

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



* 5 3 0 9 8 2 2 6 8 2 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES $\beta(1,3)$
GLUCANASA: PARTICIPACION EN LA RESPUESTA DE
DEFENSA VEGETAL Y EN LOS PROCESOS DE SENESCENCIA Y
MUERTE CELULAR.

Patricia Obregón Calderón
Madrid, 1997

Trabajo realizado en la Unidad de Genética Molecular de Plantas del C.N.B.-C.S.I.C., que Patricia Obregón Calderón, alumna de Tercer Ciclo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Junio de 1997

Fdo. Patricia Obregón Calderón

A handwritten signature in black ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature is written in a cursive style and reads "Patricia Obregón".

Conforme, la Directora de la Tesis

VºBº El Tutor

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style. The signature reads "C. Castresana Fernández".

Dra. C. Castresana Fernández

Dr. J. Perera Glez.

A Miguel Obregón, mi padre

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de investigaciones Biológicas y en el Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, quiero expresar mi agradecimiento por la acogida recibida en ambos Centros.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas, que de una forma u otra, han hecho posible la realización de esta Tesis:

A la Dra. Carmen Castresana Fernandez, por la dirección de esta Tesis, por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por las valiosas enseñanzas recibidas y por su constante dedicación para mi formación científica. Quiero manifestarle mi gratitud y más sincero aprecio por el ánimo y apoyo compartido en los momentos más difíciles durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Julian Perera Gonzales, tutor de esta tesis, por su amabilidad e interés.

Al Dr. J. F. Rodríguez, no solo por su ayuda, para la realización de los ensayos de secuenciación, sino también por su gran calidad humana.

Al Dr. Emilio Rodríguez Cerezo por su amabilidad y su disposición incondicional a ayudarme.

Al Dr. Juan Antonio García, sin cuya ayuda mi tesis hubiera sido en blanco y negro.

A Tomás Cascón, por su excelente ayuda técnica. Labor profesional, , incansable y ejemplar que compone el soporte de esta Tesis. A mi querido amigo, que me alivió con su consuelo, para mantener vivos los recuerdos.

A Emi, por su gran ayuda técnica durante mi estancia en el C.I.B y sus amenas charlas.

A Angel e Inés cuyo excelente trabajo y dedicación hicieron posible unas magníficas fotografías.

A Ana, amiga y compañera desde los inicios solitarios en el CNB.

A Juan Ignacio, por su amistad y los años compartidos.

A Maite, extraordinaria profesional y a nuestras charlas científicas sobre las glucanasas.

A Raquel y Christian, por recordarme siempre que el tiempo no acaba con la inocencia.

A Anabel y Guy, amigos en los momentos duros, por su incomparable ayuda profesional y humana, que me ha permitido escribir esta Tesis.

A Elena Alonso, porque desde su forma de entender la vida supuso una inestimable ayuda.

A Lissette, por su amistad y los buenos momentos compartidos .

A Pepe, que me descubrió los secretos del Ac. salicílico.

A Pedro, compañero de "agobios predoctorales", por su amistad y aliento.

A Joaquín Royo, por su labor didáctica y su buen humor.

A la Dra. Isabel García-Luque por sus consejos y a la Dra. María Teresa Serra siempre abierta a ayudar.

Al Dr. Juan Pablo Albar, por su amistad, sus consejos y los desayunos compartidos.

A Cristina Cordeiro y a su aire tropical.

A todos mis compañeros durante este trabajo, Tomas, Juanjo, Carmen Vaquero, Jumana, Jose Maripor su amistad y colaboración.

A mi madre e Ivan, por el constante ánimo y apoyo prestado, y por las horas que les he robado para dedicarlas a la realización de esta tesis.

A mi padre, quien me enseñó que biología es poder decir, ahora, que esté donde esté, está en mí.

A mi querido abuelo, que acompañó a mi padre, a pesar de la gran ilusión que tenía por ver esta tesis y a mi abuela por ser mi sabia y excelente consejera durante todo este trabajo.

A mi hermana, por su gran apoyo en los momentos más difíciles de esta tesis, a pesar de necesitarlo tanto como yo, y a Sigfredo por las largas charlas telefónicas con sual final siempre te da tiempo.

A Javier, a quien jamás podré agradecer lo suficiente la ayuda y el apoyo que me ha brindado a lo largo de esta Tesis y siempre.

A mí misma, por resistir y porque a estas alturas de la cuesta final, sigo probando en cada renglón que esto merece la pena.

ABREVIATURAS.

aa:	aminoácido(s)
Ap:	ampicilina
aptdo:	apartado
ABA:	ácido abcísico.
bp:	pares de bases
BrEt:	bromuro de etidio
cDNA:	DNA complementario
Ci:	curio
Cm:	cloranfenicol
c.p.m.:	cuentas por minuto
CTP:	trifosfato de citidina
dCTP:	trifosfato de desoxicitidina
DTT:	ditiotreitól
DNA:	ácido desoxiribonucleico
DH5l:	cepa bacteriana de E. coli.
d.p.i.:	diá(s) posteriore(s) a la inoculación
p.a.f.	plantas antes de florecer.
d.p.f.	plantas después de florecer.
EDTA:	ácido etilen-diamino-tetra-acético
ETE:	Etefón.
Geles IEF:	Geles de isoelectroenfoque.
GUS:	b-glucuronidasa
h.p.i.	hora(s) posteriore(s) a la inoculación
IPTG:	isopropil-tio-b-D-galactósido
kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
Km:	kanamicina
mA:	miliamperios
MES:	morfolin-etan-sulfónico
MyM:	materiales y métodos
ng:	nanogramo(s)
nm:	nanómetro(s)
npt II:	neomicina fosfotransferasa
nt:	nucleótido(s)
PEG:	polietilenglicol
PIPES:	piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RNA:	ácido ribonucleico
r.p.m.:	revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato de sodio.
Sure: cepa bacteriana de E. coli.
Stp: streptomocina.
Sp: spectinomocina.
SA: ácido salicílico.
Tris: tris (hidroximetil) aminometano
UV: luz ultravioleta
JA: ácido jasmónico.

I.INDICE.

I. INTRODUCCION.....	1
I.1 INTERACCION HUESPED-PATOGENO.....	1
I.2 RESPUESTA DE DEFENSA.....	3
I.2.1 Respuesta local inmediata.....	5
I.2.2 Respuesta de defensa local.....	7
I.2.3 Respuesta sistémica adquirida.....	9
I.3 ESTABLECIMIENTO DE LA RESPUESTA SISTEMICA ADQUIRIDA: Señales implicadas.....	11
I.4 ESTABLECIMIENTO DE LA RESPUESTA SAR A TRAVES DE SEÑALES DE TRANSDUCCION INDEPENDIENTES DEL ACIDO SALICILICO.....	13
I.5 FUNCION DE LOS PRODUCTOS DE DEFENSA VEGETAL.....	15
I.6 OBJETIVOS.....	17
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	
II.1 ANTIBIOTICOS.....	19
II.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	19
II.3 MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
II.3.1 Huéspedes herbáceos experimentales.....	20
II.3.2 Microorganismos experimentales.....	20
II.3.2.1 Bacterias.....	20
II.3.2.2 Fagos y Plásmidos.....	21
II.4 MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.....	22
II.5 MANIPULACION DE LOS MICROORGANISMOS.....	22
II.5.1 Obtención de células competentes.....	22

II.5.2	Transformación de células de <i>E. coli</i>	22
II.5.3	Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i>	23
II.5.4	Inoculación de plantas.....	23
II.6	MANIPULACION DE PLANTAS.....	24
II.6.1	Esterilización y germinación de semillas.....	24
II.6.2	Transformación de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> (SR1).....	24
II.6.2.1	Transformación de discos de hojas.....	24
II.7	PREPARACION DE ACIDOS NUCLEICOS.....	25
II.7.1	Preparación de DNA de bacteriófagos.....	25
II.7.2	Purificación de DNA de plásmidos.....	26
II.7.3	Preparación de RNA total de la planta.....	26
II.8	MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS.....	27
II.8.1	Determinación espectrofotométrica.....	27
II.8.2	Tratamiento enzimático de DNA.....	27
II.8.3	Técnicas electroforéticas y transferencia de ácidos nucleicos.....	27
II.8.4	Elución de fragmentos de DNA.....	28
II.8.5	Obtención de clones de DNA.....	28
II.8.6	Determinación de la secuencia del DNA.....	29
II.9	MARCAJE RADIOACTIVO DE ACIDOS NUCLEICOS.....	29
II.9.1	Preparación de sondas de DNA.....	29
II.9.2	Síntesis de RNA radiactivo por transcripción "in vitro".....	30
II.10	ANALISIS DE PROTEINAS.....	33
II.10.1	Extracción de las proteínas totales de hojas de plantas.....	33
II.10.2	Determinación de la actividad de proteínas $\beta(1,3)$ glucanasa.....	34
II.10.2.1	Método de Somogy y Nelson.....	34
II.10.2.2	Geles de IEF.....	34
II.11	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA EN PLANTAS TRANSGENICAS.....	35
II.11.1	Análisis fluorimétricos.....	35

II.11.2 Ensayos histoquímicos.....	36
II.12 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA.....	37
III. RESULTADOS.	
III.1. CARACTERIZACION DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE $\beta(1,3)$ GLUCANASA EN PLANTAS DE <i>Nicotiana Plumbaginifolia</i>	38
III.1.1 Aislamiento y caracterización de genes: Estudio comparativo de las secuencias de las distintas isoformas y análisis de la expresión de los genes aislados.....	38
III.1.2. Análisis de la actividad de isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en plantas de <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	42
III.2 ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS DE EXPRESION CONFERIDAS POR LOS PROMOTORES <i>gn1</i> Y <i>gn3</i> AL GEN REPORTADOR β -GLUCURONIDASA EN PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO.....	44
III.2.1 Preparación de la construcción quimera <i>gn3</i> /GUS/3'ocs y obtención de plantas transgénicas.....	44
III.3 CARACTERIZACION DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS TRANSFORMADAS CON LAS CONSTRUCCIONES <i>gn1</i> /GUS Y <i>gn3</i> /GUS.....	47
III.3.1 Análisis en plantas sanas.....	47
III.3.2 Análisis de la inducción de la expresión de los transgenes <i>gn1</i> /GUS y <i>gn3</i> /GUS en respuesta a tratamientos bióticos y abióticos.....	49
III.3.3 Análisis de la expresión de los transgenes <i>gn1</i> /GUS y <i>gn3</i> /GUS en etapas iniciales del desarrollo de las plantas.....	52
III.3.4 Análisis de la expresión de los transgenes <i>gn1</i> /GUS y <i>gn3</i> /GUS durante la senescencia foliar.....	55
III.3.5 Localización de la expresión dirigida por el promotor <i>gn1</i> en tejidos senescentes.....	58
III.3.6 Análisis de la expresión de $\beta(1,3)$ glucanasa durante la senescencia vegetal.....	61

III.3.7	Análisis de la actividad de isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa durante el proceso de senescencia en plantas de <i>N. plumbaginifolia</i>	64
III.4	ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DE $\beta(1,3)$ GLUCANASAS POR TRATAMIENTOS ABIOTICOS.....	66
III.4.1	Análisis de la expresión dirigida por el promotor <i>gnI</i> en respuesta al tratamiento con agua, ácido jasmónico y ácido abscísico.....	67
III.4.2	Análisis de la expresión de $\beta(1,3)$ glucanasa en respuesta al tratamiento con agentes abióticos.....	70
III.4.2.1	Estrés osmótico.....	70
III.4.2.2	Estudio de la expresión de isoformas ácidas y básicas frente a tratamientos hormonales.....	72
III.5	ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LA $\beta(1,3)$ GLUCANASAS EN RESPUESTA A LA INFECCION POR MICROORGANISMOS PATOGENOS.....	74
III.5.1	Selección y caracterización de los sistemas huésped-patógeno estudiados.....	74
III.5.2	Análisis de la expresión del gen <i>gnI</i> durante el establecimiento de una interacción del tipo incompatible en plantas de <i>N. tabacum</i>	77
III.5.3	Análisis de la expresión del gen <i>gnI</i> durante el establecimiento de una interacción compatible en plantas de <i>N. tabacum</i>	81
III.5.4	Análisis de la respuesta de defensa en plantas senescentes.....	84
III.5.5	Análisis transcripcional de los isoformas $\beta(1,3)$ glucanasa ácidos y básicos en respuesta a la infección por las bacterias <i>P. s. pv. syringae</i> y <i>P. s. pv. tabaci</i>	88
III.5.6	Análisis de la inducción sistémica de los genes de defensa vegetal.....	91
III.6	INDUCCION DE LA RESISTENCIA VEGETAL MEDIANTE ACTIVACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE DEFENSA.....	95
III.6.1	Inducción de la protección por tratamientos con microorganismos patógenos y no patógenos.....	95
III.6.2	Estudio de la inducción de la protección por tratamientos abióticos.....	99

IV. DISCUSION.....	1 0 4
V. CONCLUSIONES.....	1 1 3
VI. BIBLIOGRAFIA.....	1 1 4

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

I.1 INTERACCION HUESPED-PATOGENO.

Las plantas constituyen el mayor y más importante grupo de formas de vida autotrófica en la tierra. Su abundante material orgánico sirve como fuente nutricional para el resto de los organismos heterotróficos incluyendo animales, insectos, y microbios. A pesar del largo número de hongos y bacterias implicadas en la descomposición de la materia de plantas muertas, sólo unos pocos de esos patógenos potenciales han adquirido la habilidad para colonizar plantas vivas cambiando de su estado como organismos saprófitos a patógenos biotróficos. Por otro lado, la mayoría de las plantas exhiben una resistencia natural al ataque microbiano, lo que hace de la enfermedad una excepción. Esta es la denominada resistencia no huésped o incompatible que es, por tanto, considerada como la consecuencia de la inhabilidad por parte del patógeno para reconocer e infectar a la planta o la habilidad de una planta para activar rápida y adecuadamente sus mecanismos de defensa. Existe, por otro lado un número, aunque relativamente bajo, de patógenos especializados capaces de parasitar o invadir la planta huésped. Cuando esto ocurre se establece una compatibilidad básica por daño o debilitamiento de las plantas que provoca en el huésped severos síntomas de enfermedad. Sin embargo, el hecho de que cultivos resistentes y razas de patógenos con una virulencia alterada hayan coevolucionado, ha llevado al desarrollo y establecimiento de combinaciones huésped-patógeno en las cuales sólo ciertos cultivos pueden ser colonizados por razas particulares del patógeno, mientras otros conservan la resistencia. Es la denominada

resistencia específica de huésped y está basada en el modelo propuesto por Flor en 1946, según el cuál la resistencia vegetal se establece a través de la intervención de los productos de expresión de dos genes, uno correspondiente al patógeno, denominado gen de avirulencia, y otro al huésped designado gen de resistencia. La interacción directa o indirecta de ambos productos génicos provoca el establecimiento de una interacción incompatible, mientras que la ausencia o mutación de uno de ellos, conlleva a la aparición de la enfermedad vegetal.

Varios de los patosistemas que muestran este tipo de resistencia genética, específica de la interacción raza-cultivo, han sido ampliamente estudiados y, en algunos casos, se han identificado los productos génicos determinantes de la especificidad que desencadena el establecimiento de un estado de resistencia (Keen, 1990; de Wit, 1992; Pryor y Ellis, 1993). Estos estudios han permitido comprobar que tras el reconocimiento del patógeno, las plantas utilizan un largo arsenal de mecanismos de defensa para su propia protección que, además, parecen ser similares a los que intervienen en las interacciones de resistencia no huésped.

En los últimos diez años, numerosos genes avr procedentes de diversos microorganismos han sido identificados y clonados (Keen, 1992; Salmond, 1994). En algunos casos se ha determinado que poseen actividad enzimática y que actúan sobre metabolitos específicos del patógeno que a su vez se convierten en moléculas inductoras (Keen, 1992). Sin embargo, a pesar del abundante número de genes avr caracterizados se desconoce su forma de actuación. Recientemente se ha demostrado que los productos de expresión de los genes de avirulencia AvrB y AvrBs3 son transportados desde la bacteria hasta el interior de la célula vegetal donde interaccionan, directa o indirectamente, con el producto del gen de resistencia correspondiente.

Se han clonado, igualmente en los últimos años diversos genes de resistencia vegetal de los que se conoce la función del gen de maíz Hm1 cuyo producto de expresión confiere resistencia frente al hongo patógeno *Cochliobulus (Helminthosporium) carbonum* (Johal y Briggs, 1992) El gen Hm1 codifica un enzima con actividad reductasa capaz de inactivar la toxina HC responsable del carácter patogénico de dicho hongo. Se ha podido determinar, además, la actividad quinasa del gen de tomate Pto. que confiere resistencia frente a la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Martin y col., 1993). La función de los productos del resto de los genes R identificados es aún desconocida. No obstante, los datos derivados de la comparación de la secuencia de aminoácidos determinadas sugieren que podrían ser componentes de la ruta de transmisión de señales que conducen a la activación de la reacción de defensa vegetal.

I.2 RESPUESTA DE DEFENSA.

Los datos derivados del estudio de las interacciones planta-patógeno analizadas ponen de manifiesto que la resistencia vegetal, frente a una infección, se induce de forma específica en respuesta a determinados patógenos, independientemente de que la planta sea su huésped habitual o no. Esta especificidad contrasta, sin embargo, con la respuesta vegetal que se desencadena durante la reacción de resistencia ya que, una vez recibida la señal adecuada, la planta induce su sistema completo de defensa que le permite combatir, temporalmente, la acción de diferentes patógenos.

La resistencia vegetal se establece mediante inducción de múltiples compuestos de defensa de función, en algunos casos, desconocida pero cuya presencia en la planta contribuye, directa o indirectamente, a evitar el desarrollo del patógeno.

La mayor parte de dichos compuestos aparecen como consecuencia del aumento de los niveles de transcripción de los genes correspondientes, denominados genes de defensa vegetal, y su activación ocurre tanto a nivel local, alrededor de la zona de infección (respuesta local), como en tejidos alejados de dicho área (respuesta sistémica). La respuesta local está asociada a la aparición de una reacción hipersensible en la que, con objeto de dificultar el desarrollo del patógeno, la planta provoca la muerte de las células vegetales que rodean los puntos de infección dando lugar a la formación de pequeñas lesiones necróticas (Klement, Z., 1982). Los datos recientes derivados del estudio de la reacción hipersensible, en distintos sistemas huésped-patógeno, han puesto de manifiesto la complejidad de dicha respuesta que se establece mediante la activación de diversas rutas o cadenas de transmisión de señales, al menos, parcialmente independientes y la disponibilidad de las plantas mutantes en las que se inducen lesiones hipersensibles espontáneamente, en ausencia de patógenos, ha permitido demostrar que la inducción de esta respuesta vegetal es un proceso activo controlado por múltiples genes de la planta. (Mehdy, 1994; Chen y col., 1995; Tenhaken y col., 1996; Jabs y col., 1996; Dangl y col., 1996).

A diferencia de lo que ocurre en la respuesta local, la respuesta sistémica no está acompañada de formación de lesiones necróticas y representa, por lo tanto, la situación defensiva más idónea ya que los tejidos vegetales no presentan ningún daño aparente y, sin embargo, están protegidos frente a posibles infecciones secundarias (Ryals y col., 1996).

En base a los patrones de expresión temporal y espacial específicos de cada uno de los procesos celulares que ocurren durante la activación de la reacción de defensa vegetal se pueden distinguir tres niveles de respuesta:

- A. Respuesta local inmediata
- B. Respuesta de defensa local.
- C. Respuesta sistémica adquirida.

Dichos niveles no constituyen procesos independientes y, además, la manifestación de su expresión puede variar de acuerdo al sistema estudiado y a las condiciones experimentales examinadas. No obstante, su distinción facilita la descripción y comprensión de este fenómeno.

I.2.1 Respuesta local inmediata.

Corresponde a la respuesta implicada en el reconocimiento y los primeros sucesos de transducción de señales que se establecen mediante la activación de productos preexistentes en la célula vegetal. Esta respuesta constituye una primera línea de defensa frente al ingreso del patógeno y contribuye, a su vez, a generar las señales o mensajeros secundarios implicados en la activación transcripcional de los genes de defensa vegetal. El intenso estudio realizado en los últimos años acerca de los procesos iniciales del reconocimiento planta-patógeno ha permitido revelar importantes componentes sobre la percepción y transducción de señales en la planta. Un paso importante ha sido el aislamiento, purificación y análisis estructural de componentes derivados de hongos y bacterias capaces de actuar como inductores. Algunos de los compuestos identificados son de naturaleza proteica como las proteínas harpin, caracterizadas en diversas bacterias fitopatógenas, y los inductores proteináceos derivados de los hongos *Phytophthora megasperma* y *Cladosporium fulvum* (revisión Ebel y Cosio, 1994). Igualmente se han caracterizado carbohidratos inductores, de al menos parte de la respuesta de defensa vegetal, en diversos hongos patógenos y se ha identificado el heptaglucósido $\beta(1,3)$ glucano como la molécula

implicada en dicha actividad inductora (Ebel y Cosio, 1994). En algunos casos, se han determinado sitios de unión de alta afinidad, para varios de los componentes inductores caracterizados, en la membrana plasmática de la célula vegetal, en particular de soja, tomate y arroz aunque, por el momento, las moléculas receptoras involucradas en dicha interacción no han sido identificadas (Basse y col., 1993; Shibuya y col., 1993; Nürnberger y col., 1994).

La interacción con los receptores celulares inicia la respuesta de defensa vegetal que, como indicamos anteriormente, no requiere, la participación de productos obtenidos mediante activación transcripcional. Así, las primeras respuestas asociadas a la interacción inductor-receptor son la alteración del flujo de iones a través de la membrana plasmática, la fosforilación o desfosforilación de proteínas específicas de la célula y la formación de especies activas de oxígeno que tiene lugar en los primeros 2-5 minutos de respuesta y que se conoce como proceso o estrés oxidativo.

Este proceso ha sido ampliamente investigado recientemente y se ha podido concluir su actuación como primera línea de defensa participando, al menos, a tres niveles diferentes :

1. Debido a su efecto tóxico, las especies activas de oxígeno tendrían un efecto antimicrobiano que podría, además, iniciar el proceso de muerte celular característico de la reacción hipersensible.
2. Actúan como mensajeros secundarios activando la transcripción de genes específicos, probablemente, implicados en procesos de detoxificación y protección del daño celular causado por dicho estrés oxidativo en la zona de infección.
3. Contribuyen al fortalecimiento de la pared celular favoreciendo la interacción de proteínas de la pared.

La mayor parte de los procesos descritos están asociados al aumento de los niveles de ión superóxido y de peróxido de hidrógeno que ejercen, por tanto, un papel fundamental en la reacción de defensa.

I.2.2 Respuesta de defensa local.

La mayoría de los procesos que constituyen la respuesta de defensa local, se inician durante los primeros estadios de la infección y, por lo tanto, no pueden ser considerados como un proceso independiente en sí mismos. Sin embargo, a diferencia de los procesos descritos en el apartado anterior, esta respuesta incluiría a aquellos procesos que ocurren más tarde en el tiempo y, que en su mayoría, se producen como resultado de la activación transcripcional de numerosos genes de la planta designados como genes de defensa vegetal.

Durante esta respuesta se produce la muerte de las células que rodean la zona de infección originando la denominada reacción *hipersensible*. Esta reacción actúa limitando la progresión del patógeno y restringiendo la enfermedad vegetal a un pequeño foco de infección. Se ha propuesto que la muerte celular, característica de la reacción hipersensible, podría ser consecuencia del cambio en el flujo de iones que se establece a través de la membrana plasmática dañando su integridad, y de la producción de radicales y especies reactivas de oxígeno tóxico para la célula.

Asociada a la aparición de la reacción hipersensible ocurren diversos procesos bioquímicos que, en su mayoría, implican la síntesis de nuevas proteínas como consecuencia directa de la activación transcripcional de genes específicos de la planta. Entre los enzimas identificados están aquellas que participan en la detoxificación de radicales y especies activas de oxígeno como las superóxido dismutasas,

catalasas, ascorbato peroxidasas, glutathion sintetasas etc. Además, se encuentran los enzimas que participan en el metabolismo de los fenilpropanoides, como la fenilalanina amonio-Liasa (PAL) y la 4-cumarato -CoA ligasa (4CL), así como los enzimas implicados en la síntesis de fitoalexinas que constituyen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y para las que se ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de diversos patógenos en ensayos *in vitro*, pudiéndose comprobar, además, en algunos casos, que su expresión constitutiva en plantas transgénicas, contribuye a reducir el daño provocado por una infección (Bowles, 1990; Dixon y Harrison, 1990; Cutt y Klessig, 1992; Collinge y col., 1994)

Existe un tercer grupo de genes que codifica para proteínas con actividad antimicrobiana. En algunos casos, como para los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa y quitinasa, se les ha podido asignar una actividad enzimática concreta, sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce su modo de acción. La expresión constitutiva, en plantas transgénicas, de algunos de dichos genes ha permitido aumentar el nivel de resistencia de la planta frente a la infección por determinados patógenos.

Se puede distinguir un cuarto grupo de proteínas para las que si se ha encontrado una actividad enzimática pero a las que no se les asigna una actividad antimicrobiana directa. Un ejemplo lo constituyen los enzimas lipoxigenasas y peroxidasas implicadas en la síntesis de metabolitos que participan como mensajeros intracelulares secundarios y como metabolitos relacionados con la modificación y fortalecimiento de la pared celular. En relación a este proceso se han caracterizado 2 grupos de proteínas designadas en base a su composición de aminoácidos, como proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) y proteínas ricas en glicina (GRP), a las que se les ha asignado una función estructural relacionada

con la modificación de la pared de la célula vegetal que ocurre durante la respuesta de defensa.

I.2.3 Respuesta sistémica adquirida.

Además de la respuesta de defensa local que se induce en la zona de infección, existe, una segunda respuesta, denominada respuesta sistémica o resistencia sistémica adquirida (SAR) que se induce en tejidos alejados de este área y que protege a la planta frente a infecciones secundarias provocadas por distintos microorganismos. La respuesta de defensa sistémica fue descrita, inicialmente, por Frank Ross en 1961, cuando demostró que los síntomas producidos en plantas de tabaco por el virus TMV, se amortiguaban, significativamente, cuando se inoculaban en plantas que habían sido sometidas a una infección anterior. Esta resistencia era efectiva, no sólo, frente a TMV, sino también, frente a otros virus y ciertas bacterias patógenas.

A partir de esta fecha, el fenómeno descrito ha sido identificado en diversas especies vegetales y el espectro de resistencia obtenido ha sido ampliado, no sólo a virus y bacterias, sino a otros microorganismos patógenos (Kúc, 1982).

El estudio bioquímico de la respuesta vegetal en el que se manifiesta la respuesta sistémica permitió observar la presencia de abundantes proteínas que habían sido, previamente, relacionadas con la respuesta de defensa local (Van Lon y Antoniow, 1982). Posteriormente, se identificaron distintos c-DNAs cuya expresión se induce en tejidos no infectados de plantas inoculadas con diversos patógenos. Así, usando el sistema planta-patógeno constituido por tabaco-TMV, se describieron nueve familias de genes designados colectivamente como "genes SAR" cuya expresión en el tejido sistémico estaba temporalmente asociada a la

manifestación del fenómeno de resistencia sistémica adquirida (Ward y col., 1991).

De nuevo la caracterización de los genes identificados reveló su participación en la respuesta de defensa local, aunque la cinética de inducción de dichos genes variaba en los dos tipos de respuesta examinada. Se ha demostrado que algunas de las proteínas acumuladas en el tejido sistémico tienen actividad antimicrobiana *in vitro* y que, además, su expresión constitutiva, en plantas transgénicas, permite aumentar los niveles de resistencia de la planta frente a la infección por diversos patógenos (Broglie y col., 1991; Cohen y col., 1992; Alexander y col., 1993). Ambos resultados sugieren que dichas proteínas juegan, por tanto, un papel directo en el mantenimiento del estado de resistencia. No todos los productos que participan en la respuesta local se inducen, sin embargo, en el tejido sistémico.

En este sentido la diferencia más notable entre ambas respuestas consiste en que la respuesta sistémica nunca está acompañada de la formación de lesiones necróticas.

En relación directa con este hecho, se ha demostrado que la producción de especies derivadas de oxígeno y en particular de peróxido de hidrógeno en la hoja sistémica es prácticamente indetectable, y que, por lo tanto, en este sentido contribuye, de forma indirecta, a resaltar la participación del estrés oxidativo y del peróxido de hidrógeno, en la formación de lesiones hipersensibles que limitan la infección del patógeno.

I.3 ESTABLECIMIENTO DE LA RESPUESTA SISTEMICA ADQUIRIDA: Señales implicadas.

La activación de la respuesta sistémica en tejidos alejados de la zona de infección implica, necesariamente, la existencia de señales celulares que, produciéndose en las células que participan en la respuesta local, se transporten, probablemente a través del tejido vascular, hasta otros tejidos de la planta para activar en ellos la respuesta de defensa. Se han realizado numerosos trabajos dirigidos a identificar una molécula señal que se mueva a través de la planta activando la resistencia, sin embargo, dicha molécula no ha sido identificada hasta el momento. Se ha propuesto que el ácido salicílico podría ser la molécula implicada en la activación de esta respuesta. La concentración de este compuesto aumenta en la hoja coincidiendo con la inducción de la respuesta de defensa local e igualmente, aumenta en el tejido sistémico precediendo a la inducción de la expresión de los genes de defensa vegetal (Enyedi y col., 1992; Malamy y col., 1990; Metraux y col., 1990; Rasmussen y col., 1993).

Existen en la actualidad, numerosos datos que confirman la participación del ácido salicílico en la activación de la respuesta de defensa vegetal tanto local como sistémica, sin embargo, las evidencias son contradictorias en cuanto a su participación como molécula señal sistémica, y de forma casi general se advierte que de hecho el ácido salicílico no actúa como tal. Esta idea está fundamentalmente basada en dos trabajos; en el primero de ellos se analizó la interacción entre la planta de pepino y la bacteria *P. s. pv. syringae* y en él se demostró que si tras su inoculación con la bacteria se cortaba de la planta la hoja infectada antes de que produjera el aumento en la concentración de ácido salicílico, se seguía observando respuesta sistémica, por lo que la

molécula señal tendría que haberse sintetizado y liberado al tejido vascular antes de cortar la hoja y no podría ser el ácido salicílico.

En el segundo trabajo se analiza la inducción de la respuesta sistémica en la planta transgénica de tabaco que sobreexpresan el gen de la salicilato hidroxilasa (nahG) aislado de la bacteria *Pseudomonas putida* (Gaffrey y col., 1993). Este enzima cataliza la conversión del ácido salicílico (SA) a catecol, y por lo tanto reduce la concentración de ácido salicílico activo.

Las plantas transgénicas NahG no acumulan ácido salicílico en respuesta a una infección y no pueden desarrollar una respuesta sistémica adquirida.

La realización de injertos entre plantas NahG y plantas control no transformadas permitió demostrar que cuando se utilizan las plantas NahG como portainjerto, se sigue induciendo respuesta sistémica en la parte superior del injerto correspondiente a una planta control sin transformar, aún a pesar de que el ácido salicílico producido en el portainjerto se convierta en catecol, compuesto que no induce la expresión de los genes de defensa vegetal.

El mecanismo de acción del SA como intermediario de la activación de la expresión génica es desconocido. El grupo de Klessig y colaboradores identificó una proteína a la que se une el SA, al igual que otros compuestos análogos a este, y que resultó ser un enzima cuya actividad catalítica correspondía a la de una catalasa. Los resultados obtenidos por este grupo proponía que la interacción con el ácido salicílico provocaría la inactivación del enzima originando un aumento en la concentración del peróxido de hidrógeno sobre el que actúa, normalmente, el enzima y que actuaría, a la vez, como mensajero secundario en la inducción de la expresión de los genes SAR (Chen y col., 1993).

Existen, sin embargo, datos contradictorios que cuestionan la hipótesis propuesta por este grupo ya que el aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno en la respuesta local es anterior a la acumulación de salicílico, y, además, en la respuesta sistémica se produce un aumento del contenido en SA del tejido afectado, pero que no está acompañado de un aumento significativo en peróxido de hidrógeno (Bi y col., 1995; Nerenschwander y col., 1995).

I.4 ESTABLECIMIENTO DE LA RESPUESTA SAR A TRAVES DE SEÑALES DE TRANSDUCCION INDEPENDIENTES DEL ACIDO SALICILICO.

Según se describió en el apartado anterior existen numerosas evidencias que demuestran la participación del ácido salicílico como señal endógena implicada en la activación de la respuesta de defensa vegetal.

Además de este compuesto, la hormona etileno ha sido propuesta como una de las señales involucradas en la activación de esta respuesta. La implicación del etileno se basa en que la producción de esta hormona aumenta en respuesta a la infección por un patógeno (Ross y Williamson, 1957; Mauch y col., 1984; Boller, 1995) y en que la aplicación exógena de etileno induce enzimas relacionadas con la defensa como son las $\beta(1,3)$ glucanasa y quitinasas (Boller y col., 1993; Mauch y Stachelim, 1989) y enzimas implicadas en la síntesis de fitoalexinas (Ecker y Davis, 1987). No obstante, es posible que la producción de etileno sea un síntoma más que una señal ya que la infección de una planta junto con un inhibidor de la síntesis de etileno sigue produciendo la inducción de $\beta(1,3)$ glucanasa y quitinasa (Boller y col., 1993). A favor de esta idea, los resultados obtenidos por Lawton y col., 1995 indican que la producción

de etileno no es necesaria para la inducción de la respuesta sistémica adquirida ya que es posible establecer una respuesta SAR en plantas mutantes de *Arabidopsis th.* incapaz de responder al efecto del etileno.

La participación del ácido jasmónico como señal celular ha estado relacionada fundamentalmente, con la respuesta de la planta frente al daño mecánico. Al igual que en la respuesta de defensa frente a la infección por microorganismos patógenos, la respuesta frente al daño mecánico, se produce tanto a nivel local como sistémico y se establece mediante activación transcripcional de múltiples genes de la planta.

En los últimos años se ha podido demostrar, además, la participación del ácido jasmónico, en la respuesta de defensa vegetal. Así, la concentración de ácido jasmónico aumenta en hojas inoculadas con distintos patógenos e, igualmente, se ha comprobado que el tratamiento de cultivos celulares, con moléculas de naturaleza fúngica, inductores de los genes de defensa de la planta, induce la biosíntesis del ácido jasmónico.

La aplicación exógena de ácido jasmónico causa la inducción de diferentes proteínas relacionadas con la defensa de las plantas, tales como tioninas (Anderson y col., 1992; Epple y col., 1995), enzimas implicados en la síntesis de fitoalexinas (Gundlanch y col., 1992; Muller y col., 1993) y defensinas (Brockaert y col., 1995). En este último caso se ha podido demostrar que la inducción del gen pDEF1.2 que codifica para una defensina de *Arabidopsis*, se induce, local y sistémicamente en respuesta a la infección con el hongo patógeno *Alternaria brassicola* y que dicha inducción no está mediada por el ácido salicílico o por señales de transducción componentes de la ruta de respuesta del salicílico, sino que requiere componentes funcionales de las rutas de respuesta en las que participan el ácido jasmónico y el etileno. Finalmente, el hecho de que la expresión constitutiva de defensinas o tioninas en plantas

transgénicas, ambas inducibles por ácido jasmónico, provoque una disminución significativa de la susceptibilidad a la infección por diversos patógenos (Teheras y col., 1995) (Carmona y col., 1992) permite establecer una clara correlación entre la respuesta de defensa vegetal y el ácido jasmónico.

I.5 FUNCION DE LOS PRODUCTOS DE DEFENSA VEGETAL.

En base a los datos expuestos, es posible concluir que la respuesta de defensa vegetal es un proceso complejo que afecta a múltiples genes de la planta alterando su expresión. La identificación de nuevos genes progresa, además, a medida que se desarrollan técnicas más sensibles de análisis y se identifican plantas mutantes alteradas en su expresión, por lo que el número de genes implicados en la respuesta de defensa ha aumentado significativamente en los últimos años.

Es sin embargo más complejo determinar la función que los productos de defensa vegetal realizan durante el proceso de infección.

Esta complejidad se debe a las características intrínsecas del proceso de defensa que por un lado es redundante, tanto en cuanto al número de genes que participan en la protección, como en cuanto al hecho de que en muchos casos los genes indentificados forman parte de familias multigénicas. Existe, además, una segunda complicación derivada del hecho de que muchos de los productos caracterizados participan en otros procesos del desarrollo celular y se inducen en tejidos específicos de la planta sin ninguna relación aparente con un proceso infectivo. Un ejemplo significativo de esta situación lo representa la familia de enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa, objeto de este trabajo, para las que se ha determinado su actividad anti fúngica *in vitro* (Keen y

Yoshikawa, 1983), pero para las que no se ha determinado su función *in vivo* en relación con la reacción de defensa vegetal.

Los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa se han identificado en numerosas especies vegetales, pero ha sido en tabaco en donde se han examinado en más detalle. Están codificados por una familia multigénica que codifican distintos isoenzimas que se localizan en compartimentos celulares como vacuolas apoplásto y pared celular (Van den Bulcke y col., 1989; de Carvalho y col., 1992; Kombrink y col., 1988). Independientemente, de su localización celular, los enzimas vacuolares, generalmente básicos, y los extracelulares, ácidos en su mayoría, se inducen en respuesta a la infección por microorganismos patógenos, aunque por el momento se desconoce si las isoformas que ocupan distintos compartimentos celulares realizan la misma función o si existe alguna diferencia significativa entre ellos. Los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa se inducen en la planta en respuesta a la infección por hongos patógenos, pero también se inducen en respuesta a otro tipo de patógenos que no contienen $\beta(1,3)$ glucanasa en su superficie como son las bacterias y los virus. Igualmente, los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa se inducen en respuesta a otros tipos de estrés como un daño mecánico, altas temperaturas, ozono, reguladores del crecimiento etc. (Cutt y Klessig, 1992; Schroudner y col., 1992)

Estas observaciones han sugerido que las $\beta(1,3)$ glucanasa podrían tener otra función o funciones en la reacción de defensa diferente a su potencial actividad antifúngica.

Se ha propuesto que, además de su participación en la respuesta de la planta frente a una infección, los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa pueden intervenir en otros procesos del desarrollo vegetal. Esta función se propone en base a que se han detectado isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en

tejidos específicos de plantas sanas como son raíces, estilo, anteras y semillas, en donde participaran en procesos intrínsecos a estos tejidos (Neale y col., 1990; Castresana 1990). En concreto se ha comprobado que el isoenzima identificado en las anteras, designado callasa, está implicado en el proceso de maduración del polen (Worral y col., 1992).

I.6 OBJETIVOS.

El objetivo de este trabajo consiste en profundizar en el estudio de la interacción huésped-patógeno y examinar la participación de los genes de defensa vegetal; en concreto, de la familia de genes que codifican los enzimas hidrolíticos $\beta(1,3)$ glucanasa, en la protección de la planta frente a la infección por microorganismos patógenos.

Para ello, seleccionamos como plantas huésped las especies vegetales *Nicotiana plumbaginifolia* y *Nicotiana tabacum*, en las que estudiamos la presencia de los enzimas mencionados tanto en plantas sanas en distintas etapas de desarrollo, como en plantas sometidas a distintos tratamientos relacionados con la reacción de defensa vegetal. Igualmente, examinamos la respuesta de la planta frente a la infección con las bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* que establecen una interacción incompatible y compatible respectivamente, al infectar plantas de tabaco.

En todos los casos examinados se analizó, además, la participación de otros genes de defensa vegetal, descritos como marcadores específicos de los distintos procesos celulares caracterizados en la respuesta de defensa vegetal.

Finalmente, el desarrollo de nuestro estudio nos ha conducido a examinar la participación de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en diversos

procesos del desarrollo vegetal relacionados con el proceso de senescencia y muerte celular.

MATERIALES Y METODOS

II. MATERIALES Y METODOS.

II.1 ANTIBIOTICOS.

Los antibióticos ampicilina, kanamicina, streptomycin, spectinomycin y cefotaxima fueron disueltos en agua, a diferencia de la rifampicina que fue disuelta en DMSO, y filtrados para su esterilización. Su conservación se realizó a -20°C.

II.2 MEDIOS DE CULTIVO.

_Medio Luria-Bertani o LB: 1% de bacto tripton, 0.5% de extracto bacto levadura, 1% de NaCl; Ajustar el pH a 7 con NaOH.

_Medio King's B: 2% de Proteosa peptona 3,2% glicerol 87%. Autoclavar y añadir K_2HPO_4 6.5 mM, $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ 6 mM estériles.

_Medio SOB: 2% de Tripton, 0.5% de extracto de levadura, 0.05% de ClNa, Kcl 250mM pH 7.

_Medio SOC: Medio SOB con glucosa 20 mM.

_Medio NZ: 0, 5% de extracto de levadura, 1% de casaminoácidos, 0,5% de ClNa, 0.2% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH.

_Top agarosa: Medio NZ con 0.7% de agarosa.

_Medio MS: 0.2% de mezcla de sales para plantas MS, 1% de sacarosa, vitaminas B5 (Myoinositol 5%, ácido nicotínico y piridoxina-HCl 0,01%, Timina-HCl 0,1%), Ajustar pH a 5.6 con KOH. Autoclavar.

II.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

II.3.1 Huéspedes herbáceos experimentales.

Para la transformación genética de los genes quiméricos con la región promotora de $\beta(1,3)$ -glucanasas y la región codificadora del gen bacteriano β -glucuronidasa se empleó *Nicotiana tabacum*. En los ensayos de infectividad como huésped de lesiones locales y para la propagación de la infección bacteriana se empleó *Nicotiana tabacum*, además de *Nicotiana plumbaginifolia*.

Las semillas de las plantas no transformadas se germinaron en tierra esteril con diferentes grados de descomposición de distintas turberas (Subtrat Typ1, BRILL).

Las semillas de las plantas transgénicas se germinaron in vitro en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1% de sacarosa y 100 mg/ml de kanamicina. Las plántulas se transfirieron a tierra al alcanzar un tamaño de aproximadamente 2-3 cm y se mantuvieron en invernadero con humedad relativa del 70% y un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de obscuridad.

II.3.2 Microorganismos experimentales.

II.3.2.1 Bacterias.

Las cepas Dh5a y Sure de *Escherichia coli* se han empleado para la propagación y purificación de plásmidos.

La estirpe K803 se empleó para la infección con derivados del bacteriófago λ .

La cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* se empleó para la transformación de las plantas.

tres cepas diferentes fueron empleadas para la infección de plantas de *N. tabacum*:

_ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 5085, que establecen una interacción del tipo incompatible en ambos huéspedes herbáceos.

_ *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 5393, empleada para el establecimiento de una interacción del tipo compatible en ambos huéspedes herbáceos.

_ *Erwinia amylovora* 6089 como inductor de la respuesta hipersensible.

_ *Erwinia amylovora* PMV 6023 (mutante hrp que no induce la reacción hipersensible)

II.3.2.2 Fagos y Plásmidos.

El fago Charon 35 fue utilizado para la construcción de la genoteca genómica de *N. plumbaginifolia*. Su genotipo es mostrado a continuación: lsbhII1^o lac5 srI lacZ srlI3 DwL113 KH54 nin5 shndIII6^o srII5^o.

Los plásmidos PT3T7, PUC19 y pBluescript fueron utilizados para el clonaje y mantenimiento de los fragmentos de DNA.

El plásmido pGUS1 se utilizó como vector para la preparación de construcciones de transformación de planta.

Como vector de expresión en plantas se utilizó el plásmido pGSV4.

Empleamos los plásmidos PT3T7 y pBluescript que contienen los promotores de la RNA polimerasa de los fagos T3 y T7 para clonar las secuencias utilizadas para transcribir in vitro.

II.4 MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

Escherichia coli se cultivó a 37°C en medio LB. Para cultivos en medio sólido, agar 15g/l.

Los cultivos de *A. tumefaciens* y las cepas bacterianas infectivas se realizaron a 28°C en medio LB y en medio King's B respectivamente. Para conservar las cepas originales y los transformantes de *Escherichia coli* o *A. tumefaciens* así como las bacterias patógenas durante periodos cortos de tiempo se mantuvieron a 4°C en una placa de medio sólido con el antibiótico apropiado. La conservación por largos periodos de tiempo se realizó resuspendiendo las células en una solución de glicerol al 15% y manteniéndolos a -70°C.

II.5 MANIPULACION DE LOS MICROORGANISMOS.

II.5.1 Obtención de células competentes.

La obtención de células competentes DH5a y SURE de *E. coli* se realizó por tratamiento con CaCl₂ siguiendo el método descrito en Maniatis.

II.5.2 Transformación de células de *E. coli*.

Para la transfección con DNA de derivados del bacteriófago λ y para transformaciones con DNA de plásmidos que no requerían alta eficiencia, se emplearon células competentes de *E. coli*, DH5a o Sure, preparadas por el método citado anteriormente. Para transformaciones de alta eficiencia, sobre todo cuando se empleaban fragmentos ligados *in vitro*, el DNA se introdujo en células de *E. coli* DH5a por electroporación,

siguiendo los protocolos descritos en el manual de instrucciones del aparato Electro cell manipulator 600 de BTX.

II.5.3 Transformación de células de *A. tumefaciens*.

Los plásmidos que portaban el T-DNA (DNA transformante) que se pretendía transferir a la planta se purificaron a partir de las células de *E. coli* (DH5a) en las que se habían multiplicado, y se introdujeron en células de *A. tumefaciens* competentes, siguiendo el método descrito por Höfgen y Willmitzer, 1988, que portaban el plásmido auxiliar que suministra las funciones vir. Tras 5 minutos en hielo, 5 minutos en N2 líquido y 5 minutos a 37°C se incubaron las células de *A. tumefaciens* potencialmente transformadas a 28 °C durante una hora para posteriormente ser plaqueadas en medio LB con rifampicina, spectinomycin y streptomycin como antibióticos de selección. Las placas deben ser incubadas durante dos días a 28 °C para permitir el crecimiento de las colonias resistentes cuya transformación se verificó mediante minipreparación de plásmido.

.II.5.4 Inoculación de plantas.

La inoculación de las plantas *N.plumbaginifolia* y de plantas transgénicas *N. tabacum* se realizó de forma mecánica, por inyección, utilizando jeringuillas de 1ml y agujas 30G1/2 0,3 x13 estériles de Becton Dickinson. Como fuente de inóculo se utilizaron las cepas bacterianas infectivas, detalladas en el apartado de microorganismos experimentales

Las inoculaciones fueron preparadas en agua destilada estéril a la dilución microbiana adecuada a partir de cultivos crecidos a 28°C, durante toda la noche, de placas frescas con las cepas seleccionadas.

II.6 MANIPULACION DE PLANTAS.

II.6.1 Esterilización y germinación de semillas.

Las semillas procedentes de plantas transgénicas se esterilizaron durante 20 minutos en lejía comercial diluida al 10% seguido de 4 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente estas semillas se sembraron en placas de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 50 mg/ml de kanamicina como antibiótico de selección.

II.6.2 Transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* (SR1).

II.6.2.1 Transformación de discos de hoja.

El protocolo de transformación de discos de hojas, está basado en el descrito por Horsch y col. (1985) con algunas pequeñas modificaciones. El tejido más fácil de utilizar es el que procede de plantas crecidas *in vitro* debido a la innecesaria esterilización. Sin embargo, las plantas crecidas en el invernadero pueden tener una frecuencia de transformación más alta. Por esta razón, se recolectaron hojas sanas, sin daños, de plantas jóvenes crecidas en el invernadero y se esterilizaron en una solución de lejía comercial al 10% durante 10-15 minutos con agitación suave, lavándose a continuación 4 veces con agua esteril.

Se cortaron discos de hojas, utilizando un taladrador para papel, con el fin de producir heridas en los bordes, y se incubaron durante 60 minutos en 15 ml de un cultivo de *A.tumafaciens* preparado a partir de

la cepa transformada con el plásmido de interés. A continuación, los discos se secaron ligeramente para eliminar el exceso de líquido y se colocaron con el haz hacia abajo en medio MS teniendo 1mg/ml de BAP, 0.1 mg/ml de NAA y 2% de sacarosa, solidificado con agar al 0.6% (medio de regeneración). Se incubaron, los discos, durante 2-3 días y posteriormente tras limpiar ligeramente los explante sobre papal estéril, se transfirieron a placas con medio de regeneración en presencia de 100mg/ml de kanamicina y 250 mg/ml de cefotaxima y se incubaron a 25°C transfiriéndose a medio de selección fresco cada dos semanas.

Al cabo de 2-4 semanas empiezan a aparecer brotes que una vez alcanzado un tamaño apropiado, 0.5-1 cm, los brotes eran excindidos y transferidos a medio MS con 2% de sacarosa pero sin hormonas para permitir la formación de raíces (medio de enraizamiento). Según fueron enraizando las plántulas, se transfirieron a tiestos con tierra estéril tapados con plástico durante unos días.

Finalmente y tras este periodo de aclimatación, las plantas crecieron en invernadero hasta su utilización.

II.7 PREPARACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

II.7.1 Preparación de DNA de bacteriófagos.

Utilizando una librería genómica de *N.plumbaginifolia* se procedió al aislamiento de fagos de interés, según protocolo descrito en Maniatis, infectando células K803 de *E. coli*. Como sondas se utilizó el clon correspondiente a una $\beta(1,3)$ -glucanasa ácida de *N. tabacum* de 0.6kb denominada I63 (cedida por el Prf. J.Bol, Universidad Leiden, Holanda), un cDNA correspondiente a una glucanasa ácida de *N. plumbaginifolia*,

aislado y clonado en el plásmido pUC18 en nuestro laboratorio, y el clon denominado CI-125 correspondiente a la PR-2 ácida de tabaco.

La técnica de hibridación de placas *in situ* se llevó a cabo según el protocolo habitual descrito en el Maniatis y se plaquearon 180.000 bacteriófagos aproximadamente.

La minipreparación y purificación a gran escala de DNA de los fagos seleccionados se realizó también con la cepa bacteriana K803 infectada con dichos fagos basandonos en los protocolos descritos en Maniatis.

II.7.2 Purificación de DNA de plásmidos.

Para la purificación de DNA de plásmidos a partir de cultivos bacterianos utilizamos el kit de la casa comercial QUIAGEN, "Plasmid Midi Kit". Para preparaciones a pequeña escala, "miniprep", se siguió el método de la lisis alcalina (Sambrook y col. 1989).

II.7.3 Preparación de RNA total de la planta.

La preparación de RNA total de plantas se realizó siguiendo el protocolo (Jonathan Jones, 1985) en el que se utiliza LiAc, para la eliminación de DNA y RNA de bajo peso molecular. Además fue utilizado el método descrito por Logemann y col.(1987). Tras la extracción del RNA se determinó su concentración (260nm) y se alicuotó para su conservación en agua esteril, tratada con DEPC, a -80°C.

II.8 MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

II.8.1 Determinación espectrofotométrica.

Las concentraciones de los ácidos nucleicos se calcularon tras la determinación del espectro de absorción utilizándose valores de E260, 0.1%=25 para RNA monocatenario (Kaper y Geelen, 1971) y E260 0.1%=21 para DNA (Billeter col. 1966).

II.8.2 Tratamiento enzimático del DNA.

La manipulación enzimática del DNA con enzimas de restricción u otros enzimas modificadoras se hizo atendiendo a las especificaciones del proveedor del enzima y según protocolos ya establecidos (Sambrook y col., 1989).

II.8.3 Técnicas electroforéticas y transferencia de ácidos nucleicos.

La resolución de fragmentos de DNA mediante la técnica de electroforesis fue realizada en geles horizontales de 0.8%-1% de agarosa cuando el tamaño de los fragmentos era superior a 500 pb, y en geles verticales de poliacrilamida al 6%-9% para fragmentos de DNA de menor a 1kb, empleando como tampon de electroforesis 0.5 x TBE. Terminada la electroforesis el DNA se visualizaba bajo luz UV mediante tinción con BrEt (Sambrook y col.,1989). La detección de fragmentos específicos de DNA por hibridaciones tipo Southern se realizó mediante la transferencia a membranas de nylon Hybond-N, Amersham.

El RNA se separó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1.5% en presencia de formaldehído/formamida después de ser calentado a 55°C (Sambrook y col. 1989) y empleando como tampon 1 x MOPS. Se transfirió por capilaridad (Ausubel y col. 1987) también a membranas de nylon Hybon-N (Amersham), siguiendo las instrucciones de la firma comercial.

Finalmente los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana por exposición bajo luz UV durante 5 minutos.

II.8.4 Elución de fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA eran cortados una vez identificados de geles de agarosa, para su posterior elución a través de filtros de 0.22 mm tipo GVWP (Millipore) y tampón de elución (0.5 M Tris 7.5 y 0.1% SDS) según el método de Zhy y col., 1985.

II.8.5 Obtención de clones de DNA.

Después del aislamiento de los fagos seleccionados a partir de la librería genómica de *N. plumbaginifolia*, y del análisis de restricción e identificación de los fragmentos de DNA de interés, se procedió a la obtención de clones de dichos fragmentos insertándolos en vectores pT3T7 y pBluescript para la determinación de las secuencias. El vector pT3T7 fue utilizado para el clonaje del fragmento de 4 kb que incluye el gen de una $\beta(1,3)$ -glucanasa ácida (*gn3*), mientras que el fragmento de 3.5 KB correspondiente al segundo gen ácido (*gn4*) se insertó en el vector pBluescript, siendo digeridos ambos vectores con el enzima de restricción Eco RI. Dicho enzima fue seleccionado también para la

liberación de los fragmentos, mencionados, contenidos en los fagos seleccionados.

A partir de estos clones, se realizaron, utilizando los vectores descritos, los subclones adecuados para favorecer su caracterización y secuenciación.

II.6 Determinación de la secuencia del DNA.

Realizamos la secuenciación del DNA sobre moldes de doble cadena de plásmidos recombinantes de pT3T7, pUC19 y pBluescript utilizando el método de terminación de cadena de DNA (Sanger y col., 1977) con reactivos adquiridos de la casa comercial Pharmacia e incluyendo en la reacción el nucleótido dCTP marcado radiactivamente con ^{32}S , (Amersham). Los cebadores universales de pT3T7 en el sentido directo e inverso así como los primers T3 y T7 fueron adquiridos de la firma comercial Promega y utilizados a una concentración de 10ng/ml.

Igualmente se procedió a utilizar diversos oligonucleótidos para completar y confirmar las secuencias de interés. Las reacciones se resolvieron en geles verticales del 5% ó 7% de poliacrilamida, urea 8 M.

Una vez terminada la electroforesis los geles se transfirieron a papel Whatman 3MM y se secaron a vacío. El resultado de la reacción se registró en películas de autorradiografía Kodak X-OMAT S.

II.9 MARCAJE RADIATIVO DE ACIDOS NUCLEICOS.

II.9.1 Preparación de sondas de DNA.

Las sondas de DNA radiactivo empleadas en los ensayos de Southern se sintetizaron utilizando el kit para el marcaje de DNA por el

método de "Random Primer" siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Boehringer Mannheim) y utilizando [α - ^{32}P] CTP. Los nucleótidos no incorporados se separaron con el pasó de la mezcla de reacción por una columna con resina Sephadex G-50 en el tampón TE. Finalmente se calentó la sonda a 95°C antes de añadir a la mezcla de hibridación para conseguir su desnaturalización. La temperatura en el periodo de prehibridación e hibridación fue de 65°C y los lavados de los filtros, una vez finalizada la hibridación, se hicieron con una solución de 2x SSC dos veces de 15 minutos cada una, y una solución de 2x SSC con SDS al 0.1% 30 minutos, también, a 65°C.

II.9.2 Síntesis de RNA radiactivo por transcripción *in vitro*.

Las sondas de RNA radiactivo utilizadas en los ensayos tipo Northern se sintetizaron por transcripción *in vitro* en presencia de [α - ^{32}P] CTP usando el kit de transcripción de RNA de la firma Stratagene y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Los plásmidos recombinantes seleccionados para el marcaje radiactivo se detallan a continuación:

El plásmido pT3T7 contiene las secuencias promotoras de transcripción T3 y T7 separadas por un sitio de clonaje múltiple derivado del pUC19. En un sitio Hind III fue clonado un fragmento de 0.6 Kb correspondiente a la zona codificadora de la glucanasa ácida *gn3*, por lo que se seleccionó para el análisis de la expresión de dicho gen. Este fragmento fue, posteriormente, aislado por digestión con el enzima de restricción Hind III. Una vez digerido el pT3T7 recombinante con el enzima BstE II se procedió a la transcripción de dicho fragmento utilizando la T3 RNA polimerasas.

El plásmido pBluescript, al igual que el pT3T7 posee un sitio de policlonaje flanqueado por las regiones promotoras T3 y T7. Un fragmento de 0.9 kb que contiene parte de la región codificadora del gen *gn4* fue subclonado en un sitio Eco RI de dicho vector. El fragmento fue aislado después de la digestión del clon completo del gen con el mismo enzima. El plásmido recombinante fue digerido con el enzima de restricción Xba I y transcrito con la T7 RNA polimerasa.

El plásmido pGN2 es un derivado del pGEM2 que contiene un fragmento del c-DNA correspondiente a la región codificadora del gen básico de glucanasa *gn1* (Castresana y col., 1990). Este fragmento fue digerido con SStI y PstI aislado y posteriormente clonado en dicho vector, tratado con los mismos enzimas de restricción. El pGN2 contiene las secuencias promotoras Sp6 y T7. Una vez digerido con el enzima Eco RI se utilizó la T7 RNA polimerasa para la transcripción y el posterior análisis de la expresión del gen citado.

El pT3T7 fue digerido con el enzima de restricción Hind II donde fue clonado un fragmento de DNA de aproximadamente 1Kb procedente del gen glucanasa básico, designado *gn2*. La sonda de hibridación utilizada para determinar la expresión del gen glucanasa básico *gn2* se preparó mediante clonaje, en el sitio HindII del vector pT3T7, de un fragmento AhaIII de aproximadamente 1 Kb, procedente de dicho gen (*gn2*). Este fragmento contiene la región codificadora correspondiente al segundo exón y más de 100 nucleótidos de la secuencia del intrón. El plásmido obtenido se denominó pGN6 y fue tratado con el enzima Eco RI para la posterior transcripción con la T3 RNA polimerasa.

Los clones utilizados para preparar las sondas de hibridación correspondientes a los genes PR-1 y PR-2 fueron cedidas por el Dr. J.

Ryals y en ambos casos representan los c-DNAs completos y clonados respectivamente en el vector *pbluescript*.

El clon correspondiente al gen PinII de tabaco se preparó utilizando un fragmento de DNA obtenido mediante digestión con los enzimas de restricción NdeI y NsiI del correspondiente c-DNA. Los extremos de dicho fragmento de, aproximadamente 400 pb, se rellenaron con Klenow, y el fragmento aislado de un gel de agarosa se insertó en el sitio Eco RI del vector *pBluescript*. El plásmido obtenido se originó con el enzima para su posterior transcripción con la T7 DNA polimerasa.

la fijación del RNA a las membranas se realizó por exposición al crosslinker ultravioleta durante 2 minutos. Los filtros fueron prehibridados durante dos horas como mínimo en una solución que contenía 5x SSC, 50% de formamida, 5x Denhart's, 0.5% SDS y DNA de esperma de salmón 20 mg/ml.

Las condiciones de temperatura durante la prehibridación así como en la hibridación variaron dependiendo de la sonda y del RNA utilizado. Los fragmentos endógenos para la planta portadora del RNA a analizar fueron hibridados a 68°C, gn1, gn2 y CH2 de *N. plumbaginifolia*, mientras los genes ajenos, aislados de tabaco como PR-1, PR-2 eran hibridados a 65°C. El mismo criterio se siguió cuando se utilizaban RNAs extraídos de *N. tabaco*. Para el gen gn1 y CH2 se estableció una temperatura de 65°C y para PR-1 y PR-2 68°C. Cuando era el gen gn2 utilizado, la hibridación se hizo a 68°C debido a su alta homología de secuencia (95%) con isoformas intracelulares de *N. tabaco*.

El gen de inhibidor de proteasas de tabaco Pin II fue analizado utilizando unas condiciones de temperatura de 68°C, para el RNA de ambos huéspedes herbáceos, debido a la aparición frecuente de hibridaciones inespecíficas

Los lavados se hicieron primero con una solución que contenía 5x SSC y 0.1 % de SDS en dos periodos de tiempo de 15 minutos cada uno. Un segundo lavado era hecho con una solución de 2x SSC y 0.1% de SDS una vez durante 30 minutos. Cuando fue necesario se utilizaron condiciones de mayor astringencia bajando la concentración hasta el 1x SSC. Las condiciones de temperatura en los lavados eran las mismas que las utilizadas durante la hibridación.

II.10 ANALISIS DE PROTEINAS.

II.10.1 Extracción de las proteínas totales de hojas de plantas.

Se procedió en primer lugar, a la extracción de proteínas a partir de tejido congelado con N₂ líquido, y en un tampon de extracción de Acetato sódico 0.5 M pH 5.2 conteniendo 2-mercaptoetanol 15 mM como estabilizante de las proteínas. Una vez filtrado a través de Miracloth (Calbichem) y centrifugado a 14000 r.p.m., se dializó en acetato sódico 10 mM pH 5.2 durante toda la noche a 4°C. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 5000 r.p.m. para eliminar el precipitado y leer la absorción a 520 nm, utilizando el reactivo para ensayos de proteína de Bio-Rad como es indicado por la casa comercial. Este ensayo colorimétrico está basado en el procedimiento descrito por Bradford, M., (1976), y consiste en el cambio de color del tinte azul Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas como resultado de la unión de la tinción a aminoácidos básicos principalmente.

Posteriormente se procedió a la determinación de la actividad glucanasa por los métodos que se describen a continuación:

II.10.2 Determinación de la actividad de proteínas $\beta(1,3)$ glucanasa.

II.10.2.1 Método de Somogy y Nelson.

Este método se basa en la oxidación de sustancias reductoras mediante compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina.

Las sustancias reductoras son oxidadas por el SO_4Cu (reactivo de Somogy), el cuál se reduce a óxido de cobre, rojo, que reacciona con el reactivo de Nelson, formando un complejo de color azul. La intensidad de color depende de la cantidad de cobre reducido, o lo que es lo mismo, de la cantidad de sustancias reductoras existentes.

En este ensayo se usaron 10 mg de extracto proteico que se incubaron durante 1 hora con laminarina [2mg/ml] (Sigma), utilizada como substrato y después del tratamiento con los dos reactivos descritos, se midieron las muestras, espectrofotométricamente a 520 nm.

II.10.2.2 Geles de IEF.

Además del método anteriormente citado se procedió a la realización de ensayos de actividad $\beta(1,3)$ glucanasa en geles de IEF (Anpholine PAGplate, Ph 3.5-9.5, Farmacia). Para ello fueron utilizados 10-15 mg de extracto de proteína resuspendidos en 10 ml de agua destilada que se resolvieron en geles de IEF a 40 mAmp. Finalizada la electroforésis y después de un lavado de 5 minutos en agua y 5 minutos en acetato sódico 50 mM pH 5.2, se procedió a la incubación del gel en una solución de laminarina al 0.5% en acetato sódico 50 mM pH 5.2 durante 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo se lavó el gel dos veces con agua y se cubrió con 200 ml de NaOH 1M/0.3g TPT (2,3,5-trifenil tetrazolium chloride. Sigma). Después de incubar 2-3 minutos en el

microondas, con agitación cada 30 segundos, podían observarse las manchas correspondientes a los diferentes isoenzimas, con actividad glucanasa, pertenecientes al rango de pH seleccionado. Por último el gel era fijado en ácido acético 7.5%.

II.11 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA EN PLANTAS TRANSGENICAS.

II.11.1 Análisis fluorimétricos.

La cuantificación de la actividad β -glucuronidasa (GUS) fue medida por fluorescencia siguiendo el método descrito por Richard A. Jefferson, 1987; Jefferson y col. ,1991. El substrato utilizado para este ensayo es el 4-Metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG).

Se partió de 100-200 mg de tejido congelado para la extracción de proteínas con el buffer de extracción que contiene 50 mM NaPO₄ (pH 7.0), 10mM EDTA (pH 8.0), 0.1% Tritón X-100 y 10mM beta-Mercaptoetanol. Después de medir la concentración de proteína a 595 nm, utilizando el reactivo Bio-rad, se procedió a iniciar la reacción mezclando un volumen de muestra correspondiente a una O.D._{595nm}=3 con 60 ml del tampon de extracción y 60 ml de 1x MUG e que se incubó a 37°C. Se tomaron alíquotas de 20 ml y se añadieron a un eppendorf con 1000 ml de Na₂CO₃ para parar la reacción después de 15 minutos y 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia en el fluorímetro a 447 nm.

II.11.2 Ensayos histoquímicos.

Para la localización histoquímica de la actividad β -glucuronidasa (Jefferson y col., 1986, 1987) se cortó el tejido en fragmentos pequeños que abarcaran la región a analizar y se incubaron, durante toda la noche a 37°C y en oscuridad, en una mezcla que contenía 100mM Tris pH 7, 50 mM NaCl, 2 mM de Ferrocianuro Potásico y 2 mM del ácido 5-Bromo 4-Chloro-3-Indol β -D-glucurónico como sustrato (X-Gluc.). Como resultado de la hidrólisis del X-Gluc por la β -Glucuronidasa aparece el dicloro-dibromoíndigo (ClBr-indigo), producto coloreado que permite precisar la localización de la actividad enzimática. Posteriormente se lavó manteniendo las muestras 10 minutos en agua con el fin de parar la reacción y se fijaron como mínimo 6 horas en glutaraldehído 1%, Tris 100mM pH 7. Una vez concluida la fijación se realizaron 3 lavados con agua y se procedió a la eliminación de la pigmentación endógena (Clorofila u otros pigmentos) del tejido a través de la inclusión sucesiva de las muestras en etanol del 30%, 50%, 70%, 90% y 100% durante 1 hora para cada dilución. Las muestras con alta pigmentación, como el caso de hojas jóvenes, se mantuvieron en etanol 70%, periodos de tiempo superiores a una hora, dependiendo del tejido. Las muestras fueron rehidratadas invirtiendo el tratamiento de la serie del etanol. Finalmente se mantuvieron en agua destilada estéril a 4°C.

Para el ensayo histológico de tejidos florales se le añadió a la mezcla de reacción β -Mercaptoetanol 14 mM para evitar la rápida oxidación de los pigmentos localizados en estos tejidos.

II.12 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA.

Para realizar este ensayo, se escindieron discos de tejido a partir de diferentes áreas de las hojas a examinar, los cuales son homogenizados en 1 ml. de acetona al 80%. Los extractos obtenidos eran diluidos 10 veces en acetona al 100%, para posteriormente, hacer una medición de absorvancia a A645 y A663. Las concentraciones de clorofila a y b eran calculadas por la equación de Hill y col., 1985:

$$Cl\ a\ (mg/ml) = 12.5\ A_{663} - 2.55\ A_{645}$$

$$Cl\ b\ (mg/ml) = 18.29\ A_{645} - 4.85\ A_{663}$$

RESULTADOS

III. RESULTADOS

III.1 CARACTERIZACION DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE $\beta(1,3)$ GLUCANASAS EN PLANTAS DE *Nicotiana plumbaginifolia*.

III.1.1 Aislamiento y caracterización de genes: Estudio comparativo de las secuencias de las distintas isoformas y análisis de la expresión de los genes aislados.

Con objeto de determinar la participación de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en los mecanismos de defensa vegetal, y examinar la contribución de distintos isoenzimas, ácidos y básicos, en dicha respuesta, hemos procedido al aislamiento y caracterización de los genes correspondientes a los isoenzimas ácidos a partir de una biblioteca genómica de *N. plumbaginifolia*. Utilizando como sonda de hibridación un c-DNA parcial correspondiente a una isoforma ácida de tabaco y a la que se denominó I63 (cedida por el Prf. J. Bol de la Universidad de Leiden, en Holanda), se identificaron varios fagos positivos que, tras su purificación, fueron sometidos a un análisis de restricción y posterior Southern blot con el fin de seleccionar los fagos de interés. De estos estudios, dos supuestos genes $\beta(1,3)$ glucanasa designados, *gn3* y *gn4*, eran identificados en un fragmento de DNA de 4Kb y 3.5Kb, respectivamente correspondientes a dos fagos independientes. Dichos fragmentos se subclonaron en los vectores pT3T7 y pbluescript originándose 2 clones designados pT3T7/*gn3* y pbluescript/*gn4*, que posteriormente fueron analizados en detalle para determinar sus características moleculares y de expresión.

Las secuencias parciales deducidas para los genes *gn3* y *gn4*, fueron comparadas con las correspondientes secuencias de amino ácidos de las diferentes isoformas intracelulares y extracelulares, previamente caracterizadas en plantas de *Nicotiana tabacum* (Linthorst H.J. y col., 1990). El producto del gen *gn3* mostraba un 60% de identidad de secuencia con la isoforma ácida, gI9 (Linthorst H.J. y col., 1990), y un 49%, aproximadamente, con dos isoformas básicas caracterizadas en tabaco, además, el análisis de la secuencia aminoacídica de este gen revelaba un pI de 4.85. La secuencia del segundo clon, *gn4*, mostraba un 97% de identidad con una isoforma extracelular de tabaco específica de estilo, denominada sp41 (Ori N. y col., 1990). El análisis de secuencia de este gen mostraba, respectivamente, un 80% y un 49% de homología con las secuencias correspondientes a las de los isoenzimas ácidos y básicos inducibles en hojas.

Las características de expresión de los genes aislados se examinaron, inicialmente, en hojas de plantas sanas no tratadas, así como en respuesta a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* que establece una interacción del tipo incompatible con *N. plumbaginifolia*, resultando en la manifestación de una respuesta hipersensible con la subsiguiente inducción de la reacción de defensa vegetal. La densidad de inóculo utilizada fue de 10^8 ufc/ml y los tiempos examinados fueron un día y cuatro días después de la infección en relación con la aparición y establecimiento de los síntomas. Igualmente, se examinó el nivel de expresión de los genes estudiados en respuesta a la inoculación con agua utilizada como control. En base a la identidad determinada entre la secuencia correspondiente al gen *gn4* y la glucanasa específica de estilo, sp41 de *N. tabacum*, se examinó el nivel de expresión, de los genes estudiados, en órganos florales. Para este estudio se utilizaron flores jóvenes totalmente desarrolladas.

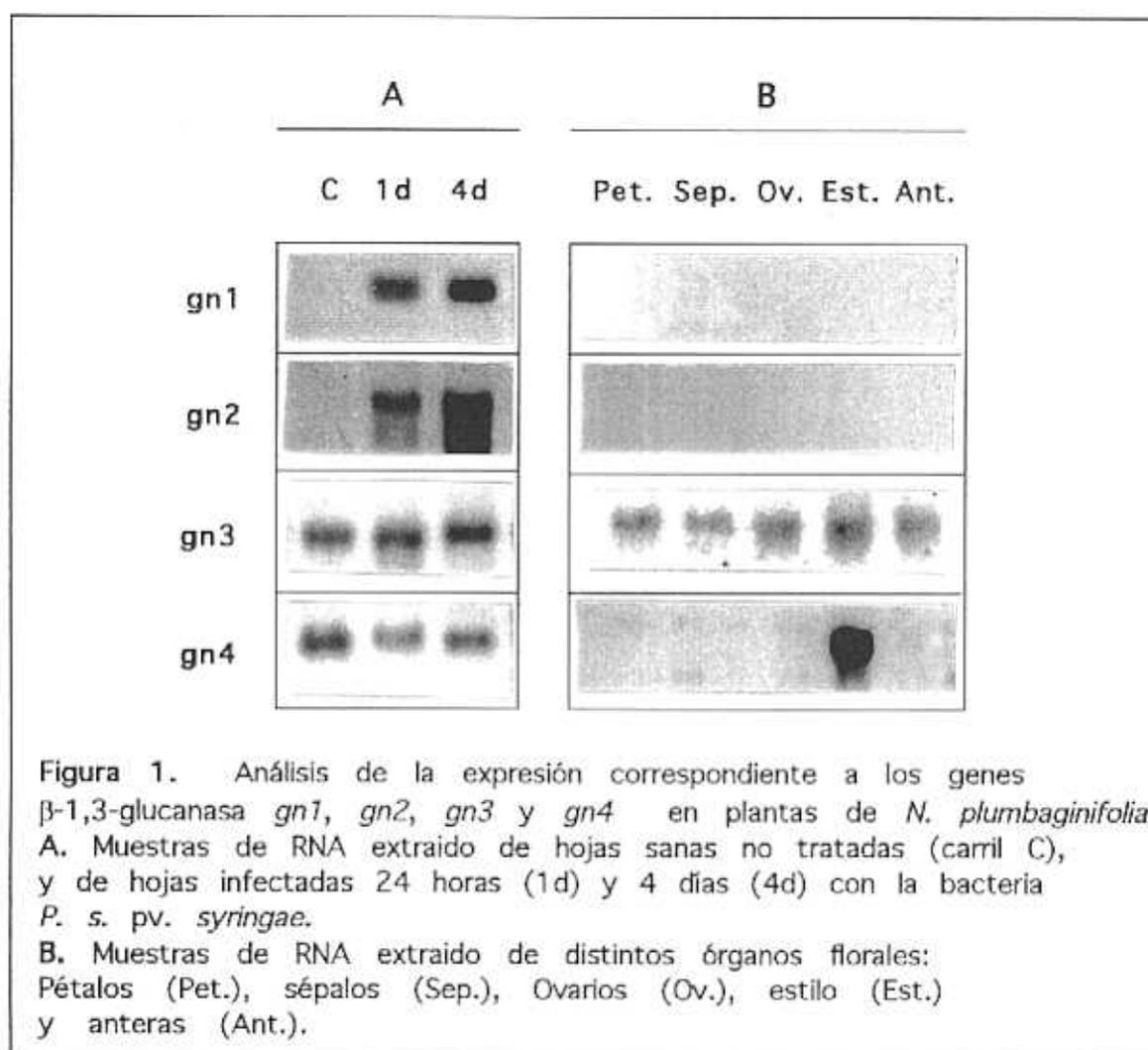


Figura 1. Análisis de la expresión correspondiente a los genes β -1,3-glucanasa *gn1*, *gn2*, *gn3* y *gn4* en plantas de *N. plumbaginifolia*. A. Muestras de RNA extraído de hojas sanas no tratadas (carril C), y de hojas infectadas 24 horas (1d) y 4 días (4d) con la bacteria *P. s. pv. syringae*. B. Muestras de RNA extraído de distintos órganos florales: Pétalos (Pet.), sépalos (Sep.), Ovarios (Ov.), estilo (Est.) y anteras (Ant.).

Los niveles de expresión de los genes *gn1* y *gn2* de *N. plumbaginifolia*, correspondientes a dos isoenzimas básicos, fueron igualmente examinados en los tejidos y tratamientos descritos. Mediante análisis de Northern blots, figura 1, se observó que los RNAs derivados de los genes *gn1* y *gn2*, no eran detectados en hojas de plantas control, acumulándose en respuesta a la infección a las 24h y alcanzando el máximo nivel a los 4 días de dicho tratamiento. Los mensajeros correspondientes a los genes *gn3* y *gn4* presentaban niveles constitutivos tanto en las hojas de plantas no tratadas como en las infectadas con la bacteria sin apreciarse, por tanto, ninguna modificación en los niveles de RNA acumulados en la planta en respuesta a la infección. Igualmente, no se observó inducción de la expresión de

ninguno de los genes examinados en respuesta al tratamiento con agua (datos no mostrados). Los análisis de expresión génica en los órganos florales examinados revelaron que los niveles correspondientes al gen *gn3* eran similares en todos los órganos florales, y que dichos niveles eran, además, similares a los detectados en las hojas de la planta. A diferencia de estos resultados, la expresión del gen *gn4* se detectaba exclusivamente en los RNAs extraídos del estilo siendo los niveles alcanzados significativamente superiores a los detectados en las hojas de la planta.

Finalmente, no se detectó RNAs en ninguno de los órganos florales cuando se examinó la expresión correspondiente a los genes *gn1* y *gn2*.

Las características de expresión determinadas para los genes *gn3* y *gn4*, junto con el análisis de sus secuencias parciales revelaban, que la proteína codificada por el gen *gn3* no correspondía a ninguna de las

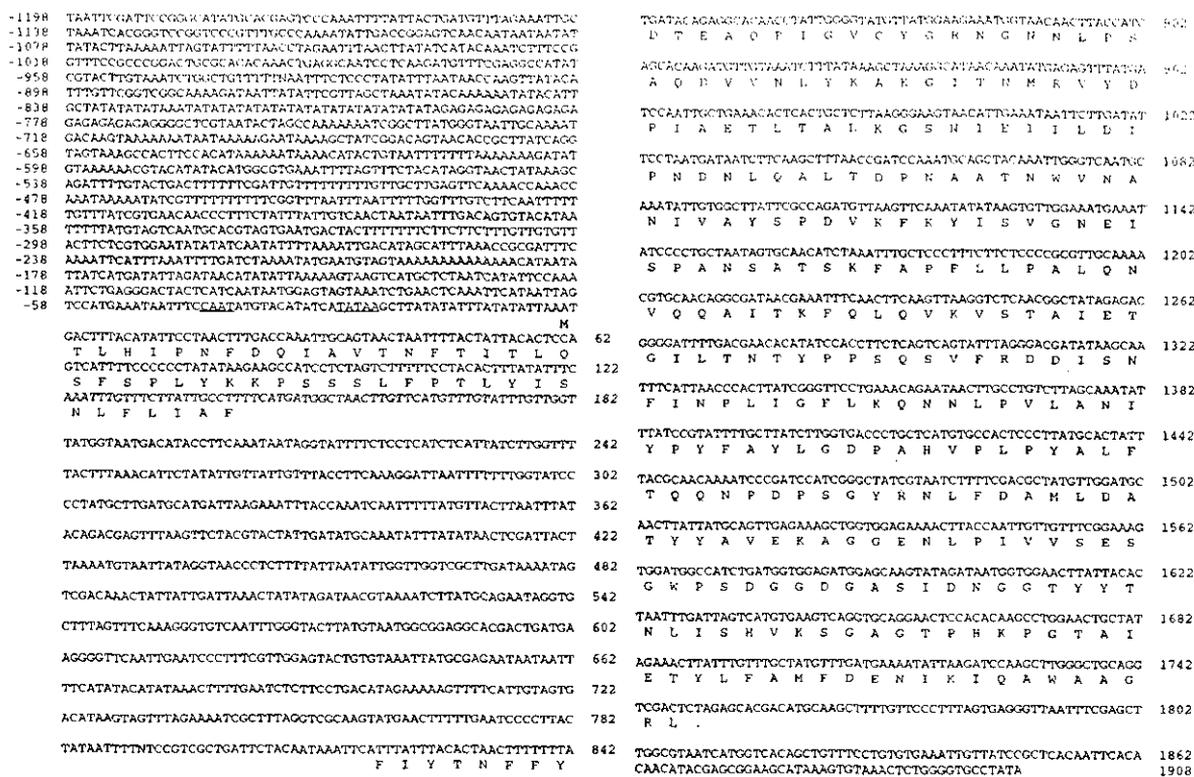


Figura 2. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del gen *gn3* de *Nicotiana plumbaginifolia*. Los nucleótidos están numerados a partir del ATG de iniciación, designando la adenina correspondiente como nucleótido +1.

isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa previamente caracterizadas, pero sí a una nueva isoforma ácida mientras que el gen *gn4* representaba, probablemente, al homólogo de sp41 (caracterizada en *N. tabacum*) en la especie *N. plumbaginifolia*. En base a estos resultados, se determinó la secuencia completa del gen *gn3*, incluyendo sus regiones 5' y 3' así como su región promotora que se utilizó, para preparar una construcción quimera, *gn3/GUS* (detallada en el apartado III.2.1), con el fin de proceder al estudio detallado de las características de expresión dirigidas por el promotor *gn3* en plantas transformadas con dicha construcción. La secuencia completa del gen *gn3* se muestra en la figura 2.

III.1.2 Análisis de la actividad de isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en plantas de *Nicotiana plumbaginifolia*.

Con objeto de completar la caracterización de los isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa y determinar su posible inducción durante la respuesta de defensa vegetal, se realizaron ensayos de actividad enzimática sobre geles de IEF de extractos proteicos obtenidos a partir de hojas sanas así como de hojas inoculadas con la bacteria *P. s. pv. syringae*. Igualmente, se examinaron los isoenzimas presentes en los distintos órganos florales de la planta. Estos análisis permitieron detectar niveles basales de dos isoenzimas, ácida (pI 6, aproximadamente) y básica (pI aproximado de 8) respectivamente, en los extractos de hojas sanas no tratadas. Los niveles de ambos isoenzimas aumentan significativamente en las muestras preparadas a partir de hojas inoculadas, alcanzando el máximo nivel de acumulación a los 8 días de infección. Durante este proceso es posible detectar además, la presencia de otras dos isoenzimas, ácida (pI inferior a 4) y básica (pI aproximado a 9) respectivamente, específicas de este tratamiento, (figura 3 A).

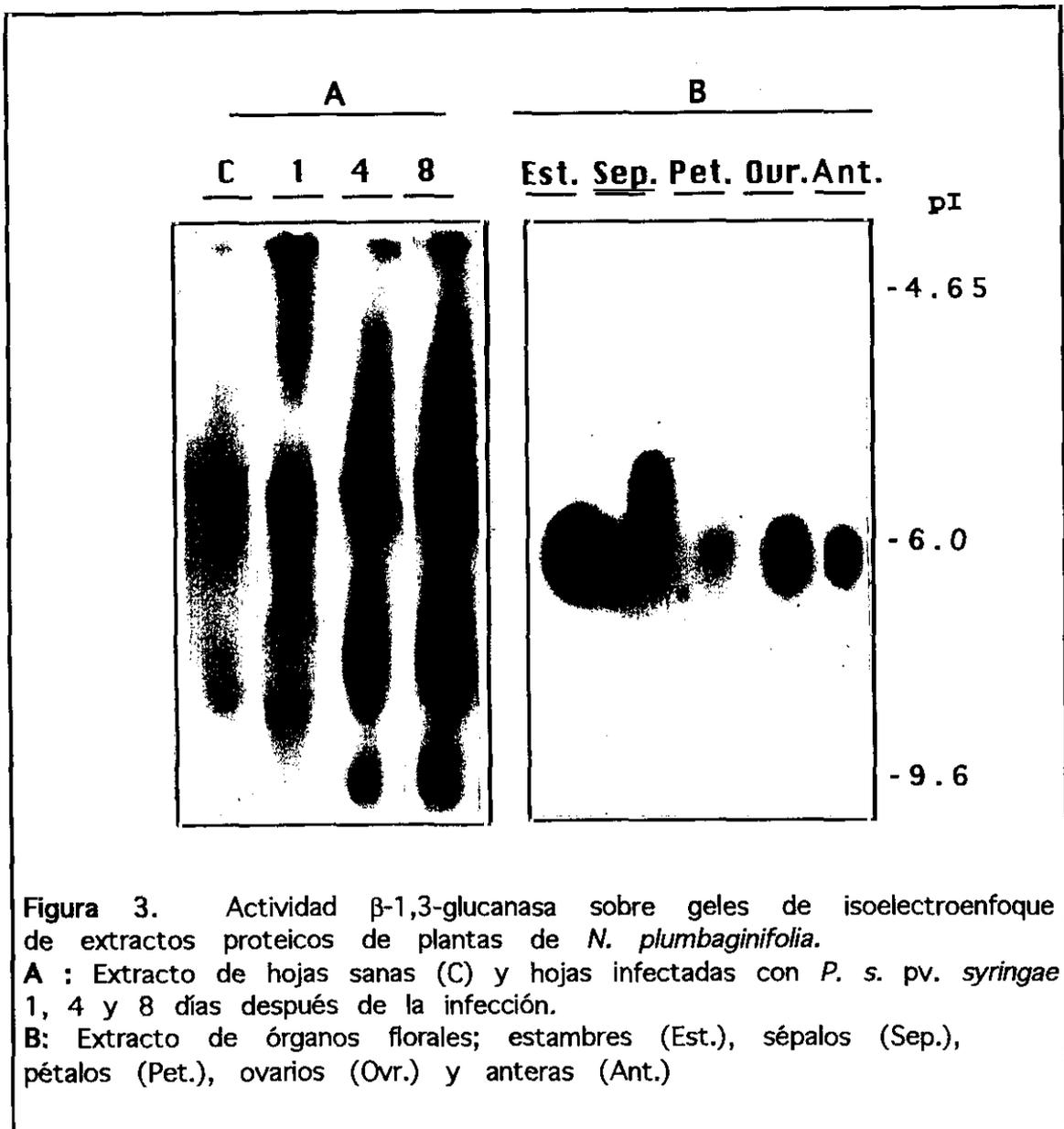


Figura 3. Actividad β -1,3-glucanasa sobre geles de isoelectroenfoque de extractos proteicos de plantas de *N. plumbaginifolia*.
A : Extracto de hojas sanas (C) y hojas infectadas con *P. s. pv. syringae* 1, 4 y 8 días después de la infección.
B: Extracto de órganos florales; estambres (Est.), sépalos (Sep.), pétalos (Pet.), ovarios (Ovr.) y anteras (Ant.)

El análisis de los órganos florales reveló la presencia de un nuevo isoenzima específico del estilo (pI aproximado a 7) que probablemente corresponde a la glucanasa codificada por los genes *sp41* y *gn4* antes descritos, y que también fue localizada en el tejido de ovario y anteras y detectada muy debilmente en los pétalos. En los sépalos se detectó una proteína con un punto isoeléctrico inferior (pI aproximado a 6) y un patrón de migración diferente al mostrado por la estilar, aunque similar a uno de los isoenzimas ácidos de hoja, (figura 3 B).

III.2 ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS DE EXPRESION CONFERIDAS POR LOS PROMOTORES *gn1* Y *gn3* AL GEN REPORTADOR β -GLUCURONIDASA EN PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO.

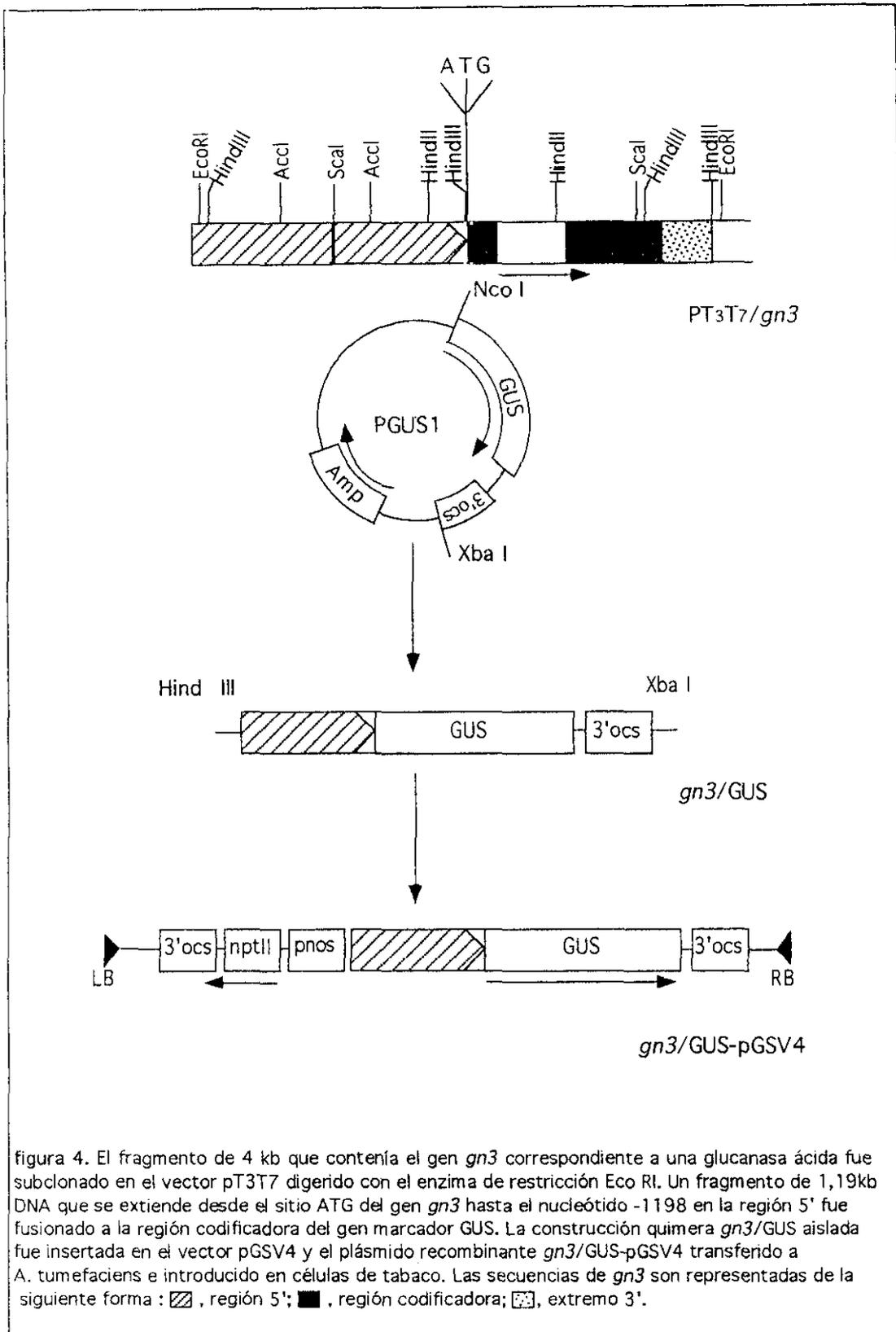
III.2.1 Preparación de la construcción quimera *gn3*/GUS/*ocs* y obtención de plantas transgénicas.

Con objeto de facilitar la caracterización del gen $\beta(1,3)$ glucanasa *gn3*, se procedió a la obtención de plantas transgénicas en las que la expresión del gen bacteriano β -glucuronidasa estaba dirigida por las secuencias reguladoras del promotor *gn3*. La determinación de la actividad GUS, así como su localización celular mediante ensayos histoquímicos, permite caracterizar en detalle las propiedades reguladoras conferidas por dicho promotor. Para ello, se procedió al aislamiento de las secuencias reguladoras del gen *gn3*, presentes en un fragmento de DNA de 1.19 Kb que se extiende desde los nucleótidos -58 hasta el nucleótido -1198 en dirección 5' con respecto al sitio ATG de iniciación de la traducción. Según está representado en la figura 4, dicho fragmento se obtuvo a partir del plásmido pT3T7/*gn3* (3.5 kb) mediante digestión con los enzimas de restricción ScaI (-1198) y HindIII (-58) y, tras reparar los extremos con el fragmento klenow de la DNA polimerasa de *E.coli*, se purificó mediante elución de un gel de agarosa. El fragmento obtenido, se insertó en el vector pGUS1 que contiene la secuencia correspondiente a la región codificadora del gen GUS unida a la secuencia terminadora 3'*ocs*. Para la inserción del gen *gn3*, el vector pGUS1 se digirió con el enzima NcoI, localizado en el ATG de iniciación del gen GUS y se sometió a tratamiento con el enzima klenow seguido de la desfosforilación con el enzima CIP (fosfatasa alcalina). La verificación del

clonaje descrito se determinó mediante análisis de restricción y secuenciación, utilizando como control el plásmido pGUS1 libre de inserto.

Para la transformación de plantas, se ha empleado un sistema binario consistente en un vector de clonación pGSV4, capaz de replicarse tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens* y un plásmido auxiliar pGV2260. pGSV4 tiene una región de clonación, con múltiples sitios de restricción únicos para el clonaje de las secuencias deseadas, y el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPT II) cuya expresión, dirigida por el promotor pnos del gen de la nopalina sintetasa permite a las células vegetales crecer en presencia de kanamicina y seleccionar las plantas transformadas. El sitio de clonación y las secuencias del vector pGSV4 descritas (gen NPTII) se encuentran flanqueados por las repeticiones directas de 25 pb caracterizadas en el plásmido Ti de *A. tumefaciens* esenciales para la transferencia e integración del DNA de interés en el genoma de la planta. El plásmido auxiliar pGV2260 es aportado por la cepa de *A. tumefaciens* y posee la región vir o región de virulencia que aporta en “trans” las funciones necesarias para permitir la transferencia e integración del DNA de interés en el genoma vegetal.

Utilizando el sistema descrito, se procedió a insertar la construcción *gn3/GUS/ocs* en el vector pGSV4. El fragmento de DNA conteniendo dicha construcción se aisló mediante digestión con los enzimas HindIII y XbaI del plásmido pGUS1 que lo portaba (figura 4) y se insertó en el vector pGSV4 digerido con los mismos enzimas. La inserción de la construcción *gn3/GUS/ocs* en pGSV4 se verificó mediante análisis de restricción. El plásmido obtenido se denominó *gn3/GUS-pGSV4* y se utilizó para transformar células de *A. tumefaciens*, siendo verificada dicha transformación mediante minipreparación de plásmido seguido de análisis de restricción.



Posteriormente, se efectuó la transformación de plantas de *N. tabacum* (SR1) mediante la incubación de discos de hojas con células de *A. tumefaciens* que portaban el plásmido *gn3/GUS-pGSV4*. Se regeneraron, en presencia de kanamicina, varias plantas transgénicas de las que 7 de ellas se seleccionaron y analizaron en más detalle. Las plantas transgénicas originales y los descendientes de la autofecundación de éstas 7 plantas fueron analizadas para verificar la expresión que mostraba la construcción quimera *gn3/GUS/ocs*.

III.3 CARACTERIZACION DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS TRANSFORMADAS CON LAS CONSTRUCCIONES *gn1/GUS* Y *gn3/GUS*.

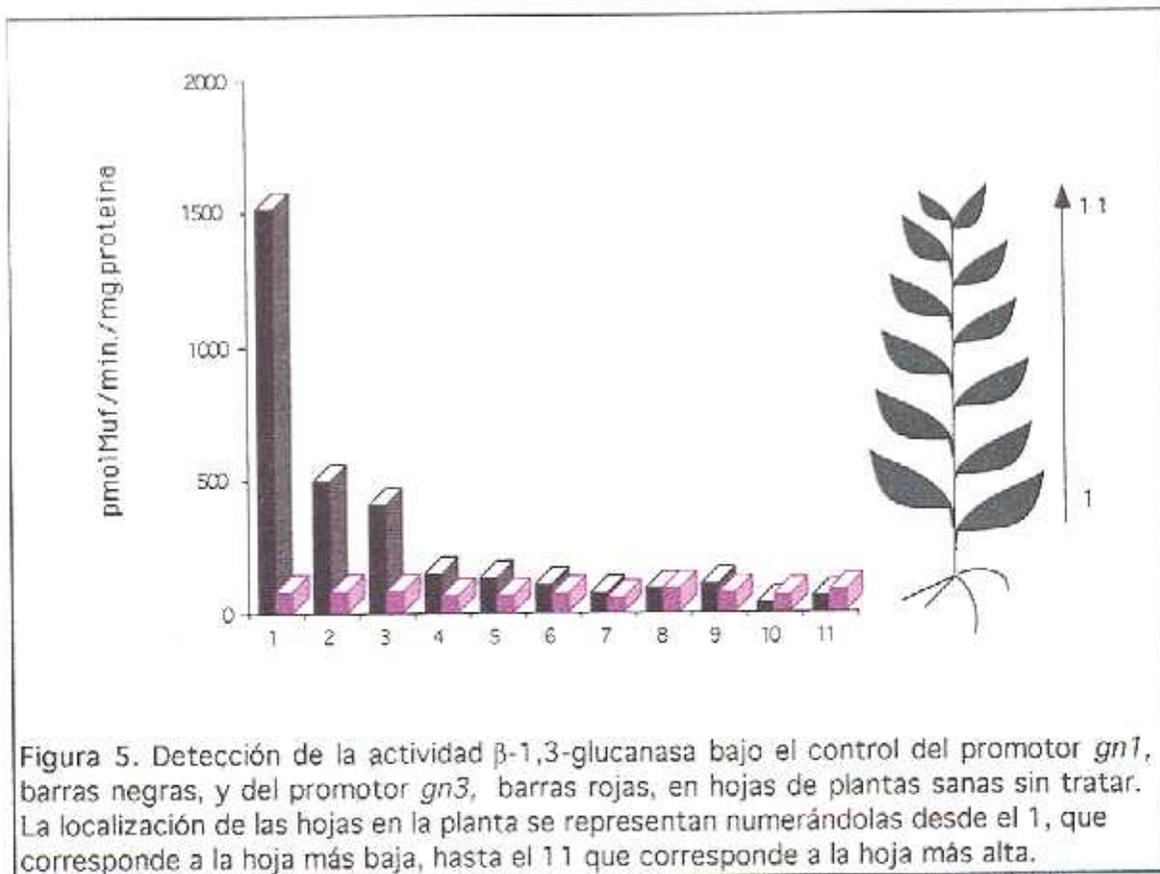
La disponibilidad de plantas transgénicas transformadas con una construcción quimera *gn1/GUS/ocs*, preparadas con anterioridad a este trabajo, nos permitió analizar la expresión dirigida por promotores correspondientes a los dos tipos $\beta(1,3)$ glucanasa de interés, *gn1* y *gn3*, en las plantas transgénicas correspondientes.

III.3.1 Análisis en plantas sanas.

Como un primer paso para investigar el posible papel de los productos proteicos de los genes aislados, así como en un intento de localizar la expresión del gen *gn3* en otras partes de la planta, caso observado con el gen *gn4*, se procedió a analizar los niveles de expresión GUS conferida por ambos promotores *gn1* y *gn3*, en hojas de plantas transgénicas sanas. Para ello se eligieron plantas jóvenes de aproximadamente 7-8 semanas de desarrollo, sin haber florecido pero con evidentes diferencias en el grado de desarrollo entre las distintas hojas desde las basales hasta las apicales. Se realizó una extracción

proteica a partir de cada una de las hojas de las plantas analizadas y, posteriormente, se realizó un ensayo fluorimétrico de actividad β -glucuronidasa (Jefferson y col., 1987)

Como se muestra en la figura 5, los niveles de actividad GUS, en las plantas transgénicas *gn1*/GUS, mostraban un gradiente decreciente desde las hojas más bajas de la planta hasta las más altas. En las hojas más bajas los niveles detectados eran hasta 15 veces superiores a los encontrados en las hojas apicales de la planta, donde casi no se detectaba expresión. Por otro lado, los resultados observados para la expresión del gen GUS dirigida por el promotor *gn3*, indicaron la presencia de niveles basales similares en todas las hojas examinadas. Estos niveles eran, además, similares a los detectados en las hojas más altas de las plantas transgénicas *gn1*/GUS.



Para completar estos resultados se procedió a la realización de un ensayo histoquímico utilizando pequeños fragmentos de las mismas

hojas de donde se habían obtenido las muestras para el análisis citado anteriormente. En el caso de las plantas transformadas con la construcción *gn1/GUS* se observó una clara, aunque ligera, tinción por todo el tejido analizado en las hojas más bajas de la planta (1ª y 2ª hojas), mientras que no se detectaba coloración azul en el resto de las hojas analizadas. El tejido analizado histoquímicamente no mostraba tinción en ninguna de las hojas de las plantas *gn3/GUS* (datos no mostrados).

Estos resultados indicaban que la expresión GUS conferida por el promotor de la isoforma básica *gn1* podría estar implicada en procesos de desarrollo y madurez foliar, mientras que el gen ácido, *gn3* caracterizado no participaría en dichos procesos, al menos, en el estado de desarrollo de las plantas analizadas.

III.3.2 Análisis de la inducción de la expresión de los transgenes *gn1/GUS* y *gn3/GUS* en respuesta a tratamientos bióticos y abióticos.

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se procedió a analizar la expresión GUS, dirigida por los promotores *gn1* y *gn3*, en respuesta al tratamiento con distintos agentes inductores relacionados con la respuesta de defensa vegetal. De esta manera se podría evaluar la posible inducción de la expresión dirigida por dichas secuencias reguladoras, y seleccionar los tratamientos más adecuados para el estudio posterior de la expresión de éstas isoformas, $\beta(1,3)$ glucanasa, ácida y básica, así como la de otros genes relacionados con la respuesta de defensa vegetal.

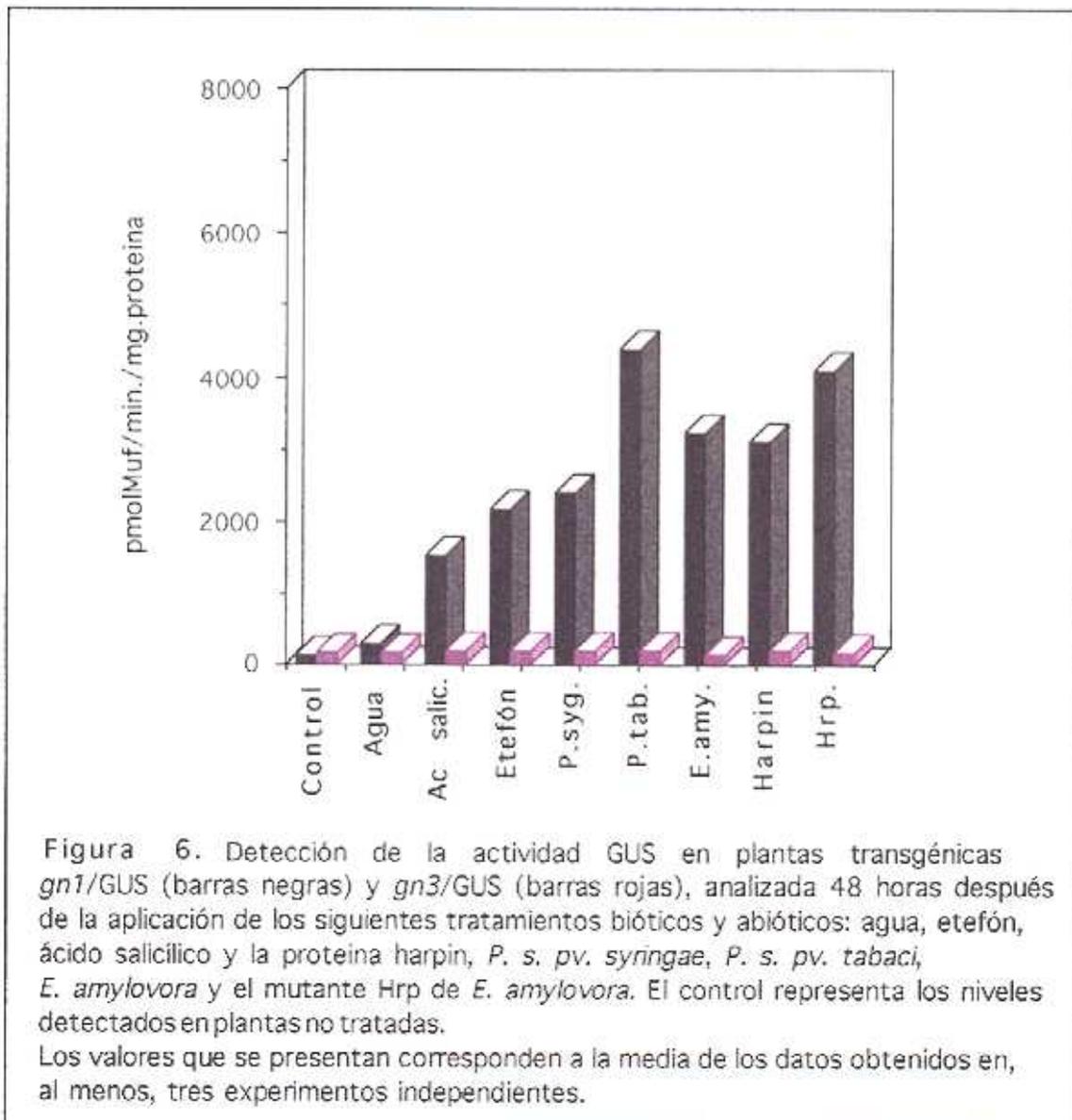
Como agentes bióticos se utilizaron las cepas bacterianas *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Erwinia amylovora* inductoras de la reacción hipersensible en plantas de *N. tabacum*. A diferencia de estas,

la cepa bacteriana *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* se seleccionó como microorganismo patógeno de tabaco, para examinar la inducción de actividad GUS durante el establecimiento de una interacción huesped-patógeno compatible que promueve la infección sistémica de la planta. Igualmente, se evaluó la inducción de la expresión GUS en respuesta a la inoculación con la proteína Harpin de *E. amylovora* inductora de una reacción necrótica similar a la reacción hipersensible cuando se inocula en los espacios intercelulares de la hoja. Además, se utilizó una cepa mutante de *Erwinia amylovora* incapaz de inducir la HR, con el fin de analizar la inducción de ambos promotores en ausencia de lesiones necróticas. Del mismo modo se ensayaron agentes abióticos como el ácido salicílico y el etefón a una concentración de 1mM en cada caso. Como control de los tratamientos ensayados se analizaron plantas no tratadas e inoculadas con agua.

Para realizar este estudio se seleccionaron plantas independientes de 7-8 semanas de cada una de las líneas transgénicas, *gn1/GUS* y *gn3/GUS*, y se determinó la actividad GUS 48 horas después de la inoculación con cada uno de los tratamientos estudiados.

Como se muestra en la figura 6, los datos obtenidos revelan que bajo la regulación del promotor del gen *gn1*, se produce un aumento significativo en los niveles de actividad GUS en respuesta a los tratamientos con etefón y a la inoculación con las bacterias seleccionadas y la proteína Harpin. Hay un nivel de inducción similar entre los tratamientos con etefón y la bacteria *P. siryngae* pv. *siryngae*, mientras que el máximo nivel de inducción se alcanzó con la bacteria patógena *P. s. pv.tabaci*. El tratamiento con la proteína harpin provoca una inducción similar a la obtenida con la bacteria portadora del gen *hrpN*, *E. amylovora*, sin embargo la inducción mostrada por el tratamiento con la bacteria mutante *hrp-* era ligeramente superior a los dos casos

anteriormente citados. Los niveles observados con el ácido salicílico eran ligeramente inferiores a los obtenidos mediante inoculación con etefón. Los niveles de actividad GUS alcanzados tras la inoculación con agua eran similares a los determinados en plantas transgénicas no sometidas a ningún tratamiento.



El análisis de las plantas transformadas con la construcción *gn3*/GUS indicó que la actividad GUS detectada era idéntica a la observada en las hojas de plantas sanas y que por tanto, la expresión dirigida por el promotor *gn3* no se induce en respuesta a ninguno de los tratamientos examinados.

III.3.3 Análisis de la expresión de los transgenes *gn1*/GUS y *gn3*/GUS en etapas iniciales del desarrollo de las plantas.

Debido a la ausencia de actividad GUS en el tejido foliar de plantas *gn3*/GUS jóvenes, así como en respuesta a los distintos tratamientos evaluados, se procedió a examinar dicha actividad en otras etapas del desarrollo y en distintos órganos y tejidos vegetales. Se comenzó analizando la actividad GUS en semillas en formación procedentes de frutos que se encontraban en diferentes etapas de maduración (de 4 a 15 días después de la floración) tanto en plantas *gn3*/GUS como en plantas *gn1*/GUS. Posteriormente, con objeto de realizar un análisis histológico durante la germinación, se sembraron semillas de ambas plantas transgénicas en placas con medio de crecimiento MS 0,5 en presencia de kanamicina, como se detalla en Materiales y Métodos. La manifestación de la actividad GUS se evaluó cada día hasta la formación completa de la plántula.

Como se muestra en la figura 7 se detectó actividad GUS en el interior de las semillas *gn1*/GUS durante su fase de formación y maduración. Igualmente, se detectaba dicha actividad en la zona de eclosión de la radícula, durante la germinación, mientras que una vez concluida la etapa germinativa la coloración azul se localizaba en la región radicular de la nueva plántula.

Por el contrario, no se detectó actividad GUS durante el proceso de formación de las semillas *gn3*/GUS, sin embargo, como se muestra en la figura 8, dicha actividad se localizaba en la zona de eclosión de la radícula y en la región de desarrollo de los cotiledones, en donde se mantuvo una vez finalizada la etapa germinativa. Igualmente, se detectó actividad GUS en el tejido vascular de plántulas de 1-2 semanas de desarrollo.

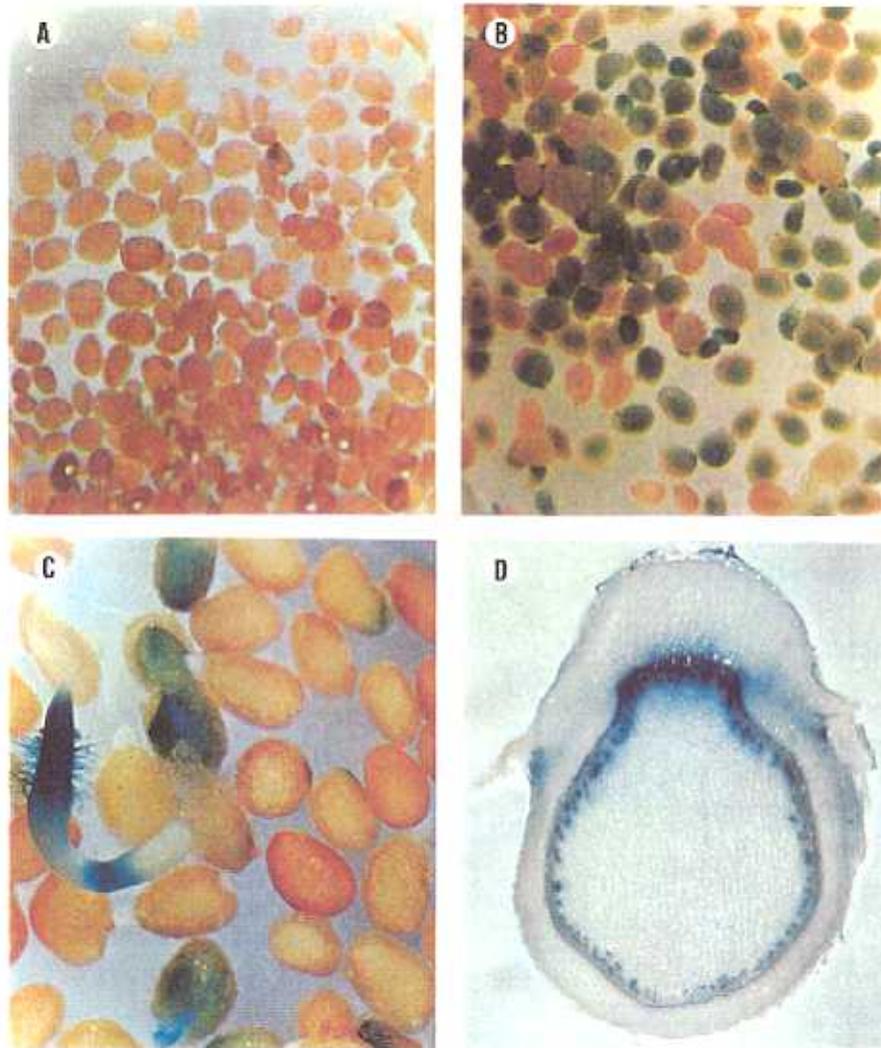
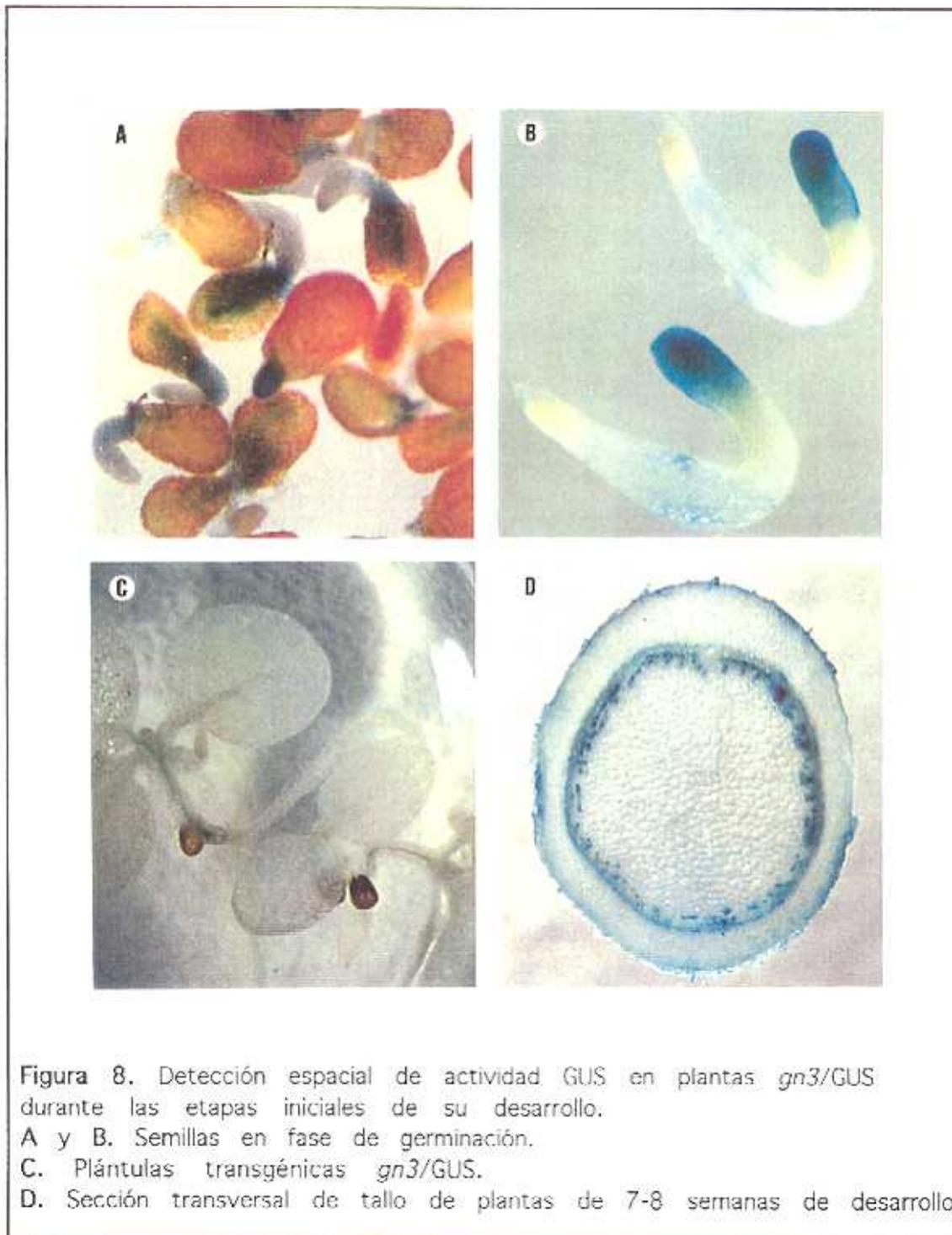


Figura 7. Detección de actividad GUS en semillas de plantas *gn1*/GUS durante las etapas de formación, maduración y germinación.

- A. semillas de plantas control sin transformar.
- B. semillas de plantas *gn1*/GUS en fase de crecimiento y maduración.
- C. semillas de plantas *gn1*/GUS en fase de germinación.
- D. sección transversal de tallo de plantas *gn1*/GUS.



Para definir el patrón de expresión del gen *gn3* y continuar la caracterización del gen *gn1*, se examinaron secciones transversales del tallo de plantas adultas (7-8 semanas). En ambas plantas transgénicas, la actividad GUS se localizaba en las células del floema, siendo de interés destacar que, en plantas *gn1/GUS*, los niveles más altos de actividad correspondían a la zona de abscisión de las hojas. Además, dicha expresión se extendían a células adyacentes del tejido floemático.

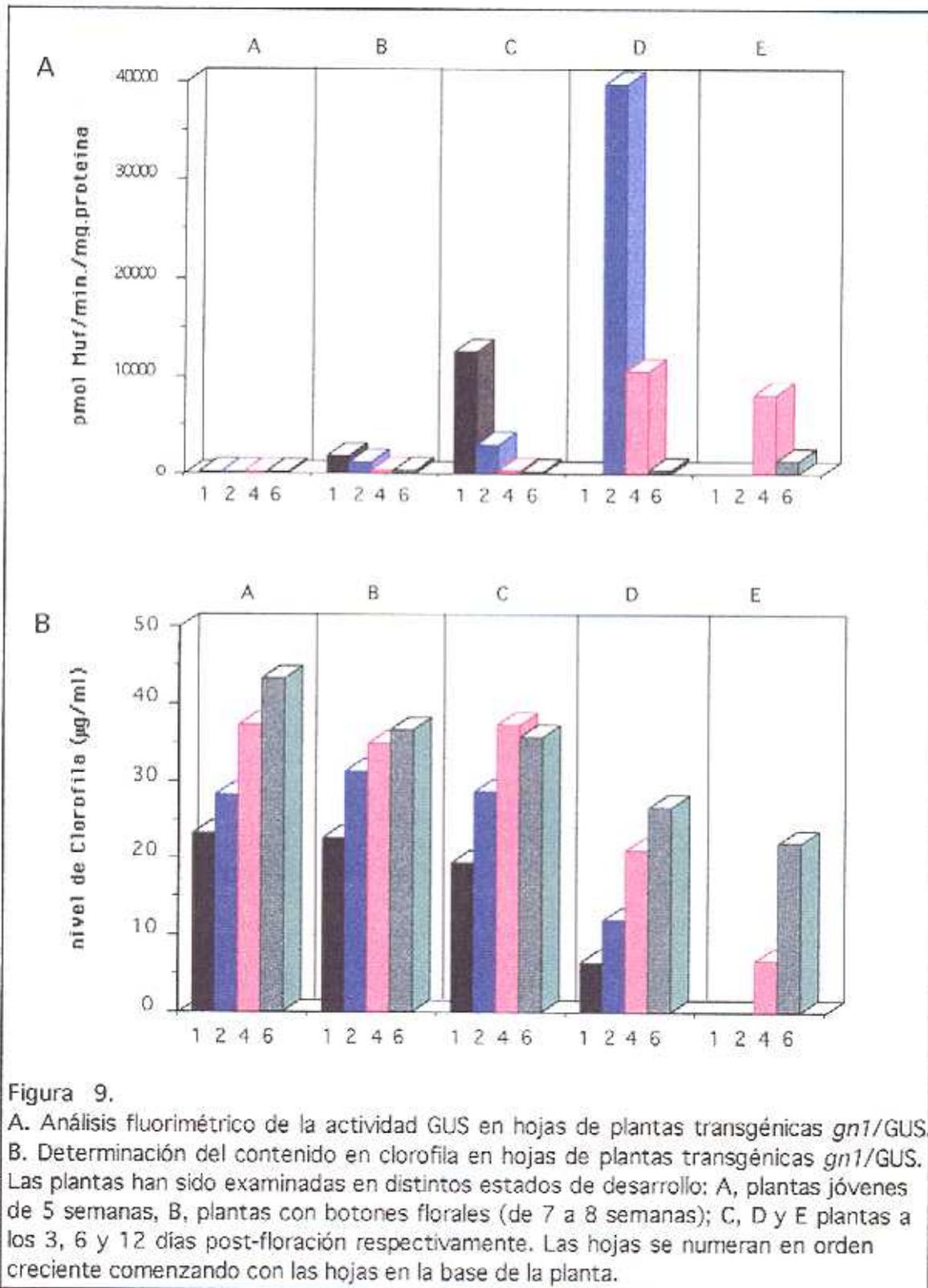
III.3.4 Análisis de la expresión de los transgenes *gn1/GUS* y *gn3/GUS* durante la senescencia foliar.

En contraste a la inducción de los enzimas con actividad $\beta(1,3)$ glucanasa durante el proceso de patogénesis, la existencia de isoenzimas en tejidos de flores (figuras 1 y 2) y de manera específica en otros tejidos de plantas sanas (figuras 7 y 8) podría sugerir su implicación en otras funciones importantes de los procesos fisiológicos asociados al desarrollo de la planta. Por otro lado, los resultados obtenidos en hojas de plantas sanas *gn1/GUS* indicaban la asociación entre la proteína GN1 y el envejecimiento foliar, por lo que decidimos estudiar la posible implicación de estos enzimas en el proceso de senescencia vegetal. Para ello se procedió al análisis fluorimétrico de actividad GUS en distintas etapas de crecimiento y maduración de plantas transgénicas, *gn1/GUS* y *gn3/GUS*. Se seleccionaron cinco etapas diferentes del desarrollo representadas por plantas jóvenes sin florecer (5 semanas), plantas con botones florales (7-8 semanas) y plantas a los 3 días, 6 días y 12 días post-floración. A los 6 días después de florecer podían observarse síntomas de clorosis en las hojas más bajas de las plantas. El análisis se realizó en las primera, segunda, cuarta y sexta

hojas desde la base al ápice de cada planta seleccionada. Los resultados mostrados en la figura 9A, revelan un ligero aumento de los niveles de expresión *gn1/Gus* en las hojas más bajas (1ª y 2ª) de las plantas con botones florales, aumentando significativamente en estas y de forma gradual, en el resto de las hojas analizadas entre los tres y seis días de la floración. A los 6 días post-floración se detectaron los niveles máximos de actividad. Los resultados correspondientes a los doce días post-floración indican una disminución, hasta la desaparición en el caso de las hojas más bajas, de los niveles de actividad GUS.

En las plantas *gn3/GUS* examinadas, no se detectó ningún aumento de actividad GUS siendo los niveles de expresión observados similares en todos los casos examinados (datos no mostrados).

Un signo marcadamente visible de la senescencia es la pérdida gradual de clorofila y consecuente amarilleamiento de la hoja que es detectado, inicialmente, en las hojas más bajas de la planta. Por consiguiente, era de interés conocer el contenido de clorofila, paralelamente, a los niveles de actividad GUS detectados en las plantas *gn1/GUS*. El nivel de clorofila fue analizado, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos, en las mismas hojas seleccionadas para el ensayo anterior. Los resultados mostrados en la figura 9B indican que, en todos los estadios examinados, el contenido en clorofila es siempre inferior en las hojas más bajas de la planta aumentando gradualmente hacia la parte apical donde las hojas más jóvenes muestran siempre los máximos valores. El contenido en clorofila de cada una de las hojas disminuye, además, de forma progresiva a medida que avanza el desarrollo de la planta experimentando una brusca disminución a los 6 días post-floración. Las plantas examinadas 12 días después de florecer revelaban una disminución aún más acusada de



éstos niveles en las hojas más altas de la planta, mientras que en las hojas más bajas, no fue posible detectar contenido en clorofila.

La disminución en el contenido de este pigmento coincide claramente con el aumento de los niveles de actividad GUS, reforzando nuestra observación anterior que permite establecer una asociación entre esta isoforma y los procesos de envejecimiento foliar. Debido a la falta de inducción de la actividad GUS en las plantas transgénicas *gn3*/GUS no es posible establecer una relación entre el gen *gn3* y la senescencia de la planta.

III.3.5 Localización de la expresión dirigida por el promotor *gn1* en tejidos senescentes.

En base a los resultados obtenidos anteriormente, y con objeto de completar el estudio de la posible implicación de las isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en procesos senescentes, analizamos a nivel histoquímico otros tejidos y órganos de plantas transgénicas *gn1*/GUS y *gn3*/GUS durante la senescencia de la planta. Se llevaron a cabo ensayos en pétalos, sépalos, carpelo y anteras de flores antes de su apertura, flores totalmente abiertas y flores con síntomas evidentes de envejecimiento. Los resultados mostrados en la figura 10 revelan claros niveles de inducción en los pétalos senescentes, sólo, en las plantas *gn1*/GUS (figura 10B). Además, en los sépalos no se observó ningún aumento de la expresión conferida por el promotor *gn1* hasta el total crecimiento del fruto, lo que provocaba un aparente desgarro de este tejido en puntos específicos. La actividad GUS estaba estrictamente localizada en dichos puntos y avanzaba a medida que el desgarro iba progresando (figura 10E y 10F). En las plantas *gn3*/GUS no se detectó actividad en ninguno de los órganos florales analizados.

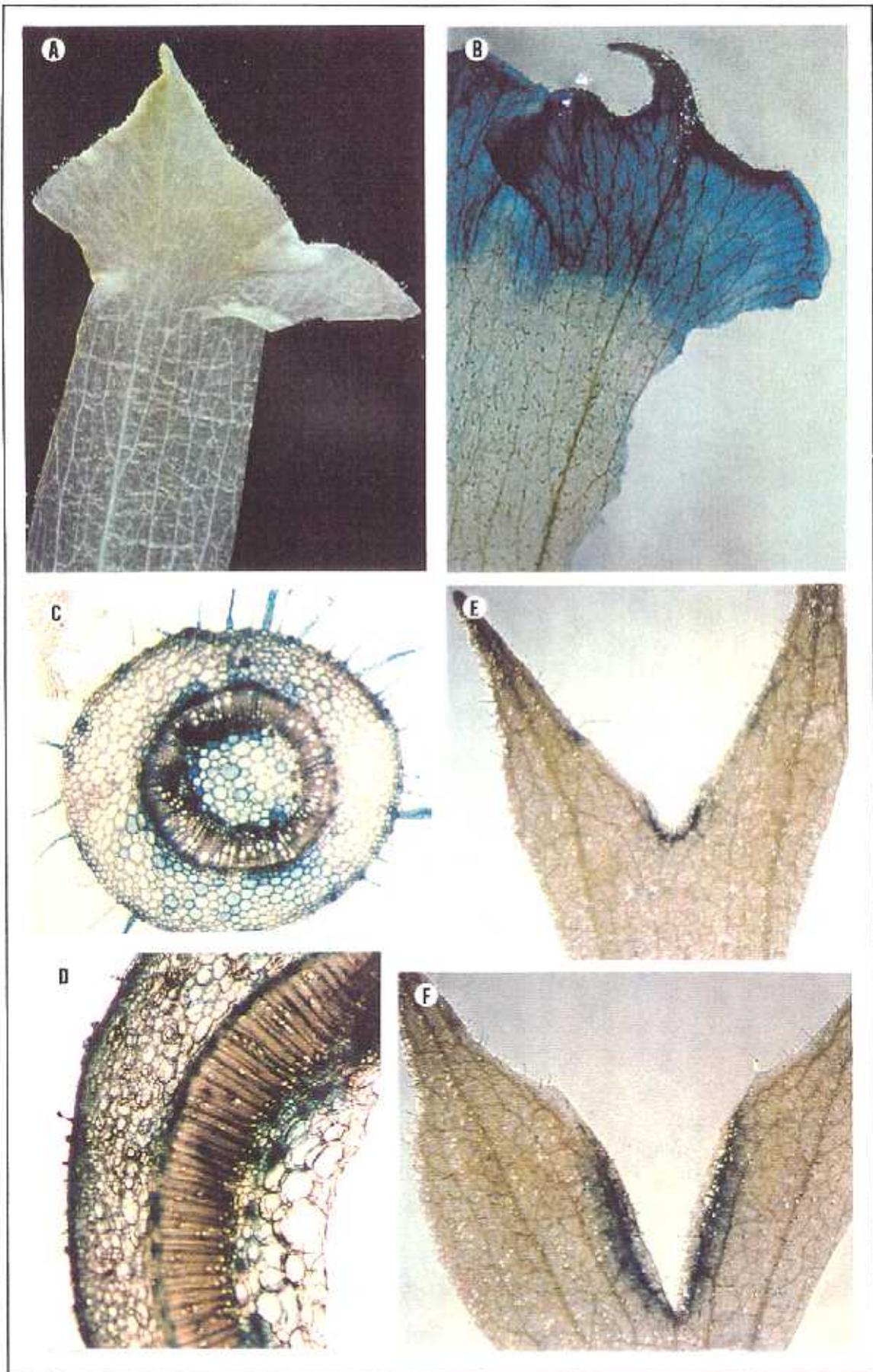


Figura 10

Se procedió, igualmente, a la realización de un ensayo histoquímico en secciones transversales del tallo de plantas senescentes de 11-12 semanas de desarrollo aproximadamente. Los cortes se obtuvieron de la parte basal, media y apical del tallo. En las secciones basales analizadas, se detectaron niveles muy altos de expresión *gn1/Gus* en el tejido vascular floemático del tallo y, sobre todo, de la zona de abscisión de las hojas que se extendía al resto de las células adyacentes. En el caso de las plantas *gn3/GUS* se observaron niveles de expresión en el floema idénticos a los observados en plantas jóvenes, (datos no mostrados). Al igual que los resultados observados en las hojas, existe un gradiente decreciente de la actividad GUS dirigida por el promotor *gn1* en el tallo de las plantas analizadas que es, por tanto, inferior en la parte apical de la planta. En ningún caso se detectó actividad GUS en las células correspondientes al xilema.

El xilema es un tejido complejo cuyas células maduras, aunque funcionales, están constituidas solamente de pared celular debido a la degeneración de su protoplasma. Esto nos sugirió examinar este tejido vascular en un estadio aún no diferenciado de manera que se pudiera completar este estudio con el análisis de ambos sistemas de transporte vegetal. Se procedió, entonces, al análisis histoquímico de secciones transversales del tallo de plántulas de 1-2 semanas de desarrollo y de secciones basales del tallo de plantas *gn1/GUS* jóvenes (7-8 semanas), donde el tejido xilemático estaba ya diferenciado. En la figura 10C, se observa la localización de la actividad GUS en el protoxilema, correspondiente a los primeros vasos xilemáticos formados. Es conocido que con el crecimiento del tallo el protoxilema se diferencia y madura elongando activamente y experimentando una situación de estrés que conduce a la degeneración del contenido celular lo que pone de

manifiesto la asociación de las $\beta(1,3)$ glucanasa básicas con un nuevo proceso relacionado con el estrés y muerte celular.

III.3.6 Análisis de la expresión de $\beta(1,3)$ glucanasa durante la senescencia vegetal.

Los datos mostrados hasta el momento revelan que la expresión conferida al gen GUS por el promotor *gn1*, se induce durante la senescencia de la planta.

Con objeto de examinar este proceso en más detalle y comprobar si afecta, de forma similar, a otras isoformas $\beta(1,3)$ glucanasa, así como a otros genes relacionados con la reacción de defensa vegetal se extrajo RNA a partir de 0,5 gramos de tejido del cotiledón y de las 1^a, 2^a, 4^a y 6^a hoja de plantas de *N.plumbaginifolia* antes de la floración y de plantas 3 días, 6 días, 9 días y 12 días después de haber florecido. Las hojas se numeran a partir de la base de la planta al igual que en experimentos anteriores. A los nueve días post-floración, con frutos en proceso de maduración, eran visibles síntomas de amarillamiento en las hojas más bajas de la planta.

El análisis de los transcritos por ensayos tipo Northern (figura 11), usando sondas radiactivas correspondientes a los genes *gn1* y *gn2*, para el estudio de las isoformas básicas permitió detectar una clara hibridación, con la movilidad electroforética esperada para dichos genes, en las muestras correspondientes a los seis días post-floración. Esta inducción pudo ser observada hasta los nueve días post-floración donde los niveles descienden, siendo indetectables en las muestras de RNA preparadas a partir de plantas a los doce días post-floración.

Se ha descrito que los enzimas con actividad chitinasa se inducen coordinadamente con las glucanasas. La utilización de una chitinasa

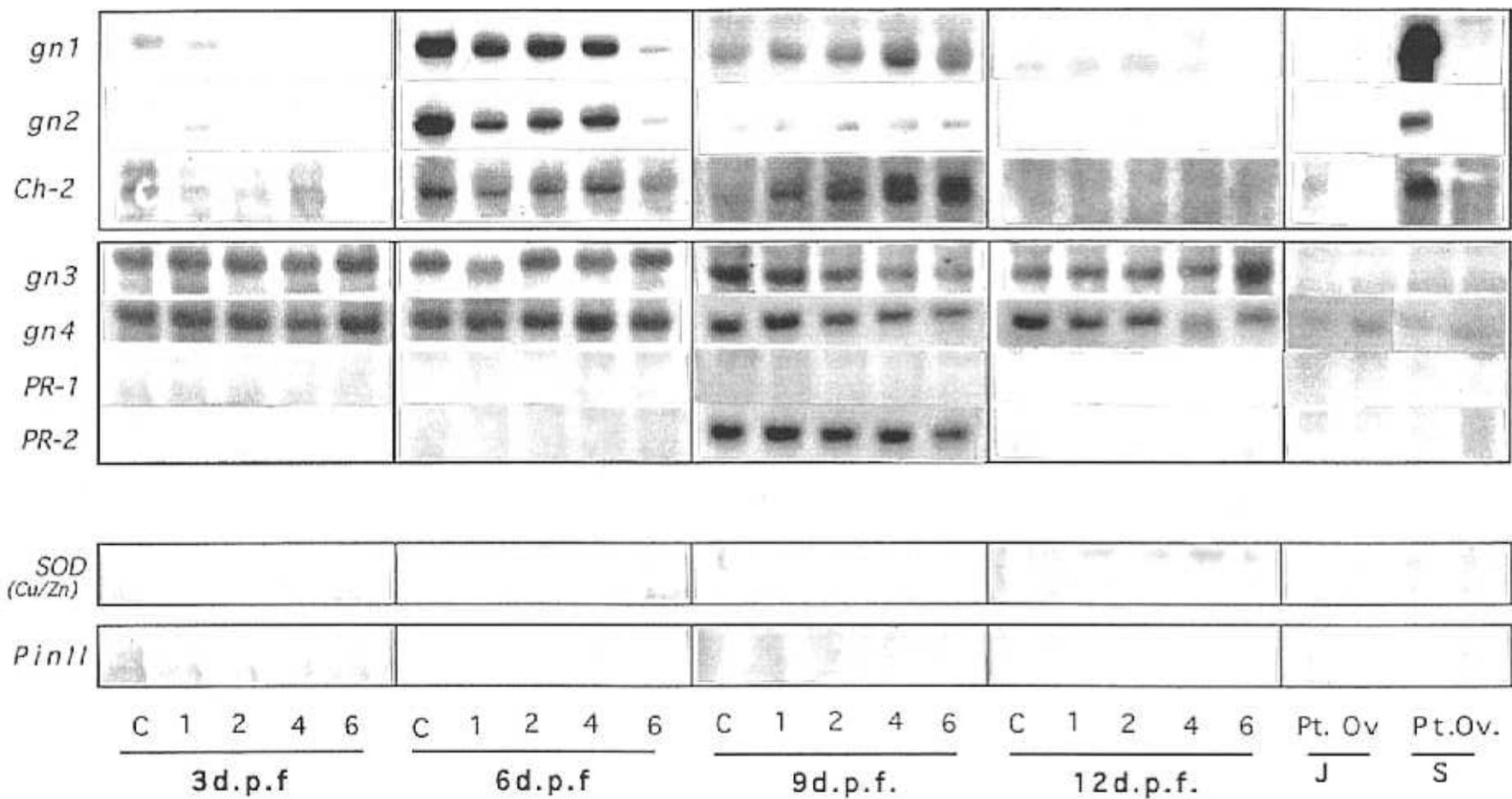


Figura 11.

básica como ribosonda mostró un patrón de inducción idéntico al de las glucanasas *gn1* y *gn2* analizadas, confirmando que efectivamente el control de la expresión de estas dos familias de genes está estrechamente regulada.

El análisis de los transcritos derivados de los genes *gn3* y *gn4* reveló que, al igual que había sido caracterizado en plantas jóvenes, existe un nivel basal de expresión constitutiva que no se ve alterado durante el proceso de senescencia.

Con objeto de analizar la implicación de otras proteínas PR en el envejecimiento foliar se utilizaron clones aislados de *N. tabacum* correspondientes a los genes de la *PR-2*, glucanasa ácida (Kauffman y col.,1987), y *PR-1a* (Cornelissen, 1986) una de las proteínas PRs más abundantes descritas en relación a la infección por el virus TMV, y a la que no se ha asociado ninguna actividad enzimática. Este último gen se induce tanto local como sistémicamente y es utilizado con frecuencia como marcador molecular de la reacción de defensa vegetal. Según se observa en la figura 11, la expresión del gen *PR-2* se induce durante la senescencia vegetal en las plantas examinadas 9 días después de la floración. Esta expresión ocurre, además, de forma similar en todas las hojas examinadas. A diferencia de estos resultados, no se detectaron los transcritos correspondientes al gen *PR-1* en ninguno de los tejidos analizados.

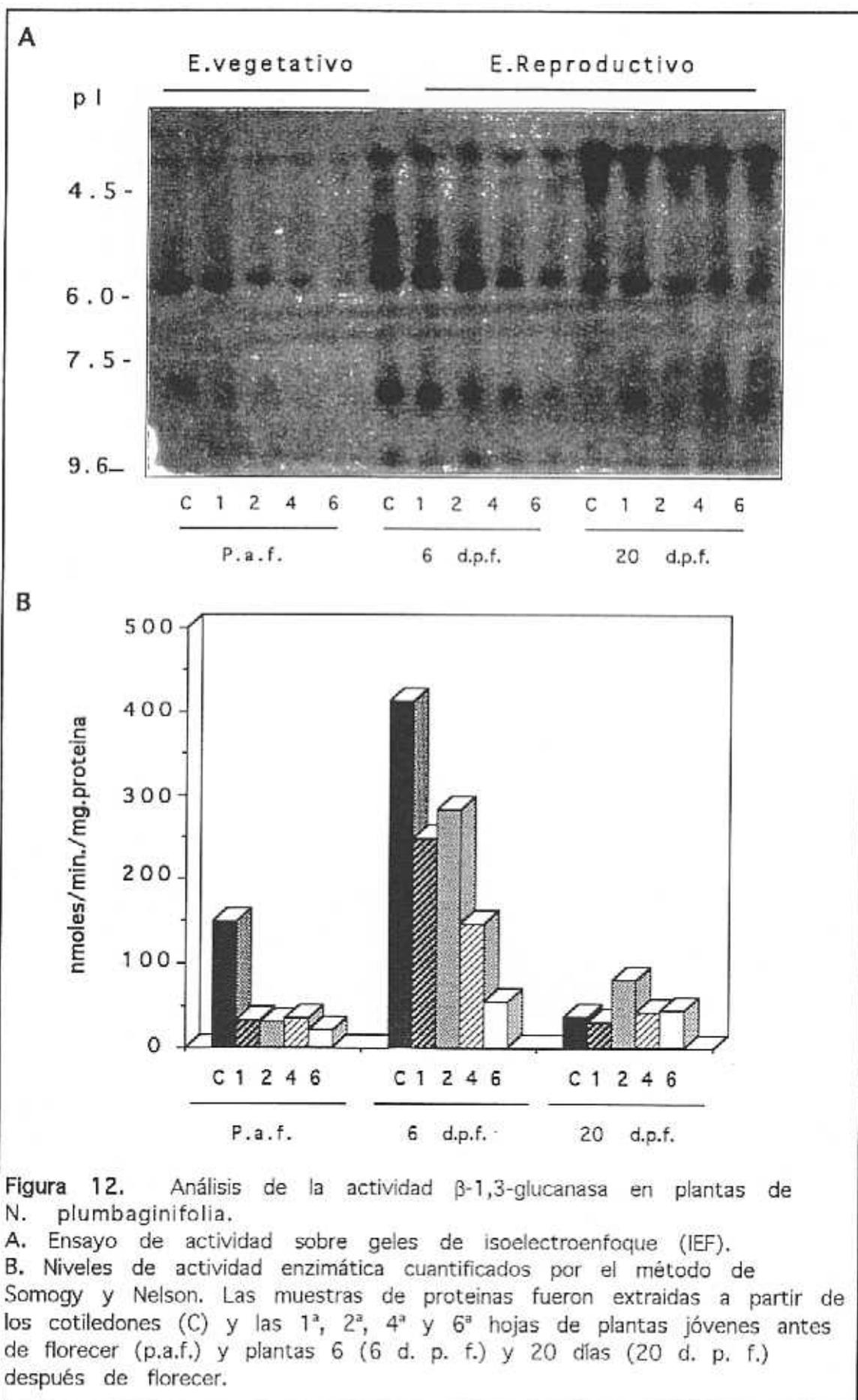
Finalmente, este estudio se completó mediante análisis de la expresión de los genes *Pin II* y *Cu/ZnSOD* que codifican, respectivamente, un inhibidor de proteínasa y el enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc. La expresión del gen *Pin II* está asociada al daño mecánico o herida vegetal (Huub J. M. Linthorst,1995), mientras que la del gen *Cu/ZnSOD* está relacionada con el estrés oxidativo. De

acuerdo a los datos obtenidos no se observó la inducción de la expresión de ninguno de los 2 genes descritos.

Las mismas sondas fueron utilizadas para el análisis de la expresión de estos genes en pétalos y ovarios de flores jóvenes y senescentes, distinguiéndose claramente altos niveles de expresión de los transcritos correspondientes al *gn1*, *gn2* y *ch-2* en las muestras extraídas de los pétalos senescentes, pero no en las de los pétalos de flores jóvenes. No fué detectada inducción en el tejido de ovarios de ninguno de los dos estados de desarrollo floral examinados. La inducción de la expresión del gen *gn4* era ligeramente detectada en las muestras correspondientes al tejido de ovario de flores jóvenes. No se detectó expresión en las muestras de RNA correspondientes al tejido de ovario y pétalos tanto de flores jóvenes como senescentes con ninguna de las otras sondas utilizadas, (*PR-1*, *PR-2*, *SOD* y *Pin II*).

III.3.7 Análisis de la actividad de isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa durante el proceso de senescencia en plantas de *N. plumbaginifolia*.

Con objeto de completar el estudio referente a la presencia de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa durante el envejecimiento vegetal, se determinó la actividad de dichos enzimas en plantas de *N. plumbaginifolia*, examinando tres estados de desarrollo que, como en casos anteriores, correspondían a plantas jóvenes sin flores (5 semanas), plantas 6 días después de florecer y plantas con síntomas visibles de clorosis y frutos desarrollados (aproximadamente 20 días después de la floración). Este último tiempo fue prolongado, respecto a ocasiones anteriores, con la intención de estudiar la permanencia de éstos enzimas durante dicho proceso. Para llevar a cabo este ensayo se hizo una



extracción de proteínas a partir de un gramo de tejido procedente del cotiledón, 1ª hoja, 2ª hoja, 4ª hoja y 6ª hoja de plantas crecidas hasta alcanzar cada uno de los estados establecidos y, se examinó la actividad glucanasa en geles de IEF (Ampholine PAGplate, Ph 3.5-9,5. Pharmacia). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12A, en la que se observa un aumento significativo de la actividad glucanasa correspondiente tanto a las isoformas básicas como a las ácidas en las plantas que habían florecido. La inducción de dichos enzimas, aunque mayor en las hojas más bajas, era detectada en todas las hojas examinadas. En el caso de las plantas examinadas 20 días después de la floración, los resultados diferían del estado anterior con respecto a las isoformas básicas que aunque eran aún observadas, experimentaban una disminución en sus niveles. Al contrario, para las isoformas ácidas la acumulación era mayor.

En la figura 12B se muestran los niveles de actividad enzimática determinada por el método de Somogy (1952) y Nelson (1957). La cinética de acumulación determinada revela que los niveles máximos de actividad corresponden, igualmente, a las muestras preparadas a partir de las plantas 6 días después de la floración. Estos resultados permiten confirmar que ambos tipos de isoformas, ácidas y básicas, se inducen a partir de la floración y durante el envejecimiento vegetal aunque con una cinética de acumulación diferente.

III.4 ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DE $\beta(1,3)$ GLUCANASAS POR TRATAMIENTOS ABIOTICOS.

Los resultados descritos hasta el momento permiten demostrar la participación de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en diversos procesos del

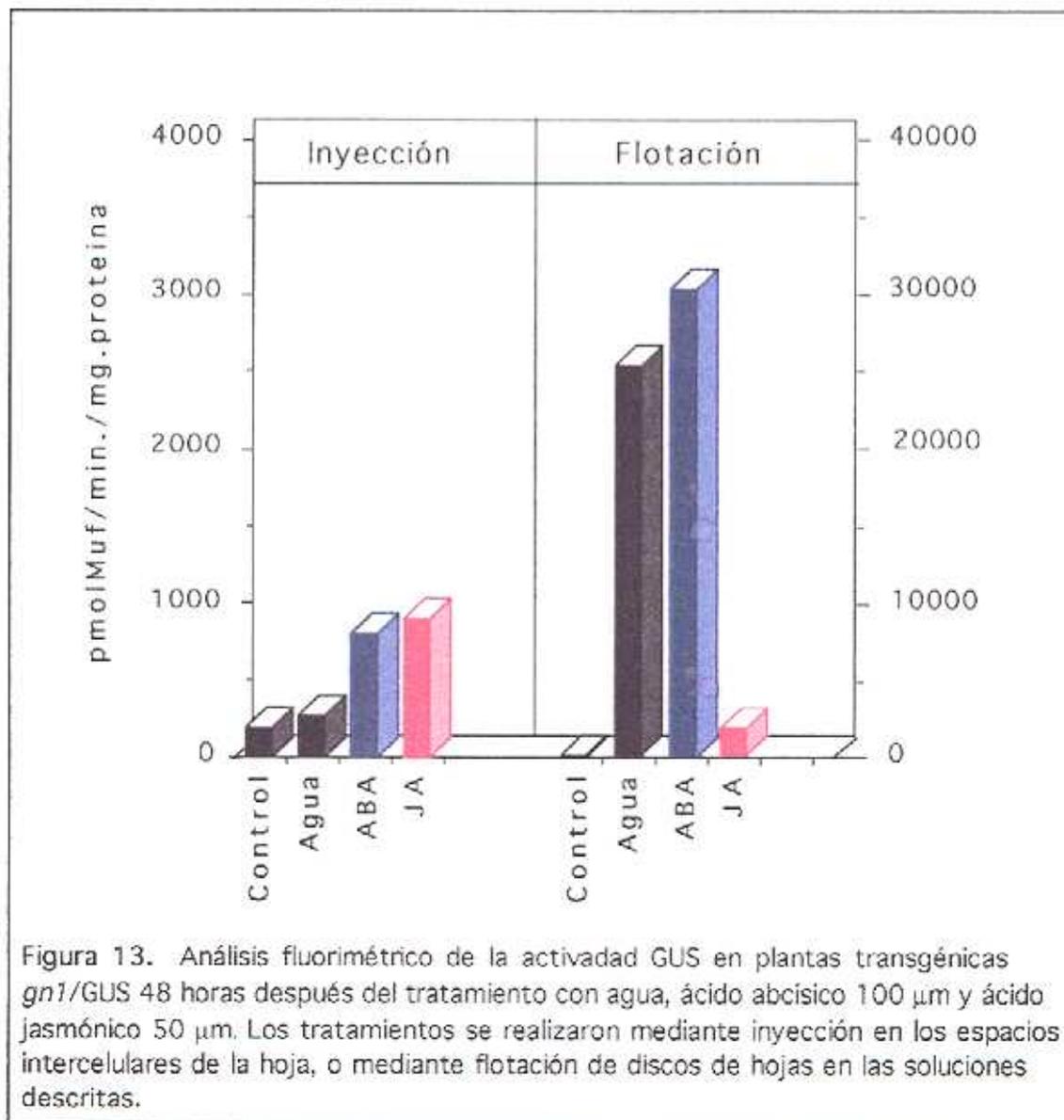
desarrollo de la planta y en procesos relacionados con la infección por microorganismos patógenos.

La participación de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en dichos procesos así como la de otros genes relacionados con la defensa vegetal, se examinó en más detalle mediante análisis de los niveles de expresión de los genes de interés en respuesta a tratamientos hormonales relacionados con los procesos de senescencia y patogénesis. Así, se examinó la expresión génica en respuesta a los siguientes tratamientos: ácido abscísico (ABA), hormona implicada en los procesos de senescencia (Thomas H. y col.,1980), estrés osmótico y desecación; ácido jasmónico, implicado en la reparación del daño mecánico y herida; y etefón, que tras su aplicación se descompone en la planta liberando etileno, la hormona implicada, entre otros procesos del desarrollo vegetal, en senescencia y abscisión. Además, se incluyó el tratamiento con ácido salicílico identificado por su participación como mensajero celular secundario en la activación de la reacción de defensa vegetal.

III.4.1 Análisis de la expresión dirigida por el promotor *gn1* en respuesta al tratamiento con agua, ácido jasmónico y ácido abscísico.

Dado que, generalmente, el protocolo establecido para los tratamientos de ABA y JA se realiza mediante flotación del tejido examinado, mientras que el resto de los tratamientos descritos, así como la inoculación bacteriana, se lleva a cabo por inyección, examinamos, como paso previo para definir nuestras condiciones experimentales, la actividad GUS dirigida por el promotor *gn1* en las plantas transgénicas *gn1/GUS* tratadas mediante flotación e inyección con los dos compuestos

descritos. Como control se evaluó el nivel de actividad GUS frente al tratamiento con agua realizado, igualmente, mediante flotación e inyección. El análisis de tejidos de hojas no tratadas se utilizó para determinar el nivel basal de actividad GUS.

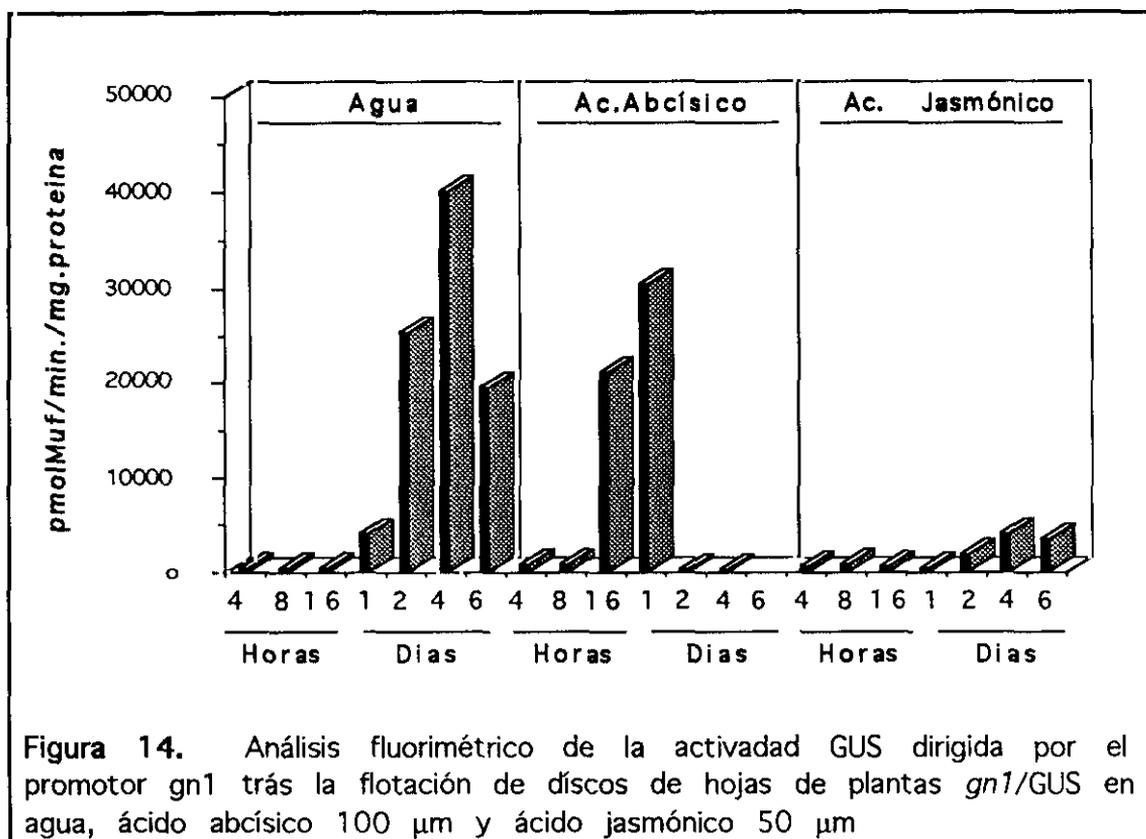


Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13 en la que se observa que la inyección con ABA o JA provoca una inducción de aproximadamente cinco veces en los niveles de actividad GUS, mientras que el tratamiento con agua muestra niveles de actividad similares a los detectados en el tejido sin tratar. La flotación de discos de hoja en agua durante el tiempo de experimentación (48 horas) provocó, sin embargo,

una fuerte inducción en los niveles de actividad GUS siendo sólo superado este valor en la muestra sometida a flotación en presencia de ABA. La inducción detectada con el ácido jasmónico fue 16 veces inferior a la alcanzada con el ABA y con el agua. Los resultados obtenidos indican que los dos compuestos examinados, ácido abscísico y ácido jasmónico, provocan la inducción del promotor *gn1*, y que dicha inducción se conseguía, aunque a distinto nivel, con los dos sistemas de aplicación, flotación e inyección, examinados.

Es difícil adjudicar sin embargo, la inducción de la actividad GUS evaluada en los tratamientos realizados por flotación, a los compuestos ácido jasmónico y ácido abscísico ya que la flotación en agua de los discos de hojas *gn1*/GUS provoca un aumento prácticamente idéntico al obtenido en presencia de ABA. Estos resultados se examinaron en más detalle analizando los niveles de actividad GUS a distintos tiempos de tratamiento, observándose, figura 14, que la inducción por flotación en agua y ABA se inicia a las 24 horas y alcanza su nivel máximo a los 4 y 2 días respectivamente. A diferencia de la inducción por agua, la actividad GUS evaluada en respuesta al tratamiento con ABA desciende hasta los niveles basales a los 4 días de tratamiento coincidiendo con la aparición de síntomas cloróticos inducidos, específicamente, en respuesta a este tratamiento. La inducción observada en respuesta al tratamiento con ácido jasmónico se inicia a las 48 horas y se mantiene, al menos, hasta los 6 días examinados. Es importante resaltar que, los máximos valores de actividad GUS detectados corresponden al tratamiento de flotación en agua por lo que, en base a estos resultados, es posible concluir que la expresión dirigida por el promotor *gn1* se modifica de forma significativa en respuesta a la alteración del equilibrio osmótico celular.

Del mismo modo se examinó la expresión GUS dirigida por el



promotor *gn3* cuyos resultados mostraban los niveles constitutivos observados en experimentos anteriores sin experimentar aparentemente, ninguna modificación, indicando que la regulación de dicho gen no se encuentra bajo el efecto de ninguno de los tratamientos examinados, al menos en esas condiciones.

III.4.2 Análisis de la expresión de $\beta(1,3)$ glucanasa en respuesta al tratamiento con agentes abióticos.

III.4.2.1 Estrés osmótico.

El estudio realizado se examinó en más detalle mediante análisis del nivel de expresión de diversos genes relacionados con la defensa vegetal en respuesta a los tratamientos de flotación examinados. Se extrajo RNA a distintos tiempos y se determinó la presencia de los transcritos de interés mediante análisis tipo Northern (figura 15).

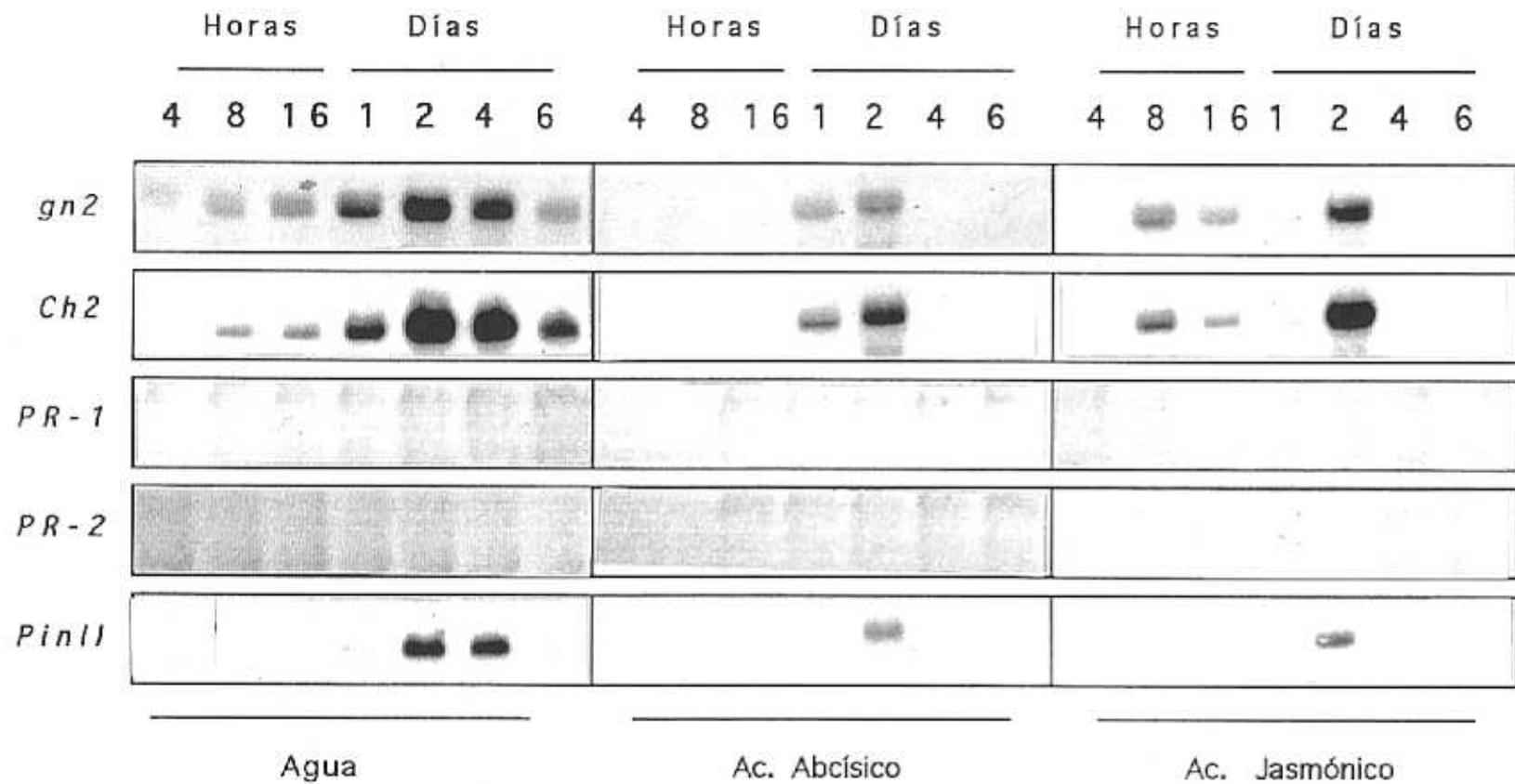


Figura 15. Análisis de la expresión de genes relacionados con la defensa vegetal en discos de hojas de plantas *gn1/GUS* sometidos a flotación en agua, ácido abscísico 100µm y ácido jasmónico 50 µm.

De acuerdo a los datos obtenidos en el ensayo fluorimétrico, el nivel del mensajero *gn2* se induce a las 8 horas de flotación en agua alcanzando máximos niveles entre los 2 y los 4 días de tratamiento, mientras que con la aplicación de ABA la inducción era menor y se detectaba sólo en las muestras de RNA correspondientes a las 24 y 48 horas. Durante el tratamiento con JA, se observaba un primer pico de inducción del gen *gn2* a las 8 horas seguido de un segundo pico de inducción a las 48 horas de tratamiento. El nivel y la cinética de acumulación de los transcritos derivados del gen *ch2* era similar a la descrita para el gen *gn2*.

Igualmente, los tratamientos analizados inducen la expresión del gen *Pin II*, observándose de nuevo los máximos niveles en el tratamiento de flotación con agua. Un patrón de expresión similar al detectado para el gen *Pin II* se encontró cuando se empleó el gen *Cu,Zn/SOD* como sonda de hibridación siendo, aunque, significativamente más bajos los niveles de inducción alcanzados (dato no mostrado).

Finalmente, no se detectó la acumulación de los transcritos correspondientes a los genes *PR-2* y *PR-1* en ninguno de los tratamientos examinados.

III.4.2.2 Estudio de la expresión de isoformas ácidas y básicas frente a tratamientos hormonales.

Se examinó la activación transcripcional de diversos genes relacionados con la defensa vegetal en respuesta a los tratamientos con ABA y JA, en este caso realizados mediante inyección, y se comparó con la respuesta a los tratamientos con SA y etefón realizados también por inyección. En este caso, se procedió a la extracción del RNA total de las

hojas a las 16, 24 y 48 horas después de la aplicación de cada tratamiento.

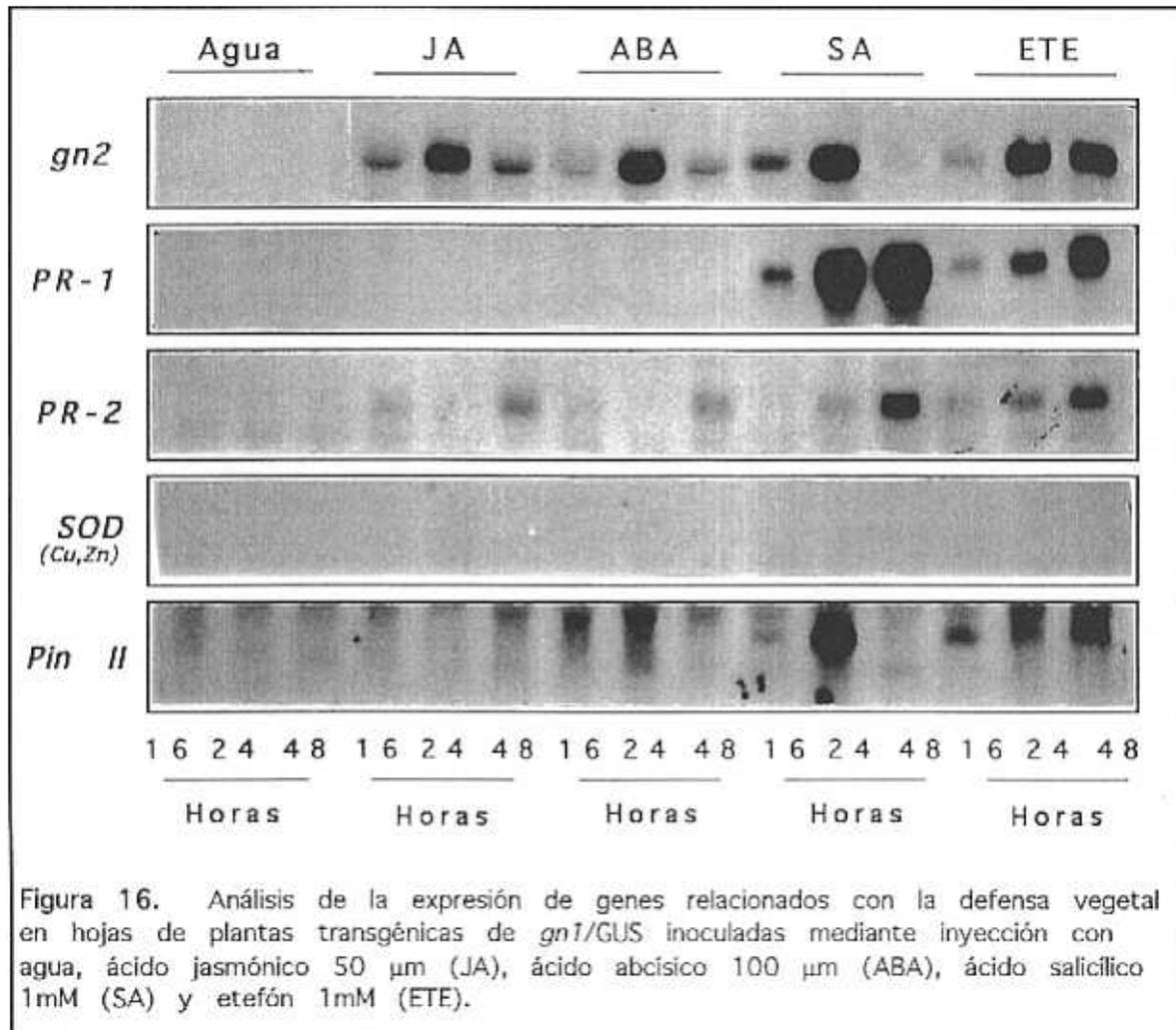


Figura 16. Análisis de la expresión de genes relacionados con la defensa vegetal en hojas de plantas transgénicas de *gn1/GUS* inoculadas mediante inyección con agua, ácido jasmónico 50 μ M (JA), ácido abscísico 100 μ M (ABA), ácido salicílico 1mM (SA) y etefón 1mM (ETE).

Los resultados obtenidos en este estudio, mostrados en la figura 16, permiten concluir que el gen *gn2* se induce en respuesta a los cuatro tratamientos examinados correspondiendo el nivel máximo de acumulación al tiempo de 24 horas y prolongándose en el caso del etefón hasta, al menos, las 48 horas. Al igual que los resultados descritos para el gen *gn2*, la expresión del gen *PR-2* se induce en todos los tratamientos examinados. No obstante los niveles alcanzados son significativamente más bajos y la máxima acumulación se detectó a las 48 horas de tratamiento. La expresión del gen *PR-1* se induce, exclusivamente, en respuesta a los tratamientos con SA y etefón, detectándose la presencia

de los transcritos correspondientes en todos los tiempos analizados. Un patrón de expresión similar al descrito para el gen *PR-1* se encontró cuando se examinó la respuesta del gen *Pin II*, aunque los niveles de RNA inducidos mediante tratamientos con SA decaen a las 48 horas de tratamiento. No se detectó ninguna señal de hibridación cuando se utilizó una sonda derivada del gen *Cu,Zn/SOD*.

III.5 ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LOS ENZIMAS $\beta(1,3)$ GLUCANASA EN RESPUESTA A LA INFECCION POR MICROORGANISMOS PATOGENOS.

III.5.1 Selección y caracterización de los sistemas huésped patógeno estudiados.

Con objeto de examinar la participación de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en la respuesta de defensa vegetal, así como la de otros genes de la planta involucrados en este proceso se seleccionaron dos cepas bacterianas *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* que establecen una interacción del tipo incompatible y compatible, respectivamente, en plantas de tabaco.

Para disponer de un sistema planta patógeno adecuado, además de seleccionar los microorganismos cuya interacción se desea examinar, hay que determinar, experimentalmente, la densidad de inóculo empleada.

Las condiciones experimentales más adecuadas para desarrollar este estudio se seleccionaron evaluando la aparición y evolución de síntomas, por inspección visual diaria, aparecidos en las hojas de la planta inoculada con distintas dosis de inóculo. Se eligieron tres dosis de inóculo diferentes de 10^8 ufc/ml, 10^7 ufc/ml y 10^6 ufc/ml. La dosis más alta de inóculo (10^8 ufc/ml) no permitía diferenciar significativamente,

de forma visual, la respuesta vegetal frente a las dos bacterias, durante los primeros días de la infección. La inoculación con la bacteria *P. s. pv. tabaci* provocaba, a esa concentración, una lesión aparentemente similar a la lesión hipersensible. Posteriormente, la infección progresaba con la formación de zonas cloróticas, que se extendían desde las zonas de infección, ocupando una amplia superficie de la hoja. A diferencia de lo que ocurre con esta bacteria, la infección provocada por la bacteria *P. s. pv. syringae* no permitía observar, en ningún caso, la formación de zonas cloróticas alrededor de la zona hipersensible para ninguna de las dosis de inóculo utilizadas, estando los síntomas en la hoja estrictamente limitados a la zona de inoculación inicial.

Con la dosis de inóculo más baja, de 10^6 ufc/ml, se apreciaba una disminución y retraso en la aparición y desarrollo de los síntomas en respuesta a la infección con ambas bacterias. Esta dosis tampoco permitía una distinción clara de los dos tratamientos durante los primeros etapas de infección.

A diferencia de los resultados descritos, la dosis de inóculo de 10^7 ufc/ml permitía distinguir con claridad la respuesta vegetal durante el establecimiento de ambas interacciones huésped-patógeno. En las figuras 17 y 18 se presenta la nomenclatura utilizada para designar los síntomas que aparecen durante el establecimiento de las dos interacciones huésped-patógeno examinadas, así como la fotografía de los estadios sintomatológicos más significativos para cada una de ellas. En el caso de la bacteria *P. s. pv. syringae* se observaba la evolución típica de una lesión hipersensible. A las 24 horas de la infección era posible observar el comienzo de la manifestación de una lesión necrótica que quedaba claramente establecida y limitada al área inoculada a los 4 días post-infección. A partir de este momento la lesión hipersensible variaba sólo en el grado de deshidratación y necrosis del tejido infectado.

D.p.i.	1	2	4	8	12	16
<i>P.s.syringae</i>	+/-	+	++	+++	++++	++++
<i>P.s.tabacci</i>	0	0	1	2	3	4

Figura 17.

Nomenclatura utilizada para definir la sintomatología observada durante el establecimiento de las interacciones planta-patógeno incompatible (*P. s. pv. syringae*) y compatible (*P. s. pv. tabaci*) examinadas :

+/-, área infiltrada visible, aunque no necrótica; +, área infiltrada visible con necrosis suave; ++, necrosis definida; +++, necrosis intensa; +++++, necrosis intensa con máximo nivel de deshidratación.

0, no síntomas; 1, clorosis suave; 2, lesiones necróticas aisladas rodeadas de áreas cloróticas; 3, intensas áreas necróticas rodeadas de clorosis; 4, necrosis rodeadas de extensas áreas cloróticas.

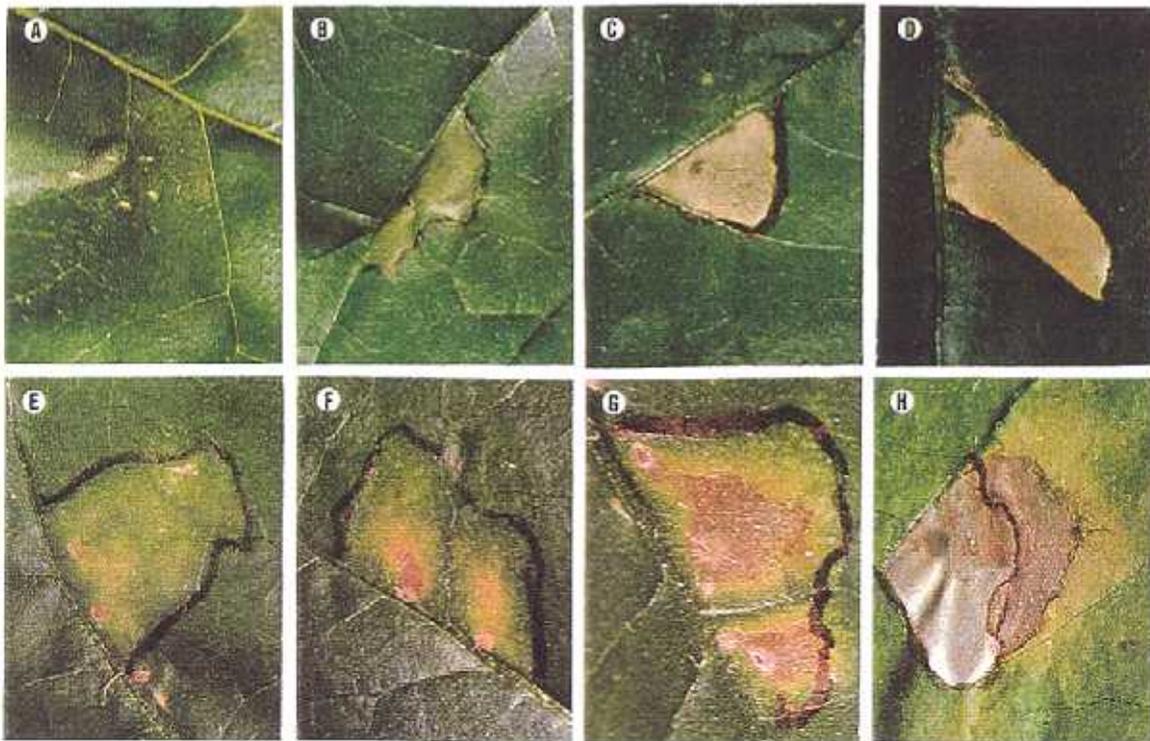


Figura 18. Evolución de los fenotipos resistente (arriba) y susceptible (abajo) de plantas de *N. tabacum* inoculadas con las bacteria *P. s. pv. syringae* (arriba) y *P. s. pv. tabaci* (abajo), respectivamente. Los síntomas representados corresponden a los siguientes tiempos post-inoculación: A, 24h; B, 2 días; C, 4 días; D, 8 días; E, 4 días; F, 8 días; G, 12 días y H, 16 días.

En el caso de la bacteria patógena *P. s. pv. tabaci* se apreciaba el establecimiento y evolución de una infección que progresaba desde el área inicialmente inoculada. La aparición de los síntomas, en este caso, también difiere temporalmente de la interacción incompatible anteriormente mencionada. Sólo a los 3-4 días después de la inoculación comenzaban a detectarse los primeros síntomas de la enfermedad consistente en un ligero amarilleamiento del área infiltrada seguido de la formación de lesiones necróticas de pequeño tamaño. Ambos síntomas avanzaban, progresivamente, ocupando todo el área inoculada entre los 4 y 8 días post-infección. Eventualmente, a los 8 días podían ser observados los primeros indicios de la progresión de la infección por la aparición de bordes cloróticos alrededor del área inicialmente infectada, que progresan paulatinamente hasta los 16 días analizados donde podía observarse un evidente avance del daño tisular.

III.5.2 Análisis de la expresión dirigida por el promotor *gnl* durante el establecimiento de una interacción del tipo incompatible en plantas de *N. tabacum*.

Anteriormente a este trabajo, la inducción de la expresión del gen *gnl* había sido observada a las 24 y 48 horas post-inoculación, identificándose que dicha expresión ocurría preferentemente, en las células que ocupan los bordes de la lesión hipersensible. Con el fin de extender estos análisis se procedió a examinar dicha expresión durante la formación y aparición de la lesión, y a determinar el tiempo mínimo necesario para que tenga lugar la inducción del gen mencionado. Para ello, se determinó la actividad GUS en plantas transgénicas *gnl/GUS* inoculadas con la bacteria necrotizante *P. syringae pv. syringae* y se

realizó un análisis, a nivel histoquímico, de la expresión dirigida por el promotor *gnl* a distintos tiempos post-inoculación.

Las infecciones se realizaban en pequeños sectores de una de las dos mitades de cada hoja ensayada. Como controles se analizaban secciones de tejido sin tratar de la mitad de la hoja opuesta a la infectada. Todas las plantas fueron inoculadas en la cuarta hoja. Se cortaron las secciones de tejido fresco que abarcaban el área inoculada y, posteriormente, fueron incubadas con el substrato cromogénico X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3 indol-beta-D-ácido glucurónico cyclohexylamonium salt) según se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 19. Las secciones analizadas 12 horas después de la inoculación revelaban la presencia de niveles bajos de actividad, que aumentaba a las 24 horas, ocupando en ambos tiempos todo el área infectada. A partir de las 48 horas, y hasta los cuatro días post-infección, se observó una disminución paulatina en la actividad GUS correspondiente al interior de la zona inoculada comenzando a desaparecer la coloración azul por la zona central de dicho área. A los cuatro y ocho días post-inoculación, cuando los síntomas externos característicos de la lesión hipersensible estaban claramente establecidos, la actividad GUS se localizó casi exclusivamente en las células que bordean la zona necrótica. Este patrón de expresión se mantiene, igualmente, en las muestras analizadas a los 12 días post-inoculación, cuando la lesión hipersensible mostraba síntomas patentes de deshidratación y muerte celular. Desde este momento y hasta los dieciseis días post-inoculación se observaba una evidente disminución de la actividad hasta su total desaparición.

De forma paralela se realizó un análisis fluorimétrico para cuantificar la actividad observada durante la interacción examinada,

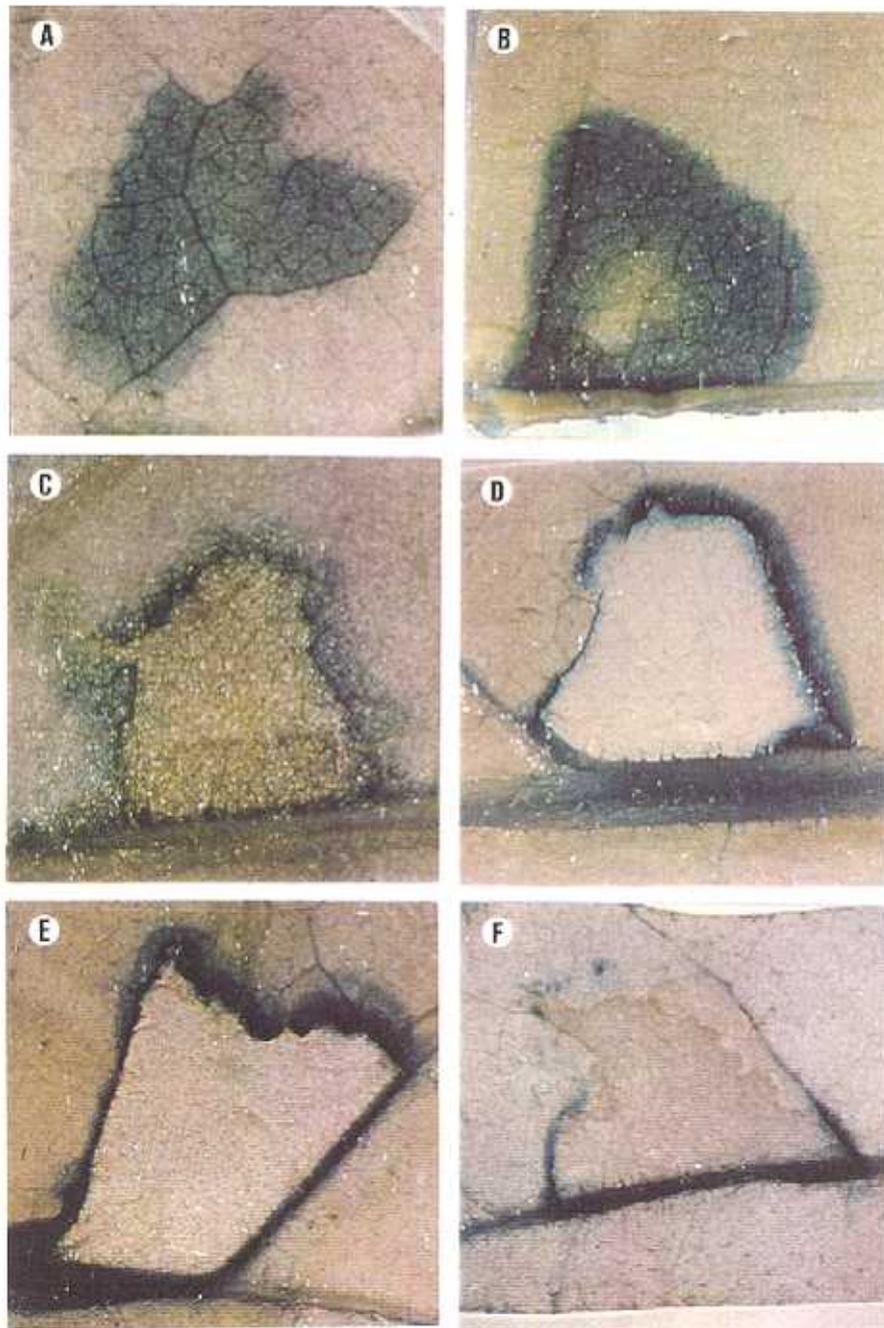
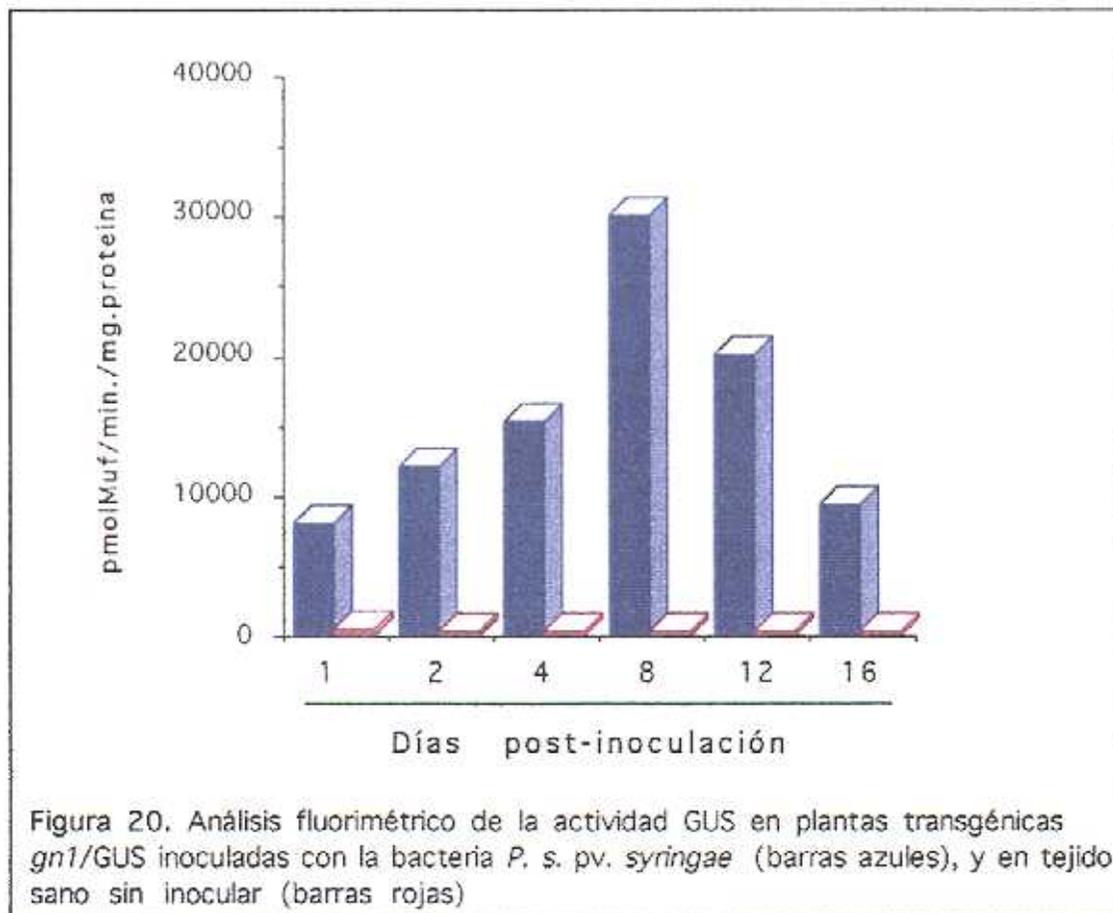


Figura 19. Análisis histoquímico de actividad GUS en plantas transgénicas *gn1/GUS* inoculadas con la bacteria *P. s. pv. syringae*. La localización de actividad GUS se realizó a las 24 horas (A); 2 días (B); 4 días (C); 8 días (D); 12 días (E) y 16 días (F) post-inoculación.

cuyos datos se muestran en la figura 20. Desde las 24 horas fue posible detectar claros niveles de inducción que aumentaban, progresivamente, hasta los 8 días post-inoculación, tiempo al que se observó el máximo nivel de actividad GUS. A los 12 días y hasta los 16 días la actividad evaluada disminuye equiparándose a la detectada a las 24 horas de infección.

En ningún caso se detectó actividad GUS en los fragmentos de hojas procedentes de plantas no tratadas que fueron examinados y utilizados como control.

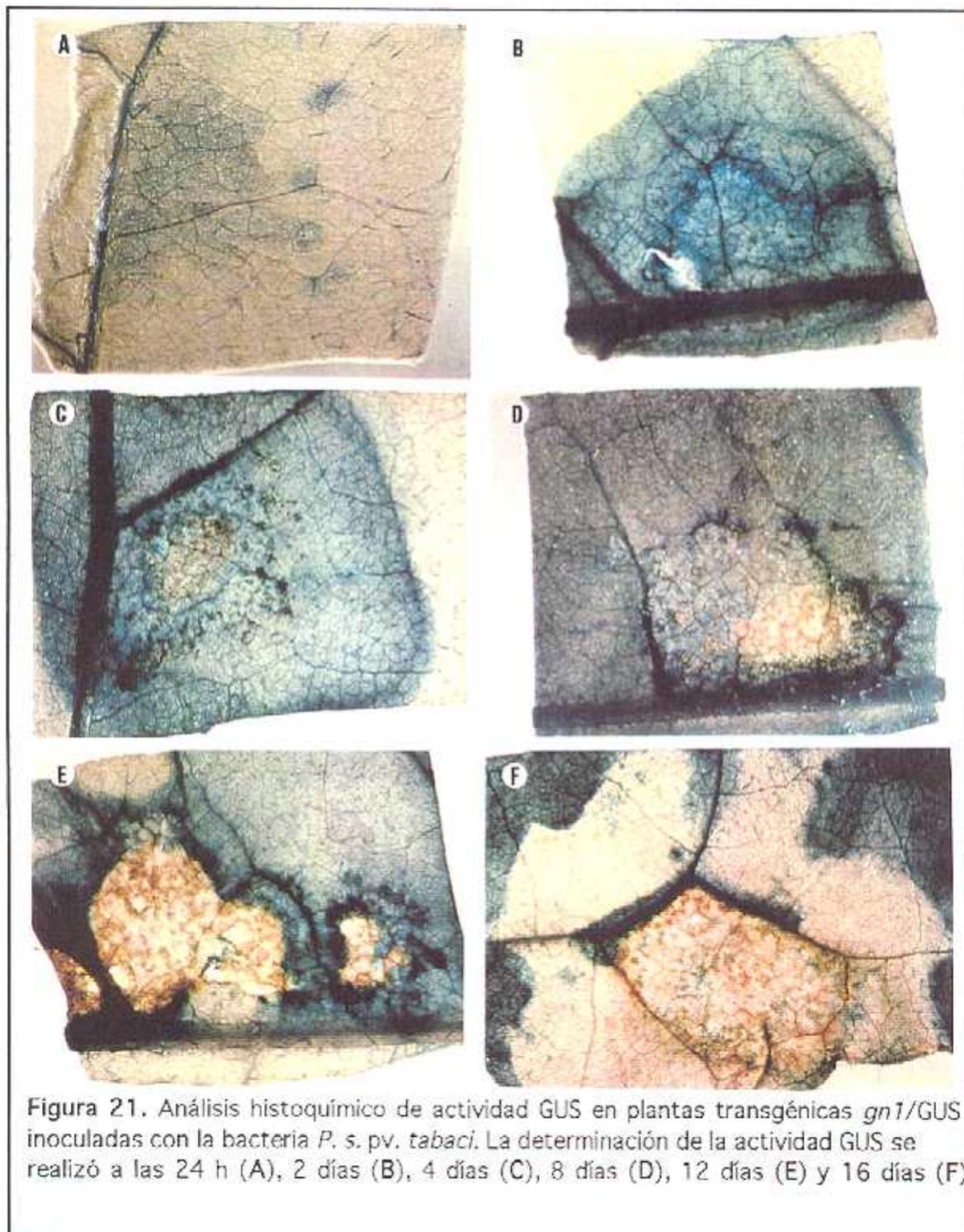


Estos resultados indican que la inducción de la expresión *gn1/Gus* precede a la aparición de los síntomas y desaparece con el completo colapso celular del área infectada, lo que permite establecer una correlación directa entre la inducción de la expresión del gen *gn1* y la programación del proceso de muerte celular característico de la reacción hipersensible.

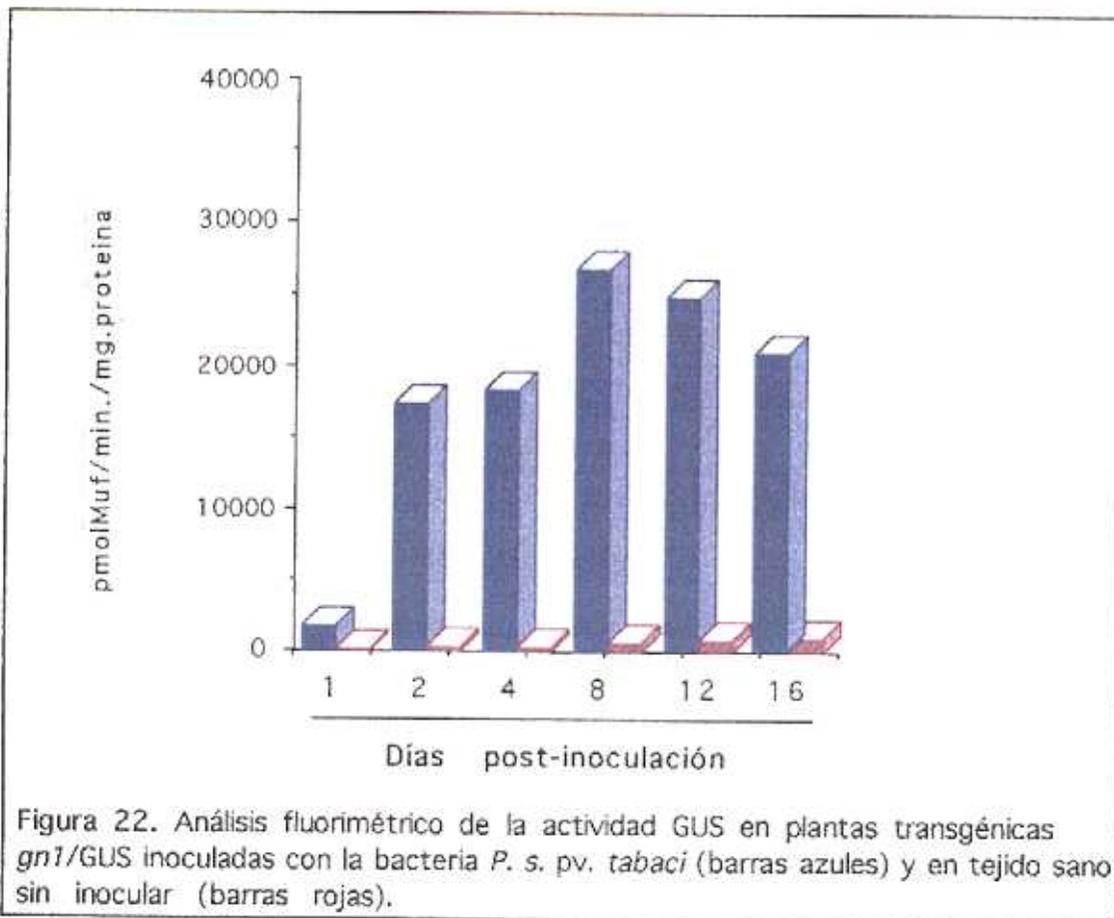
III.5.3 Análisis de la expresión dirigida por el promotor *gn1* durante el establecimiento de una interacción compatible en plantas de *N.tabacum*.

El estudio de la interacción compatible se llevó a cabo paralelamente al descrito anteriormente, por lo que los tiempos seleccionados y las condiciones de incubación de los microorganismos utilizados fueron los mismos que aquellos establecidos para el estudio anterior.

El análisis histoquímico de actividad GUS permitió observar una ligera coloración azul, a las 24 horas post-inoculación que se distribuía homogénea y paulatinamente dentro del área inoculada. La actividad detectada aumentaba progresivamente, tanto en intensidad como con respecto al área afectada, durante la infección pudiéndose observar, a los 8 días post-infección, la expansión de la zona teñida fuera del área inoculada. A este tiempo, se podía apreciar el inicio del avance de los síntomas cloróticos en el tejido adyacente al infectado inicialmente, coincidiendo este área con la localización de la actividad GUS. Entre los 12 y 16 días post-infección, la actividad GUS se detectaba fuera del área afectada, induciéndose en todo el tejido foliar afectado por el daño tisular que acompaña al avance de la infección, figura 21. A su vez, la actividad desaparece del área inicial inoculada en donde se manifiesta



una intensa necrosis y , por tanto, deshidratación y muerte del tejido afectado.



La actividad GUS por ensayo fluorimétrico fue medida también en este experimento. Como se muestra en la figura 22, no se detectaba un aumento significativo de actividad hasta los 2 días post-inoculación, al igual que lo observado en el examen histológico. Estos niveles se mantenían prácticamente iguales hasta los cuatro días post-infección aumentando, significativamente, a los ocho días de infección donde se detectó el máximo valor de actividad. Dichos valores experimentaban, sólo, un ligero descenso a los 12 y 16 días debido, probablemente, a la inducción de la actividad en el tejido infectado durante el avance de la enfermedad.

En la mitad de la hoja utilizada como control, no se observaban síntomas, y tampoco se detectó inducción en la actividad GUS, para ninguno de los ensayos realizados.

El hecho de que la actividad GUS se induzca en este tipo de interacción indica, que la inducción del promotor *gnl* no es exclusiva del establecimiento de una interacción incompatible. Estos resultados ponen de manifiesto, además, que durante una interacción compatible, la expresión dirigida por dicho promotor no se restringe al área inoculada, cómo en el caso de un lesión hipersensible, si no que se localiza en todas aquellas regiones infectadas que muestran síntomas o que los desarrollarán posteriormente.

III.5.4 Análisis de la respuesta de defensa en plantas senescentes.

Para investigar si el aumento de actividad basal $\beta(1,3)$ glucanasa detectado en las hojas de plantas sanas después de la floración, modifica de alguna manera, el establecimiento de la interacción hiesped-patógeno, se procedió a inocular las cepas bacterianas, *P. s. pv. syringae* y *P. s. pv. tabaci*, en plantas *gnl/GUS* durante el inicio de la senescencia, aproximadamente 6 días después de la floración. Las plantas seleccionadas presentaban ligeras variaciones de desarrollo, pero en todos los casos, las tres hojas más bajas presentaban síntomas claros de amarilleamiento.

Se utilizó la dosis de inóculo de 10^7 ufc/ml establecida anteriormente para nuestros estudios y se evaluó mediante inspección visual diaria la aparición y evolución de los síntomas.

A las 24h de la inoculación con la bacteria *P. s. pv. syringae* podían distinguirse, en las tres hojas más bajas de la planta lesiones

hipersensibles totalmente desarrolladas, a diferencia de lo que ocurre en las hojas apicales para las que, a ese tiempo, empiezan a vislumbrarse los primeros síntomas de infección. En estas hojas (apicales), la infección progresa formando una clara reacción hipersensible cuyo, desarrollo se adelanta ligeramente al observado anteriormente en las hojas de plantas jóvenes. El daño observado es, sin embargo, mayor en las hojas basales de la planta en la que las lesiones exhibían un daño tisular mayor que el contemplado normalmente, mostrando, a los 6 días post-infección, el área inoculada totalmente deteriorada aunque siempre limitada al área infectada inicialmente.

La respuesta a la infección con la bacteria *P. s. pv. tabaci* se desarrollaba de forma similar a la descrita para la bacteria incompatible de manera que en las hojas basales de la planta se producía una rápida necrosis del área inoculada que posteriormente, entre los 5 y 6 días post-infección sobrepasaba dicho área produciéndose una clorosis muy intensa sobre la ya existente.

Se procedió, entonces, a realizar el estudio histoquímico que se muestra en las figuras 23a y 23b. Al igual que para el primer ensayo, se utilizaron plantas ya florecidas y con características senescentes similares a las descritas anteriormente. Como control se utilizaron plantas jóvenes (de 5 semanas) donde la evolución de la reacción hipersensible era conocida. Los ensayos se llevaron a cabo a un día, tres días y seis días después de la inoculación con la dosis bacteriana establecida (10^7 ufc/ml). Las hojas analizadas fueron las dos primeras hojas más bajas, como senescentes, y la octava hoja, como hoja joven totalmente expandida. Se inoculó una mitad de la hoja utilizando la otra mitad como control de los niveles basales de actividad GUS. Desde las 24 horas, se observaban en las hojas basales de la planta inoculada con la bacteria *P. s. pv. syringae*, lesiones hipersensibles claramente definidas,

Control	<i>P. s. syringae</i>			<i>P. s. tabaci</i>		
	+/-	+	++	0	0	1
8 ^a	+/-	+	++	0	0	1
2 ^a	++	++++	++++	0	3	4
1 ^a	++	++++	++++	0	3	4
	1	3	6	1	3	6

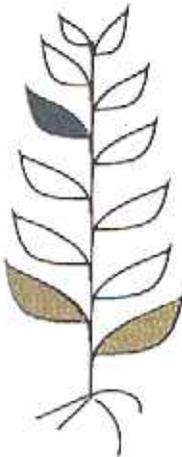


Figura 23a.

Nomenclatura utilizada para definir la sintomatología observada durante el establecimiento de las interacciones planta-patógeno incompatible (*P. s. pv. syringae*) y compatible (*P. s. pv. tabaci*) en la senescencia. 1,3 y 6 representan los días examinados.

+/-, área infiltrada visible, aunque no necrótica; +, área infiltrada visible con necrosis suave; ++, necrosis definida; +++, necrosis intensa; +++++, necrosis intensa con máximo nivel de deshidratación.

0, no síntomas; 1, clorosis suave; 2, lesiones necróticas aisladas rodeadas de áreas cloróticas; 3, intensas áreas necróticas rodeadas de clorosis; 4, necrosis rodeadas de extensas áreas cloróticas.

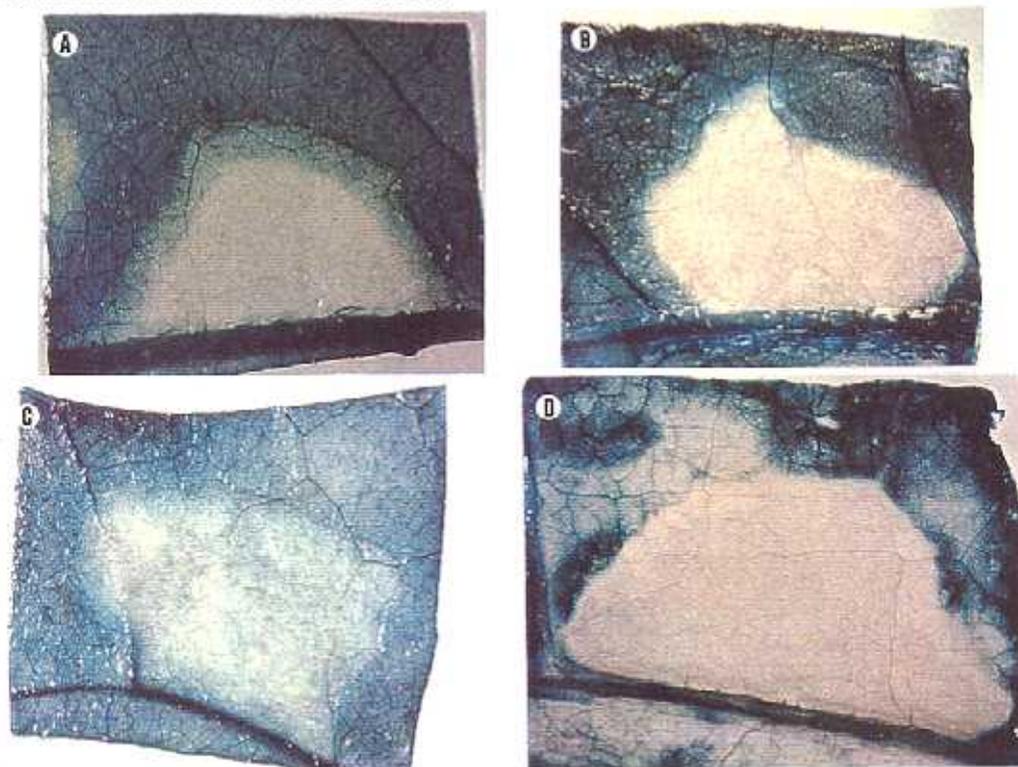


Figura 23b. Detección histoquímica de la actividad GUS en la 1^a y 2^a hojas de plantas senescentes después de la infección con *P. s. pv. syringae* 24h (A) y 6d (B) y con *P. s. pv. tabaci* 48h (C) y 6d (D).

detectándose altos niveles de actividad GUS por todo el tejido analizado excepto en la zona inoculada. Este patrón de expresión contrasta con lo que ocurre en plantas jóvenes a este tiempo de infección, en donde la actividad GUS se localiza en el interior del área infectada. Los fragmentos sin inocular, utilizados como control de estas hojas senescentes, presentaban altos niveles constitutivos de actividad GUS. En ocasiones era posible detectar un incremento en la actividad GUS, más intenso que el nivel basal constitutivo, en las células que rodean la zona hipersensible. Este patrón de expresión se observaba con más frecuencia cuando el análisis se realizaba a la 12 horas post- infección.

El estudio de la interacción compatible permitía observar la formación de lesiones necróticas en las hojas basales de la planta a las 48 horas de la infección. A este tiempo, al igual que a tiempos posteriores, no se observaba actividad GUS en las células correspondiente al área inoculada, pero sí en el resto del tejido examinado, cuya coloración azul se intensificaba a tiempos posteriores de infección. Solo en infecciones examinadas a las 12 horas post-inoculación se podía distinguir una débil coloración azul dentro del área inoculada y que, probablemente, representa la disminución de la coloración basal determinada en las hojas senescentes no tratadas.

La octava hoja verde, de plantas senescentes, al igual que las hojas de plantas control de 5 semanas, mostraban un patrón sintomático y de expresión GUS igual al descrito anteriormente en las infecciones en plantas jóvenes.

Con muestras obtenidas de las mismas hojas que para el ensayo histológico, se realizó un ensayo fluorimétrico de la actividad GUS que revelaba la presencia de altos niveles de expresión en las hojas bajas, de plantas senescentes no tratadas.

Los resultados muestran que en las hojas senescentes donde los niveles de expresión del *gnl* son más altos que en una hoja superior verde, la aparición y establecimiento de los síntomas es más rápido, y que a pesar de haber unos niveles de expresión GUS altos se sigue observando la inducción de dicha expresión frente a una infección.

Además durante una interacción compatible la invasión del tejido adyacente no infectado y el daño provocado por esta infección es más rápido en estas hojas.

III.5.5 Análisis transcripcional de las isoformas $\beta(1,3)$ glucanasa ácidos y básicos en respuesta a la infección por las bacterias *P. s. pv. syringae* y *P. s. pv. tabaci*.

Para detectar los productos de transcripción de los diferentes genes de $\beta(1,3)$ glucanasa de interés, se realizó un ensayo tipo Northern utilizando RNA total extraído de hojas infectadas con la bacteria *P. s. pv. syringae* en un caso, y con la bacteria *P. s. pv. tabaci* en otro. Una vez fraccionado por electroforesis y transferido a una membrana de nylon se hibridó con sondas radiactivas de los clones de glucanasas aislados. Los tiempos examinados fueron los mismos utilizados para los análisis histoquímicos y fluorimétricos descritos en los apartados anteriores, III.5.2 y III.5.3.

La inoculación de los microorganismos se hizo por inyección, utilizando en todos los casos ensayados, plantas de 6 semanas aproximadamente, donde se llevó a cabo el estudio de la inducción de la expresión a nivel local. Para el análisis de la respuesta sistémica, se utilizó la mitad de hoja opuesta a la infectada (SAR1) y la hoja superior a esta (SAR2) de los cuáles, igualmente, se extrajo RNA a los tiempos indicados. Como controles se extrajo RNA partir de plantas sanas no

tratadas. Las sondas radiactivas específicas para cada gen, se sintetizaron por transcripción *in vitro* en presencia de [α P³²] CTP, según se describe en Materiales y Métodos. Una banda correspondiente al tamaño esperado para el gen *gn2* se detectó a nivel local en ambas infecciones, figura 24. Una debil inducción de la expresión *gn2* era visible a las 12 horas post-infección, aumentando gradualmente para alcanzar su máximo nivel entre los 2 y 4 días post-inoculación. El patrón de inducción era similar en ambas interacciones aunque la expresión del gen *gn2* se prolongaba al menos 4 días más, en la interacción incompatible, siendo claramente visible hasta los 12 días desde el inicio de la infección. Un patrón similar se obtuvo al analizar la expresión de la chitinasa básica (*Ch2*), prolongándose, además, la inducción de este gen hasta los 16 días post-infección en la interacción incompatible.

Para analizar la expresión de las glucanasas ácidos se utilizó como sonda la correspondiente a la *PR-2* de tabaco, seleccionada en ensayos anteriores. Igualmente se realizaron hibridaciones sobre la misma membrana con el clon de la *PR-1a*. Los resultados obtenidos señalaban que aunque el perfil de expresión era similar para los dos genes examinados, sus mensajeros no se acumulan de forma idéntica. Mientras el clon de la *PR-1*, mostraba durante la interacción incompatible, una inducción progresiva y creciente desde las 24 horas hasta los 16 días, en la hibridación con el clon de la *PR-2* se observaba una ligera inducción a las 12 y 24 horas que disminuía, casi por completo hasta los 8 días post-infección volviendo a detectarse a los 12 y 16 días donde los niveles de acumulación de los correspondientes mensajeros, eran superiores a los observados inicialmente.

La inducción de la expresión de los genes *PR-1* y *PR-2*, en respuesta a la inoculación con la bacteria compatible, se detectaba inicialmente a los 2 días post-infección, alcanzando máximos niveles

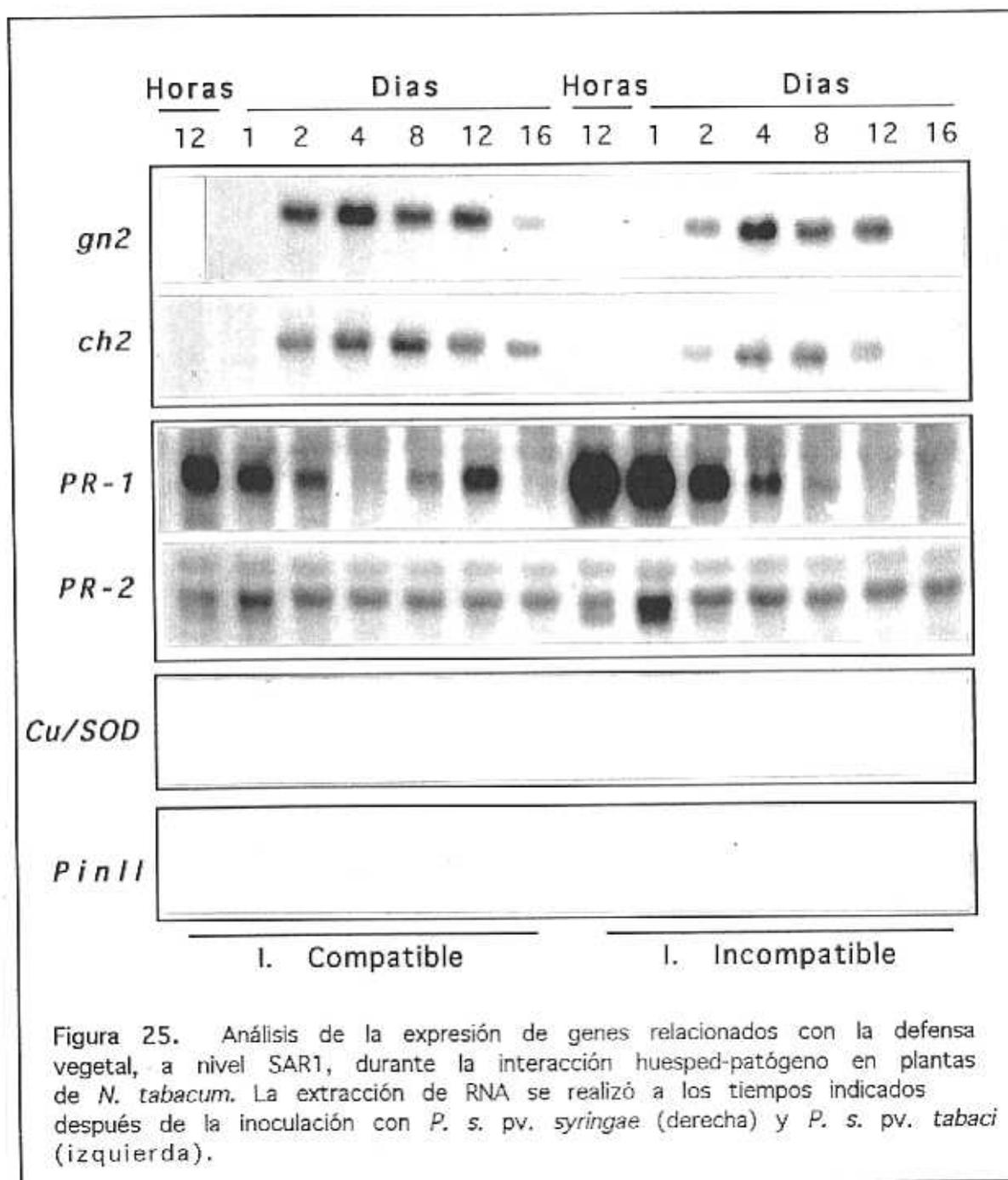
bacterias examinadas. Sin embargo, la activación de este gen era más rápida en la interacción incompatible, en la que, además, se prolongaba hasta los 16 días post-infección.

Finalmente, se analizó la expresión del gen *Cu,Zn/SOD* (citosólica) de la superóxido dismutasa, examinada como marcador del estrés oxidativo que ocurre en la célula vegetal durante una infección. El patrón de expresión detectado para dicho gen es similar al descrito anteriormente para el gen Pin II.

Como conclusión más relevante del estudio realizado cabe resaltar que, en ningún caso, la inducción de la expresión de los genes analizados ocurre exclusivamente en alguna de las dos interacciones, sin embargo, la activación génica es, generalmente, más rápida y prolongada en la interacción incompatible.

III.5.6 Análisis de la inducción sistémica de los genes de defensa vegetal.

El análisis de la inducción de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa durante la respuesta sistémica adquirida (SAR) y, de su implicación en la defensa vegetal generalizada en tejidos no infectados, se llevó a cabo con el estudio de la expresión de los mismos clones seleccionados para el ensayo de la respuesta local, en ambas infecciones. En los resultados obtenidos a nivel de SAR1 (figura 25) y SAR2 (figura 26) se puede observar que la expresión de los genes correspondientes a las distintas proteínas PR examinadas, *gn2*, *ch2*, *PR-2* y *PR-1a* se induce sistémicamente en los dos tipos de tejidos, SAR 1 y SAR 2.

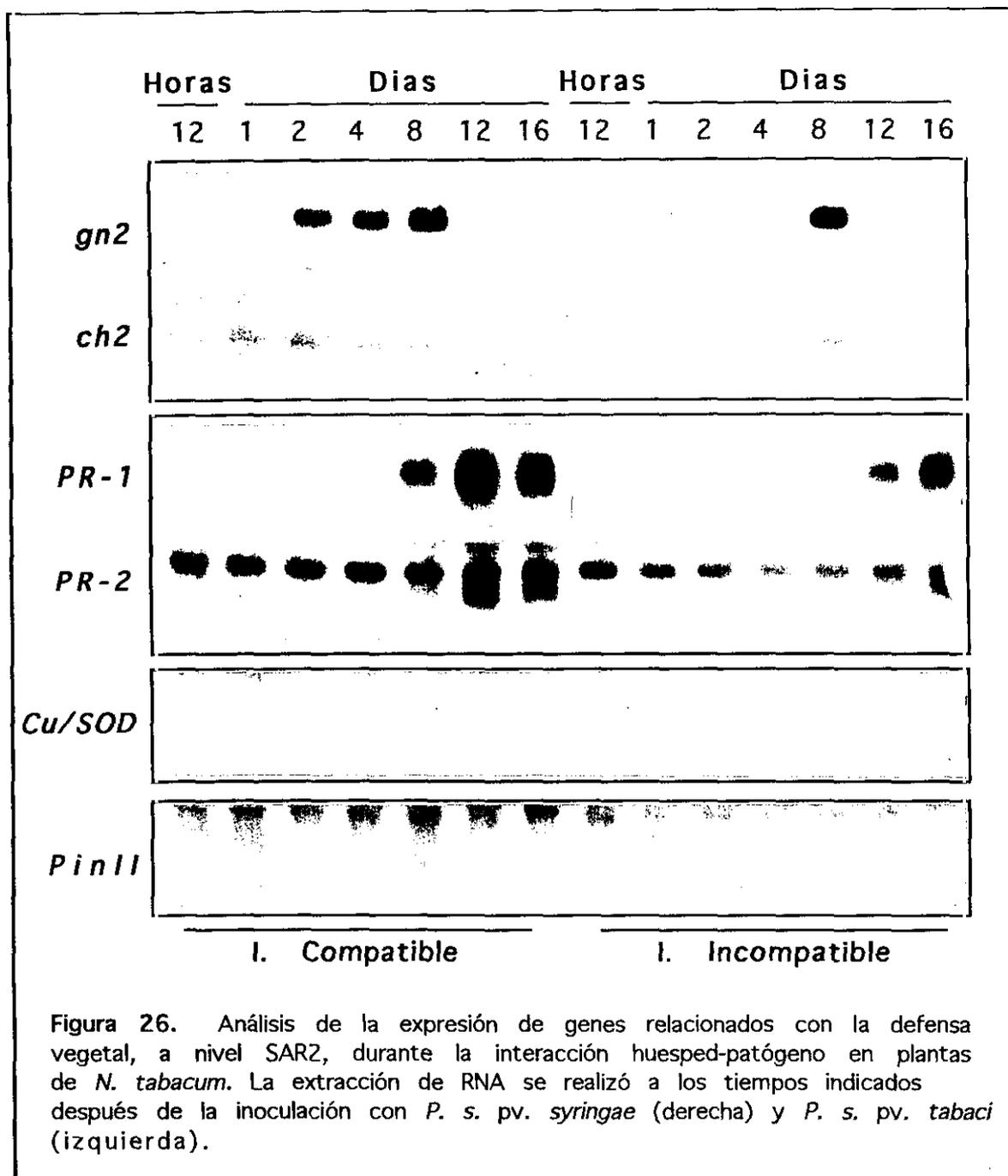


De nuevo los patrones de expresión de los genes básicos, *gn2* y *ch2*, presentan cinéticas paralelas entre sí, aunque, en ambos tejidos, la inducción del gen *ch2* es significativamente menor que la correspondiente al gen *gn2*. La inducción de la expresión de ambos genes, en los tejidos sistémicos, es menor que la que se alcanza en la zona de inoculación (respuesta local), aunque, la acumulación de transcritos derivados de los genes *gn2* y *ch2* se mantiene hasta los 16 días en el tejido sistémico SAR 1 mientras que, en la respuesta local, no se detectan dichos RNAs a los 12 y 16 días de la infección. El análisis de la expresión del gen *PR-1a* en el tejido sistémico SAR1 indica, que la inducción de este gen es más intensa y más rápida que la inducción caracterizada en la respuesta local. Este resultado difiere del resto de los genes examinados en los que, la inducción en los tejidos sistémicos, está siempre retrasada con respecto al tiempo de inducción correspondiente a la respuesta local.

Los resultados obtenidos con los genes *PR-2* y *PR-1a* mostraban también cinéticas de inducción muy similares que difieren significativamente de las descritas para los isoenzimas básicos. Estos resultados indicaban que mientras que la expresión de ambos genes se inducía a las 12 horas en las muestras SAR1, no era posible detectar dicha expresión hasta los 8 días a nivel SAR2. Además, fue posible comprobar que si en las muestras SAR1 la activación de la expresión es más intensa en la interacción incompatible, a nivel SAR2 lo es en la interacción compatible.

La acumulación de los mensajeros correspondientes a los genes *Pin II* y *Cu,Zn/SOD* no fue detectada en ninguno de los dos niveles sistémicos analizados.

Finalmente, el estudio que se llevó a cabo en las plantas control no tratadas revelaba la ausencia de expresión de los transcritos analizados en los tres niveles, local, SAR1 y SAR2 examinados en este experimento.



III.6 INDUCCION DE LA RESISTENCIA VEGETAL MEDIANTE ACTIVACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE DEFENSA.

De acuerdo a los resultados descritos en el apartado anterior, la expresión de los genes PR analizados se induce local y sistémicamente durante el establecimiento de los dos tipos de interacciones, compatible e incompatible examinados. Igualmente, hemos podido comprobar, que la expresión de dichos genes se induce en respuesta a diversos tratamientos abióticos. En base a estos resultados, hemos procedido a examinar si la inducción génica detectada en respuesta a ambos tipos de tratamientos (bióticos y abióticos) y, por tanto, la consecuente producción de las proteínas codificadas modifica la respuesta de la planta en el establecimiento de una nueva interacción huésped-patógeno.

III.6.1 Inducción de la protección por tratamientos con microorganismos patógenos y no patógenos del huésped.

Se procedió a inocular plantas de *N. tabacum* con *P. s. pv. syringae* y con la bacteria *P. s. pv. tabaci* en la mitad de una hoja como en ensayos anteriores. A los ocho y dieciseis días post-inoculación cuatro de las plantas inoculadas con la bacteria incompatible, eran infectadas por segunda vez con cada una de las dos cepas microbianas ensayadas (cuatro plantas con la bacteria *P. s. pv. syringae* y cuatro con *P. s. pv. tabaci*).

El estudio se realizó sobre la hoja superior a la infectada, descrita anteriormente como SAR2. Del mismo modo, se procedió a inocular plantas tratadas inicialmente con la bacteria *P.s. pv.tabaci*, con las dos bacterias objeto de estudio. Los tratamientos de las dos bacterias se

hicieron siempre al mismo tiempo para asegurarnos de que utilizabamos las mismas condiciones y el mismo inóculo en cada caso. Como control negativo se inocularon con agua plantas que serían sometidas, igualmente, a infecciones secundarias con ambas bacterias patógenas. Como en ensayos anteriores el alcance de las infecciones se evaluó mediante inspección visual diaria de las plantas.

Los tiempos de 8 y 16 días, seleccionados para hacer la inoculación con el microorganismo desafiante, se eligieron en base al patrón de inducción sistémica obtenido para los genes examinados. Así, mientras la acumulación de los mensajeros correspondientes a los isoenzimas básicos, *gn2* y *ch2*, en el tejido sistémico, ocurre entre 1 y 8 días post-infección, la inducción de los isoenzimas ácidos, *PR-1* y *PR-2*, se inicia a los 8 días y se mantiene, al menos, hasta los 16 días después de la inoculación.

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados a los 8 días post-infección, se reflejan en la figura 27, donde se representa de acuerdo a la nomenclatura descrita en la figura 12, los síntomas que aparecen en respuesta a la segunda inoculación bacteriana. La respuesta de la planta a la infección con la bacteria *P. s. pv. syringae*, 8 y 16 días después de una infección inicial con la misma bacteria, es similar a la obtenida en plantas control no sometidas a ningún tratamiento. Se observa, sin embargo, un adelanto de aproximadamente 24 horas en la aparición y formación de la reacción hipersensible que ocurre, igualmente, al inocular con la bacteria *P. s. pv. syringae* en plantas preinoculadas durante 8 días con la bacteria *P. s. pv. tabaci*.

Es de interés destacar, que la sintomatología desarrollada en respuesta a la inoculación con la bacteria *P. s. pv. tabaci*, en plantas preinoculadas con cualquiera de las dos cepas examinadas, varía, significativamente, con respecto al desarrollo normal de la infección de

Sin preinóculo	D.p.i.	1	2	4	8	12	16
	<i>P. s. syringae</i>	+/-	+	++	+++	++++	++++
	<i>P. s. tabacci</i>	0	0	1	2	3	4
A	D.p.i.	1	2	8	12	16	20
	<i>P. s. syringae</i>	+	++	++++	++++	++++	++++
	<i>P. s. tabacci</i>	0	2	++++	++++	++++	++++
B	D.p.i.	1	2	8	12	16	20
	<i>P. s. syringae</i>	+	+++	++++	++++	++++	++++
	<i>P. s. tabacci</i>	+	+++	++++	++++	++++	4

Nomenclatura utilizada para definir la sintomatología observada durante el establecimiento de las interacciones planta-patógeno incompatible (*p. s. pv. syringae*) y compatible (*P. s. pv. tabaci*) examinadas :

+/-, área infiltrada visible, aunque no necrótica; +, área infiltrada visible con necrosis suave; ++, necrosis definida; +++, necrosis intensa; +++++, necrosis intensa con máximo nivel de deshidratación.

0, no síntomas; 1, clorosis suave; 2, lesiones necróticas aisladas rodeadas de áreas cloróticas; 3, intensas áreas necróticas rodeadas de clorosis; 4, necrosis rodeadas de extensas áreas cloróticas.

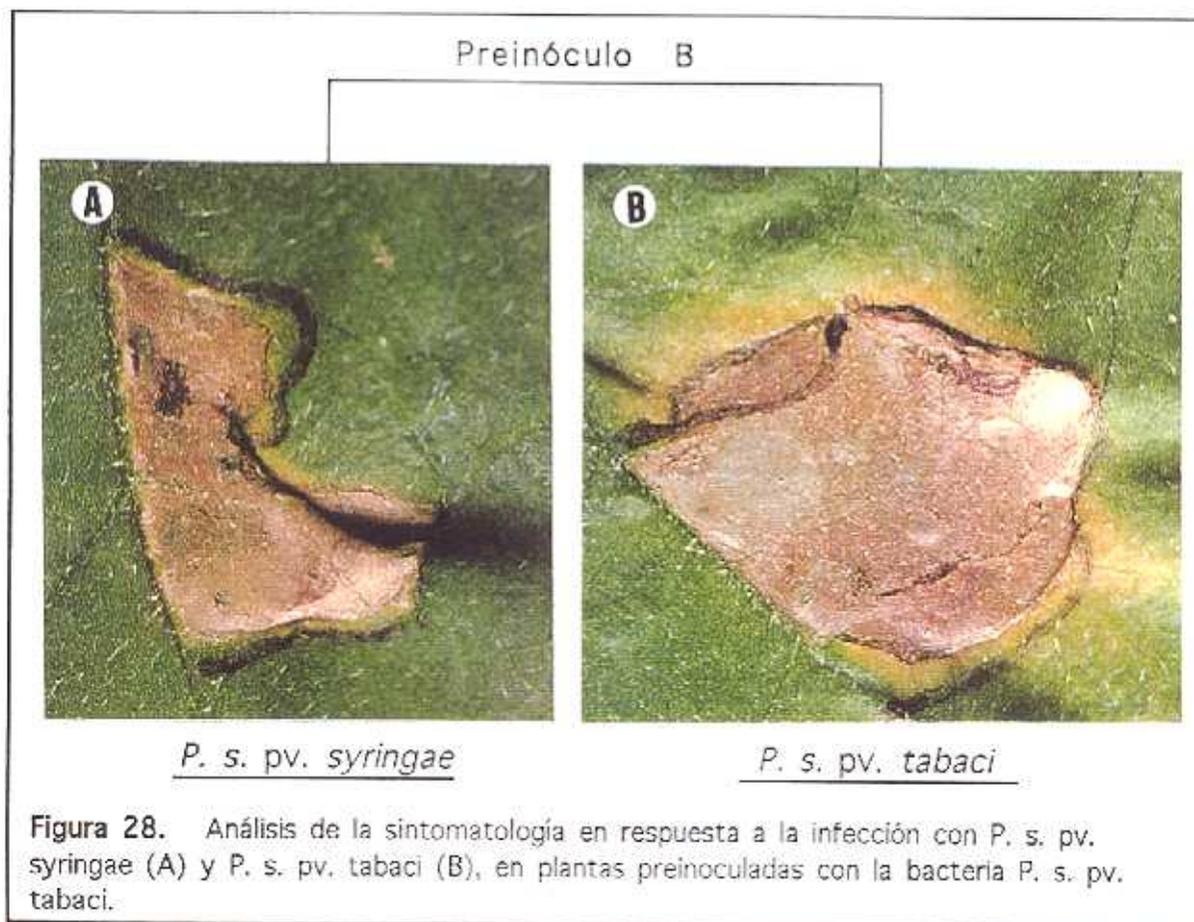
Las (+) representan lesiones muy similares a las hipersensibles.

Figura 27. Representación sintomática de la sintomatología desarrollada en respuesta a la infección con *P. s. pv. syringae* y *P. s. pv. tabaci* en plantas preinoculadas 8 días antes con las bacterias descritas:

P. s. pv. syringae, preinóculo A y *P. s. pv. tabaci*, preinóculo B.

El significado preciso de la nomenclatura utilizada se describe en la figura 17 con excepción de los símbolos representados en letra azul que corresponden a la formación de un área necrótica similar a una reacción hipersensible, pero rodeada de un halo clorótico.

dicha bacteria en plantas control no sometidas a ningún tratamiento. Así, en ambos casos, se produce una clara aceleración en la aparición de síntomas que ocupan, además, todo el área inoculada a tiempos tempranos de infección, concretamente a las 24 horas en plantas preinoculadas con *P. s. pv. tabaci* y a las 48 horas en plantas preinoculadas con *P. s. pv. syringae*. En claro contraste a estos resultados, la necrosis completa del área inoculada con la bacteria *P. s. pv. tabaci* en plantas control se desarrolla a los 8 días post-infección.



Como se muestra en la figura 28, las lesiones necróticas producidas por *P. s. pv. tabaci* en los experimentos de reinoculación, muestran inicialmente un aspecto similar a las lesiones características de la reacción hipersensible, evolucionando posteriormente de forma diferente mediante formación de un área de clorosis alrededor de la zona necrótica. La clorosis observada progresa con mayor lentitud que

en las plantas no pretratadas, y de hecho se encuentra restringida a la zona que rodea la necrosis, al menos hasta los 20 días de infección para las plantas preinoculadas con *P. s. pv. syringae*. No ocurre así en el caso de plantas preinoculadas con *P. s. pv. tabaci*, en donde la evolución de la clorosis está limitada hasta aproximadamente los primeros 16 días de infección para posteriormente, a los 20 días de infección, avanzar sobre el área adyacente a este área.

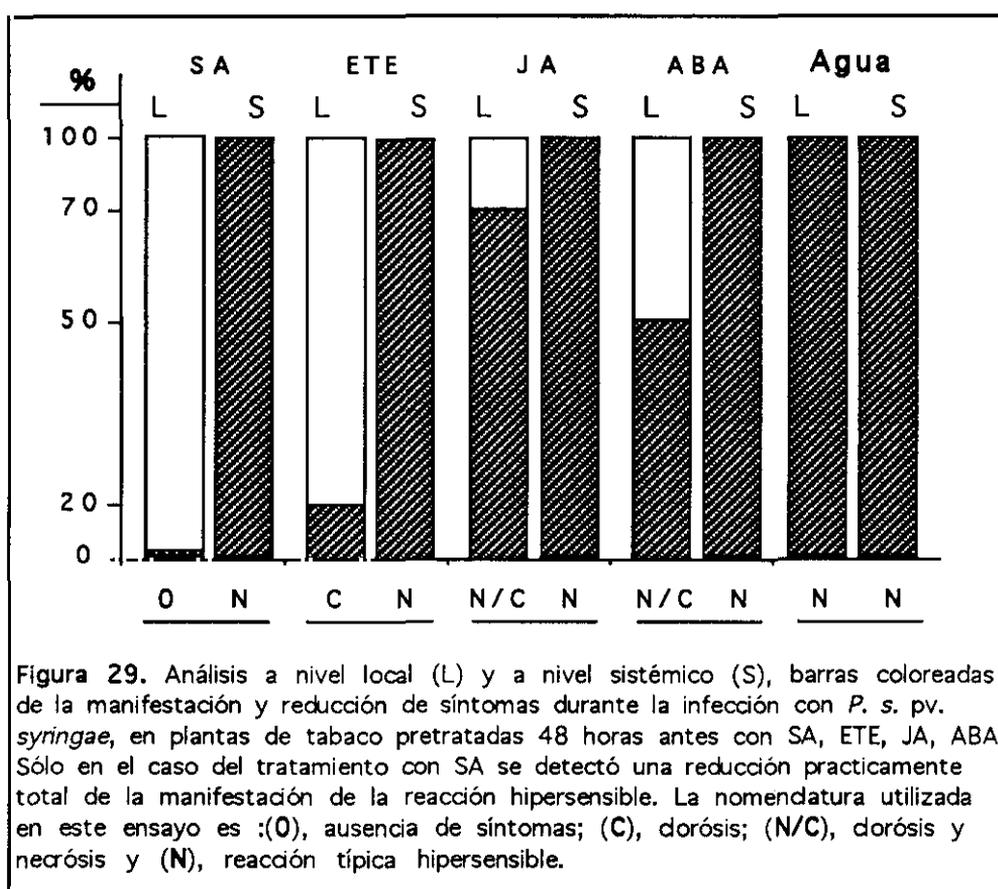
III.6.2 Estudio de la inducción de protección por tratamientos abióticos.

Según se comprobó a lo largo de este trabajo, la expresión de los genes relacionados con la defensa vegetal se induce, no sólo en respuesta a la infección por un microorganismo patógeno, sino también mediante tratamientos con diversos compuestos celulares implicados en la activación de su expresión. Además, los compuestos examinados (SA, ETE, ABA y JA) no afectan por igual a los genes caracterizados, sino que actúan de forma específica sobre determinados de ellos.

En base a estos resultados, se procedió a examinar si el pretratamiento de la planta con los inductores caracterizados, modificaba de alguna manera su interacción con las bacterias patógenas *P. s. pv. syringae* y *P. s. pv. tabaci*. Para ello, se sometió a las plantas a tratamientos con los cuatro agentes inductores examinados y se inocularon, posteriormente, a los dos y cuatro días de dicho tratamiento, la hoja tratada y la hoja sana superior con ambas bacterias. Como control negativo se inocularon con agua dos plantas que serían sometidas, igualmente, a ambas infecciones patógenas. El alcance de las infecciones se evaluó mediante inspección visual diaria de las plantas, figura 29.

Además se hizo un análisis comparativo de los síntomas utilizando plantas infectadas no pretratadas.

La inoculación con *P. s. pv. syringae*, en plantas pretratadas con ABA, JA, y SA no produce ningún síntoma visible en las primeras 48h de infección, a diferencia de lo que ocurre en las plantas control no tratadas, en las que a las 48h de infección se distingue claramente la formación de una lesión hipersensible débil.



El pretratamiento con etefón, también produce un retraso en la aparición de síntomas, aunque 48h después de la inoculación con *P. s. pv. syringae* es posible distinguir un ligero amarillamiento en la zona infectada. En las plantas inoculadas inicialmente con agua, el establecimiento de una reacción hipersensible, era indistinguible de la sintomatología mostrada por plantas sanas no pretratadas.

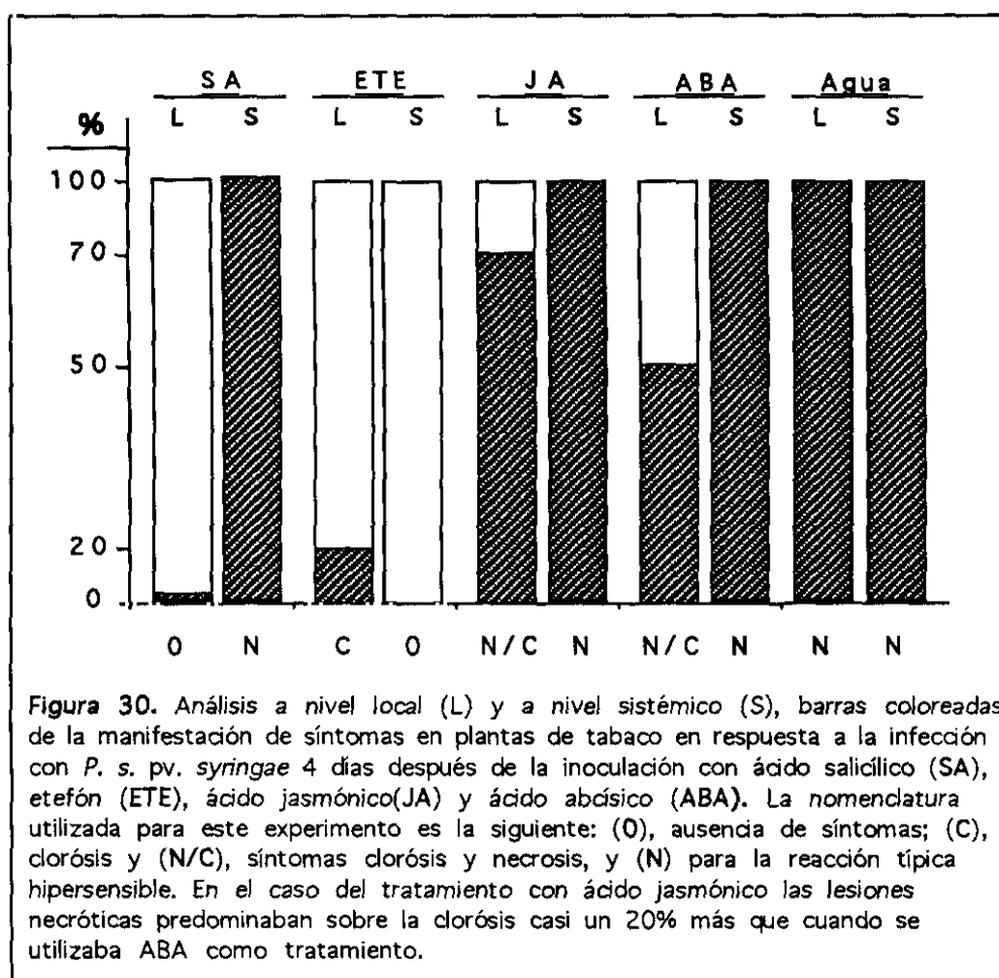
A partir de los 3 días, las plantas que habían sido pretratadas con ABA y JA empezaban a mostrar dentro del área inoculada, zonas necróticas y cloróticas cuya severidad era ligeramente superior para las plantas pretratadas con JA. A este tiempo (7 días post-infección) todavía no se observaba ninguna sintomatología en respuesta a la infección en las hojas pretratadas con SA, siendo solo entre los 9 y 12 días post-infección cuando se podía observar un ligero amarilleamiento, limitado al interior del área inoculada con la bacteria, en aproximadamente el 40% de las zonas inoculadas.

Al igual que los resultados descritos en el pretratamiento con SA y posterior inoculación con *P. s. pv. syringae*, el tratamiento con etefón produce una clara reducción del daño celular inducido por la bacteria, de manera que no se observa formación de zonas necróticas a ninguno de los tiempos examinados y solo se observa el amarillamiento de la zona infectada por la bacteria.

En todos los casos examinados, la inoculación con la bacteria *P. s. pv. syringae* en las hojas inmediatamente superiores a las hojas pretratadas con los distintos compuestos descritos (ABA, JA, SA, y Etefón) provoca la formación de una reacción hipersensible típica que, aparentemente, no difiere de la observada en una planta control sin pretratar.

Un perfil sintomático diferente al descrito con la bacteria *P. s. pv. syringae* se observó con la infección compatible para la que, a los dos días de pretratamiento con los compuestos ABA, JA, y ETE, no se observaba ningún signo de protección aparente. No ocurría así, sin embargo, con el tratamiento con SA, para el que se podía observar los mismos niveles de protección frente a la infección con *P. s. pv. tabaci* que los descritos anteriormente para *P. s. pv. syringae* con las dos bacterias.

Cuando la inoculación bacteriana se realizaba a los 4 días del pretratamiento, se observaba, para los cuatro compuestos analizados, un retraso en la aparición de síntomas de hasta 5-7 días post-infección. Este retraso se prolongaba hasta 15 días, aproximadamente, en el tratamiento con etefón, resultando, de nuevo, en una protección total cuando el pretratamiento había sido realizado con SA (figura 30).



Es interesante resaltar que, a diferencia del resto de los tratamientos examinados, el pretratamiento con etefón confiere protección sistémica frente a la infección con las dos cepas bacterianas analizadas.

Tanto con las bacterias *P. s. pv. syringae* como con las patógenas, *P. s. pv. tabaci*, a nivel local, se apreciaba un retraso en la aparición de síntomas de hasta 5-7 días en las hojas locales de plantas pretratadas

durante cuatro días con ABA y JA, estableciéndose parcialmente las lesiones a lo largo de los 20-25 días analizados. El tratamiento con ETE o SA era capaz de inducir la protección frente a ambas infecciones, resultando en una resistencia total cuando la planta había sido petratada con el SA. Una clara diferencia a nivel sistémico fue detectada en este segundo experimento, así en plantas inoculadas inicialmente con SA se observaba una ténue manifestación de resistencia cuando se infectaban con las bacterias incompatibles, sin embargo sólo se detectaba una protección total cuando la primera inoculación había sido realizada con ETE.

Es de interés destacar que las plantas infectadas con la bacteria compatible mostraban una única y total protección cuando habían sido inoculadas anteriormente con ETE.

DISCUSSION

IV DISCUSION.

Este trabajo se ha realizado con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que controlan el establecimiento de una interacción huésped patógena e investigar la función de los isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa en dicha interacción, así como en otros procesos de desarrollo de la planta

El gen $\beta(1,3)$ glucanasa, *gn3*, aislado de *N. plumbaginifolia*, fue examinado tanto a nivel molecular como funcional. La estructura de dicho gen se determinó y las características de expresión se analizaron en plantas sanas y en respuesta a varios tratamientos de estrés.

El análisis comparativo de su secuencia con las correspondiente a otras isoformas $\beta(1,3)$ glucacanasa intracelulares y extracelulares aisladas de *N. tabacum* (Von de Bulcler y col., 1989, Linthorst H.J y col., 1990) y de *N. plumbaginifolia* (Castresana y col., 1990) reveló que la proteína codificada por el *gn3* no correspondía a ninguna de las isoformas previamente caracterizadas, sino que representaba una nueva isoenzima con un punto isoeléctrico de 4.5. La conservación de secuencias determinadas para genes homólogos en las especies *N. tabacum* y *N. plumbaginifolia* es muy alta, alcanzando hasta un 97% de identidad cuando se comparan los genes que condifican para la glucanasa básica glbb de *N. tabacum* y la correspondiente isoforma *gn2* en *N. plumbaginifolia* (Gheysen y col.,1990). Por ello, la diferencia de secuencia observada entre la proteína codificada por el gen *gn3* de *N. plumbaginifolia* y el resto de las glucanasas identificadas, permite

suponer que la proteína *gn3* representa una nueva isoforma no caracterizada hasta el momento. Esta conclusión está apoyada, además, por las características de expresión determinadas para el gen *gn3* que difieren, significativamente, de las correspondientes al resto de las isoformas examinadas.

No ocurre así con el gen *gn4*, que presenta un 97% de identidad de secuencia con la determinada para el gen *sp41* de *N. tabacum* correspondiente a una isoenzima $\beta(1,3)$ glucanasa específica de estilo. Este dato, junto con el hecho de que el gen *gn4* se exprese igualmente en el estilo permiten suponer que ambos genes representan isoformas homólogas, involucradas en la misma función, en ambas especies vegetales.

El análisis de la expresión de los genes *gn3* y *gn4* en plantas sanas, no sometidas a ningún tratamiento permitía detectar una señal de hibridación basal constitutiva que, además, se mantenía estable en respuesta a todos los tratamientos bióticos y abióticos examinados, indicando que la expresión de dichos genes no se induce durante la respuesta de defensa de la planta y que, por lo tanto, que su función no está relacionada con este proceso.

El análisis de la expresión génica en órganos florales reveló que los niveles de expresión correspondiente al gen *gn4* son significativamente superiores a los niveles basales de RNA detectado en la hoja. Igualmente, la determinación de actividad enzimática en geles de isoelectroenfoque permitió comprobar la presencia de un isoenzima de pI aproximado a 7 en dichos tejidos que está, a su vez, ausente en el resto de los extractos protéicos examinados en este estudio.

Todos los datos obtenidos permiten comprobar que la expresión del gen *gn4* y, por tanto, la función de la proteína codificada (GN4) está

específicamente asociada con el desarrollo floral y más concretamente con el desarrollo del estilo. En estos momentos no es posible descartar que dicha proteína pudiera jugar un papel en la protección de dichos tejidos frente a posibles infecciones. Sin embargo, el patrón de expresión detectado sugiere su participación en procesos fisiológicos específicos de dicho tejido. En este sentido, cabría pensar que, al igual que, se ha propuesto para el gen homólogo *sp41*, la proteína GN4 podría participar en la disolución de los $\beta(1,3)$ glucanos que integran la matriz extracelular del tracto estilar permitiendo así, la progresión del tubo polínico dentro del estilo.

La función del gen *gn4* en el desarrollo floral se está investigando en más detalle en plantas transgénicas transformadas con una construcción antisense. De esta manera, nos proponemos suprimir la expresión del gen *gn4* y evaluar los posibles cambios derivados de su supresión.

A diferencia de los resultados descritos para el gen *gn4*, el análisis de la expresión del gen *gn3*, en distintos tejidos de la planta, y en respuesta a distintos tratamientos de estrés no permitió detectar la inducción de su expresión por encima de los niveles basales encontrados en tejido foliar. Por ello, la expresión de dicho gen se examinó en más detalle en plantas transgénicas en las que el gen bacteriano *b-glucuronidasa* se expresa bajo el control de las secuencias reguladoras del promotor del gen *gn3*. El estudio detallado de las plantas transgénicas obtenidas nos permitió primero, comprobar los resultados anteriores confirmando que la expresión dirigida por el promotor *gn3* no se induce en respuesta a ninguno de los tratamientos examinados. En segundo lugar, el análisis histológico de dichas plantas reveló que el promotor *gn3* dirige la expresión del gen bacteriano GUS durante la

germinación de las semillas. La actividad GUS se detecta inicialmente en el embrión localizándose, una vez finalizada la etapa germinativa, en la denominada cabeza del embrión que posteriormente se diferenciará para formar los cotiledones de la planta. En plántulas de una a dos semanas de desarrollo la actividad GUS se localiza en el tejido vascular y, en estados más avanzados de crecimiento, la actividad permanece asociada a las células del floema sin observarse modificación alguna durante todo el ciclo de la planta.

De nuevo, al igual que describimos anteriormente para el gen *gn4*, el patrón de expresión caracterizado para el gen *gn3* sugiere su participación en procesos relacionados con el desarrollo vegetal.

Posiblemente, en procesos relacionados con las divisiones celulares y/o la movilización de sustancias de reserva características del proceso de germinación y de diferenciación de los cotiledones. La expresión del promotor *gn3* en el tejido vascular de la plántula estaría, posiblemente, relacionado con la diferenciación de dicho tejido a células vasculares maduras lo que conlleva, igualmente, la reestructuración de la pared celular del tejido vascular primario

Independientemente de la función concreta que los dos isoenzimas caracterizadas, *gn3* y *gn4*, realizan en las plantas, los datos obtenidos permiten pensar en la existencia de un subgrupo de isoenzimas, dentro de la familia de genes $\beta(1,3)$ glucanasa, cuya función está, al menos, preferentemente relacionada con procesos específicos del desarrollo. Existe un segundo grupo de enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa cuya función estaría también relacionada con el desarrollo de la planta y cuya expresión se induce, además, en respuesta a la inoculación por microorganismos patógenos. En este segundo grupo se incluirían los genes *gn1* y *gn2* que codifican dos isoenzimas básicas de localización

vacuolar e, igualmente, de acuerdo a nuestros resultados, habría que incluir en este grupo el gen *PR-2* que codifica para una isoenzima ácida de localización extracelular.

La utilización de plantas transgénicas *gn1/GUS* ha permitido examinar la expresión dirigida por el promotor *gn1* en distintos tejidos de plantas sanas y comprobar que dicha expresión se induce durante la formación, maduración y germinación de la semilla, y también durante la senescencia vegetal. Estos resultados indican que la proteína GN1 participaría, junto con la isoenzima GN3, en los primeros estadios del desarrollo de la planta. No obstante, existen diferencias significativas en el patrón de expresión caracterizado para estos dos genes, que permiten suponer ligeras variaciones en su modo de acción y/o en su lugar de actuación. Así la actividad GUS dirigida por el promotor *gn1* aparece, inicialmente, en el embrión de la semilla durante las fases de formación y maduración, dos etapas del desarrollo en las que los procesos de división y elongación celular requieren, probablemente, la presencia y participación de dichas enzimas hidrolíticas.

Por otro lado, durante la formación de la semilla se produce un proceso de deshidratación en el que la comunicación celular y la translocación de compuestos a través de la pared deben estar estrictamente regulados y pueden estar acompañados de la formación de depósitos de callosa (Yuk-Shan Wong y col., 1980). Una vez iniciada la germinación, la actividad GUS se localiza en la radícula que emerge de las cubiertas de la semilla, correspondiendo de nuevo a una zona sometida a un proceso activo de división y diferenciación celular.

Al igual que se observó en las plantas *gn3/GUS*, la expresión GUS dirigida por el promotor *gn1* se localiza en el tejido floemático de las plantas adultas.

Se ha descrito que las células del tejido floemático responden a los cambios de presión mediante acumulación de depósitos de callosa que llegan incluso a taponar los canales de comunicación intercelulares alterando el movimiento de moléculas a través del tejido floemático. En esta situación la presencia de enzimas con actividad $\beta(1,3)$ glucanasa, al menos las codificadas por los genes *gn1* y *gn3*, podría indicar su participación en la regulación del flujo vertical y el transporte a través del floema. Aunque, en este trabajo no hemos evaluado directamente si la expresión de los genes *gn1* y *gn3* en el floema se induce en respuesta a alguno de los tratamientos de estrés examinados a lo largo de este estudio, el hecho de que, como discutiremos más adelante, la expresión del gen *gn1* se induce significativamente en respuesta a cambios de presión osmótica, podría establecer una relación entre estos dos procesos de manera que los cambios de presión osmótica en el tejido floemático actuarían modificando los niveles de enzimas y estos a su vez podrían participar en la regulación del flujo floemático. Por otro lado, el hecho de que los elementos del floema tengan que ser constantemente reemplazados mientras exista crecimiento, de nuevo refiere la actividad $\beta(1,3)$ glucanasa a zonas de división celular.

La actividad b-glucuronidasa detectada en el tejido vascular de las plantas *gn1/GUS* era mas intensa en la parte basal del tallo, en donde también se detectaba actividad GUS en las hojas de la planta, que incrementaba, además, con la senescencia foliar. Los valores máximos de actividad se determinaron en plantas examinadas a los 6 días de la floración, estadio que correspondía con la disminución del contenido en clorofila de las hojas y por tanto con el inicio del amarilleamiento foliar. El análisis de la actividad glucanasa en geles de isoelectroenfoque, así como la evaluación de los niveles de RNA transcritos a partir de distintos

genes relacionados con la defensa vegetal, reveló que la inducción del gen *gn1* no es un fenómeno aislado sino que afecta igualmente a los isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa básicos *gn1* y *gn2*, y al gen *PR-2* correspondiente a un isoenzima extracelular ácida. Es de interés resaltar que los tres enzimas inducidos durante la senescencia foliar se inducen también en respuesta a la infección por microorganismos patógenos, mientras que la expresión de los otros dos genes $\beta(1,3)$ glucanasa examinados, *gn3* y *gn4*, no se induce en ninguna de las dos situaciones descritas.

La expresión de la quitinasa *ch2* se induce igualmente durante la senescencia foliar mostrando un patrón de acumulación idéntico al caracterizado para los genes *gn1* y *gn2*. La presencia de quitina en la planta no está claramente establecida, sin embargo su detección en las paredes secundarias de las células vegetales ha sido descrita por Benhamou y Asselin (1984) por lo que se ha propuesto que las quitinasas podrían desempeñar alguna función en los procesos implicados en la degradación de la pared celular.

De esta manera los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa podrían intervenir y actuar de forma coordinada junto con las quitinasas en el proceso de senescencia foliar.

Por el momento desconocemos cuales son las señales celulares que provocan la inducción de la expresión de los genes mencionados durante la senescencia. Se ha descrito que la expresión de las glucanasas se modifica en respuesta a la concentración de hormonas tales como auxinas y citoquininas (Hahnen y col., 1985; Hemelink y col., 19978; De Loose y col., 1988) y que se inducen en respuesta al tratamiento exógeno con etileno.

Por otro lado, es interesante destacar que la acción de los reguladores del crecimiento vegetal puede estar mediada por las oligosacarinas liberadas de la pared de la célula vegetal por la acción de enzimas hidrolíticos (Cotè y Hahn, 1994).

A diferencia de los resultados obtenidos con los genes glucanasas (*gn1*, *gn2* y *PR2*) y quitinasas (*ch2*), no hemos detectado la inducción de la expresión del resto de los genes examinados, *PR1*, *Pin II*, y *Cu,Zn/SOD*, por lo que cabría pensar que los productos de expresión de dichos genes no intervienen en el proceso de senescencia. Es improbable, aunque, no se puede descartar en estos momentos, que la inducción de alguno de estos genes pudiera presentar una cinética de inducción muy rápida que coincidiera con los intervalos de tres días a los que se han extraído los RNAs examinados.

La participación del gen *gn1* en los procesos de senescencia y muerte celular está reforzada por los resultados obtenidos en el análisis histológico de actividad GUS realizado en las plantas transgénicas *gn1/GUS*. Así, cabe resaltar la inducción de actividad GUS observadas en los pétalos, que se localiza inicialmente en el anillo de pigmentación de la corola típico de las flores de tabaco (quizá en relación con procesos oxidativos generados por la acumulación de pigmentos en dicha zona), y que avanza ocupando el resto del tejido a medida que progresa el daño tisular y la senescencia de la corola.

Igualmente se detectó actividad GUS en las células que ocupan los bordes de los sépalos correspondiendo, estrictamente, con las zonas en las que dicho tejido se desgarran para permitir el crecimiento del fruto maduro, y en las que se puede observar con claridad deshidratación y necrosis celular.

Finalmente, la detección de actividad GUS en las células del protoxilema contribuye a confirmar la estrecha relación observada entre la inducción de la expresión dirigida por el promotor *gn1* y el proceso de muerte celular. Tanto la reacción hipersensible durante la respuesta de defensa vegetal como los procesos de senescencia y la xilogénesis, analizados en este estudio, han sido descritos como claros ejemplos de muerte celular programada.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES.

Se puede distinguir un subgrupo de isoenzimas, dentro de la familia de genes $\beta(1,3)$ glucanasa, cuya función en la planta esta, preferentemente, asociada con procesos específicos del desarrollo.

Existe un segundo grupo de isoenzimas $\beta(1,3)$ glucanasa cuya función estaría también relacionada con el desarrollo de la planta pero cuya expresión se induce, además, en el tejido foliar en respuesta a la infección por microorganismos patógenos.

La expresión de este segundo grupo de enzimas se induce también durante el proceso de senescencia vegetal, tanto en el tejido foliar como en tejidos específicos de la planta en relación con la senescencia y la muerte celular.

Todos los genes de defensa vegetal analizados se inducen en respuesta a la inoculación con las dos bacterias examinadas. Sin embargo, la cinética de activación varía en las dos interacciones caracterizadas. La activación es siempre más rápida y más prolongada durante el establecimiento de la interacción incompatible.

Existen diferencias importantes con respecto a las células de la hoja en las que se induce la expresión del gen *gn1* durante el establecimiento de las dos interacciones, compatible e incompatible analizadas. Sin embargo, en los dos casos, la activación precede a la manifestación del daño celular, aumenta a medida que el daño se hace patente, y desaparece con la muerte celular.

Las glucanasas básicas están claramente implicadas en procesos osmóticos, los cuales requieren cambios estructurales de la pared celular y la contribución de la actividad de enzimas hidrolíticos.

La inducción de la expresión de los enzimas $\beta(1,3)$ glucanasa no está necesariamente asociada con la manifestación de un daño celular.

El tratamiento con ácido salicílico provoca una protección total frente a la infección con las dos bacterias, compatible e incompatible analizadas.

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA.

Antoniw J. F. and White R. F. (1987). The role of pathogenesis-related proteins. *Ciba Foundation Symposium* **133**, 57-71.

Benhamou N., Matthieu H. A., J. Joosten and J. G. M. De Wit. (1990). Subcellular Localization of Chitinase and of Its Potential Substrate in Tomato Root Tissues Infected by *Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici*. *Plant Physiol.* **92**, 1108-1120.

Bol J. F. and Linthorst H. J. M. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 113-38.

Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Montagu M. V. and Inzé D. (1991). Manganase superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The EMBO Journal* **10**, 1723-1732.

Bowles D.J. (1990). Defense-related Proteins in Higher Plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 873-907.

Braun C. J., Jilka J. M., Hemenway C. L. and Tumer N. E. (1991). Interactions between plants, pathogens and insects: possibilities for engineering resistance. *Current Opinion in Biotechnology.* **2**, 193-198

Briggs S. P. and Johal G. S. (1994). Genetic patterns of plant host-parasite interactions. *TIG.* **10**, 12-16.

Bucciaglia P. A. and Smith A. G. (1994). Cloning and characterization of Tag 1, a tobacco anther $\beta(1,3)$ glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Molecular Biology* **24**, 903-914.

Cai Liao Y., Kreuzaler F., Fischer R., Reisener H-J, Tiburzy R. (1994). Characterization of a wheat class Ib chitinase gene differentially induced in isogenic lines by infection with *Puccinia graminis*. *Plant Science* **103**, 177-187.

Castresana, C., de Carvalho, F., Godelieve, G., Habets M., Inzé D., and Montagu M.V. (1990). Tissue-Specific and Pathogen-Induced Regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* $\beta(1,3)$ glucanase Gene. *The Plant Cell* **2**, 1131-1143.

Chamnongpol S., Willekens H., Langebartels C., Montagu M.V., Inzé D. and Van Camp W. (1996). Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *The Plant Journal.* **10(3)**, 491-503.

Chen Z., Ricigliano J.W., and Klessig D. F. (1993). Purification and characterization of a soluble salicylic acid acid-binding protein from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9533-9537. *Biochemistry.*

- Chen Z., Silva H., Klessig D. F. (1993). Active Oxygen Species in the Induction of Plant Systemic Acquired Resistance by Salicylic Acid. *Science*. **262**, 1883-1886.
- Cordero, M.J., Raventós, D., and San Segundo, B. (1994). Differential expression and induction of chitinases and $\beta(1,3)$ glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. **2**, 23-31.
- Côté, F., Cutt, J.R., Asselin, A., and Klessig, D.F. (1991). Pathogenesis-related acidic $\beta(1,3)$ glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **4**, 173-181.
- Crute I. R. and Pink D. A. C. (1996). Genetics and Utilization of Pathogen Resistance in Plants. *The Plant Cell* **8**, 1747-1755.
- Cutt J.R. and Klessig D. F. (1992) Pathogenesis-related Proteins. In *Genes Involved in Plant Defense*, (Plant Gene Research Series), T. Boller, and F. Meins (Eds.). Wien, Springer, pp. 209-243.
- Dann E. K., Meuwly P., Métraux J. P. and Deverall B.J. (1996). The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and $\beta(1,3)$ glucanase and accumulation of salicylic acid in green bean leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **49**, 307-319.
- Delaney T. P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., M. Gut-Rella, H. Kessmann, E. Ward, J. Ryals. (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science*. **266**, 1247-1250.
- Diamond J. M. (1989) Hot sex in voodoo lilies. *Nature*. **339**, 258-259.
- Dixon R. A. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 339-67.
- Doares S. H., Narváez-Vásquez 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.
- Enyedi A. J., Yalpani N., Silverman P., and Raskin I. (1992). Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Plant Biology*. **89**, 2480-2484.
- Enyedi A.J., Yalpani N., Silverman P., and Raskin I. (1992). Signal Molecules in Systemic Plant Resistance to Pathogens and Pests. *Cell*. Vol. **70**, 879-886.
- Enyedi A.J. and Raskin I. (1993). Induction of UDP-Glucose:Salicylic Acid Glucosyltransferase Activity in Tobacco Mosaic Virus-Inoculated Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Leaves. *Plant Physiol.* **101**, 1375-1380.

- Felix , G., and Meins, F. (1987). Ethylene regulation of $\beta(1,3)$ glucanase in tobacco. *Planta* 172, 386-392.
- Felix, G., and Meins, F. Jr (1986). Developmental and hormonal regulation of $\beta(1,3)$ glucanase in tobacco. *Planta* 167, 206-211.
- Fraser, R.S.S. (1981). Evidence for the occurrence of the "pathogenesis-related" proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiol. Plant Pathol.* 19, 69-76.
- Fukuda Y., Ohme M. and Shinshi H. (1991). Gene structure and expression of tobacco endochitinase gene in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Molecular Biology.* 16, 1-10.
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. (1993). Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science.* 261, 754-756.
- Glazner J. A., Orlandi E.W and Jacyn Baker C. (1996). The Active Oxygen Response of Cell Suspensions to Incompatible Bacteria Is Not Sufficient to Cause Hypersensitive Cell Dead. *Plant Physiol.* 110, 759-763.
- Gheysen G., Angenon G. and Montagu M.V. (1992). Transgenic Plant: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated. Transformation and Its Use for Crop Improvement. *Transgenesis.* pp 187-232.
- Ham K. G., Wu S., Darvill A. G. and Albersheim P. (1997). Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- $\beta(1,3)$ glucanases. *The Plant Journal.* 11(2), 169-
- Ham, K.-S., Kauffmann, S., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (1991). Host-pathogen interactions. XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with $\beta(1,3)$ glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 4, 545-
- Hammond-Kosack K. E. and Jones J. D. G. (1996). Resistance Gene-Dependent Plant Defense Respsnes. *The Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hanke D. E.(1992).A new signalling role for salicylic acid. *Current Biology.* 2, 441-443.
- Hird D. L. , Worrall D., Hodge R., Smartt S., Paul W. and Scott. R.(1993). The anther-specific protein encoded by the Brassica napus and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to $\beta(1,3)$ glucanases. *The Plant Journal.* 4(6), 1023-1033.
- Hennig, J., Dzwey, R.E., Cutt, J.R., and Klessig, D.F. (1993). Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of $\beta(1,3)$ glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. *Plan J.* 4, 481-493.
- Hennig J., Malamy J., Gryniewicz G., Indulski J.and Klessig D.F. (1993). Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *The Plant Journal.* 4(4), 593-600.

Herbers K., Meuwly P., Frommer, W. B. Métraux J.-P. and Sonnewald U. (1996). Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *The Plant Cell*, **8**, 793-803.

Horvath D., Mand Chua N.-H. (1994). The role of salicylic acid in systemic acquired resistance *Current Opinion in Biotechnology*. **5**, 131-136. *Current Biology*.

Høj, P.B., Hartman, D.J., Morrice, N.A., Doan, D.N.P., and Fincher, G.B. (1989). Purification of (1->3)- β -glucan endohydrolase isoenzyme II from germinated barley and determination of its primary structure from a cDNA clone. *Plant Mol. Bio.* **13**, 31-42

Jefferson R. A., Kavanagh T. A. and Bevan M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**, 3901-3907.

Ji C. and Kúc J. (1995). Purification and Characterization of an Acidic β (1,3)glucanase from Cucumber and its Relationship to Systemic Disease Resistance Induced by *Colletotrichum lagenarium* and Tobacco Necrosis Virus. *MPMI*. **8**, 899-905.

Jones A. M. (1994). Surprising Signals in Plant Cells. *Science*. **263**, 183-184.

Kardish N., Magal N., Aviv D. and Galun E. (1994). The tomato gene for the chloroplastic Cu,Zn superoxide dismutase: regulation of expression imposed in transgenic tobacco plants by a short promoter. *Plant Molecular Biology* **25**, 887-897.

Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P. and Fritig B. (1987). Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have β (1,3)glucanase activity. *The EMBO Journal* vol.6, 3209-3212.

Keen and Yoshikawa, M (1983). β (1,3)endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol.* **71**, 460-465.

Kim Y. J. and Hwang B. K. (1994). Differential accumulation of β (1,3)glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **45**, 195-209.

Klessig D. F. and Malamy J. (1994). The salicylic acid signal plants. *Plant Molecular Biology*. **26**, 1439-1458.

Kombrink E. and Somssich I. E. . (1995). Defense Responses of Plants to Pathogens. *Advances in Botanical Research* **21**, 2-34.

Kombrink, E., Schröder, M., and Hahlbrock, K. (1988). Several "pathogenesis-related" proteins in potato are β (1,3)glucanase and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 782-786

Lawton K., Weymann K., Friedrich L., Vernooij B., Uknes S., and Ryals J. (1995). Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis* Requires Salicylic Acid but Not Ethylene. *MPMI* 8, 863-870. The American Phytopathological Society.

León J., Shulaev V., Yalpani N., Lawton M.A., and Raskin I. (1995). Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10413-10417.

León J., Yalpani N., Raskin I., and Lawton M. A. (1993). Induction of Benzoic Acid 2-Hydroxylase in Virus-Inoculated Tobacco. *Plant Physiol.* 103, 323-328.

Lotan, T., Ori, N., and Fluhr, R.(1989). Pathogenesis-Related Proteins Are Developmentally Regulated in Tobacco Flowers. *The Plant Cell*, 1, 881-887.

Leubner-Metzger G., C. Fründt, Vögeli-Lange R., and Meins, Jr F. (1995). Class I $\beta(1,3)$ glucanases in the Endosperm of Tobacco during Germination. *Plant Physiol.* 109, 751-759.

Lusso M. and Kuc J.(1996). The effect of sense and antisense expression of the PR-N Gene for $\beta(1,3)$ glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 49, 267-283.

Lusso M. and Kuc J. (1995). Evidence for Transcriptional Regulation of $\beta(1,3)$ glucanase as it Relates to Induced Systemic Resistance of Tobacco to Blue Mold. *MPMI* 8, 473-475.

Malamy J., Sánchez-Casas P., Hennig J. , guo A., and Klessig D. F. (1996). Dissection of the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco. *The American Phytopathological Society.* 9, No, 6, 474-482.

Malamy J.and Klessig D.F. (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant Journal.* 2(5), 643-654.

Malamy J., Carr J.P., Klessig D.F. , Raskin I. (1990). Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. *Science.* 250, 1002-1004.

Mauch, F., Mauch-Mani, B., and Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and $\beta(1,3)$ glucanase. *Plant Physiol.* 88, 936-942.

Mauch-Mani 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*. *The Plant Cell* 8, 203-212.

Mauch, F. and Staehelin L. A. (1989). Functional Implications of the Subcellular Localization of Ethylene-Induced Chitinase and $\beta(1,3)$ glucanase in Bean Leaves. *The Plant Cell* 1, 447-457. American Society of Plant Physiologists.

Memelink, J., Linthors, H.J.M., Schilperoort, R.A., and Hoge, J.H.C (1990). Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-

related proteins display different expression patterns. *Plant Mol. Biol.* **14**, 119-126.

Métraux J.P. and Raskin I. (1993). Role of Phenolics in Plant Disease Resistance. *Biotechnology in Plant Disease Control*. pp 191-209. Wiley-Liss, Inc.

Meuwly P., Mölders W., Buchala A., and Métraux J.-P. (1995). Local and Systemic Biosynthesis of Salicylic Acid in Infected Cucumber Plants. *Plant Physiol.* **109**, 1107-1114.

Moore, A.E., and Stone, B.A. (1972). Effect of senescence and hormone treatment on the activity of $\beta(1,3)$ glucan hydrolase in *Nicotiana glutinosa* leaves. *Planta* **104**, 93-109

Mölders W., Buchala A., and Métraux J.-P. (1996). Transprt of Salicylic Acid in Tobacco Necrosis Virus-Infected Cucumber Plants. *Plant Physiol.* **112**, 787-792.

Mur L. A. J., Naylor G., Warner S. A. J., Sugars J. M., White R. F. and Draper J. (1996). Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal.* **9(4)**, 559-571.

Neale, A.D., Wahleithner, J.A., Lund, M., Bonnett, H.T., Kelly, A., Meeks-Wagner, D.R., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1990). Chitinase, $\beta(1,3)$ glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* **2**, 673-684.

Neuhaus J. M. , Flores S., Keefe D., Ahl-Goy P. and Meins Jr. F. (1992). The funtion of vacuolar $\beta(1,3)$ glucanase investigated by antisense transformation. Susceptibility of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology.* **19**, 803-813.

Newman M.A., Conrads-Strauch J., Scofield G., Daniels M.J., and Maxwell Dow J. (1994). Defense-Related Gene Induction in *Brassica campestris* in Response to defined Mutants of *Xanthomonas campestris* with Altered Pathogenicity. *The American Phytopathological Society.* **7**, 553-563.

O'Garro L. W. and Charlemange E. (1994). Comparison of bacterial growth and activity of glucanase and chitinase in pepper leaf and flower tissue infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* **45**, 181-188.

Ogallo J. L. and McClure M. A. (1996). Systemic Acquired Resistance and Susceptibility to Root-Knot Nematodes in Tomato. *Phytopathology* **86**, 498-501.

Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S. and Fluhr, R. (1990). A major stelar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *The EMBO Journal* **9**, 3429-3436.

Panm S. Q., Ye X. S., and Kuc J. (1992). Induction of Chitinases in Tobacco Plants Systemically Protected Against Blue Mold by *Peronospora*

tabacina or Tobacco Mosaic Virus. *Phytopathology* **82**, 119-123. The American Phytopathological Society.

Palva T. K., Hurtig M., Saindrenan P., and Tapio Palva E. (1993). Salicylic Acid Induced Resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Tobacco. *MPMI* Vol. 7, 356-363. The American Phytopathological Society.

Pallas J. A., Paiva N. L., Lamb C. and Dixon R. A. (1996). Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* **10**(2), 281-293.

Pierpoint, W.S., Jackson, P.J., and Evans, R.M. (1990). The presence of a thaumatin-like protein, a chitinase and a glucanase among the pathogenesis-related proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **36**, 325-338.

Pieterse C.M. J., van Wees S. C. M., Hoffland E., Van Pelt J. A. and van Loon L. C. (1996). Systemic Resistance in *Arabidopsis* Induced by Biocontrol Bacteria Is Independent of Salicylic Acid Accumulation and Pathogenesis-Related Gene Expression. *The Plant Cell* **8**, 1225-1237.

Penninckx I. A. M. A., Eggermont K., Terras F. R. G., Thomma B. P. H. J., De Samblanx G. W., Buchala A., Métraux J.-P., Manners J. M., and Broekaert W. F. (1996). Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *The Plant Cell* **8**, 2309-2323.

Plant-Pathogen Interactions, Short Communications: Unexpected Findings on Signal Input and Output. *The Plant Cell*. Vol: **8**, 133.

P.J.J. Hooykaas and R. A. Schilperoort. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*. **19**, 15-38.

Raskin. (1991). Salicylic Acid Is a Systemic Signal and an inducer of Pathogenesis-Related Proteins in Virus-Infected Tobacco. *The Plant Cell*. **3**, 809-818 American Society of Plant Physiologists.

Raskin I.(1992). Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 439-463.

Raskin I. (1995). "C2b. Salicylic acid. *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* pp 188-205.

Raskin I., Turner I. M., and Melander W. R. (1989). Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum Lily by endogenous salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2214-2218. Botany.

Raskin I., H.Skubatz, W. Tang, and B. J. D. Meeuse. (1990). Salicylic Acid Levels in Thermogenic and Non-Thermogenic Plants. *Annals of Botany*. **66**, 369-373.

Raskin I., Ehmann A., Melander W. R. (1987). Salicylic Acid: A Natural Inducer of Heat Production in Arum Lilies. *Science*. **237**, 1601-1602.

- Rhoads D. M. and McIntosh L. (1992). Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression. *The Plant Cell*, 4, 1131-1139. American Society of Plant Physiologists.
- Rasmussen J.B., Hammerschmidt R., and Zook M.N. (1991). Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber after Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 97, 1342-1347.
- San Segundo P., Correa J., Vazquez de Aldana C. R., and Del Rey F. (1993). SSG1, a Gene Encoding a Sporulation-Specific $\beta(1,3)$ Glucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 3823-3837.
- Schraudner, M., Ernst, D., Langebartels, C., and Sandermann, H. Jr. (1992). Biochemical plant responses to ozone. III. Activation of the defense-related proteins $\beta(1,3)$ glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 99, 1321-1328.
- Sela-Buurgale, Ponstein, M.B., A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van den Elzen, P.J.M., and Cornelissen, B.J.C. (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and $\beta(1,3)$ glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101, 857-863.
- Shinshi, H., and Kato, K. (1983). Physical and chemical properties of $\beta(1,3)$ glucanase from cultured tobacco cells. *Agric. Biol. Chem.* 47, 1455-1460.
- Shulaev V., León J., and Raskin I. (1995). Is Salicylic Acid a Translocated Signal of Systemic Acquired Resistance in Tobacco?. *The Plant Cell*, 7, 1691-1701.
- Silverman P., Seskar M., Kanter D., Schweizer P., Métraux J.-P., and Raskin I. (1995). Biosynthesis, Conjugation, and Possible Role. *Plant Physiol.* 108, 633-639.
- Silverman P., Linzer R.A. and Raskin I. (1993). The Role of Salicylic Acid as a Plant Signal Molecule. *Cellular Communication in Plant*.
- Staskawicz B. J., Ausubel F. M., Baker B. J., Ellis J. G., Jones J. D. G. (1995). Molecular Genetics of Plant Disease Resistance. *Science.* 268, 661-666.
- Summermatter K., Sticher L., and Métraux J.-P. (1995). Systemic Response in *Arabidopsis thaliana* Infected and Challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 108, 1379-1385.
- Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Tanaka, K., Shibata, D., and Hirono, O. (1990). Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, $\beta(1,3)$ endoglucanase, in soybean. *Plant Physiol.* 93, 673-682.
- Tsang E.W.T., Bowler C., Hérouart D., Camp W. V., Villarreal R., Genetello C., Montagu M. V., and Inzé D. (1991). Differential Regulation of Superoxide Dismutases in Plants Exposed to Environmental Stress. *The Plant Cell*, Vol. 3, 783-792.

Van de Rhee M. D., Van Kan J. A. L., González-Jaén M.T., and Bool J. F. (1990). Analysis of Regulatory Elements Involved in the Induction of Two Tobacco Genes by Salicylate Treatment and Virus Infection. *The Plant Cell*, **2**, 357-366. American Society of Plant Physiologists.

Van den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., Van Montagu, M., and Vandekerckove, J. (1989). Characterization of vacuolar and extracellular $\beta(1,3)$ glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized defense system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **86**, 2673-2677. Botany.

Van de Rhee, M.D., Lemmers, R., and Bol, J.F. (1993). Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organo-specific expression of tobacco acidic and basic $\beta(1,3)$ glucanase, in soybean. *Plant Mol. Biol.* **21**, 451-461.

Verma H. N., Srivastava Varsha S., and Kumar D. (1996). Induction of Systemic Resistance in Plants Against Viruses by a Basic Protein from *Clerodendrum aculeatum* Leaves. *Phytopathology* **86**, 485-492.

Vidal S., Ponce de León I., Denecke J. and Tapio Palva E. (1997). Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. *The Plant Journal*. **11**(1), 115-123.

Vernooij B., Friedrich L., Ahl Goy P., Staub T., Kessmann H., and Ryals J. (1995). 2,3-Dichloroisonicotinic Acid-Induced Resistance to Pathogens Without the Accumulation of Salicylic Acid. *MPMI* **8**, 228-234. The American Phytopathological Society.

Vögeli, U., Meins, F., Jr, and Boller, T. (1988). Co-ordinated regulation of chitinase and $\beta(1,3)$ glucanase in bean leaves. *Planta* **174**, 364-372.

Vögeli-Lange, R., Fründt, C., Hart, C.M., Beffa, R., Nagy, F., and Meins Jr, F. (1994). Evidence for a role of $\beta(1,3)$ glucanase in dicot seed germination. *Plant J.* **5**, 273-278.

Ward, E. R., Payne, G. B., Moyer, M. B., Williams S. C, Dincher S. S., Sharkey K. C., Beck, J. J., Taylor, H. T., Ahl-Goy, P., Meins, F jr. and Ryals J. A. (1991). Differential Regulation of $\beta(1,3)$ glucanase Messenger RNAs in Response to Pathogen Infection. *Plant Physiol.* **96**, 390-397.

Ward E. R., Ukness. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexandre D.C., Ahl-Goy P., Métraux J.-P. and J. A. Ryals. (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, **3**, 1085-1094.

Willekens H., Villarroel R., Montagu M.V., Inzé D., Van Camp W. (1994). Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Federation of European Biochemical Societies*. **352**, 79-83.

- Worrall, D., Hird, D.L., Hodge, R., Paul W., Draper, J., and Scott, R. (1992). Premature Dissolution of the Microsporocyte Callose Wall Cause Male Sterility in Transgenic Tobacco. *The Plant Cell* **4**, 759-771.
- Wong, Y.-S., and MacLachlan, G.A. (1979). 1,3- β -D-glucanase from *Pisum sativum* seedlings. I. Isolation and purification. *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 244-255.
- Wong, Y.-S., and MacLachlan, G.A. (1980). 1,3- β -D-glucanase from *Pisum sativum* III. Development and distribution of endogenous substrates. *Plant Physiol.* **65**, 222-228.
- Wyatt, S.E., Pan S.Q., and Kuc. J. (1991). β (1,3)glucanase, chitinase, and peroxidase activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mould as related to flowering, age and sucker development. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 433-440.
- Yalpani N. , Schulz M., Davis M.P., and Balke N.E. (1992). Partial Purification and Properties of an Inducible Uridine 5'-Diphosphate-Glucose:Salicylic Acid Glucosyltransferase from Oat Roots. *Plant Physiol.* **100**, 457-463.
- Yalpani N., A. Enyedi J., León J. , Raskin I. (1994). Ultraviolet light and ozane stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta.* **193**, 372-376.
- Yalpani N., Shulaev V., and Raskin I.(1993). Endogenous Salicylic Acid Levels Correlate with Accumulation of Pathogenesis-Related Proteins and Virus Resistance in Tobacco. *Phytopathology.* **83**, 702-708. The American Phytopathological Society.
- Yalpani N. and Raskin I. (1993). Salicylic acid: a systemic signal in induced plant disease resistance. *Reviews. Trends in Microbiology.* **88**. 1, No.3
- Yalpani N., León J., Lawton M. A., and Raskin I. (1993). Pathway of Salicylic Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco. *Plant Physiol.* **103**, 315-321.
- Yi S. Y. and Hwang B. K. (1996). Differential induction and accumulation of β (1,3)glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* **46**, 179-192.