad de las respuestas de defensa de la planta frente a patógenos es mucho más compleja que el clásico antagonismo entre SA y JA/ET (Grant y Jones, 2009; Caarls y col., 2015). Esto también indica que la susceptibilidad de la planta depende del balance hormonal, que puede diferir dependiendo del cultivo.

Nuestros resultados mostraron también cambios en la expresión de los genes *WRKY33* y *WRKY53* tras la infección con el mutante *Δbcsod1* y la cepa B05.10. *WRKY53* mostró un aumento en su expresión de forma tardía, mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de *WRKY33*. Ambos transcritos mostraron una reducción significativa en plantas de tomate infectadas con *Δbcsod1*. Los *WRKYs* son factores de

transcripción que controlan diversos procesos de la planta, como la etapa de senescencia y las respuestas frente a patógenos o heridas (Rushton y col., 2010). El gen *WRKY53* codifica un factor de transcripción que actúa como posible regulador de la resistencia basal, pero también puede actuar como regulador negativo de ciertas respuestas de SA en *Arabidopsis* (Murray y col., 2007). Este gen está implicado en respuestas de defensa de tipo *priming* mediante modificaciones epigenéticas (Jaskiewicz y col., 2011) y su inducción es dependiente de H_2O_2 en plantas de *Arabidopsis* y tabaco (Miao y Zentgraf, 2007; Golemic y col., 2014). Xie y col. (2014) también observaron que la expresión de este factor de transcripción sensible al balance redox regulaba positivamente la senescencia foliar. Previamente en nuestro grupo de trabajo se había observado una inducción de *WRKY53* en respuesta a *B. cinerea* en tomate, que era potenciado por el inductor natural ácido hexanoico tras la infección (Finiti y col., 2014). Van Eck y col. (2014) demostraron que la red transcripcional de *WRKY53* regula respuestas oxidativas frente a un amplio espectro de estreses en plantas de arroz. Por otra parte, Birkenbihl y col. (2012) describieron que *WRKY33* juega un papel importante en la resistencia de la planta frente a patógenos necrótrofos, incluido *B. cinerea* y que su papel en la resistencia en plantas de *Arabidopsis* frente a patógenos necrótrofos está ligada a la regulación positiva de genes implicados en la respuesta a JA y en la homeóstasis redox.

En resumen, los resultados mostrados en el capítulo II de la presente Tesis demuestran que los cambios en la producción de ROS, concretamente el balance O_2^-/H_2O_2 , producido en ausencia de BCSOD1 promueven un despliegue eficiente de respuestas de defensa de la planta, como la deposición de calosa, que están orquestradas por una compleja red de señalización. Los datos apoyan la hipótesis de que BCSOD1 constituye un factor de virulencia, debido a que es importante su presencia para la completa patogenicidad de *B. cinerea*, dada su habilidad para producir H_2O_2 y explotar el ambiente oxidativo generado en su propio beneficio, como sugirieron previamente los trabajos de Tiedemann (1997) y Rolke y col. (2004). Además, los resultados obtenidos apoyan que las ROS juegan papeles diferentes en las plantas infectadas por *B. cinerea*, de acuerdo con la especificidad y dinamismo de la señalización de las ROS y la conexión con otras rutas de señalización, como se ha descrito en otros sistemas (Mittler y col., 2011).

Aunque es difícil discriminar el grado de aportación en la producción de las ROS entre la planta y el hongo, es necesario continuar estudiando el papel específico de la señalización de las ROS en la interacción planta-patógeno.

CAPÍTULO III

**Estudio del papel del complejo NADPH oxidasa (Nox) de
B. cinerea en la infección en plantas de *A. thaliana* y**

S. lycopersicum

INTRODUCCIÓN

Las plantas se protegen frente a los patógenos, en parte mediante barreras estructurales. Cuando esta resistencia constitutiva para evitar que entren los patógenos falla, las plantas son capaces de producir una respuesta de resistencia basal mediante el refuerzo de barreras y la activación de defensas de las plantas. Esta respuesta tiene dos ramas: La primera se denomina PTI (PAMPs-Triggered Immunity; inmunidad desencadenada por PAMPs), basada en el reconocimiento de patrones moleculares en la invasión de patógenos para activar las respuestas de defensa basal del hospedador. La otra rama es la denominada ETI (Effector-Triggered Immunity; inmunidad desencadenada por el Efector), que consiste en la respuesta del hospedador a la supresión de las defensas basales activadas mediante el reconocimiento de los productos de genes de resistencia (genes R), que se encuentran dentro de la célula (Jones y Dangl, 2006). La respuesta ETI generalmente incluye la activación de la HR (Hypersensitive Response, respuesta hipersensible) acompañada de un estallido oxidativo, que finalmente conduce a la muerte celular programada (PCD) (Abramovitch y col., 2006; Vellosillo y col., 2010). La respuesta RH está asociada con otros mecanismos de defensa, por ejemplo, la acumulación de fitoalexinas, la deposición de lignina y la producción y deposición de calosa. La acumulación de calosa es importante para la formación de la papila, una estructura que impide que entren los patógenos. Su acumulación temprana ahorra tiempo para inducir algunas respuestas que necesitan la activación de los genes implicados en las rutas de señalización y se considera un marcador de la activación de las respuestas de defensa (Hauck y col., 2003; Voigt, 2014). Las rutas de señalización de las principales fitohormonas están implicadas en la resistencia basal de las plantas frente a patógenos a través de una red de interacción coordinada, que finalmente determina el resultado de la infección. La fina comunicación entre estas rutas genera respuestas variables de acuerdo con los distintos tipos de patógenos (Caarls y col., 2015; Grant y col., 2009; Robert-Seilaniantz y col., 2011). Los patógenos pueden manipular la señalización hormonal de la planta para contrarrestar las respuestas de defensa y para obtener acceso a los nutrientes (Pieterse y col., 2009; Robert-Seilaniantz y col., 2011). *B. cinerea* es un patógeno de amplio espectro que infecta a más de 200 especies de plantas y puede expandirse en los tejidos si las defensas

de las plantas son débiles, al producir una infección severa que conduce a la muerte celular en el tejido del hospedador (Williamson y col., 2007). La rápida acumulación de calosa puede evitar que este hongo se expanda en tomate y en *Arabidopsis* (Finiti y col., 2013), pero el patógeno puede explotar el antagonismo SA y JA como una estrategia para desarrollar la enfermedad (El Oirdi y col., 2011). *B. cinerea* también puede contribuir al estallido oxidativo de la infección y puede usar las ROS generadas para desencadenar respuestas de las plantas para lograr una patogenicidad completa (Heller y Tudzynski, 2011; Siegmund y col., 2013). La contribución de las plantas y los patógenos en la producción de ROS sigue sin estar clara. Algunos datos recientes respaldan la idea de que las ROS son predominantemente beneficiosas para las células, y que un nivel basal de ROS es esencial para la vida (Mittler, 2017). Aunque las ROS pueden ser dañinas para el patógeno, también juegan un papel en el proceso de diferenciación en este hongo patógeno (Viefhues y col., 2014). En este capítulo de la presente Tesis nos interesó estudiar los mecanismos moleculares de las respuestas de las plantas frente a *B. cinerea*, en particular la conexión entre el control del ambiente redox y las defensas de las plantas (Angulo y col., 2015; Aranega y col., 2014; Finiti y col., 2014). Para este fin, utilizamos mutantes de *B. cinerea* deficientes en actividades implicadas en el metabolismo oxidativo. En un trabajo previo, demostramos que la ausencia de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa BCSOD1 reduce la infección fúngica, asociada con la interacción entre las ROS y las respuestas de la planta (López-Cruz y col., 2017). En este capítulo se han analizado las respuestas defensivas de plantas de *A. thaliana* y de tomate inoculadas con cepas mutantes de *B. cinerea* que carecen de las diferentes subunidades del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Nox) en comparación con la cepa B05.10 (WT). Nox es una de las principales fuentes generadoras de ROS en hongos. Consiste en proteínas transmembrana que reducen el oxígeno a O_2^- , usando NADPH como donante de electrones (Scott, 2015; Segmüller y col., 2008). En *B. cinerea* se han identificado diferentes subfamilias de Nox, que incluyen BcNoxA, BcNoxB y la subunidad reguladora BcNoxR. BcNoxA está relacionada con la colonización y la expansión, y también parece ser esencial para la fusión del tubo de anastomosis conidial (CAT), mientras que BcNoxB está relacionada con la penetración (Roca y col., 2012).

BcNoxR parece necesaria para la regulación de BcNoxA y BcNoxB (Kim, 2014; Scott y Eaton, 2008). Se ha descrito recientemente una nueva subunidad llamada BcNoxD, que es una proteína de membrana asociada con BcNoxA (Siegmund y col., 2015).

En este trabajo, hemos observado una virulencia reducida de $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$ en plantas de Arabidopsis y tomate. Sin embargo, $\Delta bcnoxB$ mostró un aumento de la virulencia en Arabidopsis, pero reducida en tomate. El fenotipo de infección asociado con el nivel de deposición de calosa inducida por patógenos en todos los casos demostró que su acumulación temprana es un factor determinante para detener la invasión del hongo. Nuestros datos muestran que la ausencia de los componentes del complejo Nox produce un impacto en las respuestas de las plantas, siendo diferente en Arabidopsis y en tomate. Además, respaldan la idea de que BcNoxB contribuye a la producción de ROS intracelular, y está involucrado en un paso inicial de interacción planta-patógeno relacionado con la percepción de la planta. Los diferentes componentes del complejo Nox parecen constituir factores de virulencia que podrían realizar funciones adicionales en el proceso de infección. Los diferentes cambios observados en la regulación transcripcional de la planta y las rutas de señalización en ambos hospedadores destacan la relevancia de las actividades fúngicas implicadas en el metabolismo oxidativo para la activación de la defensa de las plantas.

RESULTADOS

Fenotipo de infección de los mutantes $\Delta bcno x$ en plantas de *Arabidopsis* y de tomate

Las plantas de *Arabidopsis* y de tomate fueron inoculadas con la cepa B05.10 (WT) y las cepas mutantes en las diferentes subunidades del complejo BcNox ($\Delta bcno xA$, $\Delta bcno xB$, $\Delta bcno xAB$ y $\Delta bcno xR$) con una suspensión de conidias de 10^5 esporas/mL en *Arabidopsis* y de $5 \cdot 10^4$ esporas/mL en tomate, tal y como está descrito en materiales y métodos. El área de lesión necrótica se midió a 48, 72 y 96 h post-inoculación (hpi).

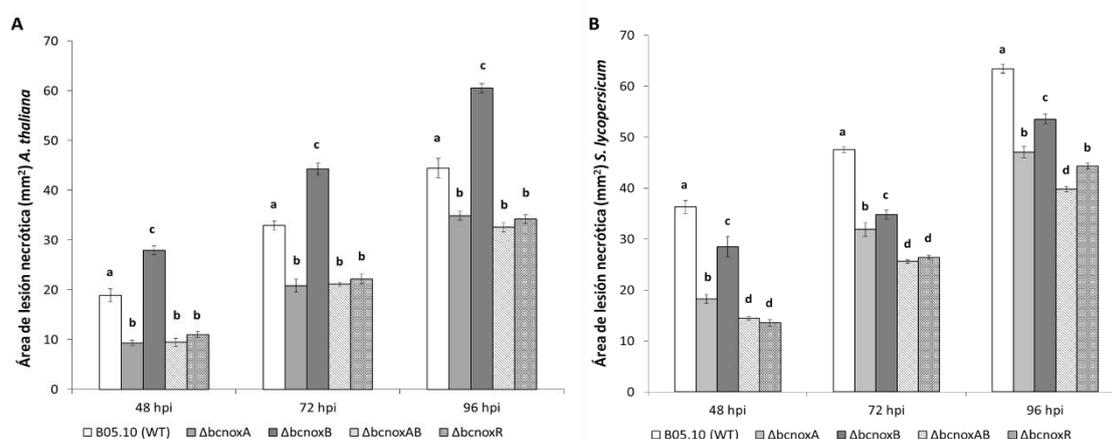


Figura 20. Plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcno x$ de *B. cinerea*. (A) Cuantificación del área de lesión necrótica medida a 48, 72 y 96 hpi en hojas de *Arabidopsis* (B) Cuantificación del área de lesión necrótica medida en los mismos tiempos mencionados con anterioridad en hojas de plantas de tomate. Imágenes representativas del fenotipo de infección suministradas en el anexo 1A, B (pág. 181). Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=12). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas dentro de cada tiempo ($p < 0.05$, LSD Test), siendo (a) significativamente diferente de (b, c, d).

Los mutantes $\Delta bcno xA$, $\Delta bcno xAB$ y $\Delta bcno xR$ mostraron una virulencia reducida en comparación con B05.10 en ambos cultivos. Es interesante que el mutante $\Delta bcno xB$ mostró una virulencia incrementada en las plantas de *Arabidopsis*, pero reducida en las plantas de tomate (Figura 20A, B). Los resultados demuestran que $\Delta bcno xA$ y $\Delta bcno xAB$ presentan el mismo perfil de fenotipo en plantas de *Arabidopsis*, lo que sugiere que *bcno xA* predomina sobre *bcno xB* en este cultivo. Por otra parte, el mutante $\Delta bcno xR$ mostró el mismo fenotipo de infección que el doble mutante $\Delta bcno xAB$, como era de

esperar para una subunidad reguladora de $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxB$. En plantas de tomate, todos los mutantes mostraron una virulencia reducida en comparación con las plantas de tomate inoculadas con B05.10, pero mostraron algunas diferencias entre ellos (Figura 20B). El mutante $\Delta bcnoxB$ mostró una virulencia menos reducida que el mutante $\Delta bcnoxA$ en todos los tiempos medidos en plantas de tomate. En este cultivo, el doble mutante mostró una virulencia menor que el mutante $\Delta bcnoxA$, aunque igual que el mutante $\Delta bcnoxB$, excepto a 72 hpi, que fue mayor (Figura 20B). Los fenotipos de infección se validaron en las plantas de Arabidopsis y de tomate inoculando con los mutantes de complementación, donde se pudo constatar la recuperación del fenotipo de infección de la cepa WT (Anexo 2A, B; Pág. 182).

Estos resultados demuestran que el complejo Nox es necesario para la infección de *B. cinerea* en plantas de Arabidopsis y de tomate, pero la ausencia de sus subunidades tiene diferentes efectos en su virulencia, dependiendo del cultivo.

Correlación entre el fenotipo de infección y la deposición de calosa en plantas de *A. thaliana* y de tomate inoculadas con los mutantes $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxB$

Como ya se ha comentado con anterioridad, la calosa se deposita entre la membrana plasmática y la pared celular primaria y constituye un buen marcador de respuesta a estrés, así como una barrera física frente a diversos patógenos, incluido *B. cinerea* (Ellinger y col., 2013). A 72 hpi, las hojas de Arabidopsis y de tomate inoculadas con B05.10 y las cepas mutantes $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxB$ fueron teñidas con azul de anilina, como está descrito en materiales y métodos.

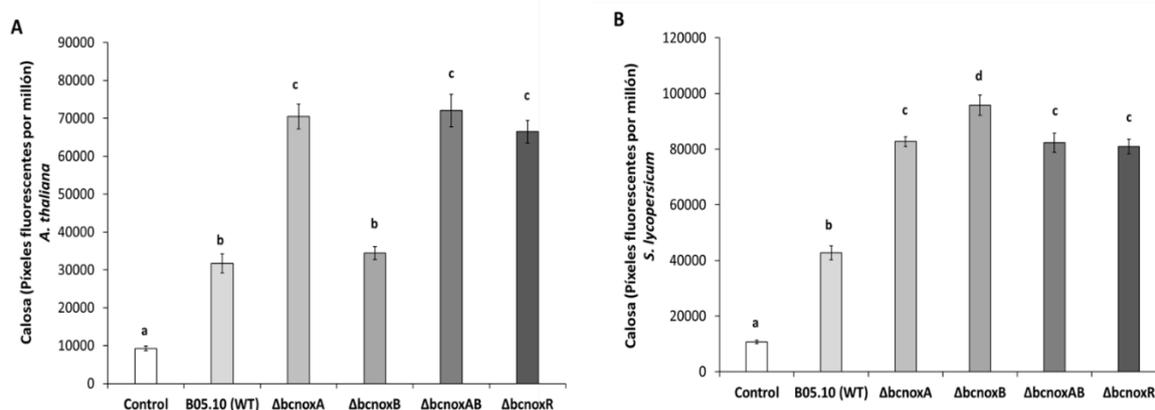


Figura 21. Deposición de calosa en plantas de *Arabidopsis* y de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*. (A, B) Cuantificación de la deposición de calosa en plantas de *Arabidopsis* y de tomate a 72 hpi, determinando el número de píxeles fluorescentes por millón mediante análisis digital de imagen en la zona de infección. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=12). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas ($p < 0.05$), de acuerdo con el test LSD.

En plantas de *Arabidopsis*, la virulencia reducida de $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoxR$ estaba asociada con un incremento en la deposición de calosa, en comparación con las plantas inoculadas con la cepa WT (Figura 21A). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la deposición de calosa tras la infección con el mutante $\Delta bcnoxB$, el cual, presentaba un aumento de la virulencia en este cultivo (Figura 21A).

En plantas de tomate, la deposición de calosa aumentó en respuesta a todos los mutantes, los cuales, presentaban una virulencia reducida. No obstante, tras la infección con el mutante $\Delta bcnoxB$ se observó más calosa que en los demás, que no presentaban diferencias entre ellos (Figura 21B). La deposición de calosa tras la infección con $\Delta bcnoxR$, $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxAB$ fue la misma a pesar de que $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxR$ presentaban un fenotipo de infección diferente (Figuras 20B y 21B). Estos resultados sugieren una diferente regulación en la deposición de calosa en las plantas de *Arabidopsis* y de tomate.

Se determinó el efecto de los mutantes $\Delta bcnox$ en el metabolismo de calosa, analizando la expresión del gen de síntesis de calosa *PMR4* mediante RT-qPCR a diferentes tiempos.

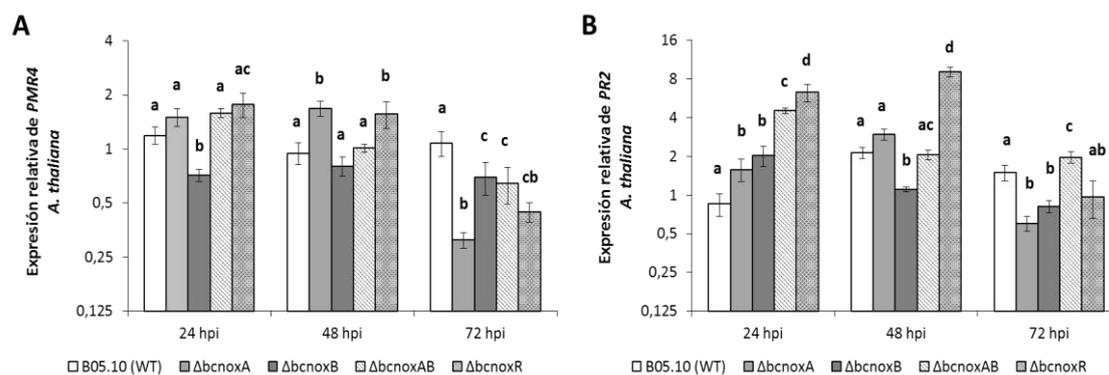


Figura 22. Expresión del gen *PMR4* y *PR2* en plantas de *A. thaliana* N700000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*. (A, B) Expresión relativa de los genes *PMR4* (síntesis de calosa) y *PR2* (modulador negativo de calosa) mediante RT-qPCR en plantas de Arabidopsis a 24, 48 y 72 hpi. *EIF4A1* fue usado como estándar interno. Los datos mostrados se expresan en Log₂. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=12). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas dentro de cada tiempo ($p < 0.05$), de acuerdo con el test LSD, siendo (a) significativamente diferente de (b, c, d).

En ausencia de las subunidades catalíticas ($\Delta bcnoxAB$) no se produjeron cambios en la expresión de *PMR4* a 24-48 hpi con respecto a la cepa WT. Sin embargo, la infección con $\Delta bcnoxA$ indujo *PMR4* a 48 hpi, comparado con la cepa WT. Sin embargo, la infección con $\Delta bcnoxB$ disminuyó significativamente la expresión de *PMR4* a 24 hpi, en comparación con la cepa WT (Figura 22A). En respuesta a $\Delta bcnoxR$, aumentó la expresión de *PMR4* a 24-48 hpi, mostrando un patrón de inducción completamente diferente a $\Delta bcnoxAB$. Esto sugiere que BcNoxR podría tener un papel adicional (Figura 22A).

El gen *PR2*, que constituye un modulador negativo de la deposición de calosa, mostró una inducción temprana frente a todos los mutantes en plantas de Arabidopsis. Es interesante que la expresión de este gen se redujo tras la infección con $\Delta bcnoxB$ a 72 hpi, comparado con B05.10, a pesar de tener la misma deposición de calosa.

El análisis de la varianza reveló diferencias en la expresión de este gen entre los mutantes a 24-48 hpi y un aumento en su expresión a 72 hpi tras la infección con el doble mutante (Figura 22B). Posteriormente, se llevó a cabo un experimento para determinar si se produjo un retraso en la deposición de calosa tras la infección con el mutante $\Delta bcnoxB$ en plantas de Arabidopsis. A 48 hpi, la deposición de calosa producida por este mutante fue menor que en la cepa WT (Figura 23), mostrando un claro retraso en su acumulación. Estos resultados sugieren que, en Arabidopsis, los cambios en calosa

parecen depender de su síntesis, y su acumulación temprana parece esencial para la defensa de la planta.

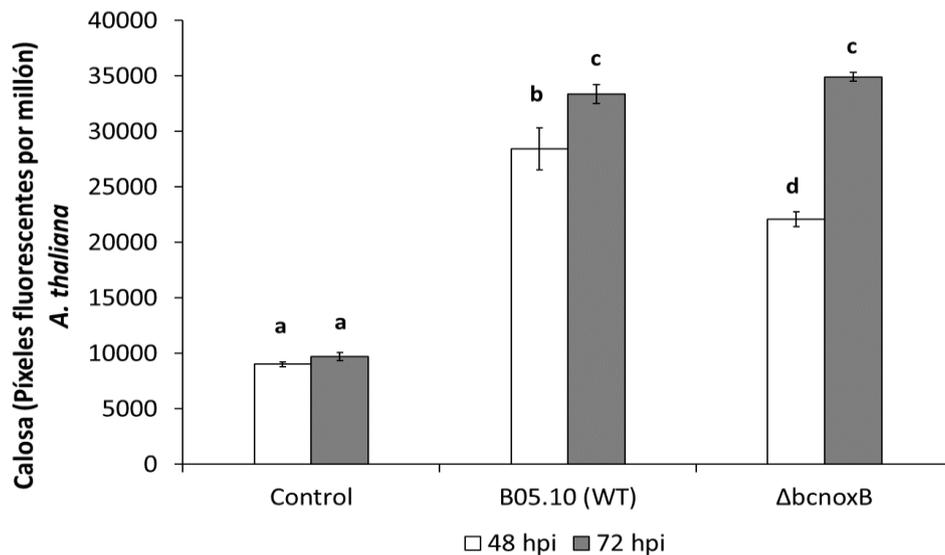


Figura 23. Deposición de calosa a 48-72 hpi en plantas de *A. thaliana* N70000 inoculadas con B05.10 (WT) y el mutante $\Delta bcnoxB$ de *B. cinerea*. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=12). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas ($p < 0.05$, LSD Test).

En plantas de tomate, donde la deposición de calosa aumentó en respuesta a todos los mutantes, no se observaron cambios significativos en *PMR4*, excepto la disminución de su expresión a 48 hpi tras la infección con $\Delta bcnoxB$. En este cultivo, la expresión de *PR2* disminuyó a tiempo corto en respuesta a todos los mutantes, excepto frente a $\Delta bcnoxA$, que no cambió en comparación con la cepa WT (Figura 24A, B). Este resultado indica que la inducción de calosa en tomate depende de la regulación transcripcional de *PR2*. Así pues, los resultados indican que hay diferencias en la regulación del metabolismo de calosa en ambos cultivos en ausencia de *bcnox*.

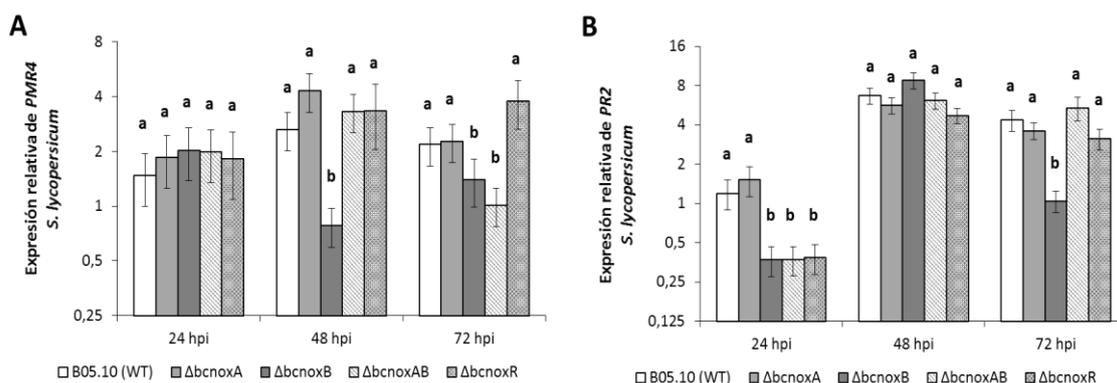


Figura 24. Expresión del gen *PMR4* y *PR2* en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*. (A, B) Expresión relativa de los genes *PMR4* (síntesis de calosa) y *PR2* (modulador negativo de calosa) mediante RT-qPCR en plantas de tomate a 24, 48 y 72 hpi. *EF1- α* fue usado como estándar interno. Los datos mostrados se expresan en Log_2 . Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=12). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas dentro de cada tiempo ($p < 0.05$), de acuerdo con el test LSD, siendo (a) significativamente de (b).

La infección con los mutantes $\Delta bcnox$ produce cambios en la expresión de genes implicados en rutas de señalización en plantas de *Arabidopsis* y de tomate

Se analizó el patrón de expresión de genes marcadores de las principales rutas de señalización mediante RT-qPCR en las plantas de *Arabidopsis* y de tomate infectadas con la cepa B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$, a las 24, 48 y 72 hpi. En plantas de *Arabidopsis* se analizaron los genes de SA (*ICS1*, *PR1*), JA/ET (*PDF1.2*), JA (*VSP1*), OPDA (*HSP17.4*, *HsfA2*) y de estrés oxidativo (*GST6*, *WRK33* y *WRKY53*). En las plantas de tomate se analizaron los genes de SA (*PR1*), JA (*LoxD*), OPDA (*HsfA2*), otras oxilipinas (*DES*) y de detoxificación/estrés oxidativo (*GST*, *WRKY33* y *WRKY53*).

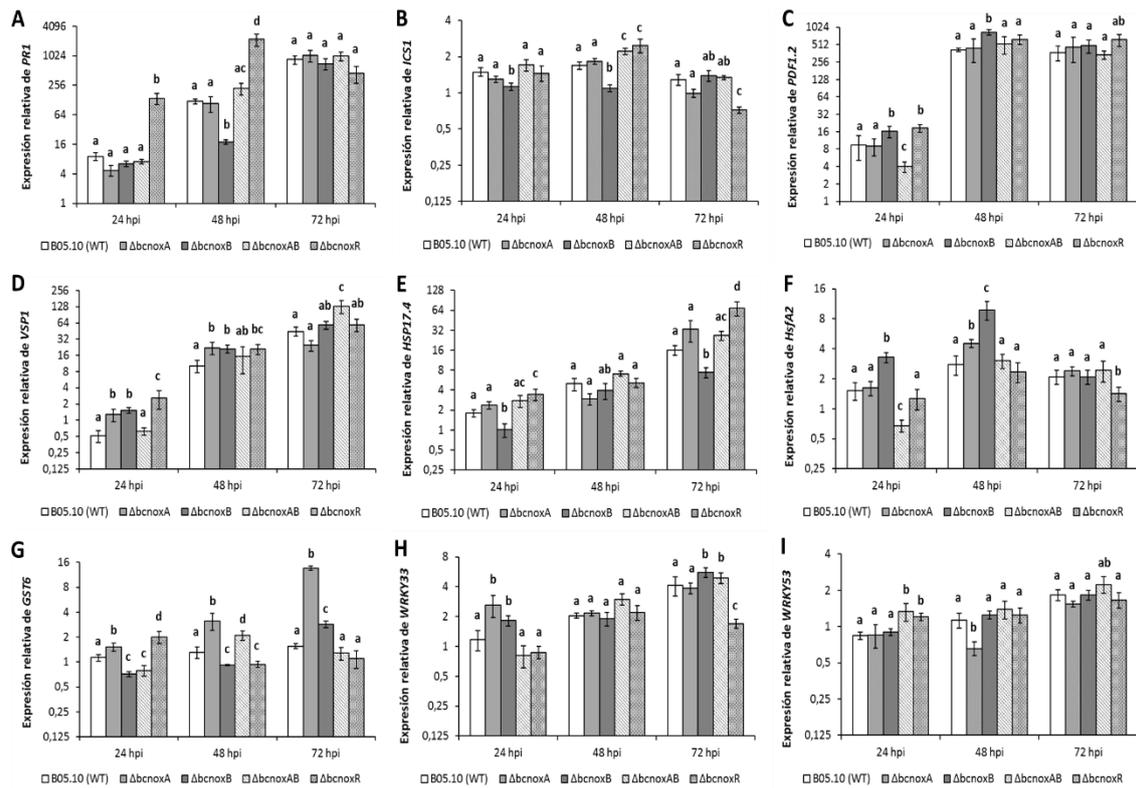


Figura 25. Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana* N70000 inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*. La expresión relativa de los genes *ICS1*, *PR1*, *PDF1.2*, *VSP1*, *HSP17.4*, *HsfA2*, *GST6*, *WRKY33* y *WRKY53* se determinó mediante RT-qPCR a 24, 48 y 72 hpi (A-I). *EIF4A1* fue usado como estándar interno. Los datos mostrados se expresan en Log_2 . Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas dentro de cada tiempo ($p < 0.05$), de acuerdo con el test LSD, siendo (a) significativamente diferente de (b, c, d).

En comparación con la cepa WT, las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con $\Delta bcnoxA$ no mostraron cambios en la ruta dependiente de SA (*ICS1*, *PR1*), mientras que hubo una disminución significativa tras la infección con $\Delta bcnoxB$. En cambio, las plantas inoculadas con los mutantes $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoxR$ mostraron un aumento significativo de *ICS1* a 48 hpi, incluso *PR1* aumentó a 48 hpi tras la infección con $\Delta bcnoxR$ (Figura 25A, B). La expresión de *PDF1.2* no cambió tras la inoculación de $\Delta bcnoxA$, pero incrementó a 24-48 hpi en respuesta a $\Delta bcnoxB$. Sin embargo, la expresión de este gen disminuyó a las 24 hpi frente al doble mutante e incrementó en respuesta a $\Delta bcnoxR$ en ese mismo tiempo (Figura 25C). El gen *VSP1* se indujo tempranamente tras la inoculación con $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxB$ y $\Delta bcnoxR$, pero no se observaron cambios frente a $\Delta bcnoxAB$ hasta las 72 hpi (Figura 25D). El gen marcador de la oxilipina OPDA, *HSP17.4* mostró una

disminución en su expresión a las 72 hpi en respuesta a $\Delta bcnoxB$, comparado con la cepa WT y los otros mutantes.

También se observó un incremento de este gen tras la inoculación de los mutantes $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$, mientras que su expresión no cambió frente a $\Delta bcnoxA$. La expresión del gen *HsfA2* se incrementó a las 24-48 hpi frente a $\Delta bcnoxB$ y a 48 hpi frente a $\Delta bcnoxA$, comparado con las demás cepas. Se observó una disminución temprana frente al doble mutante, mientras que en respuesta a $\Delta bcnoXR$ no se produjeron cambios en su expresión (Figura 25E, F).

Por otra parte, se observó un retraso en la inducción del gen marcador de estrés oxidativo *GST6* en respuesta a $\Delta bcnoxB$, mientras que su expresión se incrementó tras la infección con $\Delta bcnoxA$ y a 24 hpi frente a $\Delta bcnoXR$. La expresión de *GST6* se redujo a 24 hpi frente al doble mutante, como en presencia de $\Delta bcnoxB$, pero se incrementó a las 48 hpi. Comparando los mutantes se ha podido observar que la expresión de *GST6* en respuesta a $\Delta bcnoXR$ fue menor que en respuesta a $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoAB$ a tiempo largo, aunque incrementó respecto al doble mutante a 24 hpi (Figura 25G).

El gen *WRKY33*, que codifica un factor de transcripción relacionado con el estrés oxidativo, mostró una inducción en la fase temprana de infección de $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxB$, mientras que en respuesta a $\Delta bcnoxAB$ no se produjeron cambios y disminuyó su expresión frente a $\Delta bcnoXR$ a las 72 hpi, comparado con la cepa WT. En respuesta a $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$, la expresión de este gen fue la misma a 24 hpi, mientras que a 48 hpi no hubo cambios y a 72 hpi la expresión fue menor frente a $\Delta bcnoXR$ con respecto a los demás (Figura 25H). *WRKY53*, que codifica un factor de transcripción que actúa como posible regulador de la resistencia basal y como regulador negativo de ciertas respuestas de SA en Arabidopsis (Murray y col., 2007), no mostró cambios en su expresión frente a $\Delta bcnoxB$. En cambio, se observó una disminución a 48 hpi tras la infección con $\Delta bcnoxA$ y una inducción temprana en respuesta a $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$ (Figura 25I).

En plantas de tomate, la expresión de *PR1* y *LoxD* no mostró cambios frente a $\Delta bcnoxA$, mientras que aumentaron a las 72 hpi en respuesta a $\Delta bcnoxB$. $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$ produjeron una temprana disminución de *PR1* a 24 hpi, mientras que disminuyó la expresión de *LoxD* a tiempo largo en presencia de estos dos mutantes (Figura 26A, B). El gen *DES* mostró una inducción temprana tras la inoculación del mutante $\Delta bcnoxA$. Sin embargo, disminuyó a 24 hpi en respuesta a $\Delta bcnoxB$ y $\Delta bcnoxAB$, aunque aumentó a 72 hpi tras la infección de $\Delta bcnoxB$. También se observó una disminución en la expresión de este gen a 72 hpi frente a $\Delta bcnoXR$ (Figura 26C). La expresión de *HsfA2* disminuyó en respuesta a $\Delta bcnoxB$ a 48-72 hpi y frente a $\Delta bcnoXR$ y $\Delta bcnoxA$ at 72 hpi. No se observaron cambios en respuesta a $\Delta bcnoxAB$.

En este cultivo, la expresión de *GST* no cambió en respuesta a $\Delta bcnoxA$, mientras que la inoculación de $\Delta bcnoxB$, $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$ disminuyó su expresión, siendo menor tras la infección con $\Delta bcnoxB$ y $\Delta bcnoXR$ (Figura 26D, F).

WRKY33 se indujo a tiempo corto frente a $\Delta bcnoxB$, comparado con la cepa WT y los otros mutantes. La inducción se observó incluso tras la infección con $\Delta bcnoxA$, pero a tiempo largo. En respuesta a $\Delta bcnoxAB$, *WRKY33* disminuyó a 24 hpi y no mostró cambios a 48-72 hpi, mientras que $\Delta bcnoXR$ produjo una disminución en la expresión de este gen en todos los tiempos medidos.

WRKY53 mostró una fuerte inducción a 24-48 hpi en respuesta a $\Delta bcnoxAB$, mientras que frente a $\Delta bcnoxA$ se observó una inducción tardía (72 hpi). En respuesta a $\Delta bcnoxB$ mostró una disminución significativa en todos los tiempos, mientras que $\Delta bcnoXR$ disminuyó a tiempo largo (Figura 26G, H).

Las diferentes respuestas de los genes analizados frente a estas cepas de *B. cinerea* indica que se producen diferencias en la regulación a nivel transcripcional debida a la ausencia de las distintas subunidades *bcnox*.

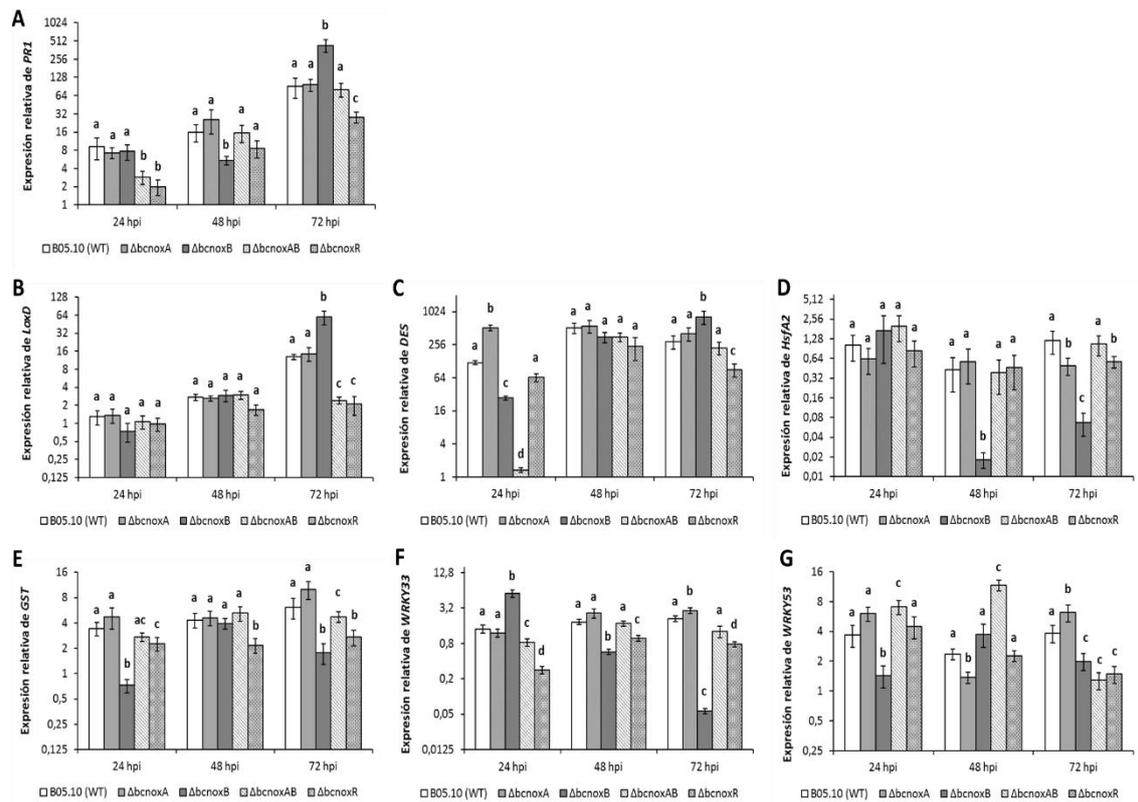


Figura 26. Expresión relativa de genes implicados en rutas de señalización y en respuestas a estrés oxidativo en plantas de tomate inoculadas con las cepas B05.10 (WT) y $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*. La expresión relativa de los genes *PR1*, *LoxD*, *DES*, *HsfA2*, *GST*, *WRKY33* y *WRKY53* se determinó mediante RT-qPCR a 24, 48 y 72 hpi (A-G). *EF1- α* fue usado como estándar interno. Los datos mostrados se expresan en Log_2 . Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas dentro de cada tiempo (p < 0.05, LSD test), siendo (a) significativamente diferente de (b, c, d).

La ausencia de las subunidades del complejo Nox de *B. cinerea* altera la acumulación de ROS

Se analizó la acumulación de O_2^- y de H_2O_2 mediante la tinción con NBT y DAB, respectivamente, en hojas infectadas de plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los diferentes mutantes $\Delta bcnox$ a 24, 48 y 72 hpi. Las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con todos los mutantes mostraron menor acumulación de H_2O_2 y mayor acumulación de O_2^- en el área de infección frente a B05.10, en todos los tiempos medidos (Figura 27A, B). Mientras que todos los mutantes mostraron el mismo aumento en H_2O_2 , se observaron diferencias en la acumulación de O_2^- . Las plantas infectadas con $\Delta bcnoxB$ presentaban una mayor acumulación de O_2^- que

en respuesta a $\Delta bcnoxA$ a 24-48 hpi. $\Delta bcnoxAB$ mostró el mismo aumento de O_2^- que $\Delta bcnoxA$ en todos los tiempos y que $\Delta bcnoxB$, excepto a 24 hpi (Figura 27A, B).

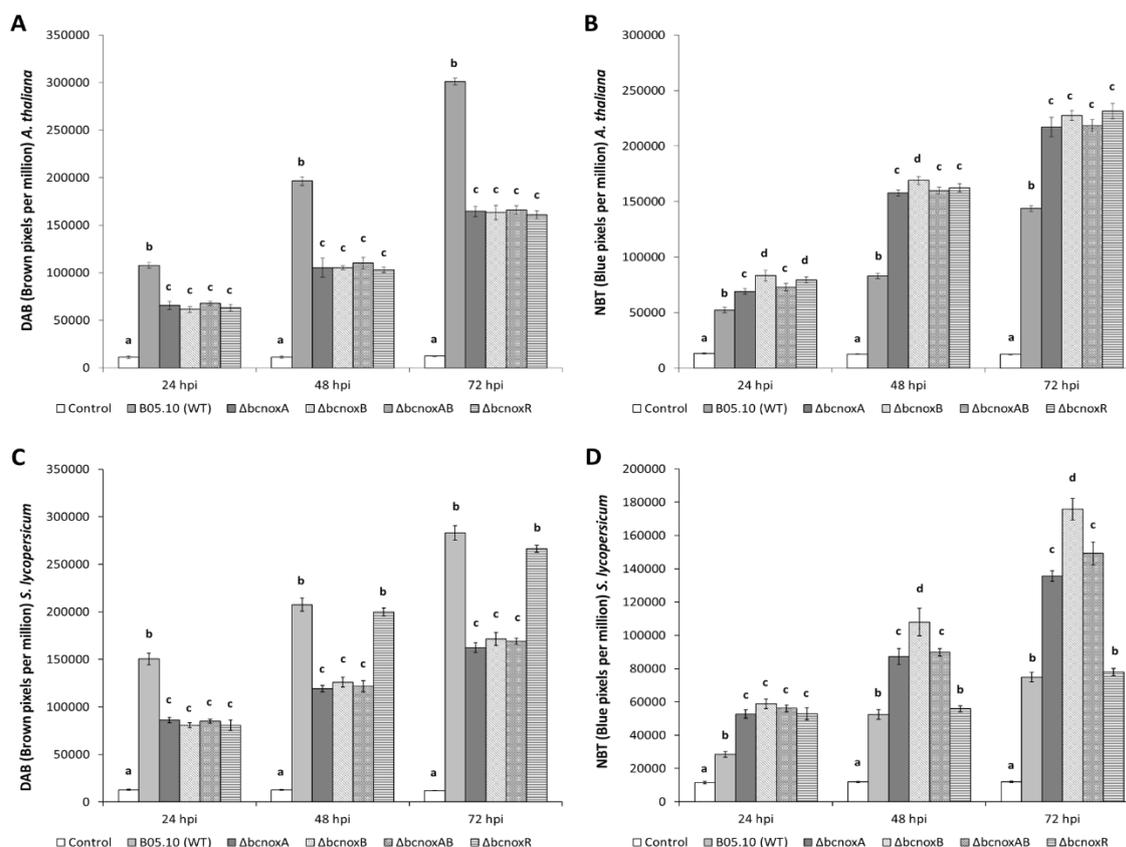


Figura 27. Acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de superóxido (O_2^-) en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de *B. cinerea* a 24, 48 y 72 hpi. (A, B) Cuantificación de H_2O_2 y de O_2^- mediante análisis digital de imagen por tinción con DAB (píxeles marrones por millón) y NBT (píxeles azules por millón), respectivamente, en plantas de Arabidopsis. (C, D) Cuantificación de H_2O_2 y de O_2^- mediante análisis digital de imagen en plantas de tomate en los mismos tiempos que en plantas de Arabidopsis. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas dentro de cada tiempo ($p < 0.05$, LSD test), siendo (a) significativamente diferente de (b, c, d).

En las plantas de tomate, la interacción con los mutantes produjo el mismo desequilibrio ROS que en Arabidopsis, excepto $\Delta bcnoxB$, que sólo lo mostró a 24 hpi frente a la cepa WT (Figura 27C, D). En este cultivo, no se observaron diferencias en el aumento de H_2O_2 entre los diferentes mutantes, mientras que en la acumulación de O_2^- si se observaron diferencias. $\Delta bcnoxB$ mostró un aumento de O_2^- a 48-72 hpi, $\Delta bcnoxAB$ mostró el mismo aumento de O_2^- que $\Delta bcnoxA$ en todos los tiempos y que $\Delta bcnoxB$ a 24 hpi (Figura 27D). La acumulación de ROS observada tras la inoculación de B05.10 se restauró en las cepas de complementación en ambos cultivos (Anexo 3, pág. 183). Estos resultados sugieren

que la alteración del balance ROS producida en ausencia de *bcnox* podría estar relacionada con su capacidad para detoxificar ROS endógeno y/o ROS del estallido oxidativo en respuesta a la infección o con la manipulación del estallido oxidativo en su propio beneficio.

La adición de antioxidantes produce cambios en la virulencia y en la deposición de calosa tras la infección con los mutantes $\Delta bcnox$

Se estudió si la producción inadecuada de ROS de los mutantes $\Delta bcnox$ era responsable de su diferente capacidad de infectar las plantas de *Arabidopsis* y de tomate. Para ello, se añadió un antioxidante en un ensayo de patogenicidad. Como se esperaba, la adición de ácido ascórbico a la suspensión de esporas antes de la inoculación disminuyó la tasa de infección de B05.10, pero no restauró el fenotipo de infección de B05.10 en $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoxR$ en ambos cultivos (Figura 28A-B y anexo 4, pág. 184).

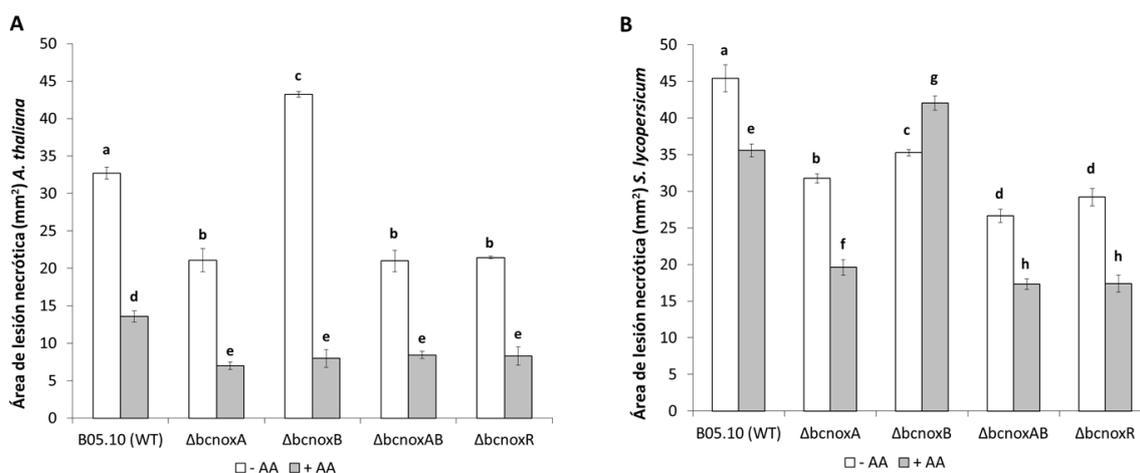


Figura 28. Influencia del antioxidante ácido ascórbico (AA) en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*. (A, B) Cuantificación del área de lesión necrótica a 72 hpi. La suspensión de conidias en plantas de *Arabidopsis* (10^5 esporas/mL) y de tomate ($5 \cdot 10^4$ esporas/mL), fueron suplementadas con 5 g de AA por litro antes de la inoculación. Los datos mostrados representan la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas en ausencia y presencia de AA ($p < 0.05$) de acuerdo con el test LSD.

Sin embargo, bajo estas condiciones, la virulencia de $\Delta bcn\text{ox}B$ cambió completamente en los dos cultivos. En *Arabidopsis*, $\Delta bcn\text{ox}B$ mostró una virulencia alterada en comparación con la cepa WT, mientras que su virulencia en tomate fue mayor que la cepa WT (Figura 28A, B y anexo 4, pág. 184). La falta de infección al añadir DTT confirmó que los ROS son cruciales en la interacción planta-*B. cinerea* (Anexo 4, pág. 184).

Por otra parte, se estudió la conexión entre la deposición de calosa inducida por los distintos patógenos y el fenotipo de infección, en presencia de ácido ascórbico.

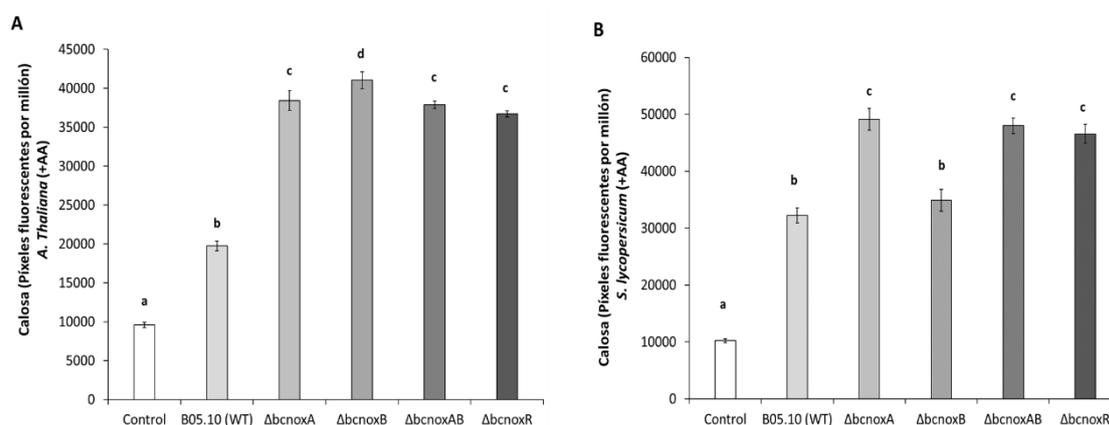


Figura 29. Influencia del ácido ascórbico (AA) en la deposición de calosa en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (cepa silvestre) y los mutantes $\Delta bcn\text{ox}$ de *B. cinerea*. (A, B) Cuantificación de la deposición de calosa mediante análisis digital de imagen, determinando el número de píxeles fluorescentes por millón en la zona de infección. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas en el tiempo medido ($p < 0.05$, Test LSD).

A nivel macroscópico, el fenotipo de infección se correlacionó con la acumulación de calosa en todos los casos en ambos cultivos, dado el aumento de la deposición de calosa en aquellos casos en que la virulencia del patógeno se redujo. No obstante, se observaron ciertas diferencias entre las cepas. En plantas de *Arabidopsis*, la deposición de calosa aumentó en respuesta a $\Delta bcn\text{ox}B$, a pesar de mostrar el mismo fenotipo de infección reducido que el resto de mutantes. En plantas de tomate, $\Delta bcn\text{ox}A$ produjo la misma deposición de calosa que $\Delta bcn\text{ox}AB$ y $\Delta bcn\text{ox}R$, a pesar de tener un fenotipo de infección ligeramente mayor, mientras que $\Delta bcn\text{ox}B$ redujo la deposición de calosa al mismo nivel que la cepa WT en este cultivo, a pesar de mostrar un fenotipo de infección superior a las demás cepas (Figura 29A, B).

El análisis de acumulación de ROS en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con los mutantes en presencia de ácido ascórbico mostró el mismo desequilibrio de ROS que en ausencia del antioxidante a 72 hpi, a pesar de los cambios significativos observados en el fenotipo de infección y en la deposición de calosa.

En tomate también se observó el mismo desequilibrio de ROS que en ausencia del antioxidante, a pesar de las diferencias observadas en el fenotipo de infección y deposición de calosa (Figura 30A-D). Estos resultados sugieren que la acumulación de ROS y la deposición de calosa podrían ser dos eventos independientes.

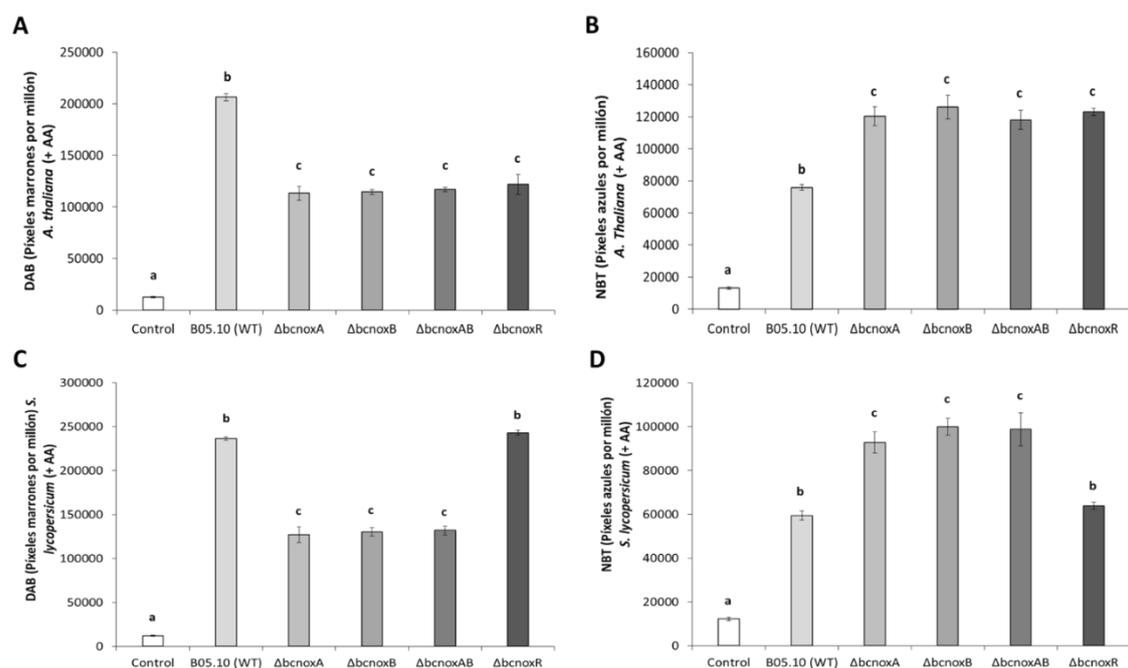


Figura 30. Influencia del ácido ascórbico (AA) en la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de superóxido (O_2^-) en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (cepa WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de *B. cinerea* a 72 hpi. (A, B) Cuantificación de H_2O_2 y de O_2^- mediante análisis digital de imagen por tinción con DAB (píxeles marrones por millón) y NBT (píxeles azules por millón), respectivamente, en plantas de *Arabidopsis*. (C, D) Cuantificación de H_2O_2 y de O_2^- mediante análisis digital de imagen en plantas de tomate en las mismas condiciones que en plantas de *Arabidopsis*. Las barras indican la media de 3 experimentos independientes \pm SD (n=18). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas en el tiempo medido ($p < 0.05$, LSD test).

En la tabla 2 se muestra un resumen simplificado de los resultados obtenidos con respecto al fenotipo de infección y a las respuestas en las plantas de *Arabidopsis* y de tomate frente a los mutantes $\Delta bcnox$.

Tabla 2. Balance global de las respuestas en plantas de Arabidopsis y de tomate frente a los mutantes $\Delta bcnox$ con respecto a la cepa B05.10 (WT).

		<i>A. thaliana</i>								<i>S. lycopersicum</i>							
		$\Delta bcnoxA$		$\Delta bcnoxB$		$\Delta bcnoxAB$		$\Delta bcnoxR$		$\Delta bcnoxA$		$\Delta bcnoxB$		$\Delta bcnoxAB$		$\Delta bcnoxR$	
		TC	TL	TC	TL	TC	TL	TC	TL	TC	TL	TC	TL	TC	TL	TC	TL
Fenotipo infección	Fenotipo Inf.	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Fenotipo Inf. (+AA)	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↑	nd	↓	nd	↓
Deposición y metabolismo de calosa	Calosa	nd	↑	↓	-	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑
	Calosa (+AA)	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	-	nd	↑	nd	↑
	PMR4	-	↓	↓	↓	-	↓	↑	↓	-	-	-	↓	-	↓	-	↑
	PR2	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↑	-	-	-	↓	↓	↓	-	↓	-
Acumulación ROS	H ₂ O ₂	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	H ₂ O ₂ (+AA)	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↓	nd	↑
	O ₂ ⁻	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-
	O ₂ ⁻ (+AA)	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	↑	nd	-
Rutas de señalización estrés oxidativo	GST	↑	↑	↓	↑	↓	-	↑	-	-	-	↓	↓	-	↓	↓	↓
	WRKY33	↑	-	↑	↑	-	↑	-	↓	-	↑	↑	↓	↓	-	↓	↓
	WRKY53	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	↑	↓	↓	↑	↓	-	↓
Rutas de señalización hormonal	SA	-	-	↓	-	-	-	↑	-	-	-	-	↑	↓	-	↓	↓
	JA/ET	-	-	↑	-	↓	-	↑	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	JA	↑	-	↑	-	-	↑	↑	-	-	-	-	↑	-	↓	-	↓
	OPDA	-	-	↑	-	↓	-	↑	↑	-	↓	-	↓	-	-	-	↓

TC: Tiempo corto (24/48 hpi), TL: Tiempo largo (72 hpi). Las celdas de color azul indican diferencias a tiempo corto, las celdas de color rosado indican diferencias a tiempo largo. Las flechas indican aumento (↑) o disminución (↓) en respuesta a los mutantes $\Delta bcnox$ con respecto a la cepa B05.10 (WT) de *B. cinerea*. (-) No cambia con respecto la cepa WT; (nd): No determinado.

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha estudiado si la ausencia de las subunidades del complejo NADPH oxidasa de *B. cinerea* (BcNox) afecta a las respuestas de plantas de Arabidopsis y tomate, utilizando la cepa B05.10 como control (WT). BcNox es una de las principales fuentes productoras de ROS, participando en la homeóstasis redox y contribuyendo a la virulencia del hongo (Siegmund y col., 2013, 2015). Estudios previos han descrito funciones diferentes para las subunidades catalíticas BcNoxA y BcNoxB, que están controladas por la subunidad reguladora BcNoxR (Siegmund y col., 2013; Scott, 2015).

Los resultados obtenidos (tabla 2) mostraron una reducción significativa de la virulencia de $\Delta bcnoxAB$, así como de $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxB$ con respecto al WT en ambos cultivos, como se describió previamente en plantas de judía (Rolke y col., 2004; Patel y col., 2008). Sin embargo, $\Delta bcnoxB$ mostró una virulencia reducida en plantas de tomate, pero incrementada en plantas de Arabidopsis. La ausencia de *bcnoxB* afectó a la virulencia de igual manera que la ausencia de ambas subunidades, lo que apoya su papel regulador. El hecho de que el fenotipo de infección del doble mutante se corresponda con el de $\Delta bcnoxA$ en ambos cultivos indica que la actividad de *bcnoxA* es esencial para el proceso de infección, predominando sobre *bcnoxB*. Esta última subunidad parece ser dispensable para infectar en Arabidopsis y, en su ausencia, *bcnoxA* mediaría una entrada y expansión más eficaz. La reducción de la virulencia de $\Delta bcnoxAB$, así como de $\Delta bcnoxA$ y $\Delta bcnoxB$ en Arabidopsis se correlacionó con un aumento en la deposición de calosa. El incremento en la virulencia de $\Delta bcnoxB$ se correlacionó con un retraso en su deposición, aunque finalmente se acumuló al mismo nivel que frente a la cepa WT.

Por otra parte, la ausencia de *bcnoxAB* y de las subunidades individuales alteró la acumulación de ROS, incrementando los niveles de O_2^- y reduciendo los de H_2O_2 con respecto a la cepa WT a lo largo del proceso de infección, en ambos cultivos. Solo $\Delta bcnoxB$ a tiempo largo no produjo cambios en tomate. Este desequilibrio ROS está asociado con una reducción en la virulencia, excepto en el caso de $\Delta bcnoxB$ en Arabidopsis. En respuesta a $\Delta bcnoxAB$, además de alterarse el balance ROS y la acumulación de calosa, se produce un desequilibrio en las rutas de señalización, que confirman el papel relevante del complejo BcNox en la infección del hongo en ambos

cultivos. El análisis de la ausencia de las distintas subunidades por separado permite diseccionar el papel jugado por este complejo en la interacción planta-patógeno.

La expresión del gen *PMR4*, que codifica la calosa sintasa, se indujo frente a $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxB$ y $\Delta bcnoxC$, mientras que disminuyó a tiempo corto en respuesta a $\Delta bcnoxB$, asociado con el retraso en la deposición de calosa. *PR2*, un modulador negativo de calosa y de respuestas de defensa dependientes de SA (Oide y col., 2013), aumentó tempranamente en respuesta a todos los mutantes, independientemente del fenotipo de infección. Por lo tanto, en *Arabidopsis* los cambios en calosa parecen depender de su síntesis y su acumulación temprana parece esencial para la defensa de la planta. En tomate, la calosa incrementó en respuesta a todos los mutantes, siendo su acumulación algo mayor tras la infección con $\Delta bcnoxB$. No se observaron cambios significativos en *PMR4*, excepto una disminución frente a $\Delta bcnoxB$, mientras que *PR2* se redujo frente a todos los mutantes, excepto en respuesta a $\Delta bcnoxA$, que no cambió. Esto indica que hay diferencias en la regulación del metabolismo de calosa en ambos cultivos en ausencia de *bcnox*. Por otra parte, la alteración del balance ROS producida en ausencia de *bcnox* podría estar relacionada con su capacidad para detoxificar ROS endógeno y/o ROS del estallido oxidativo en respuesta a la infección o con la manipulación del estallido oxidativo en su propio beneficio. La aplicación de antioxidantes no alteró el desequilibrio observado en el balance ROS en ausencia de las distintas subunidades *bcnox* en ambos cultivos, lo que sugiere que en el proceso de infección todas ellas contribuyen a manipular el estallido oxidativo. El fenotipo de infección y la deposición de calosa no se alteraron en estas condiciones, salvo en respuesta a $\Delta bcnoxB$, cuya virulencia se redujo en *Arabidopsis* y se incrementó en tomate, con respecto al WT. Estos cambios en el fenotipo se correlacionaron con un incremento y una reducción en la calosa, respectivamente. Estos resultados parecen apoyar que *bcnoxA* y *bcnoxC* constituyen factores de virulencia, mientras que *bcnoxB* además tendría otras funciones.

Se ha postulado que BcNoxB sería el principal productor de ROS, mientras que BcNoxA sería responsable de la fina regulación de procesos intracelulares (Marschall y col., 2016a). Por lo tanto, *bcnoxB* podría estar implicada en el control del balance oxidativo interno del hongo, necesario para su virulencia, teniendo efectos adicionales en el proceso de infección.

El efecto producido sobre el balance ROS en ausencia de BcNox podría deberse a que actúa sobre las actividades productoras de ROS durante el proceso de infección.

Los Nox de plantas, conocidos como RBOHs (respiratory burst oxidative homologues), son una de las principales fuentes generadoras de ROS, principalmente en el apoplasto, donde el O_2^- generado se dismuta a H_2O_2 mediante la enzima SOD (Liu y He, 2016).

Se ha postulado que las peroxidasas de la planta activarían rutas de señalización relacionadas con la acumulación de calosa, la lignificación y la expresión de genes. Por otra parte, las ROS generadas activarían las NADPH oxidasas (RBOHD y RBOHF) de la membrana plasmática para producir su propio estallido oxidativo (Camejo y col., 2016).

El O_2^- generado activaría rutas de señalización que conllevarían la muerte celular, la apertura/cierre estomático y la expresión de genes. Por lo tanto, el complejo BcNox podría actuar sobre estas actividades productoras de ROS durante el proceso de infección. Este efecto podría deberse a la producción local de ROS por parte del hongo y/o al ácido oxálico (AO), una fitotoxina secretada por hongos necrótrofos como *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, que altera el balance ROS en diferentes etapas de la infección. El AO genera un ambiente reductor en etapas tempranas para compensar el estallido oxidativo inhibiendo la SOD, pero una vez establecida la infección, promueve la producción de ROS que activa la muerte celular, favoreciendo su invasión (Williams y col. 2011). Por otra parte, el AO acidifica el medio, produciendo cristales de oxalato que inducen enzimas degradadoras de pared celular (Hegedus y Rimmer 2005). Los cambios observados en el balance ROS en todos los casos, que no se alteran en presencia de antioxidantes, podrían estar relacionados con la producción de ROS por parte de BcNox, que al inhibir la SOD y/o la peroxidasa podrían alterar el balance oxidativo facilitando la invasión, como se ha descrito previamente (Williams y col., 2011). En ese caso, todas las subunidades actuarían como factores de virulencia. Previamente se había determinado que en ausencia de *bcsod1*, que codifica la superóxido dismutasa 1, se reducía la virulencia en Arabidopsis y tomate, asociado con un desequilibrio ROS del mismo tipo que el observado en ausencia de *bcnox* (López-Cruz y col., 2017), por lo que se determinó que *bcsod1* constituía un factor de virulencia. Otra posibilidad a considerar es que la actividad y/o regulación de BcNox estuvieran relacionados con el AO. Los cambios de fenotipo observados en $\Delta bcnoxB$ tras la adición de ascorbato podrían deberse, al menos en parte, a la síntesis de AO, del que el ácido ascórbico es su precursor

(Truffault y col., 2017). En *Arabidopsis*, en estas condiciones se reduce la virulencia del hongo, mientras que en tomate se incrementa, en ambos casos con un fenotipo más severo que el del WT. Esto podría indicar que las funciones que desempeña BcNoxB están reguladas por AO o incluso, que podría estar relacionada con su metabolismo. Además, los resultados obtenidos indican una interacción diferente de *B. cinerea* con los dos hospedadores estudiados, en los que el complejo BcNox estaría implicado. Se ha descrito que mutantes deficientes en ácido D-galacturónico mostraron una virulencia reducida en *Arabidopsis* y *Nicotiana benthamiana*, pero no en tomate, debido a una diferente inhibición del crecimiento por intermediarios catabólicos, sin que se produjeran cambios en las respuestas de las plantas (Zhang y van Kan, 2013).

Los datos obtenidos en este trabajo aportan información sobre el posible papel de las distintas subunidades BcNox en el proceso de infección. En respuesta a $\Delta bcnoxB$ se retrasa la acumulación de calosa en *Arabidopsis*, mediante la inhibición transcripcional de la calosa sintasa. Esto facilitaría la entrada temprana del hongo y haría ineficaz la activación posterior de otras defensas de la planta, pudiendo incrementar la permeabilidad del AO y otros efectores del hongo, lo que contribuiría a incrementar su virulencia. Sin embargo, en tomate se acumula calosa igual que frente al resto de mutantes, reduciendo su virulencia. Esto indica que BcNoxB estaría implicada en la percepción del hongo por parte de la planta, que sería diferente en ambos cultivos, lo que podría estar relacionado con la mayor virulencia mostrada en tomate. El efecto producido en las respuestas de la planta parece apoyar esta idea. En su ausencia no solo se inhibe *PMR4*, sino que se activa la señalización mediada por JA/ET, se reduce la de SA, se altera la de OPDA y se inhibe *GST*. Todo ello contribuiría a facilitar la invasión del hongo. Sin embargo, la ausencia de *bcnoxA* activa la acumulación de calosa y afecta poco las rutas de señalización. Por lo tanto, BcNoxA podría constituir un factor de virulencia que facilitara la penetración y la expansión. Se ha descrito en hojas de pera inoculadas con *Alternaria alternata* que las ROS derivadas del Nox del hongo pueden acumularse dentro del apresorio reforzando la pared celular, y que BcNoxB puede regular la reorientación del sustrato en la maquinaria de penetración (Morita y col., 2013). Se ha demostrado que las ROS y el flujo de calcio pueden producir una deformación mecánica del apresorio, que es percibida por la planta activando sus defensas (Mbengue y col., 2016). Nuestros resultados confirman que BcNoxR es esencial para una apropiada

infección y apoya funciones adicionales para regular las subunidades catalíticas. Recientemente, An y col. (2016) demostraron que BcNoxR y la acuoporina8 (AQP8) afecta a la distribución de ROS en los apices de las hifas, que puede estar enlazada con la ruta polarizada de calcio a través de su impacto en la distribución polar de mitocondrias y ROS. Por otra parte, se han descrito nuevos reguladores y subunidades del complejo BcNox. La tetraspanina BcPls1 estaría asociada con BcNoxB, mientras que BcNoxD estaría implicado en el complejo BcNoxA (Siegmond y col., 2013, 2015; Scott, 2015).

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que la ausencia del complejo BcNox produce un impacto en las principales respuestas de las plantas, que es diferente en *Arabidopsis* y en tomate. *B. cinerea* podría manipular las defensas de la planta para facilitar su entrada y expansión, mediante los componentes del complejo BcNox que actuarían como factores de virulencia. La deposición temprana de calosa parece ser crucial para prevenir la progresión del hongo, estando regulada a nivel transcripcional tras la infección. Esta deposición de calosa podría ser un evento independiente de la alteración producida en el balance ROS. Estas ROS, a su vez, podrían retroalimentar la deposición de calosa y las rutas de señalización. BcNoxA tiene un papel preponderante en el proceso de infección. Tanto BcNoxB como BcNoxR podrían jugar papeles adicionales. BcNoxB podría ser esencial en la percepción del hongo por parte de la planta, que sería distinta en *Arabidopsis* y tomate. BcNoxR podría tener un efecto adicional sobre las rutas de señalización y el balance ROS en algunas etapas de la infección, que también parece distinto en ambos cultivos.

La complejidad del tema tratado en este capítulo de la presente tesis denota la necesidad de abordar futuras investigaciones analizando la producción de metabolitos, la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la señalización y el estudio del posible papel del complejo NADPH oxidasa y del AO, con el fin de aportar datos que ayuden a comprender esta compleja interacción planta-patógeno.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado que existe una conexión entre la EG KOR1 y las respuestas de defensa de *Arabidopsis* frente a *P. syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst*).
2. La EG KOR1 altera la deposición de calosa, la acumulación de ROS y el balance hormonal y de metabolitos secundarios, contribuyendo a aumentar la susceptibilidad en respuesta a *Pst*.
3. La ausencia de KOR1 interfiere en la resistencia de la planta frente a *Pst* mediante la activación de la ruta del JA por un efecto de *priming*.
4. La ausencia de BCSOD1 reduce la virulencia de *B. cinerea*, produciendo alteraciones significativas en las respuestas de defensa en plantas de *Arabidopsis* y de tomate.
5. La pérdida de BCSOD1 altera el balance ROS, concretamente el balance O_2^-/H_2O_2 promoviendo respuestas de defensa mas eficientes, como la deposición de calosa y la expresión de genes que responden a cambios en el ambiente redox, orquestadas por una compleja red de señalización.
6. BCSOD1 constituye un factor de virulencia, siendo importante para la completa patogenicidad de *B. cinerea*, dada su contribución a la producción de H_2O_2 que permite explotar el ambiente oxidativo generado en su propio beneficio.
7. La ausencia de las diferentes subunidades del complejo NADPH oxidasa de *B. cinerea* (BcNox) produce un impacto en las respuestas de las plantas, siendo diferente en *Arabidopsis* y en tomate.
8. *B. cinerea* puede manipular las defensas de la planta para facilitar su entrada y expansión mediante componentes del complejo BcNox, que actuarían como factores de virulencia.

9. BcNoxA tendría un papel importante en todo el proceso de infección, mientras que BcNoxB sería esencial en la etapa de penetración de *B. cinerea* en la planta. BcNoxR actuaría como subunidad reguladora de las dos subunidades catalíticas.

10. BcNoxB y BcNoxR podrían jugar papeles adicionales, que podrían ser diferentes en ambos cultivos. BcNoxB sería esencial en la percepción de *B. cinerea* por parte de la planta, mientras que BcNoxR podría actuar sobre las rutas de señalización y el balance ROS en algunas etapas de la infección.

11. La deposición temprana de calosa parece ser crucial para prevenir la infección de *B. cinerea*, estando regulada a nivel transcripcional. Este puede ser un evento independiente de la alteración en el balance ROS, que podrían retroalimentar la deposición de calosa y las rutas de señalización.

Resumen

RESUMEN

Las plantas pueden sufrir diferentes tipos de estreses, uno de ellos es la invasión de patógenos. Cuando tiene lugar la interacción, la planta activa rutas de señalización para generar respuestas de defensa para limitar la expansión del patógeno. Durante la interacción, la pared celular de la planta forma parte de la defensa activa frente a invasores. En los últimos años se ha relacionado a enzimas implicadas en la síntesis, crecimiento y desarrollo de la pared celular de la planta con la susceptibilidad o resistencia frente al patógeno. En estudios previos en nuestro grupo de investigación se identificaron numerosas endo-1,4- β -glucanasas (EGs) de *Arabidopsis* y de tomate implicadas en las interacciones planta-patógeno. Tras el ataque se produce un estallido oxidativo que resulta perjudicial para patógenos biótrofos, limitando su expansión, mientras que los patógenos necrótrofos lo utilizan en su propio beneficio. Estos patógenos son capaces de producir especies reactivas del oxígeno (ROS), que favorecen el proceso de colonización. En plantas, las ROS actúan como señalizadoras, jugando un papel en la protección de la planta. Al igual que en plantas, algunos patógenos también tienen sistemas para la producción y detoxificación de ROS. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión de superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que posteriormente se convertirá en agua, que es inocuo, por medio de otras enzimas. La enzima SOD se encuentra en diferentes compartimentos subcelulares de la planta, pero también se encuentra en muchos patógenos. Uno de los complejos enzimáticos productores de ROS es el complejo NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa (Nox). El NADPH dona electrones al O_2 , que es reducido a O_2^- y éste, se dismuta a H_2O_2 mediante SOD. En hongos, el complejo Nox contiene diferentes subunidades especializadas en la penetración, colonización y expansión del hongo en el tejido del hospedador.

Estos aspectos han sido tratados en la presente Tesis doctoral, cuyos objetivos se fundamentan en la caracterización de las respuestas de defensa de las plantas frente a patógenos mediante dos aproximaciones: La primera aproximación consiste en el análisis de la contribución de la pared celular mediante un análisis funcional de plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la enzima hidrolítica de pared Korrigan1 (KOR1) (mutantes de inserción *kor1-1*) y su cultivar silvestre Wasselewskija (Ws, plantas

control), frente a la bacteria hemibiótrofa *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst*).

Los resultados han revelado que las plantas *kor1-1* son más susceptibles frente a *Pst*, mostrando diversos síntomas, como deformación foliar y mayor presencia de clorosis, así como mayor crecimiento bacteriano, comparado con las plantas Ws. El análisis hormonal y la expresión de genes mostraron que la ruta del ácido jasmónico (JA) estaba más activo en plantas *kor1-1*, asociado a un incremento en el gen de biosíntesis de JA, *Lox3*, y una mayor acumulación de JA. Tras la infección, la acumulación de JA y de JA-Isoleucina (JA-Ile) fue mayor que en las plantas Ws, incrementando *Lox3* y el gen de respuesta a jasmónico/etileno (JA/ET) *PDF1.2*. Adicionalmente, el aumento de ácido salicílico (SA) en plantas control y en plantas *kor1-1* refleja la compleja interacción entre JA y SA, que resulta en una gran susceptibilidad mostrada por las plantas mutantes infectadas. La deposición de calosa, un polisacárido que se deposita en la zona de infección tras el ataque por el patógeno, fue mayor en plantas *kor1-1* que en plantas Ws. El fenotipo susceptible desplegado por las plantas deficientes en KOR1 es independiente en coronatina, un compuesto mimético en metil-JA que sintetizan algunas cepas de *P. Syringae* para infectar al hospedador. No se detectaron cambios significativos en el perfil hormonal de las plantas *kor1-1* infectadas con la cepa de *P. Syringae* deficiente en coronatina (*CmaA*), lo que apoya que la ausencia de la EG KOR1 altera *per se*, la respuesta de la planta a la infección. Previamente habíamos descrito un aumento de la resistencia frente al hongo necrótrofo *Botrytis Cinerea*, así pues, la ausencia de esta EG altera las propiedades de la pared celular y las respuestas de la planta en un sentido que beneficia la colonización de *P. Syringae* pero restringe la invasión de *B. Cinerea*. En general, los resultados indican que la ausencia de KOR1 produce cambios significativos en algunos de los principales mecanismos de defensa frente a *P. Syringae* y demuestra que existe una interacción entre la EG KOR1 y las rutas de señalización, como se observó previamente en *B. Cinerea* (Finiti y col., 2013). Este capítulo de la Tesis muestra que la ausencia de KOR1 interfiere en la resistencia de la planta frente a *P. Syringae* mediante un efecto de tipo *priming*, inducido por la ruta de JA y la deposición de calosa y la alteración de la acumulación de ROS. Los datos obtenidos sugieren que la ausencia de KOR1 produce cambios en los mecanismos de respuesta a estrés en la planta que inducen mayor susceptibilidad frente a la bacteria

hemibiotrofa. Estos efectos son el resultado de la alteración en la estructura de la pared celular en el mutante debido a la actividad hidrolítica de la EG, estando ausente. Sin embargo, la causa puede ser mediante sensores de la pared celular, que puede percibir la ausencia de productos degradadores de KOR1 y/o estructuras alteradas de la pared celular como señal de alarma. La alteración de la pared celular puede generar un estado de pre-alarma en plantas *kor1-1*, que induce la ruta de JA y la deposición de calosa, que da lugar a los cambios defensivos observados, que probablemente refleja una alteración de la compleja red de señalización implicada en la defensa de la planta.

La otra aproximación se basa en el estudio del papel desempeñado por el estrés oxidativo en las respuestas de defensa en plantas de *A. Thaliana* N70000 y de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) frente a cepas mutantes del hongo necrótrofo *B. cinerea*, que son deficientes en actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo oxidativo, como la carencia de la enzima superóxido dismutasa Cu-ZnSOD y de las subunidades del complejo Nox.

Previamente, se ha demostrado en nuestro grupo de investigación que las plantas de tomate infectadas con *B. cinerea* acumulan ROS y calosa, junto con la inducción de genes implicados en defensa, señalización y metabolismo oxidativo. En esta parte de la Tesis se estudió el fenotipo de infección de la cepa $\Delta bcsod1$ de *B. cinerea* en plantas de Arabidopsis y tomate. Este mutante carece de *bcsod1*, que codifica para la enzima Cu-ZnSOD. $\Delta bcsod1$ mostró una virulencia reducida en ambos cultivos, comparado con la cepa B05.10 (wildtype, WT). Las plantas infectadas con $\Delta bcsod1$ acumularon menos H_2O_2 , pero más O_2^- que las plantas infectadas con la cepa WT. Esto estaba asociado a una mayor deposición de calosa, apoyando un papel importante de la SOD fúngica en la producción de H_2O_2 durante la interacción planta-patógeno. La inducción temprana del gen de la calosa sintasa, *PMR4*, sugiere cambios en ROS y alteración en respuestas de defensa a nivel transcripcional. Los genes y metabolitos implicados en señalización y en respuesta a estrés oxidativo se expresaron diferencialmente en respuesta a la infección con $\Delta bcsod1$, apoyando la noción de que las plantas perciben cambios en el balance ROS y activan respuestas de defensa. Un balance O_2^-/H_2O_2 parece ser beneficioso para la protección de la planta frente a este necrótrofo. Los resultados destacan, además, la importancia de la deposición de calosa y la acumulación de la oxilipina OPDA (ácido 12-oxo-fitodienoico) en la respuesta a cambios en el medio oxidativo y clarifica los

mecanismos que subyacen a las respuestas frente a *B. cinerea* en plantas de Arabidopsis y de tomate. SOD es importante para la completa virulencia de *B. cinerea*, dada su habilidad para producir H_2O_2 y explotar el estallido oxidativo de la planta, como sugirieron previamente Tiedemann (1997) y Rolke y col. (2004). Además, los datos apoyan la idea de que las ROS juegan papeles diferentes en plantas infectadas por *B. cinerea*, de acuerdo con la dinámica y especificidad de la señalización ROS y la conexión con otras rutas de señalización, como se describió en otros sistemas (Mittler y col., 2011).

Por otra parte, se estudió el efecto en las respuestas en plantas de Arabidopsis y de tomate en ausencia de las diferentes subunidades del complejo Nox de *B. cinerea* (BcNox), una de las mayores fuentes productoras de ROS. Los mutantes $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$ mostraron una virulencia reducida en ambos hospedadores. Sin embargo, el mutante $\Delta bcnoxB$ presentaba un aumento en la virulencia en plantas de Arabidopsis, pero reducida en plantas de tomate. Esto sugiere que BcNoxB tendría un papel en percepción. Se observó un aumento de la deposición de calosa inducida por el patógeno en ambos cultivos tras la reducida infección con $\Delta bcnoxA$, $\Delta bcnoxAB$ y $\Delta bcnoXR$ e incluso tras la infección con $\Delta bcnoxB$ en plantas de tomate. En cambio, la ausencia de BcNoxB retrasó la acumulación de calosa y no mostró cambios comparado con la cepa WT en plantas de Arabidopsis a tiempo largo. La diferente regulación a nivel transcripcional en el metabolismo de calosa demuestra que su acumulación temprana es determinante para detener la invasión del hongo. El hongo puede manipular las defensas de la planta para facilitar su entrada y expansión mediante factores de virulencia como BcNoxA y BcNoxR, el cual, puede jugar papeles adicionales en el proceso infectivo. El hecho de que BcNoxAB y BcNoxR presenten el mismo fenotipo de infección y deposición de calosa, apoya el papel de BcNoxR como regulador. Tras la infección con los mutantes $\Delta bcnox$, se observó una menor acumulación de H_2O_2 y una mayor acumulación de O_2^- en ambos cultivos, excepto para $\Delta bcnoXR$ en tomate, que mostró una acumulación de ROS similar a la cepa WT a tiempo largo, lo que indica que esta subunidad tiene papeles adicionales. La aplicación de antioxidantes no cambió el fenotipo ROS en ninguno de los mutantes, pero si se observó un cambio en el fenotipo de infección y en la deposición de calosa tras la infección con $\Delta bcnoxB$, mostrando una reducida virulencia y mayor acumulación de calosa en Arabidopsis, mientras que en

tomate presentaba mayor virulencia pero con una deposición de calosa similar a la cepa WT. Los resultados sugieren que BcNoxA podría estar implicada en la fase de penetración y BcNoxB podría estar implicado en la producción intracelular de O_2^- para mantener los niveles basales de ROS necesarios y la señalización redox. Además, se ha podido establecer una correlación entre la deposición de calosa y el fenotipo de infección. La deposición de calosa podría ser un evento temprano e independiente de la alteración en el balance ROS, pudiéndose producir estos dos eventos de forma simultánea. Estas ROS, a su vez, podrían retroalimentar la deposición de calosa y las rutas de señalización. Por lo tanto, en este capítulo de la Tesis se ha demostrado que la ausencia del complejo BcNox produce un impacto en las respuestas de las plantas, que es diferente en Arabidopsis y tomate, mostrando una diferente percepción frente al patógeno y una diferente reprogramación transcripcional en ambos cultivos. La deposición temprana de calosa sería crucial para prevenir la progresión del hongo, estando regulada a nivel transcripcional tras la infección.

En futuras investigaciones sería necesario abordar el estudio de la producción de metabolitos, la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la señalización y el estudio del posible papel del complejo NADPH oxidasa y del ácido oxálico producido por *B. cinerea*, con el fin de aportar datos que ayuden a comprender esta compleja interacción planta-patógeno.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Abramovitch, R.B., and Martin, G.B. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 356-364.

Abramovitch, R.B., Janjusevic R., Stebbins, C.E., and Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2851-2856.

AbuQamar, S., Moustafa, K., and Tran, L.S. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 262-274.

Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C., and Innes, R.W. (2007). Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2531-2536.

Adie, B.A., Perez-Perez, J., Perez-Perez, M.M., Godoy, M., Sanchez-Serrano, J.J., Schmelz, et al. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 1665-1681.

Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology* (5 ed.). Elsevier Academic Press. 919 p.

Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., and Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 111-118.

Ahmad, S., Gordon-Weks, R., Pickett, J., and Ton, J. (2010). Natural variation in priming of basal resistance: From evolutionary origin to agricultural exploitation. *Mol. Plant Pathol.* 11, 817-827.

Ahn, I.P., Lee, S.W., and Suh, S.C. (2007). Rhizobacteria-induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 759-768.

Albrecht, C., Boutrot, F., Segonzac, C., Schwessinger, B., Gimenez-Ibanez, S., Chinchilla, D., et al. (2012). Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 303-308.

Albrecht, T., and Argueso, C. T. (2017). Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Ann. Bot. (Lond).* 119, 725-735.

Alfano, J.R., and Collmer, A. (1996). Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell* 8, 1683-1698.

- Alfano, J.R., and Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 385-414.
- Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., and Martínez, J.L. (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front Microbiol.* 4, 7. doi: 10.3389/fmicb.2013.00007.
- Amselem, J., Cuomo, C.A., van Kan, J.A., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A. et al. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* 7, e1002230. doi: 10.1371/journal.pgen.1002230.
- An, B., Li, B., Li, H., Zhang, Z., Qin, G., and Tian, S. (2016). Aquaporin8 regulates cellular development and reactive oxygen species production, a critical component of virulence in *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* 209, 1668-1680.
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., et al. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 3460-3479.
- Angulo, C., Leyva, M.O., Finiti, I., López-Cruz, J., Fernández-Crespo, E., García-Agustín, P., et al. (2015) Role of dioxygenase α -DOX2 and SA in basal response and in hexanoic acid-induced resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants against *Botrytis cinerea*. *J. Plant Physiol.* 175, 163-173.
- Aranega-Bou, P., de la O Leyva, M., Finiti, I., García-Agustín, P., and González-Bosch, C. (2014). Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Front. Plant Sci.* 5, 488. doi: 10.3389/fpls.2014.00488.
- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van, B.F., et al. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol.* 144, 1863-1877.
- Asselbergh, B., de Vleeschauwer, D., and Höfte, M. (2008a). Global switches and fine-tuning – ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 709-719.
- Asselbergh, B., de Vleeschauwer, D., and Höfte, M. (2008b). Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 11-24.
- Attaran, E., Zeier, T.E., Griebel, T., and Zeier, J. (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 954-971.

- Audenaert, K., De Meyer, G.B., and Höfte, M.M. (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol.* 128, 491-501.
- Baker, C.M., Chitrakar, R., Obulareddy, N., Panchal, S., Williams, P., and Melotto, M. (2010). Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 698–704.
- Baltrus, D.A., McCann, H.C., and Guttman, D.S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol. Plant Pathol.* 18, 152-168. doi: 10.1111/mpp.12506.
- Bari, R., and Jones, J.D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473-88. doi: 10.1007/s11103-008-9435-0.
- Beckers, G.J.M., and Spoel, S.H. (2006). Fine-tuning plant defense signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol.* 8, 1-10.
- Bellés, J.M., Garro, R., Pallás, V., Fayos, J., Rodrigo, I., and Conejero, V. (2006). Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* 223, 500-511.
- Benavides, A., Ramírez, H., Robledo, V., Fuentes, L.O. (2009). Antioxidantes en las plantas: Algunos factores edáficos y ambientales que los modifican. Temas modernos de nutrición vegetal, A. C. Pp. 13-26. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Texoco, Mexico.
- Bender, C.L., Arcon-Chaidez, F., and Gross, D.C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 266-292.
- Beneloujaephajri, E., Costa, A., L'Haridon, F., Métraux, J.P., and Binda, M. (2013). Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium. *BMC Plant Biol.* 13, 160. doi: 10.1186/1471-2229-13-160.
- Beno-Moualem, D., Gusev, L., Dvir, O., Pesis, E., Meir, S., and Lichter, A. (2004). The effects of ethylene, methyl jasmonate and 1-MCP on abscission of cherry tomatoes from the bunch and expression of endo-1,4-beta-glucanases. *Plant Sci.* 167, 499-507.
- Bernoux, M., Ellis, J.G., and Dodds, P.N. (2011). New insights in plant immunity signaling activation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 512-518.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* 29, 23-32.

- Bestwick, C.S., Bennett, M.H., and Mansfield, J.W. (1995). Hrp Mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* Induces Cell Wall Alterations but Not Membrane Damage Leading to the Hypersensitive Reaction in Lettuce. *Plant Physiol.* 108, 503-516.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., and Mansfield, J.W. (1998). Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a non-host hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 118, 1067-1078.
- Birkenbihl, R.P., Diezel, C., and Somssich, I.E. (2012). Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol.* 159, 266-285.
- Blanco-Ulate, B., Vincenti, E., Powell, A.L.T., and Cantu, D. (2013). Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and *Botrytis cinerea*. *Front. Plant Sci.* 4, 142. doi: 10.3389/fpls.2013.00142.
- Block, A., and Alfano, J.R. (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 39-46. doi: 10.1016/j.mib.2010.12.011.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A, Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., et al. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367-1376.
- Bosch, M., Wright, L.P., Gershenzon, J., Wasternack, C., Hause, B., Schaller, A., et al. (2014). Jasmonic acid and its precursor 12-oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato. *Plant Physiol.* 166, 396-410. doi: 10.1104/pp.114.237388
- Brooks, D.M., Hernández-Guzmán, G., Kloek, A.P., Alarcón-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., et al. (2004). Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 162-174.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and de Lorenzo G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9452-9457.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., et al. (2003). The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotech. J.* 1, 3-22.
- Caarls, L., Pieterse, C.M., and Van Wees, S.C. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6, 170.

- Camañes, G., Scalschi, L., Vicedo, B., González-Bosch, C., and García-Agustín, P. (2015). An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum*, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* 84, 125-139.
- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, A., and Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol. Biochem.* 103, 10-23. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.02.035.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., et al. (2008a). The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 859-864.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Labavitch, J.M., Bennett, A.B., and Powell, A.L.T. (2008b). Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends Plant Sci.* 13, 610-617.
- Cessna, S.G., Sears, V.E., Dickman, M.B., and Low, P.S. (2000). Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. *Plant Cell* 12, 2191–2199.
- Chanclud, E., and Morel, J.B. (2016). Plant hormones: a fungal point of view. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1289-1297.
- Chang, K.N., Zhong, S., Weirauch, M.T., Hon, G., Pelizzola, M., Li, H., et al. (2013). Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in *Arabidopsis*. *Elife* 2, e00675. doi: 10.7554/eLife.00675.
- Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, H.J., Métraux, J.P., and Lamotte, O. (2008). Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *Plant J.* 55, 555-567.
- Chehab, E.W., Kim, S., Savchenko, T., Kliebenstein, D., Dehesh, K., and Braam, J. (2011). Intronic T-DNA insertion renders *Arabidopsis opr3* a conditional jasmonic acid producing mutant. *Plant Physiol.* 156, 770-778.
- Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.H., and Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* 19, 284-295.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., and Ausubel, F.M. (2009). Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323, 95-101.

- Clergeot, P.H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.P., Pepin, R., et al. (2001). PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 98, 6963-6968.
- Collado, I.G., Sánchez, A.J., and Hanson, J.R. (2007). Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Nat. Prod. Rep.* 24, 674-686.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 217, 67–75.
- Collinge, D.B., Borch, J., Madriz-Ordeñana, K., and Newman, M.A. (2001). The responses of plants to pathogens. In Hawkesford, MJ; Buchner, P. (eds), *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers.
- Colmenares, A.J., Aleu, J., Durán-Patrón, R., Collado, I.G., and Hernández-Galán, R. (2002). The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol.* 28, 997-1005.
- Conrath, U., Amoroso, G., Köhle, H., and Sültemeyer, D.F. (2004). Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *Plant J.* 38, 1015-1022.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* 16, 524-531.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Langenbach, C.J., and Jaskiewicz, M.R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 97-119.
- Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell Wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850-861.
- Cuesta-Arenas, Y., Kalkman, E., Schouten, A., Dieho, M., Vredenburg, P., Uwumukiza, B., et al. (2010). Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 376–386.
- de Bruyne, L., Höfte, M., and de Vleeschauwer, D. (2014). Connecting growth and defense: the emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. *Mol. Plant* 7, 943-959.
- de Gara, L., de Pinto, M.C., and Tommasi F. (2003). The antioxidant systems vis à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 863-870.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389, 244.

- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D. et al. (1994). A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.
- de Lorenzo, G., Brutus, A., Savatin, D.V., Sicilia, F., and Cervone, F. (2011). Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Lett.* 585, 1521-1528. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.043.
- Dempsey, D.A., Shah, J., and Klessig, D.F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 547-575.
- Dempsey, D.A., and Klessig, D.F. (2012). SOS – too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.* 17, 538-545.
- de Storme, N., and Geelen, D. (2014). Callose homeostasis at plasmodesmata: Molecular regulators and developmental relevance. *Front. Plant Sci.* 5, 138. doi: 10.3389/fpls.2014.00138. eCollection 2014.
- de Torres-Zabala, M., Sanchez, P., Fernandez-Delmond, I., and Grant, M. (2003). Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defence responses in RPM1-mediated resistance. *Plant J.* 33, 665-676.
- de Torres-Zabala, M., Mansfield, J.W., Grabov, N., Brown, I.R., Ammoun, H., Tsiamis, G., et al. (2006). Pseudomonas syringae effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. *Plant J.* 47, 368-382.
- de Torres-Zabala, M., Bennett, M.H., Truman, W.H., and Grant, M.R. (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *Plant J.* 59, 375-386.
- de Vleeschauwer, D., Van Buyten, E., Satoh, K., Balidion, J., Mauleon, R., Choi, I.R., et al. (2012). Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice. *Plant Physiol.* 158, 1833-1846.
- Dirschnabel, D.E., Nowrousian, M., Cano-Domínguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., and Kück, U. (2014). New insights into the roles of NADPH oxidases in sexual development and ascospore germination in Sordaria macrospora. *Genetics* 196, 729-744.
- Divi, U.K., Rahman, T., and Krishna, P. (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol.* 10, 151. doi: 10.1186/1471-2229-10-151.
- Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.

- Doares, S.H., Narvaezvasquez, J., Conconi, A., and Ryan, C.A. (1995). Salicylic-Acid Inhibits Synthesis of Proteinase-Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol.* 108, 1741-1746.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539-548.
- Dong, X., Hong, Z., Chatterjee, J., Kim, S., and Verma, D.P. (2008). Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta* 229, 87-98.
- Donofrio, N.M., and Delaney, T.P. (2001). Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis* *nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 439-450.
- Doss, R.P., Deisenhofer, J., Krug von Nidda, H.A., Soeldner, A.H., and McGuire, R.P. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63, 687-691.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185-209.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., et al. (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161, 1433-1444.
- El Oirdi, M., El Rahman, T.A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M.C., Daayf, F., et al. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* 23, 2405-2421.
- Escalante-Pérez, M., Krol, E., Stange, A., Geiger, D., Al-Rasheid, K.A.S., Hause, B., et al. (2011). A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15492-15497.
- Faulkner, C., Petutschnig, E., Benitez-Alfonso, Y., Beck, M., Robatzek, S., Lipka, V., et al. (2013). LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9166-9170.
- Fernández-Acero, F.J., Colby, T., Harzen, A., Carbú, M., Wieneke, U., Cantoral, J.M. et al. (2010). 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *Proteomics* 10, 2270-2280.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., de Lorenzo, G., and Ausubel, F.M. (2003). *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* 35, 193-205.

- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., de Lorenzo, G., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol.* 144, 367-379.
- Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., and Lorenzo, G.D. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4, 49. doi: 10.3389/fpls.2013.00049.
- Finiti, I., Leyva, M.O., López-Cruz, J., Calderan-Rodrigues, B., Vicedo, B., Angulo, C., et al. (2013). Functional analysis of endo-1,4-beta-glucanases in response to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* reveals their involvement in plant-pathogen interactions. *Plant Biol.* 15, 819-831.
- Finiti, I., de la O Leyva, M., Vicedo, B., Gómez-Pastor, R., López-Cruz, J., García-Agustín, P., et al. (2014). Hexanoic acid protects tomato plants against *Botrytis cinerea* by priming defence responses and reducing oxidative stress. *Mol. Plant Pathol.* 15, 550-562.
- Flor, H.H. (1971). Current Status of Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.
- Flors, V., Ton, J., Jakab, G., and Mauch-Mani, B. (2005). Abscisic acid and callose: Team players in defence against pathogens? *J. Phytopathol.* 153, 377-383.
- Flors, V., Leyva, M.O., Vicedo, B., Finiti, I., Real, M.D., García-Agustín, P., et al. (2007). Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant J.* 52, 1027-1040.
- Flors, V., Ton, J., van Doorn, R., Jakab, G., Garcia-Agustin, P., and Mauch-Mani, B. (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* 54, 81-92.
- Fontecave, M., Atta, M., and Mulliez, E. (2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* 29, 243-249.
- Forcat, S., Bennett, M., Grant, M., and Mansfield, J.W. (2010). Rapid linkage of indole carboxylic acid to the plant cell wall identified as a component of basal defence in *Arabidopsis* against hrp mutant bacteria. *Phytochemistry* 71, 870-876.
- Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S.W., et al. (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1773-1778.
- Fray, S. (2004). Primary cell Wall metabolism: Tracking the careers of Wall polymers in living plant cells. *New phytol.* 161, 641-675.

- Frederickson, D.E., and Loake, G.J. (2014). Redox regulation in plant immune function. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1373-1388. doi: 10.1089/ars.2013.5679.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., de Lorenzo, G., et al. (2008). The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against Botrytis cinerea. *Plant Physiol.* 148, 1695-1706.
- Gao, Q.M., Zhu, S., Kachroo, P., and Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 6, 228. doi: 10.3389/fpls.2015.00228.
- Garcia, Y.M., Barwinska-Sendra, A., Tarrant, E., Skaar, E.P., Waldron, K.J., and Kehl-Fie, T.E. (2017). A Superoxide Dismutase Capable of Functioning with Iron or Manganese Promotes the Resistance of Staphylococcus aureus to Calprotectin and Nutritional Immunity. *PLoS Pathog.* 13, e1006125.
- Gatehouse, J.A., Ferry, N., and Raemaekers, R.J. (2002). The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. *Trends Genet.* 18, 249-251.
- Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A., and Mackey, D. (2012). The coronatine toxin of Pseudomonas syringae is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defense. *Plant Cell* 24, 4763-4774.
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M.G., and Mackey, D. (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of Pseudomonas syringae. *Planta* 240, 1149-65. doi: 10.1007/s00425-014-2151-x.
- Glazebrook, J., Chen, W.J., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., et al. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* 34, 217-228.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205-227.
- Golemic, E., Tokarz, K., Wielanek, M., and Niewiadomska, E. (2014). A dissection of the effects of ethylene, H₂O₂ and high irradiance on antioxidants and several genes associated with stress and senescence in tobacco leaves. *J. Plant Physiol.* 171, 269-275.
- González, M., Brito, N., and González, C. (2017). The Botrytis cinerea elicitor protein BcIEB1 interacts with the tobacco PR5-family protein osmotin and protects the fungus against its antifungal activity. *New Phytol.* 215, 397-410. doi: 10.1111/nph.14588.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., and Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell* 24, 762-777.

- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M.H., and Levis, C. (2004). The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Mol. Microbiol.* 51, 619-629.
- Govrin, E.M., and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr.Biol.* 10, 751-757.
- Grant, M.R., and Jones, J.D. (2009). Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324, 750-752.
- Greene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *Arabidopsis Book* 1, e0036. doi: 10.1199/tab.0036.1.
- Hahn, M., Viaud, M., and van Kan, J. (2014). The Genome of *Botrytis cinerea*, a Ubiquitous Broad Host Range Necrotroph. Dean, R.A. et al. (eds.), Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens. doi: 10.1007/978-3-662-44056-8_2
- Hamada, M., Shoguchi, E., Shinzato, C., Kawashima, T., Miller, D.J., and Satoh, N. (2013). The complex NOD-like receptor repertoire of the coral *Acropora digitifera* includes novel domain combinations. *Mol. Biol. Evol.* 30, 167-176.
- Hamann, T. (2012). Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front. Plant Sci.* 3, 77. doi: 10.3389/fpls.2012.00077.
- Hamann, T. (2015). The plant cell wall integrity maintenance mechanism-concepts for organization and mode of action. *Plant Cell Physiol.* 56, 215-223.
- Harberd, N.P. (2003). Botany. Relieving DELLA restraint. *Science* 299, 1853-1854.
- Harrison, H.F., Peterson, J.K., Snook, M.E., Bohac, J.R., and Jackson, D.M. (2003). Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage root periderm. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2943-2948.
- Hauck, P., Thilmony, R., and He, S.Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8577-8582.
- Hegedus, D.D., and Rimmer, S.R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: when "to be or not to be" a pathogen? *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 177-1784.
- Heller, J., and Tudzynsk P. (2011). Reactive oxygen species in pathogenic fungi: Signaling development and disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 369-390.
- Henrissat, B., Coutinho, P.M., and Davies, G.J. (2001). A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 47, 55-72.

- Henry, G., Thonart, P., and Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16, 257-268.
- Hernandez-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., et al. (2007). Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* 19, 890-903.
- Herrera-Vasquez, A., Salinas, P., and Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.* 6, 171.
- Howden, A.J., Harrison, C.J., and Preston, G.M. (2009). A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *Plant J.* 57, 243-253.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101-127.
- Hückelhoven, R., and Kogel, K.H. (2003). Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216, 891-902.
- Hwang, J., Sheen, J., and Muller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 353-380.
- Ito, S., Ihara, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ikeda, T., Kajihara, H., et al. (2007). Alpha-Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett.* 581, 3217-3222.
- Itoh, A., and Howe, G.A. (2001). Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 276, 3620-3627.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U., and Peterhansel, C. (2011). Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* 12, 50-55.
- Jiménez-Quesada, M.J., Traverso, J.A., and Alché, J. (2016). NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues. *Front. Plant Sci.* 7, 359. doi: 10.3389/fpls.2016.00359.
- Jin, L., and Mackey, D.M. (2017). Measuring Callose Deposition, an Indicator of Cell Wall Reinforcement, During Bacterial Infection in Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* 1578, 195-205. doi: 10.1007/978-1-4939-6859-6_16.
- Jones, J.D., and Dang, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

- Jones, J.D., Vance, R.E., and Dangl, J.L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354(6316). pii: aaf6395.
- Kadota, Y., Shirasu, K., and Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol.* 56, 1472-1480.
- Kamatham, S., Neela, K.B., Pasupulati, A.K., Pallu, R., Singh, S.S., and Gudipalli, P. (2016). Benzoylsalicylic acid isolated from seed coats of *Givotia rottleriformis* induces systemic acquired resistance in tobacco and *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 126, 11-22.
- Kang, J.S., Frank, J., Kang, C.H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A., et al. (2008). Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5933-5938.
- Kaouthar, F., Ameny, F.K., Yosra, K., Walid, S., Ali, G., and Faiçal, B. (2016). Responses of transgenic *Arabidopsis* plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 198, 56-68.
- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L., and VAN Kan, J.A. (2005). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10. *Mol. Plant Pathol.* 6, 641-652. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00312.x.
- Katagiri, F., and Tsuda, K. (2010). Understanding the plant immune system. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1531-1536. doi: 10.1094/MPMI-04-10-0099.
- Kazan, K., Manners, J.M. (2012). JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17, 22-31.
- Kende, H. (1993). Ethylene Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 283-307.
- Kettner, J., and Dörffling, K. (1995). Biosynthesis and Metabolism of Abscisic-Acid in Tomato Leaves Infected with *Botrytis cinerea*. *Planta* 196, 627-634.
- Kim, K.S., Min, J.Y., and Dickman, M.B. (2008). Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 605-612.
- Kim, H.J. (2014). Exploitation of Reactive Oxygen Species by Fungi: Roles in Host-Fungus Interaction and Fungal Development. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1455-1463.
- Kotchoni, S.O., and Gachomo, E.W. (2006). The reactive oxygen species network pathways: An essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J. Biosci.* 31, 389-404.

- Kravchuk, Z., Vicedo, B., Flors, V., Camañes, G., González-Bosch, C., and García-Agustín, P. (2011). Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect *Arabidopsis* against *B. cinerea*. *J. Plant Physiol.* 168, 359-366.
- Krishna, P. (2003). Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *J. Plant Growth Regul.* 22, 289-297.
- Kumar, J., Hüchelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S., and Kogel, K.H. (2001). A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* 1, 127-133.
- Lai, Z., Schluttenhofer, C.M., Bhide, K., Shreve J., Thimmapuram, J., Lee, S.Y., et al. (2014). MED18 interaction with distinct transcription factors regulates multiple plant functions. *Nat. Commun.* 5, 3064. doi: 10.1038/ncomms4064.
- Laluk, K., and Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *Arabidopsis Book*. 8, e0136. doi: 10.1199/tab.0136.
- Landis, G.N., and Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126, 365-379.
- Lay, F.T., and Anderson, M.A. (2005). Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 85-101.
- Lee, S.W., Ahn, I.P., Lim, J.W., and Lee, Y.H. (2005). *Pseudomonas putida* strain 17 isolated from replant soil promotes plant growth and strain 17 isolated from replant soil promotes plant growth and inhibits conidial germination of soilborne plant pathogens. *Plant Pathol. J.* 21, 244-251.
- Leyva, M.O., Vicedo, B., Finiti, I., Flors, V., del Amo, G., Real, M.D., et al. (2008). Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant pathol.* 57, 1038-1046.
- L'Haridon, F., Besson-Bard, A., Binda, M., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Balet, F., et al. (2011). A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathog.* 7, e1002148.
- Libertini, E., Li, Y., and McQueen-Mason, S.J. (2004). Phylogenetic analysis of the plant endo-beta-1,4-glucanase gene family. *J. Mol. Evol.* 58, 506-515.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., et al. (2005). Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310, 1180-1183.

- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., et al. (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 143, 1871-1880.
- Lionetti, V., Fabri, E., De Caroli, M., Hansen, A.R, Willats, W., Piro, G., and Bellincampi, D. (2017). Three pectin methyl esterase inhibitors protect cell wall integrity for immunity to *Botrytis*. *Plant Physiol.* 173, 1844-1863. doi: 10.1104/pp.16.01185.
- Liu, S., Ziegler, J., Zeier, J., Birkenbihl, R.P., and Somssich, I.E. (2017). *Botrytis cinerea* B05.10 promotes disease development in Arabidopsis by suppressing WRKY33-mediated host immunity. *Plant Cell environ.* doi: 10.1111/pce.13022.
- Liu, Y., and He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Rep.* 35, 995-1007.
- López-Cruz, J., Finiti, I., Fernández-Crespo, E., Crespo-Salvador, O., García-Agustín, P., and González-Bosch, C. (2014). Absence of endo-1,4- β -glucanase KOR1 alters the jasmonate-dependent defence response to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *J. Plant Physiol.* 171, 1524-1532.
- López-Cruz, J., Crespo, O., Fernández-Crespo, E., García-Agustín, P., and González-Bosch, C. (2017). Absence of Cu-Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in Arabidopsis and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Mol. Plant Pathol.* 18, 16-31.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). Ethylene Response Factor1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell* 15, 165-178.
- Lyon, G.D., Goodman, B.A., and Williamson, B. (2007). *Botrytis cinerea* Perturbs Redox Processes as an Attack Strategy in Plants. *Botrytis: Biology, pathology and control.* (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N., eds Springer Netherlands), pp. 119-141.
- Macho, A.P., and Zipfel, C. (2015). Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 14-22. doi: 10.1016/j.mib.2014.10.009.
- Mackey, D., and McFall, A.J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol. Microbiol.* 61, 1365-1371.
- Mansoori, N., Timmers, J., Desprez, T., Alvim-Kamei, C.L., Dees, D.C., Vincken, J.P., et al. (2014). KORRIGAN1 interacts specifically with integral components of the cellulose synthase machinery. *PLoS One* 9, e112387.

- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., and Legendre, L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 359-366.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., and Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 17, 9-15.
- Marschall, R., and Tudzynski, P. (2014). A new and reliable method for live imaging and quantification of reactive oxygen species in *Botrytis cinerea*: technological advancement. *Fungal Genet. Biol.* 71, 68-75. doi: 10.1016/j.fgb.2014.08.009.
- Marschall, R., and Tudzynski, P. (2016a). Reactive oxygen species in development and infection processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 57, 138-46. doi: 10.1016/j.semcdb.
- Marschall, R., Schumacher, J., Siegmund, U., and Tudzynski, P. (2016b). Chasing stress signals - Exposure to extracellular stimuli differentially affects the redox state of cell compartments in the wild type and signaling mutants of *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 90, 12-22.
- Marschall, R., and Tudzynski, P. (2016c). Bclqg1, a fungal IQGAP homolog, interacts with NADPH oxidase, MAP kinase and calcium signaling proteins and regulates virulence and development in *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* 101, 281-298. doi: 10.1111/mmi.13391.
- Marschall, R., and Tudzynski, P. (2017). The Protein Disulfide Isomerase of *Botrytis cinerea*: An ER Protein Involved in Protein Folding and Redox Homeostasis Influences NADPH Oxidase Signaling Processes. *Front. Microbiol.* 8, 960. doi: 10.3389/fmicb.2017.00960.
- Martínez-Aguilar, K., Ramírez-Carrasco, G., Hernández-Chávez, J.L., Barraza, A., and Alvarez-Venegas, R. (2016). Use of BABA and INA As Activators of a Primed State in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Front. Plant Sci.* 7, 653. doi: 10.3389/fpls.2016.00653.
- Masuda, S., Tokaji, Y., Kobayashi, Y., and Ohta, H. (2014). Mechanisms of induction of the stress-responsive transcription factors HsfA2 and DREB2A by 12-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 647-650.
- MauchMani, B., and Slusarenko, A.J. (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.
- Mauch-Mani, B., and Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 409-414.

- Mbengue, M., Navaud, O., Peyraud, R., Barascud, M., Badet, T., Vincent, R., Barbacci, A., and Raffaele, S. (2016). Emerging trends in molecular interactions between plants and the broad host range fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Plant Sci.* 7, 422. doi: 10.3389/fpls.2016.00422.
- Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J., and Heath, M.C. (2002). H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J.* 29, 257-268.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-980.
- Metraux, J.P., Nawrath, C., and Genoud, T. (2002). Systemic acquired resistance. *Euphytica* 124, 237-243.
- Miao, Y., and Zentgraf, U. (2007). The antagonist function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *Plant Cell* 19, 819-830.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., and Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5, 358. doi: 10.3389/fpls.2014.00358.
- Miller, R.N., Costa-Alves, G.S., and Van Sluys, M.A. (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Ann. Bot. (Lond)*. 119, 681-687.
- Minic, Z., and Jouanin, L. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 435-449.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K. et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300-309.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends Plant Sci.* 22, 11-19.
- Mohr, P.G., and Cahill, D.M. (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Funct. Integr. Genomics.* 7, 181-191.
- Molhoj, M., Johansen, B., Ulvskov, P., and Borkhardt, B. (2001). Expression of a membrane-anchored endo-1,4-beta-glucanase from Brassica napus, orthologous to KOR from Arabidopsis thaliana, is inversely correlated to elongation in light-grown plants. *Plant Mol. Biol.* 45, 93-105.
- Molhoj, M., Pagant, S., and Höfte, H. (2002). Towards understanding the role of membrane-bound endo-beta-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 43, 1399-1406.

- Moore, S., de Vries, O.M., and Tudzynski, P. (2002). The major Cu,Zn SOD of the phytopathogen *Claviceps purpurea* is not essential for pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 3, 9-22.
- Moraga, J., Dalmais, B., Izquierdo-Bueno, I., Aleu, J., Hanson, J.R., Hernández-Galán, R. et al. (2016). Genetic and Molecular Basis of Botrydial Biosynthesis: Connecting Cytochrome P450-Encoding Genes to Biosynthetic Intermediates. *ACS Chem. Biol.* 11, 2838-2846.
- Morita, Y., Hyon, G.S., Hosogi, N., Miyata, N., Nakayashiki, H., Muranaka, Y., et al. (2013). Appressorium-localized NADPH oxidase B is essential for aggressiveness and pathogenicity in the host-specific, toxin-producing fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Mol. Plant Pathol.* 14, 365-378.
- Muckenschnabel, I., Williamson, B., Goodman, B.A., Lyon, G.D., Stewart, D., and Deighton, N. (2001). Markers for oxidative stress associated with soft rots in French beans (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Botrytis cinerea*. *Planta* 212, 376-381.
- Muckenschnabel, I., Goodman, B.A., Williamson, B., Lyon, G.D., and Deighton, N. (2002). Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J. Exp. Bot.* 53, 207-214.
- Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., and Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140, 249-262.
- Murray, S.L., Ingle, R.A., Petersen, L.N., and Denby, K.J. (2007). Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 1431-1438.
- Nafisi, M., Fimognari, L., and Sakuragi, Y. (2015). Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry* 112, 63-71.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., et al. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* 33, 887-898.
- Naumann, M., Somerville, S.C., and Voigt, C.A. (2013). Differences in early callose deposition during adapted and non-adapted powdery mildew infection of resistant *Arabidopsis* lines. *Plant Signal. Behav.* 8, 1-4.

- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., et al. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436-439.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., et al. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* 18, 650-655.
- Newman, M.A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., and Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 4, 139. doi: 10.3389/fpls.2013.00139.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., and Höfte H. (1998). A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis. *EMBO J.* 17, 5563-5576.
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., and Niu, D. (2017). Induced Systemic Resistance against Botrytis cinerea by Bacillus cereus AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent Signaling Pathway and Activates PAMP-Triggered Immunity in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8, 238. doi: 10.3389/fpls.2017.00238.
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H., Vogel, J.P., Edwards, H., and Somerville, S.C. (2003). Loss of acallose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301, 969-972.
- Noctor, G., Reichheld, J.P., and Foyer, C.H. (2017). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* pii: S1084-9521(17)30246-X. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
- Normanly, J. (2010). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001594. doi: 10.1101/cshperspect.a001594.
- Oide, S., Bejai, S., Staal, J., Guan, N., Kaliff, M., and Dixelius, C. (2013). A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* 200, 1187-1199.
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B., and Staub, T. (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 19-28.
- Pajeroska-Mukhtar, K.M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C.L., Fonseca, J.P., et al. (2012). The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Curr. Biol.* 22, 103-112.
- Pajeroska-Mukhtar, K.M., Emerine, D.K, and Mukhtar, M.S. (2013). Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 18, 402-411.

- Pangesti, N., Reichelt, M., van de Mortel, J.E., Kapsomenou, E., Gershenzon, J., van Loon, J.J., et al. (2016). Jasmonic Acid and Ethylene Signaling Pathways Regulate Glucosinolate Levels in Plants During Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance Against a Leaf-Chewing Herbivore. *J. Chem. Ecol.* 42, 1212-1225.
- Park, S.W., Li, W., Viehhauser, A., He, B., Kim, S., Nilsson, A.K., Andersson, M.X., Kittle, J.D., Ambavaram, M.M., Luan, S., Esker, A.R., Tholl, D., Cimini, D., Ellerström, M., Coaker, G., Mitchell, T.K., Pereira, A., Dietz, K.J., and Lawrence, C.B. (2013). Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9559-9564.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., and Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environ. Exp. Bot.* 94, 46–56. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.02.013.
- Patel, R.M., van Kan, J.A.L., Bailey, A.M., and Foster, G.D. (2008). RNA-mediated gene silencing of superoxide dismutase (bcsod1) in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 98, 1134-1139.
- Pedras, M.S., and Ahiahonu, P.W. (2005). Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 66, 391-411.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., et al. (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103, 1111-1120.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pieterse, C.M.J., and van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52-58.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308-316.
- Pilling, E., and Höfte, H. (2003). Feedback from the wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 611-616.
- Preston, G.M. (2017). Profiling the extended phenotype of plant pathogens: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol. Plant Pathol.* 18, 443-456. doi: 10.1111/mpp.12530.
- Prins, T.W., Wagemakers, L., Schouten, A., and van Kan, J.A. (2000). Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* double dagger. *Mol. Plant Pathol.* 1, 169-178.

- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., et al. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.* 139, 1902-1913.
- Ramonell, K.M., Zhang, B., Ewing, R.M., Chen, Y., Xu, D., Stacey, G., and Somerville, S. (2002). Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol.* 3, 301-311.
- Real, M.D., Company, P., García-Agustín, P., Bennett, A.B., and González-Bosch, C. (2004). Characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase Cel1 protein in fruit during ripening and after fungal infection. *Planta* 220, 80-86.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D.A. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.
- Ribera-Fonseca, A., Inostroza-Blancheteau, C., Cartes, P., Rengel, Z., and Mora, M.L. (2013). Early induction of Fe-SOD gene expression is involved in tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass. *Plant Physiol. Biochem.* 73, 77-82.
- Rivera-Carriles, K., Argáiz, A., Palou, E., and Lopez-Malo, A. (2005). Synergistic inhibitory effect of citral with selected phenolics against *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Food Prot.* 68, 602-606.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, and M., Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317-343. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447.
- Roca, M.G., Weichert, M., Siegmund, U., Tudzynski, P., and Fleissner, A. (2012). Germling fusion via conidial anastomosis tubes in the grey mould *Botrytis cinerea* requires NADPH oxidase activity. *Fungal Biol.* 116, 379-387.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.M., et al. (2004). Functional analysis of H₂O₂ generating systems in *Botrytis cinerea*: The major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* 5, 17-27.
- Ross, A.F. (1961). Systemic Acquired Resistance Induced by Localized Virus Infections in Plants. *Virology* 14, 340-358.
- Rossi, F.R., Gárriz, A., Marina, M., Romero, F.M., Gonzalez, M.E., Collado, I.G, et al. (2011). The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 888-896. doi: 10.1094/MPMI-10-10-0248.

- Rufián, J.S., Sánchez-Romero, M.A., López-Márquez, D., Macho, A.P., Mansfield, J.W., Arnold, D.L., et al. (2016). *Pseudomonas syringae* Differentiates into Phenotypically Distinct Subpopulations During Colonization of a Plant Host. *Environ Microbiol.* 18, 3593-3605.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., and Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci.* 15, 247-258.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., and Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141, 336-340.
- Sasanuma, I., and Suzuki, T. (2016). Effect of calcium on cell-wall degrading enzymes of *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1730-1736.
- Satoh, M., Tokaji, Y., Nagano, A.J., Hara-Nishimura, I., Hayashi, M., Nishimura, M., Ohta, H., and Masuda, S. (2014). Arabidopsis mutants affecting oxylipin signaling in photo-oxidative stress responses. *Plant Physiol. Biochem.* 81, 90-95. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.11.023.
- Scalschi, L., Sanmartín, M., Camañes, G., Troncho, P., Sánchez-Serrano, J.J., García-Agustín, P., et al. (2015). Silencing of OPR3 in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *Plant J.* 81, 304-315.
- Scheler, C., Durner, J., and Astier, J. (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 534-399. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.020.
- Schillmiller, A.L., Koo, A.J., and Howe, G.A. (2007). Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol.* 143, 812-824.
- Schoonbeek, H., Jacquat-Bovet, A., Mascher, F., and Métraux, J. (2007). Oxalate-Degrading Bacteria Can Protect *Arabidopsis thaliana* and Crop Plants Against *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 1535–1544. doi:10.1094 /MPMI -20-12-1535.
- Schouten, A., Tenberge, K.B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B. et al. (2002). Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 3, 227-238.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Viaud, M., and Tudzynski, P. (2014). The Transcription Factor BcLTF1 Regulates Virulence and Light Responses in the

- Necrotrophic Plant Pathogen *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* 10, e1004040. doi: 10.1371/journal.pgen.1004040.
- Scott, B., and Eaton, C.J. (2008). Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 488-493.
- Scott, B. (2015). Conservation of fungal and animal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complexes. *Mol. Microbiol.* 95, 910-913.
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J., and Tudzynski, P. (2008). NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 808-819.
- Sels, J., Mathys, J., de Coninck, B.M., Cammue, B.P., and de Bolle, M.F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 941-950.
- Shakeel, S.N., Wang, X., Binder, B.M., and Schaller, G.E. (2013). Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants* 5, plt010. doi: 10.1093/aobpla/plt010.
- Sham, A., Al-Azzawi, A., Al-Ameri, S., Al-Mahmoud, B., Awwad, F., Al-Rawashdeh, A., et al. (2014). Transcriptome analysis reveals genes commonly induced by *Botrytis cinerea* infection, cold, drought and oxidative stresses in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9, e113718.
- Sham, A., Moustafa, K., Al-Shamisi, S., Alyan, S., Iratni, R., and AbuQamar, S. (2017). Microarray analysis of *Arabidopsis* WRKY33 mutants in response to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS One* 12, e0172343.
- Shen, Q.H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., et al. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315, 1098-1103.
- Siegmund, U., Heller, J., van Kann, J., and Tudzynski, P. (2013). The NADPH oxidase complexes in *Botrytis cinerea*: Evidence for a close association with the ER and the Tetraspanin Pls1. *PLoS One.* 8, e55879.
- Siegmund, U., Marschall, R., and Tudzynski, P. (2015). BcNoxD, a putative ER 624 protein, is a new component of the NADPH oxidase complex in *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* 95, 988-1005.
- Siemens, J., Keller, I., Sarx, J., Kunz, S., Schuller, A., Nagel, W., et al. (2006). Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 480-494.

- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Gronover, C.S., Pradier, J.M., et al. (2005). Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 602-612.
- Singh, A., Lim, G.H., and Kachroo, P. (2017). Transport of chemical signals in systemic acquired resistance. *J. Integr. Plant Biol.* 59, 336-344.
- Skalamera, D., Jibodh, S., and Heath, M.C. (1997). Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytol.* 136, 511-524.
- Skelly, M.J., and Loake, G.J. (2013). Synthesis of Redox-Active Molecules and Their Signaling Functions During the Expression of Plant Disease Resistance. *Antioxid. Redox Signal* 19, 990-997. doi: 10.1089/ars.2013.5429.
- Smart, M.G., Aist, J.R., and Israel, H.W. (1986). Structure and function of Wall appositions. 2. Callose and the resistance of oversize papillae to penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. *Can. J. Bot.* 64, 802-804.
- Son, G.H., Wan, J., Kim, H.J., Nguyen, X.C., Chung, W.S., Hong, J.C., et al. (2012). Ethylene-responsive element-binding factor 5, ERF5, is involved in chitin-induced innate immunity response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 48-60.
- Song, L.X., Xu, X.C., Wang, F.N., Wang, Y., Xia, X.J., Shi, K., et al. (2017). Brassinosteroids act as a positive regulator for resistance against root-knot nematode involving RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG-dependent activation of MAPKs in tomato. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.12952.
- Soylu, S., Brown, I., and Mansfield, J.W. (2005). Cellular reactions in *Arabidopsis* following challenge by strains of *Pseudomonas syringae*: From basal resistance to compatibility. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66, 232-243.
- Staal, J., Kaliff, M., Dewaele, E., Persson, M., and Dixelius, C. (2008). RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of *Arabidopsis* to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J.* 55, 188-200.
- Staswick, P.E., and Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2117-2127.
- Stepanova, A.N., and Alonso, J.M. (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 548-55. doi: 10.1016/j.pbi.2009.07.009.

- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12837-12842.
- Stotz, H.U., Jikumaru, Y., Shimada, Y., Sasaki, E., Stingl, N., Mueller, M.J., et al. (2011). Jasmonate-dependent and COI1-independent defense responses against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*: auxin is part of COI1-independent defense signaling. *Plant Cell Physiol.* 52, 1941-1956.
- Stotz, H.U., Mueller, S., Zoeller, M., Mueller, M.J., and Berger, S. (2013). TGA transcription factors and jasmonate-independent COI1 signalling regulate specific plant responses to reactive oxylipins. *J. Exp. Bot.* 64, 963-975.
- Suarez-Rodriguez, M.C., dams-Phillips, L., Liu, Y.D., Wang, H.C., Su, S.H., Jester, P.J., et al. (2007). MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 143, 661-669.
- Survilla, M., Davidsson, P., Pennanen, V., Kariola, T., Broberg, M., Sipari, N., Heino, P., and Palva, E. (2016). Peroxidase-Generated Apoplastic ROS Impair Cuticle Integrity and Contribute to DAMP-Elicited Defenses. *Front. Plant Sci.* 7, 1945. doi: 10.3389/fpls.2016.01945.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321, 952-956.
- Takahashi, J., Rudsander, U.J., Hedenström, M., Banasiak, A., Harholt, J., Amelot, N., et al. (2009). KORRIGAN1 and its aspen homolog PttCel9A1 decrease cellulose crystallinity in *Arabidopsis* stems. *Plant Cell Physiol.* 50, 1099-1115.
- Takemoto, D., Tanaka A., and Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet. Biol.* 44, 1065-1076.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Aina, T., et al. (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 1268-1283.
- Tang, X., Xie, M., Kim, Y.J., Zhou, J., Klessig, D.F., and Martin, G.B. (1999). Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell* 11, 15-29.
- Tani, H., Koshino, H., Sakuno, E., Cutler, H.G., and Nakajima, H. (2006). Botcinins E and F and Botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *J. Nat. Prod.* 69, 722-725.

- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., et al. (2003). Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15, 317-330.
- Temme, N., and Tudzynski, P. (2009). Does *Botrytis cinerea* ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of *Botrytis* activator protein 1. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 987-998.
- ten Have, A., Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J., and van Kan, J.A.(2001). *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.* 33, 97-105.
- ten Have, A., Espino, J.J., Dekkers, E., Van Sluyter, S.C., Brito, N., Kay, J., et al. (2010). The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet. Biol.* 47, 53-65.
- Terry, L.A., Joyce, D.C., Adikaram, N.K.B., and Khambay, B.P.S. (2004). Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 201-212.
- Thaler, J.S., Fidantsef, A.L., and Bostock, R.M. (2002). Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *J. Chem. Ecol.* 28, 1131-1159.
- Thilmony, R., Underwood, W., and He, S.Y. (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the Arabidopsis thaliana interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* 46, 34-53.
- Thomma, B.P., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta* 216, 193-202.
- Thomma, B.P., Nürnberger, T., and Joosten, M.H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23, 4-15.
- Tiedemann, A.V. (1997). Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50, 151-166.
- Ton, J., and Mauch-Mani, B. (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38, 119-130.
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V., and Vera, P. (1997). Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-

related gene during the hypersensitive response and development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 624-634.

Torres, M.A., and Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397-403.

Truffault, V., Fry, S.C., Stevens, R.G, and Gautier, H. (2017). Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. *Plant J.* 89, 996–1008.

Truman, W., de Zabala, M.T., and Grant, M. (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J.* 46, 14-33.

Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., and Grant, M. (2007). Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1075-1080.

Truman, W.M., Bennett, M.H., Turnbull, C., and Grant, M. (2010). Arabidopsis Auxin Mutants Are Compromised in Systemic Acquired Resistance and Exhibit Aberrant Accumulation of Various Indolic Compounds. *Plant Physiol.* 152, 1562-1573.

Tsai, C.H., Singh, P., Chen, C.W., Thomas, J., Weber, J., Mauch-Mani, B., and Zimmerli, L. (2011). Priming for enhanced defence responses by specific inhibition of the Arabidopsis response to coronatine. *Plant J.* 65, 469-479. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2010.04436.x.

Tudzynski, P., Heller, J., and Siegmund, U. (2012). Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 653-659.

Turrión-Gómez, J.L., and Benito, E.P. (2011). Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Mol. Plant Pathol.* 12, 606-616.

Urbanowicz, B.R., Catalá, C., Irwin, D., Wilson, D.B., Ripoll, D.R., and Rose, J.K. (2007). A tomato endo-beta-1,4-glucanase, SlCel9C1, represents a distinct subclass with a new family of carbohydrate binding modules (CBM49). *J. Biol. Chem.* 282, 12066-12074.

Urena, A.G., Orea, J.M., Montero, C., Jimenez, J.B., Gonzalez, J.L., Sanchez, A., et al. (2003). Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans-resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 51, 82-89.

VAN Baarlen, P., Staats, M., and van Kan, J.A. (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Mol. Plant Pathol.* 5, 559-574.

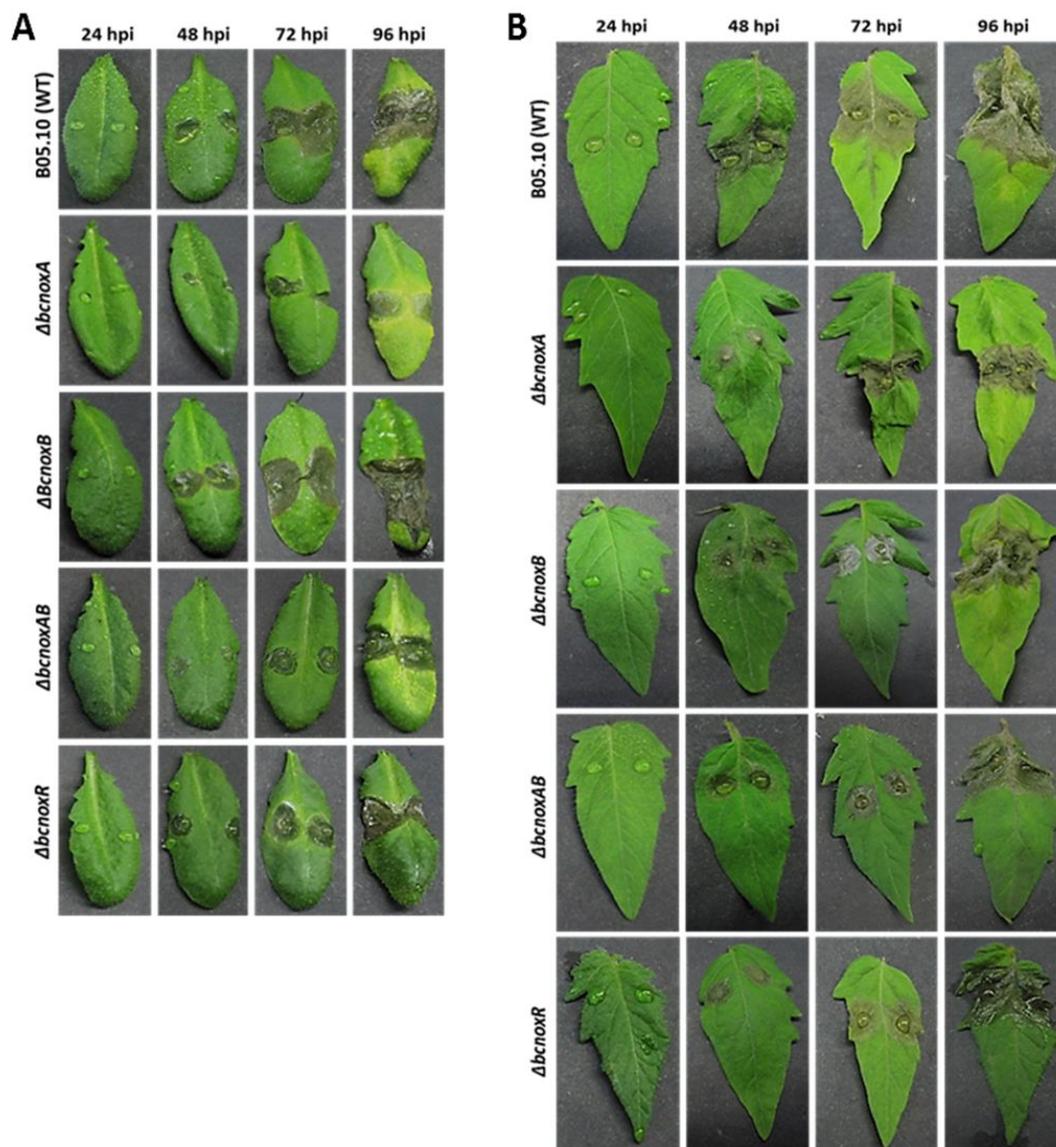
- Van Eck, L., Davidson, R.M., Wu, S., Zhao, B.Y., Botha, A.M., Leach, J.E., et al. (2014). The transcriptional network of WRKY53 in cereals links oxidative responses to biotic and abiotic stress inputs. *Funct. Integr. Genomics*. 14, 351-362.
- van Kan, J.A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci*. 11, 247-253.
- van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., and Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 12, 245-264.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P., and Linthorst, H.J. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*. 11, 184-191.
- Velásquez, A.C., Oney, M., Huot, B., Xu, S., and He, S.Y. (2017). Diverse mechanisms of resistance to *Pseudomonas syringae* in a thousand natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.14517.
- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M., and Castresana, C. (2010). Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol*. 154, 444-448.
- Vicedo, B., Flors, V., de la O Leyva, M., Finiti, I., Kravchuk, Z., Real, M.D., et al. (2009). Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1455-1465.
- Viefhues, A., Heller, J., Temme, N., and Tudzynski, P. (2014). Redox systems in *Botrytis cinerea*: impact on development and virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 858-874.
- Voigt, C.A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Front. Plant Sci.* 5, 168.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Schiff, C., and Somerville, S.C. (2002). PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2095-2106.
- Vorwerk, S., Somerville, S., and Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci*. 9, 203-209.
- Walters, D.R. and McRoberts, N. (2006). Plants and biotrophs: A pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci*. 11, 581-586.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., and Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* 17, 1784-1790.

- Wang, H., Nagegowda, D.A., Rawat, R., Bouvier-Nave, P., Guo, D.J., Bach, T.J., et al. (2012). Overexpression of Brassica juncea wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in Arabidopsis up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 10, 31-42.
- Wasternack, C., Goetz, S., Hellwege, A., Forner, S., Strnad, M., and Hause, B. (2012). Another JA/COI1-independent role of OPDA detected in tomato embryo development. *Plant Signal Behav.* 7, 1349-1353. doi: 10.4161/psb.21551.
- Wasternack, C., and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann Bot (Lond)*. 111, 1021-1058.
- Westfall, C.S., Zubieta, C., Herrmann, J., Kapp, U., Nanao, M.H., Jez, J.M. (2012). Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins. *Science* 336, 1708-1711.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565.
- Wiesel, L., Newton, A.C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E.M., Birch, P.R. et al. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Front. Plant Sci.* 5, 655. doi: 10.3389/fpls.2014.00655.
- Williams, B., Kabbage, M., Kim, H.J., Britt, R., and Dickman, M.B. (2011). Tipping the balance: Sclerotinia sclerotiorum secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathog.* 7, e1002107. doi: 10.1371/journal.ppat.1002107.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and van Kan, J.A. (2007). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8, 561-80. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y, Boyle, P., Wang, Y., I.D. Brindle, I.D., De Luca, V., and Despres, C. (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep.* 1, 639-647.
- Xie, Y., Huhn, K., Brandt, R., Potschin, M., Bieker, S., Straub, D., et al. (2014) REVOLUTA and WRKY53 connect early and late leaf development in Arabidopsis. *Development* 141, 4772-4783.
- Xin, X.F., and He, S.Y. (2013). Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 473-498.

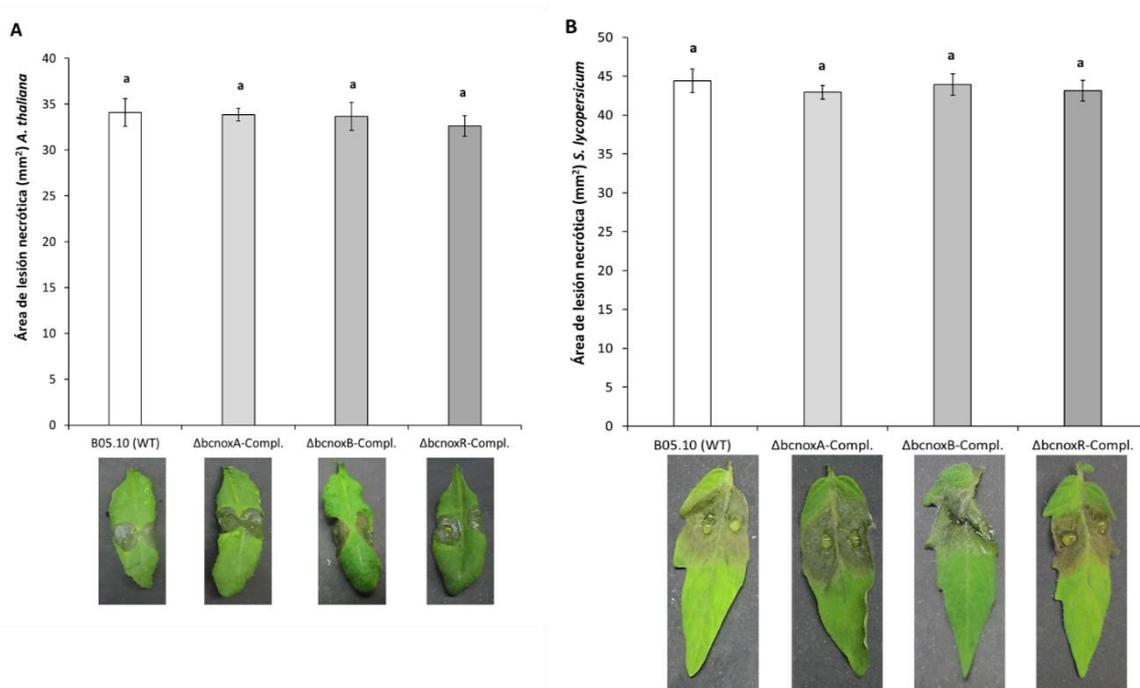
- Xu, P., Blancaflor, E.B., and Roossinck, M.J. (2003). In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with cucumber mosaic virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 467-476.
- Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B.L., and Citovsky, V. (2011). Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 117-130. Doi:10.1007/s00709-010-0247-0.
- Zhang, L., and van Kan, J.A. (2013). Botrytis cinerea mutants deficient in D-galacturonic acid catabolism have a perturbed virulence on Nicotiana benthamiana and Arabidopsis, but not on tomato. *Mol Plant Pathol.* 14, 19-29. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00825.x.
- Zhang, Y., Li, D., Zhang, H., Hong, Y., Huang, L., Liu, S., Li, X., Ouyang, Z., and Song, F. (2015). Tomato histone H2B monoubiquitination enzymes SIHUB1 and SIHUB2 contribute to disease resistance against Botrytis cinerea through modulating the balance between SA- and JA/ET-mediated signaling pathways. *BMC Plant Biol.* 15, 252. doi: 10.1186/s12870-015-0614-2.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J.P., and Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12920-12925.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., and Somerville, S. (2004). Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant J.* 40, 633-646.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., et al. (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428, 764-767.
- Zipfel, C., and Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 353-360

Anexos

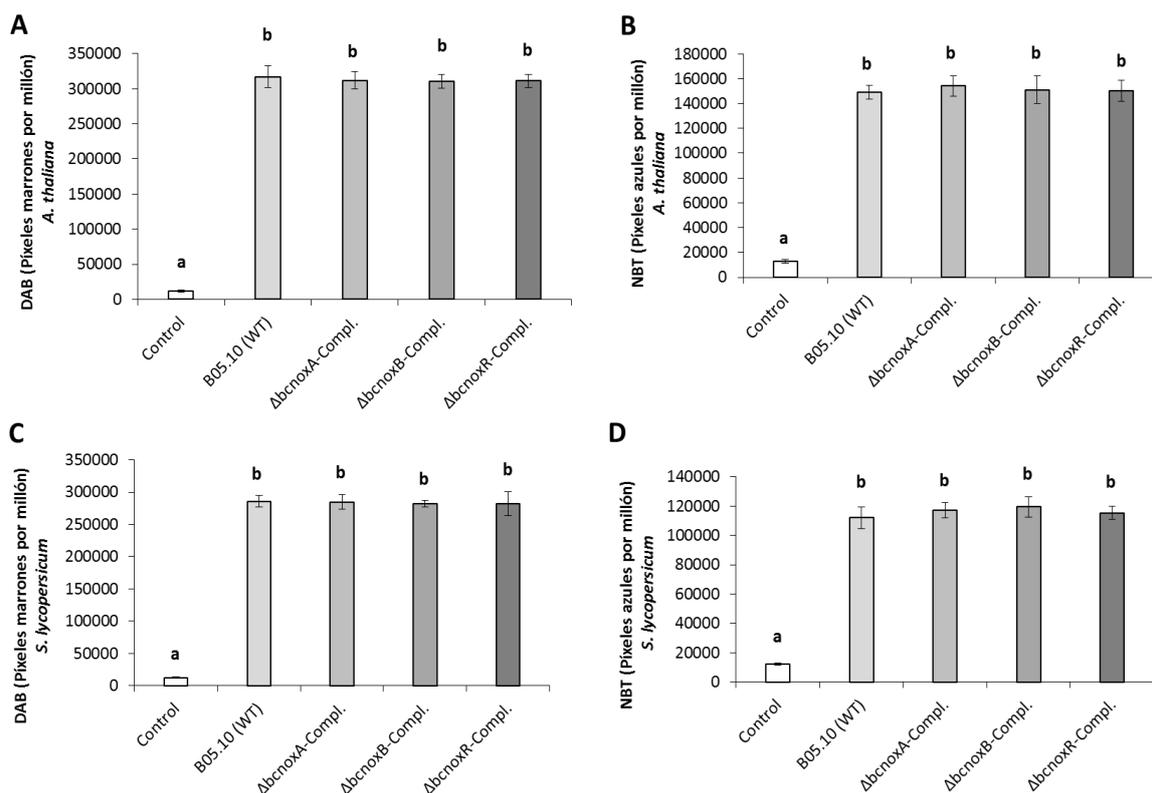
Capítulo III



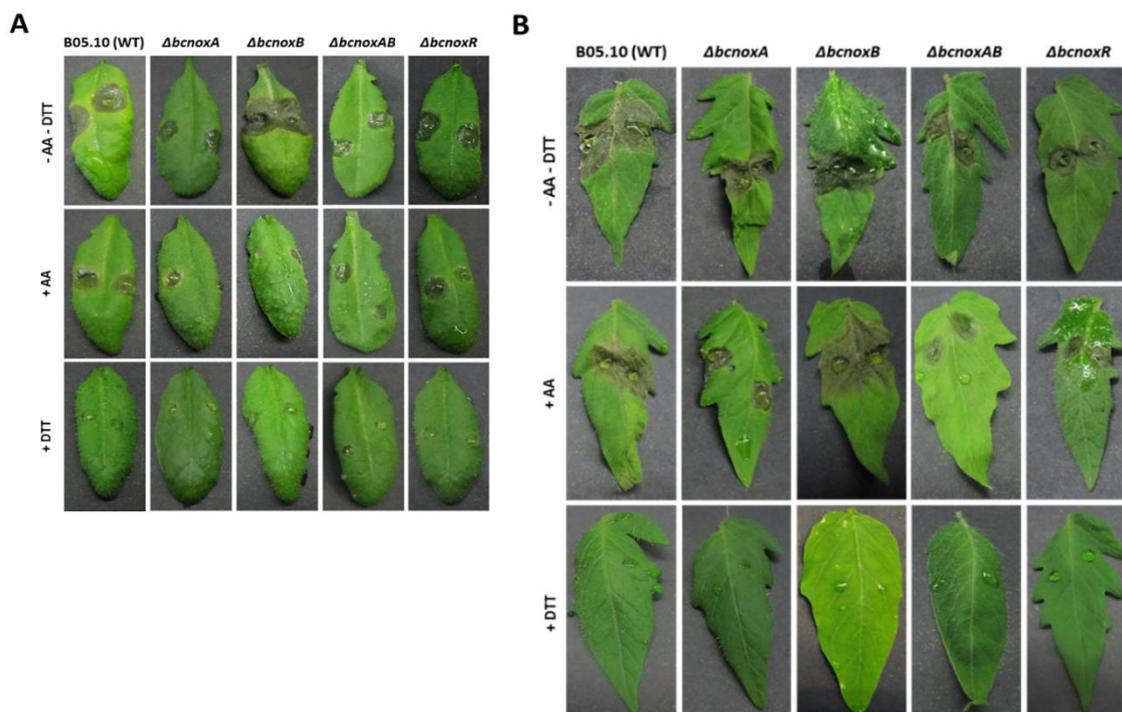
Anexo 1. Fenotipo de infección en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnox$ de *B. cinerea*. (A-B) Imágenes representativas de las lesiones necróticas en plantas de Arabidopsis (izquierda) y de tomate (derecha) a 24, 48, 72 y 96 hpi.



Anexo 2. Plantas de Arabidopsis y de tomate inoculadas con los mutantes de complementación de los mutantes $\Delta bcnox$ y la cepa B05.10 (WT) de *B. cinerea* 72 hpi. (A-B) Cuantificación e imágenes representativas del área de lesión necrótica medido a 72 hpi en plantas de Arabidopsis (izquierda) y de tomate (derecha). Las barras expresan la media de tres experimentos independientes \pm desviación estandar (SD) (n=12). Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el test LSD.



Anexo 3. Acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de superóxido (O_2^-) en plantas de *A. thaliana* N70000 y de tomate inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes de complementación *bcnox* de *B. cinerea* 72 hpi. (A, B) Cuantificación de la acumulación de H_2O_2 y O_2^- mediante análisis digital de imagen en plantas de Arabidopsis. (C, D) Cuantificación de la acumulación de H_2O_2 y O_2^- mediante análisis digital de imagen en plantas de tomate. Las barras expresan la media de tres experimentos independientes \pm desviación estandar (SD) ($n=18$). Letras Diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$, test LSD).



Anexo 4. Influencia de los antioxidantes ácido ascórbico (AA) y ditioneitol (DTT) en plantas de *Arabidopsis* (izquierda) y de tomate (derecha) inoculadas con B05.10 (WT) y los mutantes $\Delta bcnx$ de *B. cinerea*. (A-B) Imágenes representativas de las lesiones necróticas en plantas de *Arabidopsis* y de tomate 72 hpi. La suspensión de conidias (10^5 esporas/mL en *Arabidopsis* y $5 \cdot 10^4$ esporas/mL en tomate) fue suplementada con 5 g de AA por litro y con 750 μ M de DTT en *Arabidopsis* o 1,5 mM de DTT en tomate, prior antes de la inoculación.

