



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**Participación de las mitocondrias en la respuesta de  
defensa de *Arabidopsis thaliana* frente a la infección de  
microorganismos patógenos**

TESIS DOCTORAL

**Ada Martínez Ayala**

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Departamento de Biología Molecular Facultad de Ciencias

**Participación de las mitocondrias en la respuesta de  
defensa de *Arabidopsis thaliana* frente a la infección de  
microorganismos patógenos**

TESIS DOCTORAL

**Ada Martínez Ayala**  
Licenciada en Biología

DIRECTORA  
**Carmen Castresana Fernández**

CO-DIRECTOR  
**Yovanny Izquierdo Nuñez**

Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, 2018

**Participación de las mitocondrias en la respuesta de  
defensa de *Arabidopsis thaliana* frente a la infección de  
microorganismos patógenos**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias, por

**Ada Martínez Ayala**

Universidad Autónoma de Madrid,  
Enero de 2018

Directora de la Tesis  
**Dra. Carmen Castresana Fernández**

Co-Director de la Tesis:  
**Dr. Yovanny Izquierdo Nuñez**

Tutor de la Tesis:  
**Dr. Aurelio Hidalgo Huertas**

El Doctorando  
**Ada Martínez Ayala**

## RECONOCIMIENTOS

Mi reconocimiento y gratitud por la financiación de la presente tesis, a la beca “Señor Presidente” concedida por el Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC) del Gobierno Peruano. La presente tesis se ha realizado en el Centro Nacional de Biotecnología, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Mi sincero reconocimiento a todas las personas que han hecho posible la culminación de la presente tesis.

A la Dra. Carmen Castresana por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y poder recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza.

Al Dr. Yovanny Izquierdo por el apoyo constante en el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Aurelio Hidalgo por aceptar la tutoría de esta tesis y facilitar cualquier trámite documentario.

Al Dr. Luis Muñoz y a Alfonso González por su ayuda durante la cuantificación de transcritos mediante PCR cuantitativa.

A la Dra. Verónica Aguilera por el trabajo inicial con el mutante *noxy54*.

A Rubén Fernández por su ayuda en la puesta a punto de la metodología de infección de *Alternaria brassicicola*.

A Tomás Cascón por su colaboración en el desarrollo de diferentes experimentos.

Al personal del Departamento de Genética Molecular de Plantas.

Al servicio de cultivo *in vitro*, por su ayuda en la preparación de medios y siembra de semillas.

Al servicio de invernadero, por su colaboración en el mantenimiento de plantas.

A Sylvia Gutiérrez y Ana Oña del servicio de microscopía confocal por su ayuda durante el análisis de la morfología y distribución mitocondrial en los mutantes *noxy*.

A Inés Poveda, por el trabajo fotográfico realizado.

A los servicios de Mantenimiento e Instrumentación, por su ayuda en la resolución de los problemas técnicos surgidos.

A los departamentos de Personal y Administración, por su ayuda en numerosas ocasiones con diversos trámites.

## **AGRADECIMIENTOS**

Finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral; hubiese sido imposible sin la participación de personas que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresarles mi eterna gratitud.

A Carmen por la dirección de la tesis, por su profesionalismo, por la dedicación en la corrección de la tesis y por la confianza depositada en mí para el desarrollo de la presente investigación.

A Yovanny por la Co-dirección de la tesis, infinitas gracias por tu apoyo y amistad durante estos años, por el esmero en la corrección de la tesis, por estar siempre dispuesto a ayudar y enseñar.

A Tomás por su excelente labor técnica y su disposición a ayudar.

A los miembros del 315, ha sido un verdadero placer trabajar con ustedes durante estos años, muchas gracias por ayudarme en los diferentes ensayos de laboratorio y resolver mis dudas: Satish, Verónica, Marta, Ruth, Rubén, Luis, Alfonso y Bran.

A todo el personal del departamento de Genética Molecular de Plantas por su disposición a ayudar siempre y por su amabilidad.

A mis amigos, más que amigos hermanos de Villaverde Alto, mi eterno agradecimiento por todo lo que recibí, ustedes hicieron mi vida familiar y placentera en Madrid, con ustedes las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. (Juan Jesús, Eduardo, Carmen, Miguel, Toñi, Jesús, Teresa, Arturo, Charo, Tito, Lety, Margarita, Silvia, Esperanza, Carlos, Peter, Mónica, Julia, Elena). En especial a Patricio, Lucy y Marco por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir en familia. Mil gracias Lucy por impulsarme a escribir cuando me parecía imposible, por tus sabios consejos, por todo.

A mis amigos de Perú: José Luis, Herbert, Rocío, Yesika, Miluska, Marilia, Yazmín a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me fortalece para seguir adelante.

Llegar hasta aquí nunca hubiera sido posible sin el cariño y apoyo incondicional de mi familia: a la memoria mi madre a la que llevo presente siempre con la seguridad de que vela mis sueños, a mi padre, hermanos, sobrinos, cuñados, tíos, primos. Esta tesis es por ustedes y para ustedes.

# *Abreviaturas*

---

## ABREVIATURAS

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>9-HOT</b>                      | Ácido 9-hidroxy-octadecatrienoico                  |
| <b>AA</b>                         | Antimicina A                                       |
| <b>ABA</b>                        | Ácido Abscísico                                    |
| <b>ACC</b>                        | Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico            |
| <b>AOX1a</b>                      | <i>Alternative oxidase 1a</i>                      |
| <b>BR</b>                         | Brasinoesteroides                                  |
| <b>CI</b>                         | Complejo I; Complejo NADH deshidrogenasa           |
| <b>CII</b>                        | Complejo II; Succinato deshidrogenasa              |
| <b>CIII</b>                       | Complejo III; Complejo de citocromo bc1            |
| <b>CIV</b>                        | Complejo IV; Citocromo c oxidasa                   |
| <b>CV</b>                         | Complejo V; ATP-sintasa                            |
| <b>Cyt c</b>                      | Citocromo c  |
| <b>ETI</b>                        | <i>Effector triggered immunity</i>                 |
| <b>GA</b>                         | Ácido giberélico                                   |
| <b>HR</b>                         | <i>Hypersensitive response</i>                     |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de hidrógeno                              |
| <b>ISR</b>                        | <i>Induced systemic resistance</i>                 |
| <b>JA</b>                         | Ácido jasmónico                                    |
| <b>LOX</b>                        | Lipoxigenasa                                       |
| <b>noxy</b>                       | <i>Non-responding to oxylipins</i>                 |
| <b>OPDA</b>                       | Ácido 12-oxo fitodienoico                          |
| <b>PAMP</b>                       | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>       |
| <b>PDC</b>                        | <i>Pyruvate dehydrogenase complex</i>              |
| <b>PPR</b>                        | <i>Pentatricopeptide Repeat containing Protein</i> |
| <b>PRR</b>                        | <i>Pattern recognition receptor</i>                |
| <b>ROS</b>                        | <i>Reactive oxygen species</i>                     |
| <b>SA</b>                         | ácido salicílico                                   |
| <b>SL</b>                         | estrigolactonas                                    |

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| <b>SAR</b> | <i>Systemic acquired resistance</i> |
| <b>TCA</b> | <i>Tricarboxylic acid cycle</i>     |
| <b>TF</b>  | Factor de transcripción             |
| <b>UTR</b> | <i>Untranslated region</i>          |
| <b>UQ</b>  | Ubiquinona                          |
| <b>UQH</b> | Ubiquinol                           |



# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>1.1 La defensa vegetal</b> .....  | <b>11</b> |
| 1.1.1 Respuesta de defensa según el patógeno.....  | 12        |
| 1.1.2 Interacción planta-patógeno.....   | 12        |
| 1.1.3 Interacción hormonal e inmunidad vegetal.....  | 13        |
| 1.1.4 Oxilipinas y defensa de la planta .....  | 14        |
| 1.1.5 Funciones y señalización de oxilipinas de la ruta 9-LOX.....                           | 16        |
| <b>1.2 Las mitocondrias en plantas</b> .....   | <b>18</b> |
| 1.2.1. Principales funciones de las mitocondrias en la célula vegetal.....                   | 18        |
| 1.2.2 Señalización retrógrada y estrés mitocondrial en plantas .....                         | 19        |
| 1.2.3 Relación entre las mitocondrias y las hormonas vegetales.....                          | 21        |
| 1.2.3.1 El ácido salicílico .....  | 22        |
| 1.2.3.2 El ácido jasmónico .....   | 23        |
| 1.2.3.3 El Etileno.....  | 24        |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>3.1. Material biológico, crecimiento y mantenimiento</b> .....                            | <b>33</b> |
| <b>3.2. Material vegetal</b> .....   | <b>34</b> |
| 3.2.1 Crecimiento de las plantas in vitro .....  | 34        |
| 3.2.2. Crecimiento de plantas en tierra .....  | 34        |
| 3.2.3 Cruzamientos de plantas .....  | 35        |
| <b>3.3. Tratamientos en plantas</b> .....  | <b>35</b> |
| 3.3.1. Inoculación de plantas con <i>Pseudomonas syringae</i> .....                          | 35        |
| 3.3.2. Evaluación de síntomas y crecimiento bacteriano in planta .....                       | 35        |
| 3.3.3. Inoculación de plantas con el hongo fitopatógeno <i>Alternaria brassicicola</i> ..... | 36        |

|  |              |
|--|--------------|
| 3.3.4 Evaluación de síntomas de infección con <i>Alternaria brassicicola</i> .....                               | 36           |
| 3.3.5. Recuento de esporas.....  | 37           |
| 3.3.6. Tratamientos in vitro .....   | 37           |
| <b>3.4. Técnicas histológicas .....</b>  | <b>38</b>    |
| 3.4.1. Tinción de calosa.....  | 38           |
| 3.4.1. Tinción de lignina .....  | 38           |
| <b>3.5. Preparación y análisis de ácidos nucleicos .....</b>   | <b>38</b>    |
| 3.5.2. Preparación de ADN genómico de plantas .....  | 38           |
| 3.5.3. Preparación de ARN total de plantas.....  | 38           |
| 3.5.4. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....                                 | 38           |
| (PCR) .....  | 38           |
| 3.5.5. PCR Cuantitativa.....   | 39           |
| 3.5.6. Secuenciación de ADN.....   | 39           |
| 3.5.7. Técnicas electroforéticas .....   | 39           |
| <b>3.6. Identificación de mutaciones .....</b>   | <b>.....</b> |
| 3.6.1 Cruzamientos de mutantes <i>noxy</i> .....   | .....        |
| 3.6.2. Clonaje posicional de las mutaciones <i>noxy5</i> , <i>noxy23</i> y <i>noxy54</i> .....                   | 40           |
| <b>3.7. Obtención y análisis de imágenes mitocondriales .....</b>  | <b>41</b>    |
| <b>3.8. Aplicaciones bioinformáticas .....</b>   | <b>41</b>    |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>  | <b>43</b>    |
| <b>4.1 Caracterización preliminar de los mutantes <i>noxy</i>: respuesta a 9-HOT e isoxaben.....</b>             | <b>43</b>    |
| <b>4.2 Clonaje posicional de los genes <i>NOXY5</i>, <i>NOXY23</i> y <i>NOXY54</i> .....</b>                     | <b>45</b>    |
| 4.2.1. Identificación de la mutación <i>noxy5</i> .....  | 46           |
| 4.2.2 Identificación de la mutación <i>noxy23</i> .....  | 47           |
| 4.2.3 Identificación de la mutación <i>noxy54</i> .....  | 48           |
| <b>4.3 Análisis de la función mitocondrial en los mutantes <i>noxy5</i>, <i>noxy23</i> y <i>noxy54</i> .....</b> | <b>49</b>    |
| 4.3.1 Respuesta de los mutantes <i>noxy</i> frente al estrés mitocondrial.....                                   | 50           |
| <b>4.3 Respuesta de los mutantes <i>noxy</i> frente a la infección de patógenos .....</b>                        | <b>54</b>    |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.2 Análisis de los mutantes <i>noxy</i> frente a la infección de la bacteria virulenta<br><i>Pseudomonas syringaepav. tomato</i> .....   | 54        |
| 4.3.3 Análisis de los mutantes <i>noxy</i> frente a la infección del hongo necrotrofo<br><i>Alternaria brassicicola</i> .....   | 59        |
| .....   | 74        |
| <b>5. DISCUSION</b> .....   | <b>75</b> |
| <b>5.1. Las mutaciones <i>noxy5</i>, <i>noxy23</i> y <i>noxy54</i> alteran la funcionalidad de las<br/>mitocondrias y la respuesta de las plantas frente al daño mitocondrial</b> ..... | <b>75</b> |
| <b>5.2. Efecto de las mutaciones <i>noxy</i> en la activación de la respuesta de defensa vegetal</b> ....   | <b>79</b> |
| 5.2.1 Respuesta a la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato .....   | 79        |
| 5.2.2 Respuesta al hongo <i>Alternaria brassicicola</i> .....   | 81        |
| .....   | 88        |
| <b>6. CONCLUSIONES:</b> .....   | <b>89</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>90</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLA

|  |    |
|--|----|
| <i>Figura 1. Esquema simplificado del ciclo mitocondrial del TCA y de la cadena respiratoria..</i>   | 19 |
| <i>Figura 2. Descripción general de las vías de señalización entre el núcleo, las mitocondrias y cloroplastos.....</i>   | 20 |
| <i>Figura 3. Respuestas de plantas silvestres (Col-0) y mutantes noxy5, noxy23 y noxy54 a la presencia 9-HOT. ....</i>   | 44 |
| <i>Figura 4. Respuestas de plantas silvestres (Col-0) y mutantes noxy5, noxy23 y noxy54 a la presencia de isoxaben. ....</i>                                     | 44 |
| <i>Figura 5. Representación esquemática de la estrategia de cartografía seguida para identificar la mutación noxy5. ....</i>                                     | 46 |
| <i>Figura 6. Topología de la proteína NOXY5, constituida por 10 dominios PPR y 1 dominio PPR (DYW). ....</i>   | 46 |
| <i>Figura 7. Representación esquemática de la estrategia de cartografía seguida para identificar la mutación noxy23.. ....</i>                                   | 47 |
| <i>Figura 8. Topología de la proteína NOXY23, que contiene un dominio S5_DSRBD.....</i>  | 48 |
| <i>Figura 9. Representación esquemática de la estrategia de cartografía seguida para identificar la mutación noxy54. ....</i>                                    | 48 |
| <i>Figura 10. Topología de la proteína NOXY54, que contiene un dominio CAF1. ....</i>  | 49 |
| <i>Figura 11. Visualización de mitocondrias en raíces de plantas silvestres y mutantes noxy15, noxy5, noxy23 y noxy54. ....</i>                                  | 50 |
| <i>Figura 12. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes noxy5, noxy15, noxy23, y noxy54 a la presencia de AA.....</i>                          | 52 |
| <i>Figura 13. Cuantificación de la expresión del gen AOX1a en respuesta al tratamiento con Antimicina A.....</i>   | 53 |
| <i>Figura 14. Cuantificación de la expresión del gen MSD1 en respuesta a Antimicina A. ....</i>  | 54 |
| <i>Figura 15. Análisis de síntomas y del crecimiento bacteriano en plantas silvestres y mutantes noxy frente a la infección de Pst DC3000. ....</i>              | 56 |
| <i>Figura 16. Cuantificación de la expresión del gen PR1 durante la infección de Pst DC3000.....</i>   | 57 |
| <i>Figura 17. Cuantificación de la expresión del gen S3H durante la infección con Pst DC3000.....</i>  | 58 |
| <i>Figura 18. Cuantificación de la expresión del gen AOX1a durante la infección con Pst DC3000.....</i>  | 59 |
| <i>Figura 19. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes noxy frente a la infección del hongo necrotrofo Alternaria brassicicola. ....</i>        | 61 |
| <i>Figura 20. Análisis del recuento de esporas en plantas silvestres y mutantes noxy frente a la infección del hongo necrotrofo Alternaria brassicicola.....</i> | 62 |
| <i>Figura 21. Cuantificación de la expresión del gen PDF1.2 durante la infección con Alternaria brassicicola. ....</i>   | 63 |
| <i>Figura 22. Cuantificación de la expresión del gen PR4 durante la infección con Alternaria brassicicola. ....</i>  | 64 |

---

|   |    |
|---|----|
| <i>Figura 23. Cuantificación de la expresión del gen PAD3 durante la infección con Alternaria brassicicola.</i> .....                     | 65 |
| <i>Figura 24. Cuantificación de la expresión del gen AOX1a durante la infección con Alternaria brassicicola.</i> .....                    | 66 |
| <i>Figura 25. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes noxy5, noxy15, noxy23 y noxy54 a la presencia de SA.</i> .....  | 67 |
| <i>Figura 26. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes noxy5, noxy15, noxy23 y noxy54 a la presencia de JA.</i> .....  | 68 |
| <i>Figura 27. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes noxy5, noxy15, noxy23 y noxy54 a la presencia de ACC.</i> ..... | 69 |
| <br>  |    |
| <i>Tabla 1. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa</i> .....  | 40 |

# *Resumen*

---

## RESUMEN

Las oxilipinas sintetizadas a través de la ruta iniciada por la acción de las enzimas 9-lipoxygenasas actúan como moléculas señalizadoras durante la activación de la defensa vegetal frente a la infección de patógenos. Dado que sus receptores y mecanismos de acción no han sido descritos, el estudio de mutantes insensibles a oxilipinas (*noxy*) constituye una importante herramienta para identificar los componentes celulares que intervienen en la señalización de estas moléculas y dilucidar los procesos celulares sobre los que ejercen su acción. En este trabajo se han seleccionado tres mutantes, designados *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, con objeto de examinar la participación de las proteínas NOXY en la activación de la defensa vegetal frente a la infección de patógenos hemibiotrofos y necrotrofos tales como la bacteria *Pseudomonas syringae* y el hongo *Alternaria brassicicola*. El clonaje posicional de estos mutantes reveló que, en los tres casos, los genes afectados codifican proteínas mitocondriales asociadas a la traducción de mensajeros en este orgánulo. Así, la mutación *noxy5* fue localizada en el locus At3g02010, que codifica una proteína PPR (*PENTATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING PROTEIN*); la mutación *noxy23* fue localizada en el locus At1g64880 que codifica la proteína ribosomal S5; mientras que la mutación *noxy54* afecta al locus At1g55870 que codifica una exorribonucleasa específica de poli-A. La caracterización de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* muestra la formación de acúmulos mitocondriales y la alteración de la respuesta al daño mitocondrial, indicando que las proteínas NOXY identificadas regulan la función mitocondrial, tanto en condiciones basales, como en situaciones de estrés.

El análisis de la respuesta de defensa de los mutantes *noxy* puso de manifiesto diferencias importantes en relación a la formación de síntomas, al crecimiento de los patógenos y a la activación de la expresión de genes marcadores de las distintas rutas de defensa de la planta. Los resultados obtenidos en estos estudios pusieron de manifiesto el aumento de la susceptibilidad de las plantas *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* frente a los dos tipos de patógenos examinados, y permiten definir la acción de las proteínas NOXY correspondientes como reguladores positivos de la defensa frente a patógenos hemibiotrofos y necrotrofos. El hecho de que los genes identificados codifiquen proteínas mitocondriales involucradas, directa o indirectamente, en la síntesis de proteínas mitocondriales es particularmente relevante, y apunta a la existencia de nuevos mecanismos de defensa vegetal dependientes de la función de estos orgánulos, que escaparían al clásico antagonismo salicílico-jasmonato.

# *Abstract*

---



## ABSTRACT

Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway act as signaling molecules during the activation of plant defense against pathogen infection. As their receptors and mechanisms of action have not been described, non-responding to oxylipins (*noxy*) mutants are important tools to identify the cellular components involved in oxylipin signaling and to discover the cellular processes on which they exert their actions. In this work we have selected three mutants, namely *noxy5*, *noxy23* and *noxy54*, in order to elucidate the participation of NOXY proteins in defense activation against the infection by hemibiotrophic and necrotrophic pathogens such as the bacteria *Pseudomonas syringae*, and the fungus *Alternaria brassicicola*. Map-based cloning followed by whole genome sequencing of these mutants showed that, in all three cases, the affected genes encode mitochondrial proteins associated with the translation of messengers in this organelle. Thus, the *noxy5* mutation was located at the At3g02010 locus, which encodes a PPR protein (PENTATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING protein); *noxy23* was located at the At1g64880 locus encoding a S5 ribosomal protein; whereas *noxy54* affects the At1g55870 locus encoding a poly-A specific exoribonuclease. Characterization of *noxy5*, *noxy23* and *noxy54* shows the formation of mitochondrial accumulations, as well as altered responses to mitochondrial damage, in comparison with wild type plants. This indicates that NOXY proteins regulate mitochondrial function in both basal and stress conditions. Analysis of *noxy* defense responses revealed important alterations regarding symptom formation, pathogen growth and induction of genes from several defense pathways. Results obtained in these studies showed the increased susceptibility of *noxy5*, *noxy23* and *noxy54* plants to the two classes of pathogens examined, and allow to define the action of the corresponding NOXY proteins as positive regulators of defense against both hemibiotrophs and necrotrophs. The fact that the identified genes encode mitochondrial proteins which are directly or indirectly involved in mitochondrial translation is particularly relevant, as it points to the existence of new plant defense mechanisms dependent on the function of these organelles, which could escape the classical salicylic-jasmonate antagonism.

# *Introducción*

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas, a diferencia de los mamíferos, carecen de un sistema de células móviles encargadas de activar una respuesta de defensa frente a la infección de patógenos, así como de un sistema inmune adaptativo. No obstante, al igual que el resto de los organismos, las plantas están en contacto constante con agentes patógenos y para evitar su infección han desarrollado numerosas estrategias de defensa, que en su conjunto se denominan sistema inmune vegetal, y que les ha permitido ser la forma de vida dominante en nuestro planeta y colonizar una amplia variedad de hábitats de los que dependen la mayoría de las especies restantes. Como parte de los mecanismos de defensa frente a la infección de patógenos, las plantas han desarrollado diversas respuestas que van desde la formación de barreras físicas (tales como las ceras y la cutina en la superficie de sus órganos, y la formación de paredes celulares rígidas), hasta la reprogramación celular a través de distintas señales y rutas de señalización que modifican el metabolismo celular para generar compuestos de defensa e interferir con las estrategias de virulencia desarrolladas por los patógenos. Los mecanismos de defensa de la planta se activan a nivel local, en la zona de infección, así como en tejidos alejados de estos, en lo que se denomina defensa sistémica, cuya activación protege a las plantas frente a infecciones secundarias (Zipfel, 2008; Boller & Felix, 2009).

### 1.1 La defensa vegetal

La inmunidad de las plantas está integrada por respuestas de defensa preformadas e inducidas (Mysore & Ryu, 2004). Las respuestas de defensa preformadas no son específicas e incluyen compuestos con propiedades antimicrobianas o barreras estructurales, tales como la pared celular (Mysore & Ryu, 2004; Senthil-kumar, 2013). Las defensas inducidas se activan tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) presentes, en su mayoría, en la superficie de estos (Boller & He, 2009), o por el reconocimiento de proteínas específicas (efectores) que son liberadas por los patógenos al interior de las células del hospedero (Jones & Dangl, 2006; Bonardi, 2012). Las respuestas de defensa inducidas incluyen la reorganización del citoesqueleto (Hardham et al., 2007; Higaki et al., 2011), la fortificación de la pared celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hardham et al., 2007; Torres, 2010), y la síntesis de fitoalexinas (Ahuja et al., 2012), así como la activación de procesos posteriores tales como la transcripción de los genes que codifican las proteínas de defensa (PR) (van Loon et al., 2006) y la activación de un proceso de muerte celular programada en los puntos de infección (PCD), denominada respuesta hipersensible (HR) que limita el acceso de los patógenos a los nutrientes de la planta y su propagación en los tejidos infectados (Coll et

al., 2011). Aunque los estudios realizados en los últimos años han contribuido enormemente al conocimiento de la respuesta de defensa vegetal, los procesos relacionados con la alteración de las rutas metabólicas basales de la planta que permiten tanto el crecimiento de los patógenos como la activación de la defensa aún son en gran medida desconocidos (Rojas et al., 2014).

### **1.1.1 Respuesta de defensa según el patógeno**

Los patógenos establecen una interacción parasitaria con las plantas hospederas y, en función de su estilo de vida, pueden dividirse en dos grandes grupos, denominados biotrofos y necrotrofos. Los patógenos biotrofos obtienen nutrientes del tejido vivo del hospedero, para lo que han desarrollado en algunos casos estructuras especializadas denominadas haustorios; el oomyceto obligado, *Peronospora parasitica* es un ejemplo clásico de patógenos de este grupo (Koch & Slusarenko, 1990). Los patógenos necrotrofos están adaptados para alimentarse a partir de células muertas del hospedero y para ello causan un daño importante en los tejidos vegetales; los hongos patógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola* pertenecen a este grupo de patógenos. Existe un tercer grupo de patógenos tales como la bacteria *Pseudomonas syringae*, que muestran un estilo de vida mixto dependiendo del estadio de infección, y en consecuencia se denominan hemibiotrofos. Las bacterias del género *Pseudomonas* infecta las plantas a través de heridas y aperturas naturales tales como los estomas, para multiplicarse en los espacios intercelulares de la hoja. El crecimiento bacteriano en el interior del apoplasto llega a colapsar estos espacios, provocando la muerte de las células vegetales que a nivel sintomático se traduce en la formación de manchas cloróticas y la necrosis tisular del hospedero (Glazebrook, 2005).

La percepción de los patógenos por parte de la planta puede conducir mayoritariamente a dos tipos de interacciones: si la activación de la respuesta de defensa permite evitar el crecimiento del patógeno, la interacción establecida se denomina incompatible y la planta se considera resistente a la infección; por el contrario, si la activación de la respuesta de la planta no es suficiente para evitar la infección, el patógeno puede completar su ciclo de vida a expensas de la planta e invadir los tejidos vegetales, en cuyo caso la interacción se denomina compatible.

### **1.1.2 Interacción planta-patógeno**

Las respuestas de defensa de la planta inducidas como consecuencia de la presencia de patógenos incluyen la resistencia de plantas no hospederas, la inmunidad inducida por patrones moleculares patogénicos (PTI, del inglés *Pathogen-associated molecular pattern*

(PAMP)-Triggered Immunity) y la inmunidad inducida por efectores (ETI, del inglés *Effector-Triggered Immunity*) (Spoel & Dong, 2012). Cuando las moléculas de los patógenos son reconocidas por los receptores transmembrana (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptors*) del hospedero, se produce la activación de una respuesta de resistencia basal o PTI. La inducción de esta respuesta minimiza la propagación de los patógenos, y puede controlar y evitar la infección. Si esto no ocurre, los patógenos producen y liberan a las células de la planta moléculas denominadas efectores o factores de avirulencia (*avr*), que pueden ser reconocidos, directa o indirectamente, por las proteínas de resistencia (R) de la planta. De existir este reconocimiento se activa la ETI, una respuesta específica que induce una resistencia más fuerte y duradera, y por tanto más efectiva para evitar la propagación del patógeno (Spoel & Dong, 2012). La inducción de esta respuesta de inmunidad (ETI) está a menudo acompañada de un proceso muerte celular localizada en el sitio de entrada del patógeno. Este fenómeno, denominado respuesta hipersensible (HR), es una de las primeras manifestaciones visibles de la respuesta de defensa inducidas y comparte cierta homología con los procesos de la muerte celular programada que ocurren en otros organismos (Gray, 2002). Las respuestas de defensa PTI y ETI comparten algunos componentes de señalización, e implican la generación de señales y el establecimiento de rutas de señalización reguladas por la acción de las denominadas hormonas de defensa de la planta. De estas, el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) constituyen las mejor caracterizadas (Kachroo & Kachroo, 2009). El SA es una molécula de naturaleza fenólica y pequeño tamaño que se sintetiza a través de la vía del shikimato. El JA se sintetiza a partir del ácido graso  $\alpha$ -linolénico (18:3) y constituye un miembro clave dentro de la familia de oxilipinas que se generan en respuesta a una infección. Además de los mecanismos de defensa locales, las plantas inducen también respuestas sistémicas que confieren resistencia de amplio espectro frente a infecciones secundarias. En estas respuestas se incluyen la resistencia sistémica inducida (ISR), que se desencadena tras la colonización de la raíz por bacterias beneficiosas (Van Wees et al., 2008), y la resistencia sistémica adquirida (SAR), que se activa tras la infección de patógenos biotrofos (Lim et al., 2017).

### **1.1.3 Interacción hormonal e inmunidad vegetal**

Las hormonas vegetales ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) constituyen las señales reguladoras esenciales durante la activación de la respuesta inmune de las plantas (Pieterse et al., 2012). La respuesta de defensa que se activa frente a la infección de patógenos biotrofos, se establece a través de la biosíntesis y la ruta de señalización dependiente del SA, mientras que la biosíntesis de JA y la señalización regulada por esta hormona, determina la resistencia de la planta frente a la infección de patógenos

necrotrofos (Glazebrook, 2005). Se ha demostrado que en muchas de las interacciones planta-patógeno reguladas por la acción del JA, el etileno (ET) contribuye también a la activación de la respuesta de defensa, y que la acción conjunta de ambas hormonas aumenta el nivel de resistencia (Penninckx et al., 1998; Lorenzo et al., 2003). Igualmente, se ha podido determinar que además de actuar de forma conjunta para potenciar la resistencia vegetal, las hormonas de defensa pueden establecer entre sí una interacción antagonista. Tal es el caso de las rutas de señalización reguladas por la acción del SA y del JA cuyo antagonismo ha sido claramente demostrado en numerosos experimentos (Uknes et al., 1993; Penninckx, 1996; Penninckx et al., 1998).

En las últimas dos décadas, varios estudios han demostrado que otras hormonas vegetales, cuya función está principalmente dirigida a la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como las auxinas (AUX), las citoquininas (CK), los brasinoesteroides (BR), las giberelinas (GA), las estrigolactonas (SL), así como la hormona de estrés abiótico ácido abscísico (ABA), participan también en la defensa de las plantas (Shigenaga & Argueso, 2016). Estas hormonas intervienen en la inmunidad vegetal actuando sobre las rutas de señalización reguladas por la acción del SA y del JA, con las que establecen interacciones cruzadas necesarias para equilibrar la defensa y el desarrollo vegetal. Las interacciones establecidas por las hormonas vegetales durante la activación de la inmunidad son a menudo utilizadas por los patógenos para favorecer la infección, bien mediante la acción de los efectores, o incluso mediante la producción de compuestos similares a las hormonas vegetales, cuya liberación al interior de la célula vegetal interfiere con la activación de la defensa de la planta y altera su metabolismo para favorecer el crecimiento de los patógenos (Kazan & Lyons, 2014; Shigenaga & Argueso, 2016; Ravindran et al., 2016; Ma & Ma, 2016). El ejemplo más estudiado a este respecto es la fitotoxina coronatina (COR), una molécula que mimetiza la acción del JA y que es secretada por la bacteria *Pseudomonas syringae* durante la infección (Fonseca et al., 2009). La liberación de coronatina interfiere con la ruta de señalización regulada por el SA, cuya activación es necesaria para la defensa frente a la infección de patógenos biotrofos. Otros ejemplos a este respecto son la producción por parte de los patógenos de hormonas vegetales tales como ET (Weingart & Völksch, 1997; Weingart et al., 2001), Gas (Metraux et al., 1990), AUXs (Bömke & Tudzynski, 2009), ABA (Gong et al., 2014) y CKs (Gaffney et al., 1993; Pertry et al., 2009).

#### **1.1.4 Oxilipinas y defensa de la planta**

La oxidación de la membrana por parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS) es dañina para la integridad y supervivencia de las células, pero también es una consecuencia

de la vida en una atmósfera que contiene oxígeno. La peroxidación de lípidos que acompaña a la activación de la respuesta de defensa vegetal da lugar a la producción de una gran variedad de formas oxidadas de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), las cuales se denominan genéricamente oxilipinas (Mosblech et al., 2009; Farmer & Mueller, 2013). En animales se han descrito oxilipinas tales como las prostaglandinas o los leucotrienos, que actúan como moléculas señal participando en la regulación de procesos relacionados con el desarrollo y la inmunidad (Guéraud et al., 2010). Además, algunas oxilipinas, en particular compuestos con grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados, son altamente reactivas (Especies Reactivas Electrofilicas RES) ya altas concentraciones exhiben propiedades tóxicas y/o mutagénicas (Farmer & Davoine, 2007). No obstante, a niveles más bajos, las RES actúan como moléculas señalizadoras, desencadenando la activación de la expresión de los genes que favorecerán la protección celular (Guéraud et al., 2010; Farmer & Mueller, 2013). En las plantas, las oxilipinas pueden sintetizarse a partir de distintos ácidos grasos (FA), bien de forma no enzimática por la acción directa de especies reactivas de oxígeno, o bien de forma enzimática a través de la acción de distintas enzimas oxigenasas (Farmer & Davoine, 2007; Farmer & Mueller, 2013). Entre estas destacan las lipoxigenasas (LOXs) con preferencia hacia los ácidos linoleico (18: 2) y linolénico (18: 3), y las alfa dioxigenasas ( $\alpha$ -DOXs) que pueden usar una mayor variedad de ácidos grasos. En ambos casos, la acción enzimática da como resultado la formación de hidroperóxidos altamente reactivos de ácidos grasos (FA-OOH) que se convierten posteriormente, por la acción de actividades enzimáticas secundarias, en distintas clases de oxilipinas (Hamberg et al., 2003; Bannenberg et al., 2009). De acuerdo con la regioespecificidad de los sustratos con respecto al carbono oxigenado, se distinguen dos tipos de lipoxigenasas, 9-LOX y 13-LOX. En *Arabidopsis* se ha descrito la presencia de seis lipoxigenasas distintas, de las cuales dos tienen actividad 9-LOX (LOX1, LOX5), y las otras cuatro son 13-LOX (LOX2, LOX3, LOX4, LOX6)(Bannenberg et al., 2009). Entre las oxilipinas caracterizadas, las ceto-oxilipinas son generalmente sintetizadas solo por la acción de las LOX sobre los FA, mientras que las hidroxil-oxilipinas generalmente requieren además de la modificación de los hidroperóxidos iniciales mediante la acción de enzimas reductasas como las caleosinas/peroxigenasas (Blée et al., 2012; Blée et al., 2014).

Otras oxilipinas requieren vías de síntesis más complejas. Es el caso de la fitohormona ácido jasmónico (JA), cuya ruta de biosíntesis ha sido definida en gran detalle. Esta se inicia con la acción de las 13-LOX sobre el ácido linolénico dando lugar al hidroperóxido correspondiente, el cual es transformado en ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA) por la acción secuencial de las enzimas aleno óxido sintasa y aleno óxido ciclasa. El OPDA es posteriormente sometido a tres rondas de  $\beta$ -oxidación para dar lugar al JA (Browse, 2009;

Pauwels & Goossens, 2011). El JA es una de las fitohormonas de mayor relevancia y como tal su señalización ha sido extensamente estudiada. Tras su biosíntesis, el JA se convierte en un conjugado de isoleucina (JA-Ile), que interacciona con la proteína COI-1 (CORONATIN INSENSITIVE1). El complejo COI1-JA-Ile induce la degradación dependiente del proteasoma de los represores JAZ (JASMONATE-ZIM DOMAIN), los cuales se encuentran constitutivamente reprimiendo la expresión de genes clave de respuesta a JA como MYC2, MYC3 y MYC4 (Fonseca et al., 2009; Chini et al., 2009; Gimenez-Ibanez et al., 2014). De esta forma, la unión de JA-Ile a su receptor reprime la transcripción de estos genes MYC, que a su vez son factores de transcripción que activarán la expresión de numerosos genes de respuesta a JA (Pauwels & Goossens, 2011). Los genes de respuesta a JA ejercen múltiples funciones en el desarrollo y en la respuesta a estrés de las plantas, de manera que esta hormona constituye una de las moléculas señal más importantes en el reino vegetal (Browse, 2009).

#### **1.1.5 Funciones y señalización de oxilipinas de la ruta 9-LOX**

El JA está ampliamente distribuido en el reino vegetal y sus funciones han sido ampliamente caracterizadas. Por el contrario, las funciones de las oxilipinas producidas por la acción de las 9-LOX están menos establecidas. Durante los últimos años, se han acumulado datos que respaldan la función de señalización de las oxilipinas 9-LOX en el desarrollo de la planta y la respuesta a la infección de patógenos biotrofos (Vellosillo et al., 2007; López et al., 2011; Marcos, 2014; Walper et al., 2016). La aplicación exógena de 9-HOT (ácido 9-hidroxi-10,12,15-octadecatrienoico) o 9-KOT (ácido 9-ceto-10,12,15-octadecatrienoico) provoca una disminución de la producción de raíces laterales, mientras que, de acuerdo a estos resultados, el doble mutante *lox1lox5*, deficiente en actividad 9-LOX, desarrolla un número más alto de raíces laterales que las plantas silvestres (Vellosillo et al., 2007). Igualmente, los estudios dirigidos a determinar la acción de estas oxilipinas han demostrado la capacidad del 9-HOT para inducir una respuesta de rizo radicular, acompañada de la formación de depósitos de calosa, que contribuyen al reforzamiento de la pared celular y por tanto, a favorecer la defensa de la planta frente a la infección de patógenos (Vellosillo et al., 2007).

La participación de las oxilipinas derivadas de las enzimas 9-LOXs, en las modificaciones de la pared celular ha sido sustanciada además, por los resultados que demuestran que una gran cantidad de mutantes insensibles a la aplicación de oxilipinas son, también, insensibles a la presencia de isoxaben, un herbicida que inhibe la síntesis de celulosa (Vellosillo et al., 2013). La acción de estas oxilipinas en la modificación de la pared se establece a través de la síntesis y activación de la señalización de los brasinoesteroides,



y contribuye a limitar la infección de patógenos foliares tales como la bacteria *Pseudomonas syringae*, y la penetración del hongo *Golovinomyces cichoracearum* en los tejidos de la planta (Marcos et al., 2015). Paralelamente, se ha demostrado que la aplicación directa de oxilipinas derivadas de 9-LOX aumenta la resistencia de la planta frente a la infección de *Pseudomonas*, tanto a nivel local como sistémico, y que dicha acción defensiva se establece a través de la inducción transcripcional de genes de defensa (Vicente et al., 2012). Igualmente, la oxilipina 9-KOT contribuye a la defensa de la plantas induciendo el cierre estomático durante la infección de patógenos, a través de una ruta de señalización independiente del ABA (Montillet et al., 2013). En línea con estos resultados, cabe mencionar también, el aumento de los niveles de 9- y 13-cetodienos en hojas de *Arabidopsis* tras la infección con *Pseudomonas syringae* (Vollenweider et al., 2000) y la identificación del 10-OPEA (ácido 10-oxo-11-fitoenoico), un compuesto derivado de 9-LOX análogo al precursor del JA, Ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA), como activador de la defensa frente a hongos patógenos de raíz en plantas de maíz (Christensen et al., 2015).

Los resultados descritos apoyan la participación de las oxilipinas derivadas de las enzimas 9-LOX como moléculas señalizadoras, función que estaría reforzada además por el hecho de que su naturaleza lipídica favorece su difusión célula a célula y, por tanto, su acción señalizadora. A pesar de ello, se desconocen por el momento los componentes celulares que pudieran estar involucrados en la percepción de estas moléculas.

El análisis fenotípico de la respuesta a oxilipinas ha puesto de manifiesto que la señalización activada por la acción de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT es independiente de la ruta de señalización regulada por la acción del JA (Vellosillo et al., 2007). La obtención de una colección de mutantes insensibles a la acción de las oxilipinas 9-LOX denominados *noxy*, del inglés *non-responding to oxylipins*, ha permitido iniciar los estudios dirigidos a identificar los componentes celulares que intervienen en la señalización de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT (Vellosillo et al., 2007). El clonaje posicional de los mutantes *noxy* ha puesto de manifiesto la relación antagónica entre la acción del 9-HOT y del etileno (López et al., 2011), así como su participación en la regulación de la síntesis de proteínas (Izquierdo, 2017). Asimismo, y en estrecha relación con este trabajo, se han identificado tres mutantes *noxy2*, *noxy15* y *noxy38*, que afectan a la función de proteínas mitocondriales codificadas en el genoma nuclear, y ponen de manifiesto el papel de estos orgánulos en la señalización de las oxilipinas (Vellosillo et al., 2013). Es importante mencionar que los mutantes *noxy* caracterizados son más susceptibles que las plantas silvestres a la infección con *P. syringae*, confirmando la relación funcional entre las

oxilipinas y la activación de la inmunidad vegetal (López et al., 2011; Vellosillo et al., 2013; Izquierdo, 2017).

## **1.2 Las mitocondrias en plantas**

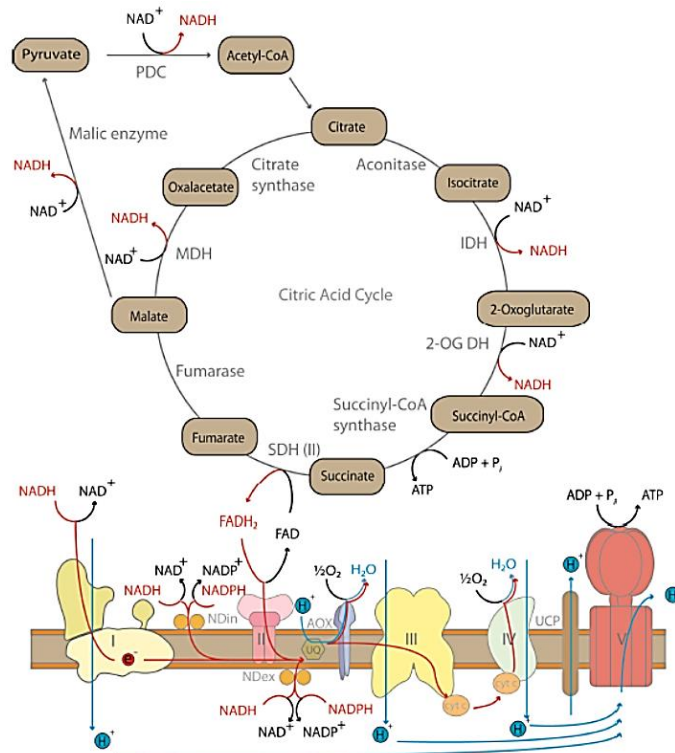
### **1.2.1. Principales funciones de las mitocondrias en la célula vegetal**

Las mitocondrias son orgánulos responsables de suministrar energía en forma de ATP a la célula vegetal a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la fosforilación oxidativa (Figura 1).

Ocurren, además, en las mitocondrias otros procesos metabólicos relativos a la biosíntesis de aminoácidos, vitaminas y co-factores enzimáticos, nucleótidos y lípidos (Mekhedov et al., 2000) que constituyen elementos básicos necesarios para el crecimiento y la división celular.

La fosforilación oxidativa se lleva a cabo a través de la cadena de transporte de electrones, que consiste en cuatro complejos de proteínas (CI, CII, CIII, CIV) en los que las reacciones de oxidación y reacción sucesivas se suceden de forma concomitante al transporte de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial, generando un gradiente que es aprovechado por el complejo V (CV) para sintetizar ATP, a partir de ADP y Pi. (Figura 1).

El complejo CI contiene un núcleo hierro-azufre que capta los electrones provenientes de NADH y reduce la ubiquinona (UQ). Este complejo cuenta con varias subunidades específicas de plantas, como las anhidrasas carbónicas (Perales et al., 2005; Sunderhaus et al., 2006). El CII, o succinato deshidrogenasa, forma parte del ciclo TCA y de la cadena de transporte de electrones. Este complejo convierte el succinato en fumarato generando  $FADH_2$ , que es a su vez utilizado para reducir la UQ a ubiquinol (UQH). Este último libera su electrón en el CIII desde donde es transferido al citocromo c (cyt c). El CIV transfiere los electrones desde el cyt-c reducido hacia el oxígeno molecular reduciéndolo a agua (Millar et al., 2011). El gradiente de protones generado por los complejos CI, CIII y CIV es utilizado por la enzima ATP sintasa, en el CV, para producir ATP (König, 2014).



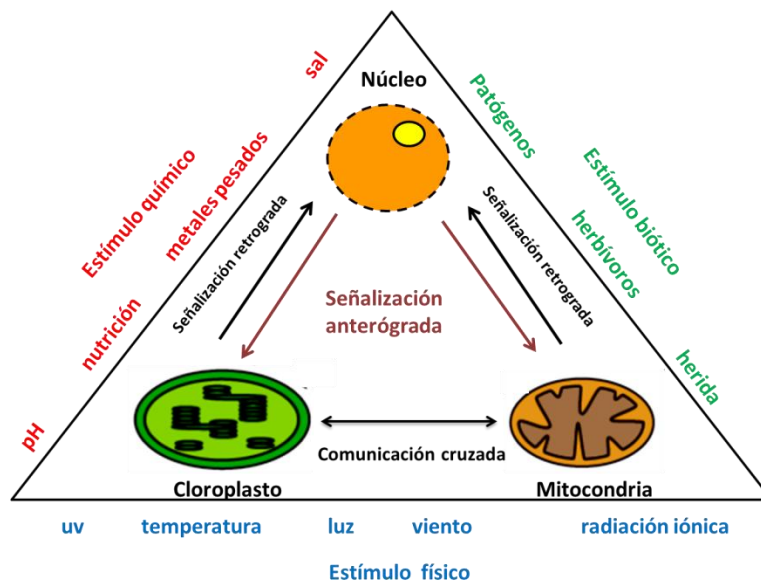
**Figura 1. Esquema simplificado del ciclo mitocondrial del TCA y de la cadena respiratoria.** PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; IDH, isocitrato deshidrogenasa; 2-OG DH, alpha-cetoglutarato deshidrogenasa; SDH, succinil Co-A sintasa; MDH, malato deshidrogenasa; I, complejo I; II, complejo II; III, complejo III; IV, complejo IV; AOX, oxidasa alternativa; UCP, proteína de desacoplamiento; NDin, deshidrogenasa interna; DDex, deshidrogenasa externa. Los equivalentes reductores se representan en rojo para la forma reducida o en negro para la forma oxidada. Las flechas en azul simbolizan el flujo de los protones y las flechas en rojo de los electrones König, (2014).

Además de la vía clásica de fosforilación oxidativa, las mitocondrias de plantas contienen otras proteínas respiratorias como la oxidasa alternativa (AOX), que participa en la cadena de transporte de electrones utilizando directamente el pool de UQH para reducir el oxígeno a agua (Moore & Siedow, 1991). Existen diversas isoenzimas AOX, que actúan en condiciones basales para prevenir la sobrerreducción del pool de UQ y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Maxwell et al., 1999). La actividad AOX participa también en aquellas respuestas de estrés que perturban el transporte electrónico, actuando como sumidero de electrones. La isoforma AOX1 es la que más se induce y, es por ello, la que está más asociada a los procesos de adaptación de las plantas a estrés (Maxwell et al., 1999). Además, las mitocondrias de la planta contienen otras enzimas que ayudan a prevenir la sobrerreducción de intermediarios y la sobreproducción de un gradiente protónico, tales como las NAD(P)H deshidrogenasas que controlan el pool de NAD(P)H sin bombear protones (Møller & Rasmusson, 1998; Møller, 2001).

### 1.2.2 Señalización retrógrada y estrés mitocondrial en plantas

Las mitocondrias son orgánulos semi-autónomos de origen endosimbiótico, que derivan presumiblemente de las proteobacterias (Martin et al., 2002; Esser et al., 2004; Deusch et

al., 2008). Durante el desarrollo de las plantas terrestres superiores, la información genética se distribuyó entre los orgánulos, de tal manera que aunque las mitocondrias albergan todavía su propio genoma, la mayor parte de su material genético fue transferido al núcleo. Por esta razón, la mayoría de las proteínas necesarias para el funcionamiento mitocondrial están codificadas en el genoma nuclear y tienen que ser transcritas en el núcleo, sintetizadas en el citosol e importadas en las mitocondrias (Woodson & Chory, 2008).



**Figura 2. Descripción general de las vías de señalización entre el núcleo, las mitocondrias y cloroplastos.** Núcleo a orgánulo: señalización anterógrada; orgánulo a núcleo: señalización retrógrada; orgánulo al orgánulo: señalización cruzada. Los factores que desencadenan rutas de señalización pueden ser estímulos químicos, bióticos o físicos. Modificado de König (2014).

La coordinación de las funciones nucleares y mitocondriales se establece a través de dos rutas de comunicación: la señalización anterógrada, mediante la cual el núcleo responde a señales ambientales modificando la tasa de transcripción de genes que codifican proteínas mitocondriales; y la retrógrada, mediante la cual las perturbaciones en el estado de la mitocondria son señalizadas hacia el núcleo, con la consecuente modificación de la transcripción de los genes de respuesta (Figura 2).

Dado el papel de las mitocondrias en el metabolismo celular, así como su sensibilidad a las perturbaciones ambientales, la regulación retrógrada es de gran importancia para evitar la producción incontrolada de ROS en estos orgánulos, así como para detectar y responder a cambios en las condiciones de crecimiento de la planta, a la presencia de patógenos y, en general a cualquier tipo de estrés (Millar et al., 2011; Suzuki et al., 2012;

Colombatti et al., 2014; Ng et al., 2014). Las mitocondrias son, por tanto, diana de las respuestas transcripcionales del núcleo durante la adaptación de la célula a los factores ambientales que perturban la función mitocondrial, así como los sensores que detectan determinadas alteraciones y desencadenan una respuesta de aclimatación (Vanlerberghe, 2013).

Estudios recientes han permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el control de la señalización retrógrada, aunque dichos avances conciernen principalmente a la comunicación cloroplasto-núcleo (Kleine et al., 2009; Woodson & Chory, 2008). En este caso, se han descrito que varios tipos de moléculas, tales como los niveles de tetrapirroles, azúcares y ROS, pueden actuar como señales cloroplásticas (Leister, 2005). A diferencia de estos orgánulos, la naturaleza de las señales retrógradas mitocondriales está aún sin resolver. Se ha descrito que el nivel de ROS que se produce durante la inhibición de la fosforilación oxidativa, podría actuar como molécula señal del estrés mitocondrial (Vanlerberghe et al., 1994; Maxwell et al., 2002; Millar et al., 2011). Sin embargo, la capacidad de estas moléculas para llegar al núcleo, así como su especificidad, son todavía cuestión de debate (Møller & Sweetlove, 2010). Estudios recientes apuntan a que los propios intermediarios del ciclo TCA podrían actuar como señales retrógradas provocando la inducción transcripcional del gen *AOX*, sin que haya ocurrido un aumento de los niveles de ROS (Umbach et al., 2012). El aumento de los niveles de ROS en la mitocondria puede provocar la inhibición de varias de las enzimas del ciclo TCA, y como consecuencia la alteración de los niveles de metabolitos que podrían contribuir así, a la señalización (Morgan et al., 2008). La reducción de la actividad aconitasa por ejemplo puede provocar la acumulación de citrato, sustrato que actúa como inductor de los niveles de transcripción del gen *AOX1* (Gray et al., 2004).

### **1.2.3 Relación entre las mitocondrias y las hormonas vegetales**

Las mitocondrias juegan un papel central en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Su participación en la fosforilación oxidativa para producir el ATP que se utiliza en múltiples funciones celulares, es la base del papel central de este orgánulo en la biología de las células vegetales (Millar et al., 2011). Además de esto, las mitocondrias juegan un papel importante en la ejecución de la muerte celular que ocurre durante el desarrollo de la planta, como por ejemplo durante la formación de los vasos del xilema, la defensa frente a patógenos, la senescencia, etc., (Whelan & Murcha, 2015). En este sentido, es lógico que la función mitocondrial interaccione con la regulación hormonal de las respuestas adaptativas de la planta, ya que las hormonas como el SA, JA, ET o ABA actúan como

reguladores centrales de estos procesos (Vanstraelen & Benková, 2012). Igualmente, el óxido nítrico (NO) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), algunas de ellas, producidas en las mitocondrias, están con frecuencia, asociadas a diversas condiciones de estrés y a respuestas de defensa, y pueden interactuar con la señalización hormonal (Neill et al., 2002).

### 1.2.3.1 El ácido salicílico

El SA es la hormona central de la respuesta de defensa frente a la infección de patógenos biotrofos y hemibiotrofos, y participa en la regulación del gen *AOX* y, por tanto, en la activación de la señalización retrógrada. De esta forma, se ha propuesto que el SA actuaría como agente antioxidante para desviar exceso de electrones del pool de ubiquinona y prevenir la producción excesiva de ROS, contribuyendo a controlar el proceso de muerte celular programada que acompaña a la respuesta de defensa frente a estos patógenos (Mur et al., 2008). En línea con esta idea, se ha descrito que el silenciamiento del gen *AOX* en cultivos de células de tabaco potencia la activación de la muerte celular (Rhoads & McIntosh, 1992; Kapulnik et al., 1992; Vanlerberghe & McIntosh, 1994; Van Aken et al., 2009).

La señalización regulada por el SA provoca cambios en el estado redox que conduce a la monomerización del regulador transcripcional NPR1 (del inglés NON-EXPRESSION OF PR GENES 1) y a su posterior translocación al núcleo para activar la expresión de los genes de respuesta a SA (Mou et al., 2003). Dado que las mitocondrias pueden generar cantidades importantes de ROS, estos orgánulos podrían controlar, de forma indirecta, la actividad del regulador transcripcional NPR1. Cabe añadir además, que el mecanismo de regulación dependiente de SA que controla la expresión de las proteínas mitocondriales no está bien establecido y parece ser complejo, ya que algunos casos como en el del gen *AtOM66/BCS1* (del inglés *OUTER MITOCHONDRIAL MEMBRANE PROTEIN OF 66KD/CYTOCHROME BC 1 SYNTHASE*) la regulación de la expresión ocurre a nivel transcripcional, mientras que en otros (por ejemplo, *AOX1a*, *NDB2*, *UPOX*) la expresión está también regulada a nivel post-transcripcional (Ho et al., 2008). Además, se producirían ciclos de retroalimentación positiva en este tipo de regulación, ya que la sobre expresión del gen *AtOM66* produce un aumento en los niveles de SA y la consecuente inducción de los genes marcadores *PR1* y *PR2* (del inglés *PATHOGENESIS-RELATED1, 2*). De acuerdo a estos resultados, la sobreexpresión del gen *AtOM66* en plantas transgénicas, aumenta los niveles de resistencia frente a *Pseudomonas syringae* (*Pst* DC3000) (Zhang et al., 2014).

Estudios recientes han demostrado que parte de la expresión génica dependiente del SA se induce mediante la acción de esta hormona sobre la maquinaria mitocondrial, de manera que existe un pool de genes de respuesta a SA cuya expresión se activa como consecuencia de la generación de ROS en las mitocondrias. La activación de esta respuesta es independiente de NPR1 y contribuye a la defensa de la planta frente a la infección de patógenos. De acuerdo a esta idea, el defecto mitocondrial asociado a la mutación *sdh1-1* que limita la actividad de la proteína SUCCINATO DESHIDROGENASA1 (SDH1) del complejo II mitocondrial, reduce la producción de ROS mitocondrial dependiente de SA y la activación de la respuesta inmune de la planta (Gleason et al., 2011). Igualmente, se ha descrito que el SA puede interactuar con la enzima del ciclo TCA  $\alpha$ -CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA E2 ( $\alpha$ -KGDH) reduciendo su actividad y afectando al transporte electrónico y a la función mitocondrial (Liao et al., 2015). La acción del SA conduce, por tanto, al desacoplamiento del transporte de electrones provocando la generación de ROS y, a su vez, la activación de la expresión de genes de defensa de la planta (Norman et al., 2004).

### 1.2.3.2 El ácido jasmónico

La información disponible acerca del impacto del JA en las mitocondrias y viceversa es escasa. Como hemos mencionado anteriormente, el JA es la hormona responsable de la activación de la respuesta de defensa frente a patógenos necrotrofos (Pieterse et al., 2012), actuando de manera antagónica al SA (Spoel et al., 2003). No se ha descrito si las mitocondrias intervienen de alguna forma en el establecimiento del antagonismo JA-SA, sin embargo, la sobreexpresión del gen mitocondrial *AtOM66*, dependiente de SA, aumenta, la susceptibilidad frente al hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*, y reduce la expresión de los genes de respuesta a JA *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) y *VSP2* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2*). En línea con estos resultados, en las plantas de pérdida de función, *atom66*, se inducen niveles más altos de estos genes que en las plantas control (Zhang et al., 2014). Por otro lado, el tratamiento de protoplastos de *Arabidopsis* con metil jasmonato (MeJA) induce la producción de ROS en las mitocondrias y la alteración del potencial de membrana en estos orgánulos, que conlleva, además, la parada del movimiento mitocondrial y la acumulación de estos orgánulos alrededor de los cloroplastos, proceso que va seguido de un colapso de la función fotosintética y de la muerte celular mediada por JA (Zhang & Xing, 2008). Este estudio sugiere, por tanto, que la disfunción mitocondrial y la producción de ROS son un eslabón en la cascada de señales de muerte celular mediada por la acción del JA.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos caracterizado la participación de los genes *NOXY2*, *NOXY15* y *NOXY38*, codifican proteínas mitocondriales, en la señalización de oxilipinas de la ruta 9-LOX (Vellosillo et al., 2013). Al igual que el MeJA, la oxilipina 9-HOT provoca la alteración del potencial de la membrana mitocondrial e induce la formación de acúmulos mitocondriales, una característica que aparece, de forma constitutiva, en los mutantes *noxy2*, *noxy15* y *noxy38* (Vellosillo et al., 2013). EL hecho de que los tres mutantes descritos sean más susceptibles a la bacteria *Pst* DC3000 que las plantas silvestres, deja abierta la posibilidad de que estas proteínas, y las oxilipinas que actúan como señal, ejecuten funciones similares a las asignadas al SA o al JA en la regulación de la homeostasis mitocondrial para contribuir a la adaptación de las plantas a situaciones de estrés.

### 1.2.3.3 El Etileno

El impacto del ET en la función mitocondrial es limitado, a juzgar por el reducido número de genes mitocondriales que responden al tratamiento con esta hormona (Berkowitz et al., 2016). Existen evidencias indirectas que muestran que la expresión del gen *AOX*, que se induce en respuesta a patógenos y a ozono, se reduce en los mutantes insensibles al etileno *ein2* y *ein1* (Simons et al., 1999; Tuominen et al., 2004). Además, el aumento de la expresión y de la actividad *AOX* durante la maduración del fruto se ha correlacionado con el aumento de la producción de ET, no obstante, la relación causa-efecto entre ambos factores no ha sido establecida hasta el momento (Duque et al., 1999). La formación de cianuro (un inhibidor del complejo mitocondrial IV) durante la biosíntesis de ET, proporciona un enlace hipotético entre la producción de esta fitohormona y el aumento de la actividad *AOX*, sin embargo, la existencia de mecanismos eficientes de detoxificación de cianuro en las mitocondrias pone en duda la influencia real de este metabolito (Yi et al., 2012). Por último, cabe mencionar que en plantas de tomate, se ha establecido la participación del ET en la regulación de la respiración durante la maduración del fruto. En este cultivo, el uso de líneas transgénicas alteradas en los niveles de expresión del gen *AOX* sugiere que esta enzima influye en la señalización regulada por la acción del ET y que podría tener una función en la autocatálisis de esta hormona (Xu et al., 2011).



# *Objetivos*

---

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis consiste en profundizar en el conocimiento de los procesos de señalización activados por las oxilipinas sintetizadas a través de la ruta iniciada por acción de las enzimas 9-lipoxygenasas, así como determinar el papel de estos compuestos en la respuesta de defensa de la planta frente a la infección de patógenos biotrofos y necrotrofos. Para este fin, hemos centrado nuestro estudio en la caracterización de tres mutantes de *Arabidopsis thaliana*, *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, aislados en base a su insensibilidad a la presencia de oxilipinas, con los que hemos abordado los siguientes objetivos:

1.- Identificación de las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* y caracterización de sus efectos fenotípicos y funcionales.

2.- Evaluación de la respuesta de defensa de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* frente a patógenos que utilizan distintas estrategias de infección, tales como la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae* y el hongo necrotrofo *Alternaria brassicicola*, comparando la respuesta de estos mutantes con la de otros mutantes *noxy* previamente identificados.

3.- Caracterización de la respuesta de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* frente al estrés mitocondrial, así como al tratamiento con las fitohormonas que regulan la respuesta de inmunidad vegetal.

# ***Materiales y Métodos***

---

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico, crecimiento y mantenimiento

##### - Especies bacterianas fitopatógenas

Para los ensayos de patogenicidad se utilizó la bacteria modelo *Pseudomonas syringae*, específicamente la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) (Whalen et al., 1991).

##### -Especies fúngicas fitopatógenas

Para los ensayos de patogenicidad con hongos se utilizó *Alternaria brassicicola*, cepa MUCL20297 facilitado por la Dra. Brigitte Mauch-Mani (Universidad de Fribourg).

#### Medios de cultivo para microorganismos

##### - Medios de cultivo para bacterias

Medio King's B (KB) (para cultivos de *Pseudomonas*): 2% (m/v) proteosa peptona, 2% (v/v) glicerol, 6,5 mM  $K_2HPO_4$  y 6 mM  $MgSO_4(H_2O)_7$ . Para obtener el medio en estado sólido se añadió 15 g/L agar (Difco)

##### - Medio de cultivo para hongos

Medio Patata-Dextrosa líquido (PDB): 24 g/L de extracto patata-glucosa (Difco). Para obtener el medio en estado sólido (Patata-Dextrosa-Agar, PDA) se añadió 15g/L agar (Difco).

#### Mantenimiento de los microorganismos

##### *Mantenimiento de cepas bacterianas.*

Los cultivos de *Pseudomonas syringae* se crecieron en medio King's B, a una temperatura de 28°C. La cepa utilizada se mantuvo, durante períodos cortos de tiempo, a 4°C en placas de medio sólido que contenían los antibióticos apropiados. La conservación a largo plazo se realizó resuspendiendo las células en medio King's B líquido con glicerol al 20%, manteniéndolas a una temperatura de -80°C.

##### *Mantenimiento de hongos*

Los hongos se crecieron durante 15 días en placas con medio PDA, a temperatura ambiente y 100% de humedad. Después de este tiempo, se obtuvieron las esporas por lavado del micelio aéreo con medio PDB. Para su mantenimiento, a dichas suspensiones se les añadió glicerol (10% v/v), se alicuotaron y se mantuvieron a -80°C.

### 3.2. Material vegetal

El presente trabajo de investigación se ha realizado con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, utilizando los ecotipos silvestres Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler). Además, se han empleado mutantes obtenidos en laboratorio a partir de la mutagénesis de plantas Col-0 (Vellosillo et al., 2007): *noxy2-2*, *noxy15* y *noxy38* (previamente caracterizadas) y *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* caracterizadas en este estudio. Igualmente se utilizaron los mutantes *ein2-5* y *sid2* disponibles en el laboratorio. Para estudios de morfología mitocondrial se utilizó la línea transgénica *35S:Mt-YFP* que expresa la proteína fluorescente amarilla (YFP) fusionada a un péptido de localización mitocondrial (Nelson et al., 2007). El marcador mitocondrial *35S:Mt-YFP* se introdujo en los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* mediante cruzamiento con las plantas transgénicas Col-0 conteniendo la construcción *35S:Mt-YFP*.

#### 3.2.1 Crecimiento de las plantas in vitro

Para el crecimiento *in vitro*, las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron con una mezcla de lejía al 75% y 0,01% de Tween-20 durante 7 minutos, seguido de tres lavados consecutivos con agua estéril y se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 2 días. La germinación de las semillas se realizó en medio de cultivo sólido MS 0,5X (Murasnige & Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 1% y usando agar como agente solidificante, a pH 5,7. Para el crecimiento en posición horizontal se utilizó una concentración de agar del 0,7%, mientras que para el crecimiento en posición vertical se utilizó una concentración de agar del 1,5%. Las placas se sellaron con cinta Micropore porosa (3M Health care, St. Paul MN, USA) y se crecieron en cámaras climáticas a 21°C y 50% de humedad relativa.

#### 3.2.2. Crecimiento de plantas en tierra

Para el crecimiento de plantas en tierra, las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas en bandejas con alveolos sobre una mezcla de tierra con vermiculita en proporción 3:1. Las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad en el proceso de germinación y se mantuvieron a 4°C durante 2 días. Posteriormente, las bandejas se pasaron al invernadero o a cámaras climáticas en donde crecieron con un fotoperiodo de 14h de luz, temperatura de 21°C y humedad relativa del 60%. A los 2 días se quitaron los plásticos utilizados para preservar la humedad. El riego se realizó 2 veces por semana o dependiendo del requerimiento de humedad.

### 3.2.3 Cruzamientos de plantas

Los cruzamientos llevados a cabo para en este trabajo se realizaron sobre plantas con botones florales cerrados, que se abrieron, sin dañar la parte femenina, con unas pinzas de la marca Tanic nº 5. A continuación, el estigma de dichas plantas receptoras se polinizó con polen de varias flores de una misma planta donadora. Posteriormente, para evitar cruces no deseados, la flor polinizada se cubrió con papel celofán hasta el comienzo del desarrollo de la silicua.

## 3.3. Tratamientos en plantas

### 3.3.1. Inoculación de plantas con *Pseudomonas syringae*

Para realizar las infecciones se utilizaron bacterias crecidas durante 24h a 28°C en medio KB suplementado los con los antibióticos adecuados. El césped bacteriano se recogió con la ayuda de una espátula y se resuspendió en una solución de MgCl<sub>2</sub> 10 mM para usarse como inóculo. La concentración del inóculo se ajustó mediante lectura en espectrofotómetro a 600 nM, asumiendo que DO =1 equivale a 10<sup>8</sup> ufc/mL. Para la evaluación de los síntomas y el crecimiento bacteriano, se inoculó la bacteria por aspersión de forma uniforme sobre las plantas usando un vaporizador. Como inóculo se usaron suspensiones bacterianas de 10<sup>8</sup> ufc/mL en 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,04% (v/v) Silwet L-77 (OSi Specialties) como agente surfactante. Para analizar la expresión de genes, se inocularon suspensiones bacterianas (10<sup>6</sup> ufc/mL en 10 mM MgCl<sub>2</sub>) o control (10 mM MgCl<sub>2</sub>) directamente al apoplasto, utilizando una jeringuilla de 1 mL sin aguja y aplicando la suspensión a través de la cara abaxial de las hojas. Se inocularon, por cada planta, tres hojas adultas pertenecientes al mismo verticilo. Las muestras se recogieron a las 0, 8, 24 y 48 h post-inoculación. Durante el muestreo, se recogieron las hojas de al menos dos plantas (6 hojas) para constituir cada muestra.

### 3.3.2. Evaluación de síntomas y crecimiento bacteriano in planta

La determinación del crecimiento bacteriano, en las hojas de las plantas inoculadas, se realizó según el protocolo descrito por (Whalen et al., 1991) con pequeñas variaciones. Se inocularon por aspersión plantas de 4 semanas como se ha descrito anteriormente, en bandejas cubiertas con la finalidad de mantener las condiciones de humedad óptimas para la infección. Después de 3 días se evaluaron los síntomas por inspección visual, específicamente la presencia de clorosis en las hojas de las plantas infectadas, y se recogió tejido infectado para determinar el crecimiento bacteriano. Para ello, se seleccionaron las mismas tres hojas (adultas, del mismo verticilo) de cada planta, y se cortaron discos de 0,6

cm de diámetro de cada hoja. Con los discos así obtenidos de seis plantas infectadas (18 discos en total) se formaron al azar grupos de 3 discos cada uno, de forma que cada grupo constituyera una muestra. Cada grupo de discos se homogenizó en  $\text{MgCl}_2$  10 mM, mediante la introducción de cuentas de cristal de 2 mm de diámetro y usando el robot homogenizador MM300 (Retsch). La población bacteriana del tejido vegetal se determinó plaqueando diluciones de cada muestra en placas de medio KB sólido, en presencia del antibiótico de selección. En cada experimento, se realizaron al menos tres curvas de crecimiento independientes y se determinó la media de los datos generados en cada uno de ellos.

### **3.3.3. Inoculación de plantas con el hongo fitopatógeno *Alternaria brassicicola***

La infección de plantas con el hongo fitopatógeno se *Alternaria brassicicola* se realizó por inoculación superficial con suspensiones de esporas sobre hojas de plantas de 4 semanas de edad. En cada planta se seleccionaron las mismas tres hojas (adultas, del mismo verticilio) y sobre cada una se colocó una gota de 20  $\mu\text{L}$  con  $2,5 \times 10^6$  esporas/mL en medio PDB. Las infecciones se condujeron en bandejas de plástico cubiertas, añadiendo al fondo una fina capa de agua para garantizar 100% de humedad. El análisis de síntomas y conteo de esporas se realizó en plantas a los 5 días de infección, mientras que para los análisis de expresión de genes se utilizaron muestras recogidas a las 0, 24 y 48 h de infección. Durante el muestreo, se recogieron las hojas infectadas de al menos dos plantas (6 hojas) para constituir cada muestra.

### **3.3.4 Evaluación de síntomas de infección con *Alternaria brassicicola***

Los síntomas de la infección con *A. brassicicola* se evaluaron 5 días después de la inoculación de esporas. Se estableció una escala de severidad de los síntomas en 4 grados crecientes: Grado I, lesiones pequeñas de color beige necrótico, no mayor que la gota de inoculación inicial; Grado II, lesiones necróticas rodeadas de un halo clorótico; Grado III, lesiones con presencia de micelio de color pardo oliváceo, de aspecto afeiltrado y bordes irregulares con aureolas cloróticas; Grado IV, lesiones que ocupan gran área de la hoja cubierta con una masa negra de esporas. Para cada genotipo, se determinó el porcentaje de hojas en cada grado a partir de al menos 6 plantas infectadas. El recuento de síntomas se realizó en tres experimentos independientes y se determinó la media de los datos generados en cada uno de ellos.

### 3.3.5. Recuento de esporas

El recuento de esporas se realizó a los 5 días de infección. Para cada genotipo, las hojas de al menos 10 plantas se recogieron y organizaron en grupos al azar de 6 hojas infectadas cada uno. Cada grupo de hojas se colocó en un tubo con 10 mL de una solución de 0,01% de Tween 20 y se aplicó vórtex por 30 s para facilitar el desprendimiento de las esporas. La suspensión obtenida se filtró a través de una gasa Miracloth (Merck) y las esporas desprendidas se recogieron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. El precipitado de esporas se resuspendió en 250  $\mu$ L de agua y se procedió a determinar el número de esporas empleando una cámara de Neubauer. Las esporas remanentes del inóculo inicial, distinguibles por su color más oscuro, se excluyeron del conteo. El recuento de esporas se realizó en tres experimentos independientes y se determinó la media de los datos generados en cada uno de ellos.

### 3.3.6. Tratamientos *in vitro*

El análisis fenotípico de las plantas a la presencia de oxilipinas, isoxaben, Antimicina A (AA) y hormonas vegetales se realizó mediante ensayos *in vitro*, en los que las semillas, previamente esterilizadas y vernalizadas, se germinaron en placas en posición vertical como ha sido descrito anteriormente.

Para la evaluación de la sensibilidad a isoxaben y 9-HOT, las plántulas crecidas durante 3 días en medio MS, se transfirieron a placas suplementadas con 9-HOT (25  $\mu$ M) o isoxaben (10 nM) en las que crecieron durante 4 días adicionales. Los fenotipos se evaluaron a nivel de las raíces, observando la formación del rizo radicular (9-HOT) o el engrosamiento y acortamiento de la raíz (isoxaben).

De manera análoga se analizó la respuesta a Antimicina A y hormonas vegetales. En estos casos se evaluó la inhibición del crecimiento de la raíz tras transferir las plántulas a medio suplementado con SA (50  $\mu$ M), JA (25  $\mu$ M), ACC (1  $\mu$ M) o AA (2,5 o 15  $\mu$ M). Se evaluó el crecimiento radicular tras transferir las plántulas a las placas conteniendo los productos de interés y la longitud de la raíz en las plántulas transferidas a medio MS. El efecto de los productos examinados se expresó en porcentaje de crecimiento en cada uno de los productos con respecto al determinado en medio MS.

Para analizar la expresión de genes en respuesta a Antimicina A (AA) se utilizaron plántulas de 12 días, crecidas *in vitro* en posición vertical. El tratamiento se realizó colocando las placas en posición horizontal y añadiendo AA (20  $\mu$ M) diluida en medio MS líquido. Las placas fueron mantenidas en esta posición unos minutos hasta la absorción del



producto y luego colocadas en posición vertical. Las muestras se recogieron a los tiempos requeridos, se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

### **3.4. Técnicas histológicas**

#### **3.4.1. Tinción de calosa**

La presencia de calosa se identificó mediante observación de la fluorescencia inducida por luz ultravioleta en el fluorocromo del azul de anilina. Las raíces se sumergieron en una solución de azul de anilina 0,1 mg/mL (SiroBiosupplies, Australia) durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, se lavaron con agua y se visualizaron al microscopio bajo luz ultravioleta.

#### **3.4.1. Tinción de lignina**

Para la tinción y visualización de lignina, las plántulas se sumergieron en una solución de floroglucinol-HCl al 2% durante 10 minutos, se lavaron y se montaron en agua para su visualización en el microscopio con luz visible.

### **3.5. Preparación y análisis de ácidos nucleicos**

#### **3.5.2. Preparación de ADN genómico de plantas**

La preparación de ADN genómico de plantas se realizó siguiendo el método descrito por (Dellaporta et al., 1983). El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría midiendo la absorción a una  $\lambda=260$  nm (DO=1 equivale a 50 mg/mL).

#### **3.5.3. Preparación de ARN total de plantas**

El ARN total de las plantas se obtuvo a partir de hojas mediante la precipitación con ácido acético 1M y etanol 100%, según el protocolo descrito por (Logemann et al., 1987), y se cuantificó mediante espectrofotometría a una  $\lambda=260$  nm (DO=1 equivale a 40 mg/mL).

#### **3.5.4. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa**

##### **(PCR)**

Las amplificaciones de ADN mediante la reacción de polimerización en cadena o PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Perkin Elmer.

### 3.5.5. PCR Cuantitativa

Para la cuantificación de la expresión génica se realizaron ensayos de PCR Cuantitativa utilizando los ARNs obtenidos del tejido objeto de estudio según el protocolo descrito anteriormente. Posteriormente, mediante el uso del kit DNase TURBO DNA-free (Ambion) se eliminaron posibles contaminaciones de ADN en las muestras. Se usaron 1,5 µg de ARN para preparar el ADNc mediante el kit “Transcription First Strand cDNA synthesis kit” (Roche), y la expresión se cuantificó mediante el uso del kit “FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) system” (Roche), según indicaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GenAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se usó el gen AT1G49240 que codifica la proteína ACT8. Los genes analizados y los cebadores utilizados se muestran en la (tabla 1).

### 3.5.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN fue realizada por la empresa Secugen. Las secuencias se analizaron mediante el programa informático Lasergene.

### 3.5.7. Técnicas electroforéticas

La separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de concentración variable, dependiendo del tamaño de los fragmentos analizados. Se utilizó el tampón TBE (Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8) al 0,5X. Los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta por tinción con BrEt 0,5 mg/mL (Wood, 1983).

## 3.6. Identificación de mutaciones

### 3.6.1 Cruzamientos de mutantes *noxy*

Con el fin de determinar el carácter dominante o recesivo de las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, así como para eliminar otras mutaciones adicionales que pudieran interferir con la mutación de interés, se procedió a cruzar las plantas mutantes con plantas silvestres Col-0, recaptándose el fenotipo en las progenies F1 y F2 obtenidas de dichos cruces.

Además, con objeto de localizar en el genoma de *A. thaliana* las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, las plantas mutantes se cruzaron con plantas silvestres del ecotipo Landsberg *erecta* y se seleccionaron plantas con fenotipo mutante en la población F2 recombinante.

| Tabla 1. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa |           |  |
|---|-----------|--|
| Gen   | Locus     | Secuencia de los cebadores                                     |
| <b>PR1</b>  | At2g14610 | 5' GTTCACAACCAGGCACGAGG 3'<br>5' CAAGTCACCGCTACCCCAG 3'        |
| <b>S3H</b>  | At4g10500 | 5' CACTACTCCGCAGATCCAACAA 3'<br>5' TCTCCAGTTCAAGACTTTGTCTGC 3' |
| <b>AOX1a</b>  | At3g22370 | 5' TTGTTCTTCCAGAGGAGATA 3'<br>5' CTCAAAACGTCGAAGCGA 3'         |
| <b>PDF1.2</b>                                       | AT2G42840 | 5' CTTTGCTGCTTTCGACGCA 3'<br>5' TTGGCTCCTTCAAGGTTAATGC 3'      |
| <b>PR4</b>  | AT3G04720 | 5' TAAGGTGAAGAACAACAAGA 3'<br>5' CCAAAACCATCGGTGTCTAT 3'       |
| <b>PAD3</b>   | AT3G26830 | 5' ATCTCGGACATATTTGTAGCAG 3'<br>5' CCCAAGTGTTGTCCGAATCTC 3'    |
| <b>MSD1</b>   | At3g10920 | 5' AGTTGCAGAGCGCCATCAAA 3'<br>5' AGGAGCAAGGTTCTTCCAGA 3'       |
| <b>ACT8</b>   | At1g49240 | 5' CTGCAGGGATCCACGAGACA 3'<br>5' CTCGGGGCAAGAGCTGTGAT 3'       |

Tabla 1. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa

### 3.6.2. Clonaje posicional de las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*.

Las plantas F2 de los cruces *noxy* x *Ler* con fenotipo mutante fueron identificadas y se extrajo ADN genómico de al menos 50 de ellas. Para identificar las región en que se encontraban las mutaciones, se utilizaron marcadores moleculares tipo SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms); (Bell & Ecker, 1993) y CAPs (Codominant Cleaved Amplified Polymorphic Sequences); (Konieczny & Ausubel, 1993) entre los ecotipos Col-0 y *Ler*, presentes en las bases de datos de *A. thaliana* TAIR y TIGR. Las regiones flanqueantes de estos polimorfismos fueron amplificadas en las plantas F2 mutantes para acotar la región ligada a la mutación en cada caso. Posteriormente, el ADN de las plantas mutantes fue secuenciado mediante secuenciación masiva (BGI, Hong Kong) y se identificaron las mutaciones *noxy* en la región previamente acotada.

### 3.7. Obtención y análisis de imágenes mitocondriales

Para el análisis de imágenes mitocondriales, se utilizaron los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* (este trabajo) y en el mutante *noxy15*, portadoras del marcador mitocondrial *35S:Mt-YFP* (Nelson et al., 2007). Las plántulas se sembraron en placas verticales, se dejaron crecer durante 6 días y se observaron las raíces al microscopio confocal. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica TC5-SP8 acoplado a un software LAS AF v.2.6.0 y usando un objetivo de inmersión en agua 63x/1.2NA. Para visualizar la fluorescencia se escaneó con el láser Argón 488 nm.

Para cada genotipo se tomaron imágenes representativas. Todas las imágenes fueron procesadas con la aplicación Fiji (<https://fiji.sc>), con los mismos parámetros de exposición y ganancia, salvo las referidas al *noxy54* que se tomaron con una ganancia aumentada debido al bajo nivel de fluorescencia.

### 3.8. Aplicaciones bioinformáticas

Para el análisis de la secuencia y estructura de genes se utilizaron las bases de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), <http://www.arabidopsis.org>, y NCBI (National Center for Biotechnology Information), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Las secuencias peptídicas de los genes identificados se tomaron de la base de datos UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), mientras que para la predicción de la estructura y dominios de las proteínas se utilizaron las bases Pfam (<http://pfam.xfam.org>) y ProSite (<https://prosite.expasy.org>).

La medición de raíces se realizó con ayuda de la aplicación de análisis de imágenes ImageJ (<https://imagej.nih.gov>).

# *Resultados*

---

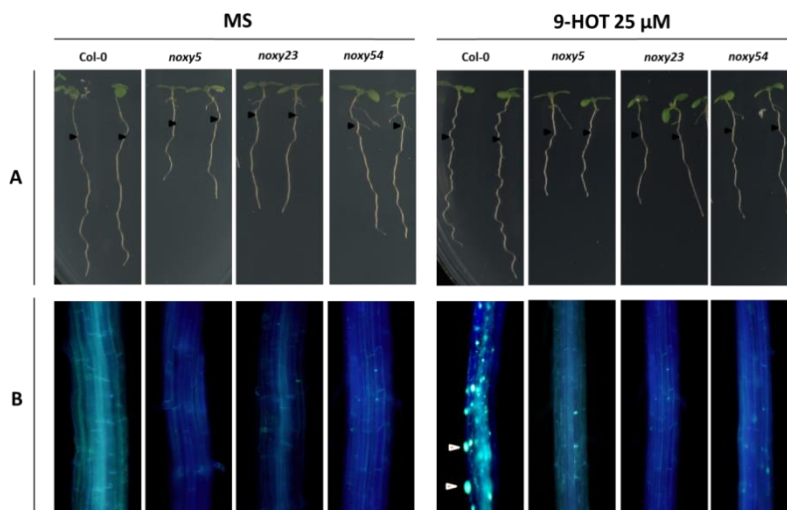
## 4. RESULTADOS

En este trabajo se han seleccionado tres mutantes, designados *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* (del inglés *non-responding to oxylipins*), con objeto de investigar la acción de las oxilipinas durante la respuesta de defensa vegetal frente a la infección de patógenos.

### 4.1 Caracterización preliminar de los mutantes *noxy*: respuesta a 9-HOT e isoxaben

Las plantas *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* pertenecen a una colección de mutantes aislados en base a su insensibilidad a la aplicación del ácido 9-hidroxi-octadecatrienoico (9-HOT), un derivado lipídico sintetizado a través de la ruta de oxilipinas iniciada por la acción de las enzimas 9-lipoxigenasas (9-LOX), cuya presencia en el medio de crecimiento induce la formación de rizo radicular y la reducción del número de raíces laterales en las plántulas de *Arabidopsis* (Vellosillo et al., 2007). Además de las alteraciones fenotípicas descritas, la aplicación de 9-HOT induce la formación de depósitos de calosa y la activación de una respuesta de estrés oxidativo en la que se producen altos niveles de ión superóxido (Vellosillo et al., 2007). Resultados previos derivados de la caracterización de los mutantes *noxy2*, *noxy15* y *noxy38*, habían puesto de manifiesto que, además de la insensibilidad a 9-HOT, estos mutantes eran insensibles al tratamiento con el herbicida isoxaben (Vellosillo et al., 2013), un inhibidor de la enzima celulosa sintasa que provoca la reducción de los niveles de celulosa y la acumulación ectópica de lignina, y cuya acción se refleja en el acortamiento y engrosamiento de la raíz (Hamann et al., 2009; Denness et al., 2011; Hamann, 2012).

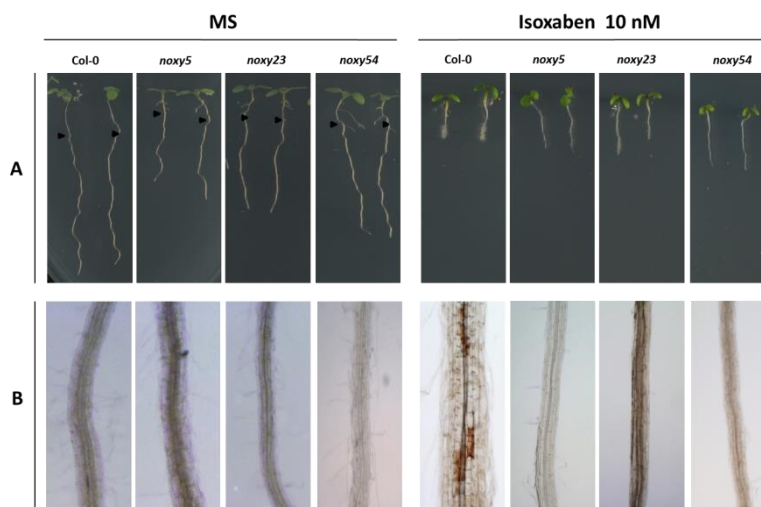
El análisis fenotípico de la respuesta a 9-HOT e isoxaben, puso de manifiesto la insensibilidad de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* a ambos compuestos. Así, mientras que las plantas silvestres Col-0 responden a la presencia de 9-HOT (25  $\mu$ M) induciendo una respuesta de rizo radicular acompañada de la formación de depósitos de calosa, en los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* no se observa ninguna de estas respuestas (Figura 3A y 3B). Igualmente, el análisis de la respuesta al tratamiento con isoxaben permite observar la reducción del crecimiento y el engrosamiento radicular de las plantas silvestres, mientras que ambas respuestas son menos acusadas en los tres mutantes examinados (*noxy5*, *noxy23* y *noxy54*), (Figura 4A y 4B). Además, la tinción con fluoroglucionol reveló la acumulación de lignina en las raíces de las plantas silvestres, mientras que esta respuesta no se observa en ninguno de los tres mutantes analizados (Figura 4B).



**Figura 3. Respuestas de plantas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* a la presencia 9-HOT.**

(A) Fenotipo radicular en plantas Col-0 y mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, crecidas durante 3 días en medio MS y transferidas a medio MS en donde crecieron durante 4 días en presencia de 9-HOT (25µM). Las flechas negras indican la longitud de las raíces en el momento de su transferencia.

(B) Tinción con azul de anilina de las raíces de las plantas mostradas en (A). Se señalan con flechas blancas los acúmulos de callosa más significativos visualizados con esta tinción.



**Figura 4. Respuestas de plantas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* a la presencia de isoxaben.**

(A) Fenotipo radicular en plantas Col-0 y mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* crecidas durante 3 días en medio MS y transferidas a medio MS en donde se crecieron durante 4 días en presencia de isoxaben(10 µM). Las flechas negras indican la longitud de las raíces en el momento de su transferencia.

(B) Tinción con floroglucinol de las raíces de las plantas mostradas en (A) para la visualización de lignina.

Los resultados descritos ponen de manifiesto la insensibilidad de los tres mutantes *noxy* analizados, *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, a los tratamientos con 9-HOT e isoxaben, y en consecuencia la participación de las proteínas NOXY5, NOXY23 y NOXY54 en la señalización de la respuesta a 9-HOT y en la respuesta al daño en la pared celular inducido por el isoxaben.

#### 4.2 Clonaje posicional de los genes *NOXY5*, *NOXY23* y *NOXY54*

Con objeto de definir la relación de dominancia o recesividad de los fenotipos *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* con respecto al genotipo silvestre, se procedió a realizar su cruzamiento con la línea silvestre Col-0. El análisis de las respuestas a 9-HOT y a isoxaben de las poblaciones F1 y F2 resultantes reveló el carácter recesivo de las mutaciones. En la población F2 procedente de dichos cruces, la segregación de los fenotipos silvestre:mutante se ajustaba a una proporción 3:1 mostrando, por tanto, que los fenotipos mutantes se debían a una única mutación nuclear en cada caso. La población F1 procedente del primer cruzamiento, se retrocruzó con el genotipo silvestre con objeto de eliminar mutaciones adicionales a las causantes de los fenotipos *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, que pudieran interferir en la caracterización de las mismas; se realizaron tres retrocruzamientos consecutivos.

Con el fin de identificar las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, procedimos a su localización empleando un abordaje de mapeo posicional. Para ello los mutantes *noxy*, en fondo Col-0, se cruzaron con plantas silvestres del ecotipo *Ler* y se generaron las poblaciones recombinantes que empleamos para realizar el cartografiado de los mutantes. Las poblaciones F2 obtenidas se sembraron en placas en presencia de isoxaben, y se seleccionaron para el análisis cartográfico las plantas F2 que mostraban el fenotipo mutante.

El ADN de al menos 50 individuos F2 recombinantes, correspondientes a cada una de las mutaciones examinadas, se analizó mediante PCR, utilizando marcadores SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms) y dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) que revelan el polimorfismo entre los ecotipos Col-0 y *Ler*. De esta forma, las mutaciones de interés se acotaron a las siguientes regiones en el genoma: el mutante *noxy5*, se localizó en una región de 31 genes perteneciente al BAC F1C9 del cromosoma 3, el mutante *noxy23* se acotó en una región de 56 genes situada en el BAC F13011 del cromosoma 1 y el mutante *noxy54* se localizó en una región de 48 genes perteneciente al BAC F14J16 del cromosoma 1 (Figuras 5, 7 y 9).

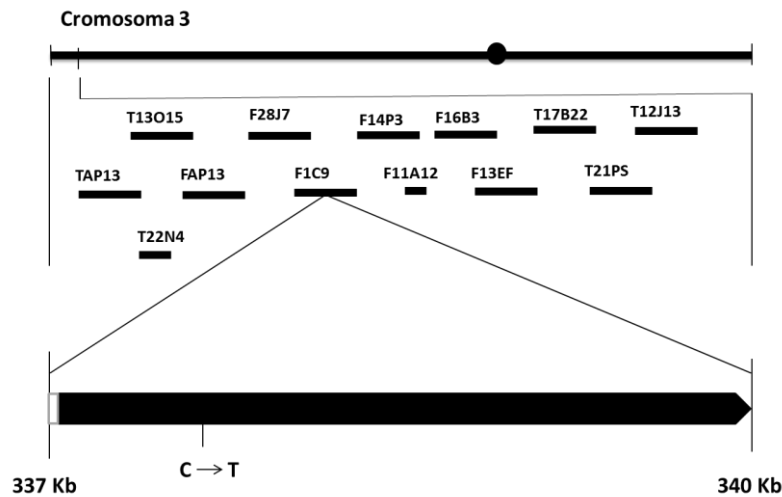
Posteriormente, las mutaciones examinadas se identificaron mediante la secuenciación del ADN de cada uno de los mutantes.



#### 4.2.1. Identificación de la mutación *noxy5*

La mutación *noxy5* fue localizada en el locus At3g02010 que codifica una proteína de 825 aminoácidos perteneciente a la superfamilia de proteínas PPR, del inglés PENTATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING PROTEIN, codificada por un único exón de 2.475 pb. El análisis de la secuencia codificada por el gen *NOXY5* revela la presencia de 11 dominios PPR ([www.Uniprot.org](http://www.Uniprot.org)) situados en tándem a lo largo de la proteína NOXY5 (Figura 6).

La mutación *noxy5* produce un cambio de citosina a timina que causa un cambio en la secuencia aminoacídica de treonina a metionina en la posición 217, correspondiente al tercer dominio PPR de la proteína.



**Figura 5. Representación esquemática de la estrategia de cartografía seguida para identificar la mutación *noxy5*.** Una vez acotada la mutación al fragmento señalado, la secuenciación masiva de plantas *noxy5* reveló una única mutación (C por T) en el cromosoma 3, correspondiente al locus At3g02010.



**Figura 6. Topología de la proteína NOXY5, constituida por 10 dominios PPR y 1 dominio PPR (DYW).** Se señala el cambio de aminoácido, de treonina a metionina, causado por la mutación *noxy5* en la posición 217 de la secuencia péptica, correspondiente al tercer dominio PPR.

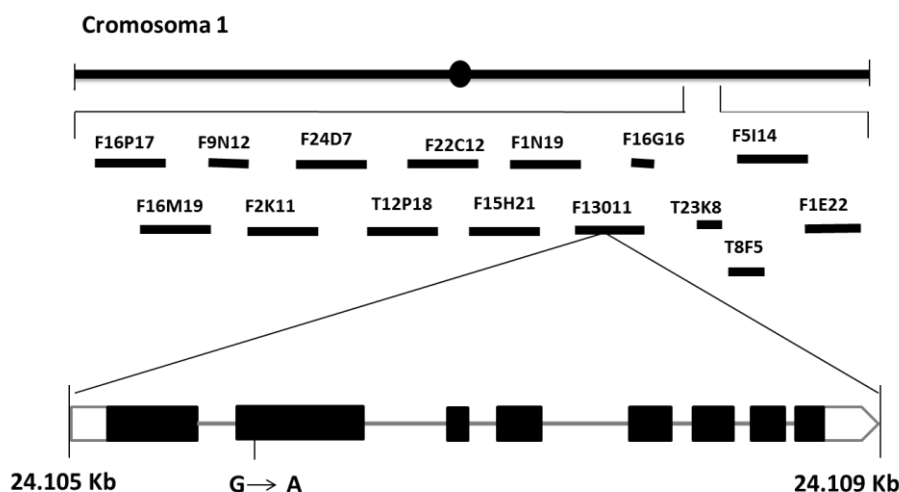
El análisis de la secuencia genómica de *Arabidopsis* ha puesto de manifiesto que la familia de proteínas PPR incluye a más de 450 miembros distintos, cuya función es

desconocida en la mayoría de los casos. No obstante, la caracterización funcional de algunas proteínas de esta familia ha revelado su localización en orgánulos tales como cloroplastos, mitocondrias y núcleos, en donde participarían en la regulación post-transcripcional de la expresión génica (Liu et al., 2016).

#### 4.2.2 Identificación de la mutación *noxy23*

La mutación *noxy23* fue localizada en el locus At1g64880 que codifica una proteína ribosomal de la familia S5 de 515 aminoácidos. La secuencia del ARN mensajero codificada por el gen *NOXY23* se compone por las regiones 5' y 3'UTR (de 102 y 463 pb respectivamente) y una región codificadora contenida en 8 exones de 544, 521, 51, 108, 96, 99, 60 y 66 pb, respectivamente (Figura 7). La mutación *noxy23* produce un cambio de nucleótidos de citosina a timina en el segundo exón del gen, que conlleva un cambio en la secuencia aminoacídica de ácido glutámico a lisina en la posición 199 de la secuencia peptídica.

La proteína S5 posee localización mitocondrial y contiene un dominio S5\_DSRND (del inglés *S5 double stranded RNA-binding domain*) ([www.Uniprot.org](http://www.Uniprot.org)) (Figura 8). La proteína NOXY23 constituye, por tanto, una proteína estructural perteneciente a la subunidad pequeña de los ribosomas mitocondriales cuya capacidad de unión a ARN podría contribuir a la regulación de la traducción (Yanshina et al., 2006).



**Figura 7. Representación esquemática de la estrategia de cartografía seguida para identificar la mutación *noxy23*.** Una vez acotada la mutación al fragmento señalado, la secuenciación masiva de plantas *noxy23* reveló una única mutación (G por A) en el cromosoma 1, correspondiente al segundo exón del locus AT1G64880.

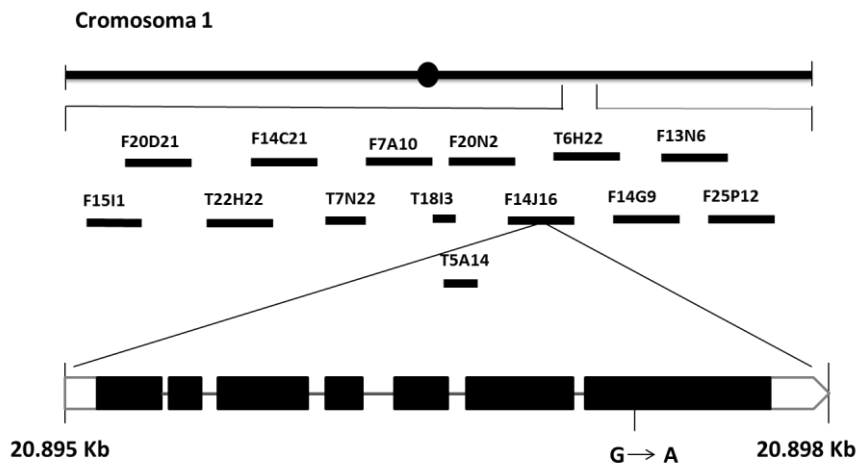


**Figura 8. Topología de la proteína NOXY23, que contiene un dominio S5\_DSRBD.** Se señala el cambio de aminoácido, de ácido glutámico a lisina, causado por la mutación *noxy23* en la posición 199 de la secuencia péptica.

#### 4.2.3 Identificación de la mutación *noxy54*

La mutación *noxy54* fue localizada en el locus At1g55870 que codifica una exoribonucleasa de 689 aminoácidos específica de poli-A (Figura 10). La secuencia del ARN mensajero codificada por el gen *NOXY54* se compone de regiones 5' y 3' UTR, de 81 y 109 pb, respectivamente, y de una región codificadora contenida en 7 exones de 365, 131, 320, 114, 127, 271 y 739 pb, respectivamente (Figura 9).

La mutación *noxy54* produce un cambio de nucleótidos de guanina a adenina que origina un condón de parada en la posición 533 de la secuencia peptídica, que daría lugar a una proteína truncada (Figura 10).



**Figura 9. Representación esquemática de la estrategia de cartografía seguida para identificar la mutación *noxy54*.** Una vez acotada la mutación al fragmento señalado, la secuenciación masiva de plantas *noxy54* reveló una única mutación (G por A) en el cromosoma 1, perteneciente al séptimo exón del locus At1g55870.



**Figura 10. Topología de la proteína NOXY54, que contiene un dominio CAF1.** Se señala el cambio de aminoácido, de triptófano a un codón de parada prematuro, causado por la mutación *noxy54* en la posición 522 de la secuencia peptídica.

La desadenilación de transcritos es un proceso crítico en la funcionalidad de los mensajeros ya que puede afectar a la eficiencia de la síntesis de proteínas. La caracterización bioquímica de ribonucleasas de Poli-A (NOXY54), ha puesto de manifiesto propiedades únicas que le permiten interactuar de forma simultánea, tanto con la caperuza m<sup>7</sup>G de los mensajeros como con la cola de poli(A) (Virtanen et al., 2013).

#### 4.3 Análisis de la función mitocondrial en los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*

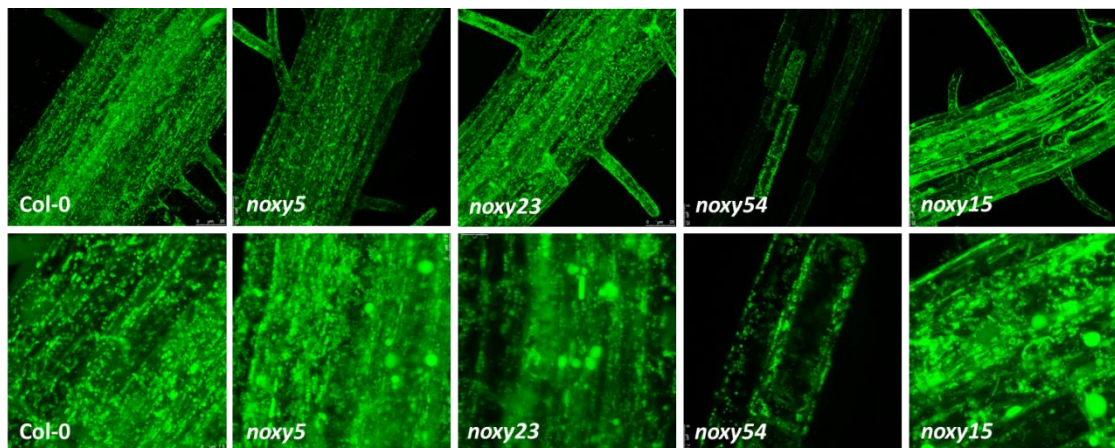
La identificación de los mutantes *noxy23* y *noxy54* en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales apoya la participación de estos orgánulos en la respuesta a las oxilipinas examinadas (Vellosillo et al., 2013). Además, y aunque la localización mitocondrial de la proteína NOXY5 no ha sido demostrada experimentalmente, la predicción de su localización, junto a la estrecha relación establecida entre las mitocondrias y la señalización activada por las oxilipinas (Vellosillo et al., 2013) sugieren la presencia de la proteína NOXY5 en estos orgánulos. Por ello, y dado que las mutaciones *noxy2*, *noxy15* y *noxy38* producen importantes alteraciones en la morfología y distribución de las mitocondrias (Vellosillo et al., 2013), cabía esperar que las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* pudieran provocar, igualmente, algún tipo de alteración mitocondrial.

Para examinar esta posibilidad, y con objeto de inspeccionar visualmente el número y la distribución de las mitocondrias en estos mutantes, procedimos a cruzar las plantas *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* con línea transgénica *35S:Mt-YFP* en la que la proteína fluorescente amarilla se encuentra fusionada a un péptido de transporte mitocondrial que dirige a la proteína YFP al interior de estos orgánulos (Nelson et al., 2007).

Tras realizar los cruzamientos necesarios, se seleccionaron líneas homocigotas en las que se procedió a la visualización de las mitocondrias en la raíz de plántulas de 6 días crecidas en medio MS en posición vertical. En estos ensayos se examinó igualmente la distribución de las mitocondrias en las plantas silvestres Col-0, así como en el mutante *noxy15* previamente caracterizado, en el que se observa una importante alteración de la morfología y distribución de las mitocondrias, que aparecen unidas entre sí formando grandes acúmulos fluorescentes (Vellosillo et al., 2013).

Como se observa en la (Figura 11), los mutantes *noxy5* y *noxy23* muestran la formación de acúmulos fluorescentes de forma y tamaño variable, que contrasta con el aspecto de las mitocondrias observado en las plantas silvestres. Los acúmulos fluorescentes que aparecen en los mutantes *noxy5* y *noxy23*, corresponden a agregados mitocondriales, cuyo tamaño es inferior a los que aparecen en el mutante *noxy15*, y que a diferencia de lo que ocurre en este último, no parecen estar unidos entre sí. En el mutante *noxy54* se observa una importante disminución de la intensidad de la fluorescencia en comparación al resto de las plantas examinadas. La fluorescencia en el mutante *noxy54* solo es visible en una pequeña parte de las células de la raíz, lo que sugiere un daño mitocondrial distinto al correspondiente a los mutantes *noxy5* y *noxy23*.

Independientemente de lo observado en cada uno de los mutantes, los resultados de estos análisis ponen de manifiesto que las mutaciones *noxy* identificadas en este trabajo afectan a la morfología mitocondrial, y probablemente a la funcionalidad de estos orgánulos. Además, las alteraciones mitocondriales observadas sustentan los resultados que demuestran la participación de las mitocondrias en la señalización de las oxilipinas objeto de nuestro estudio.



**Figura 11. Visualización de mitocondrias en raíces de plantas silvestres y mutantes *noxy15*, *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*.** Imágenes de mitocondrias (en verde) en raíces de plantas silvestres y mutantes, conteniendo el marcador mitocondrial *35S:Mt-YFP*.

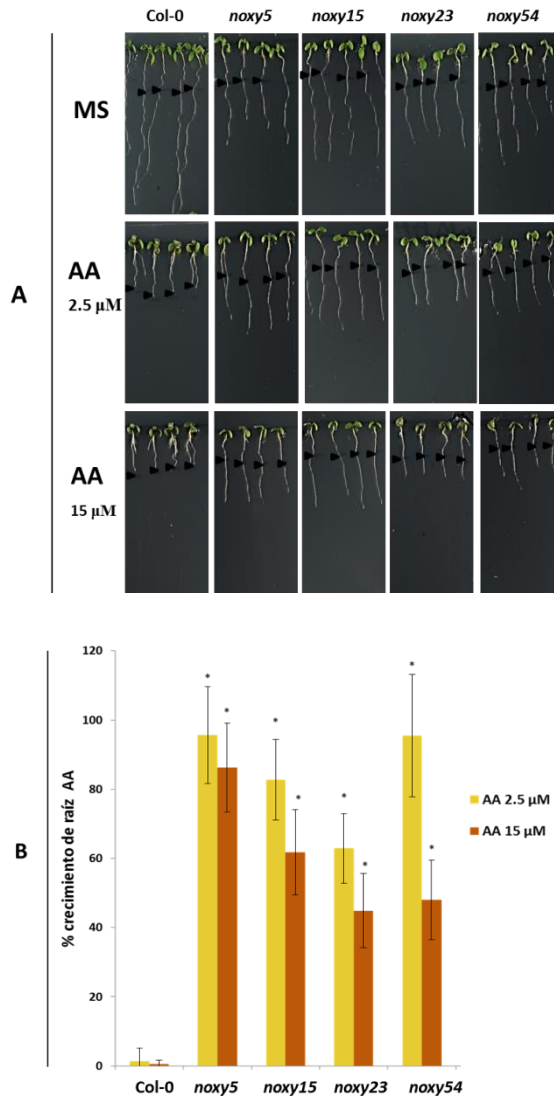
#### 4.3.1 Respuesta de los mutantes *noxy* frente al estrés mitocondrial

Con objeto de examinar el efecto de las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* en la función mitocondrial, procedimos a realizar un tratamiento con la toxina Antimicina A (AA) empleada, con frecuencia, para activar una situación de estrés mitocondrial. La Antimicina

A provoca la inhibición del transporte electrónico y la generación de especies reactivas de oxígeno que activan, a su vez, una señalización retrógrada en la que la producción de una señal mitocondrial, de naturaleza desconocida, informa al núcleo del daño en estos orgánulos (Chang et al., 2012). La señalización retrógrada afecta a la expresión de los genes nucleares que contribuyen a reparar el daño mitocondrial y a favorecer la adaptación de las plantas al estrés causante de dicho daño (Chang et al., 2012).

Para analizar la respuesta de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* a AA procedimos a examinar el efecto fenotípico producido por este tratamiento en plántulas crecidas en posición vertical (Figura 12). En estos análisis, las semillas de interés se germinaron y crecieron durante 3 días en medio MS, y se transfirieron, posteriormente, a placas con AA (2,5 o 15  $\mu\text{M}$ ) en las que se observó y evaluó el crecimiento en comparación al correspondiente a las plantas silvestres Col-0 y al mutante *noxy15*, utilizados como control en estos ensayos.

La presencia de AA provocó la detención del crecimiento de la raíz de las plántulas silvestres. La cuantificación de esta respuesta reveló que la elongación radicular de las plantas silvestres se reduce a un 2% y un 1%, en presencia de AA 2,5  $\mu\text{M}$  o 15  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en comparación al crecimiento que ocurre en medio control MS. A diferencia de estos resultados, todos los mutantes *noxy* evaluados mostraron un cierto nivel de insensibilidad a la presencia de AA. De hecho, los mutantes examinados fueron prácticamente insensibles a la presencia de AA 2,5  $\mu\text{M}$ , alcanzando valores medios de crecimiento de más del 90% en los mutantes *noxy5* y *noxy54*, de ~80% en el mutante *noxy15* y de ~60% en el mutante *noxy23*, con respecto a su crecimiento en medio MS (Figura 12 A y 12B). Estos valores disminuyeron en todos los casos a la concentración más alta de AA (15  $\mu\text{M}$ ), aunque fueron claramente más altos que los de las plantas silvestres, con crecimientos del 85% en el mutante *noxy5*, del 60% en *noxy15*, y de más del 40% en los mutantes *noxy23* y *noxy54* (Figura 12A y 12B).



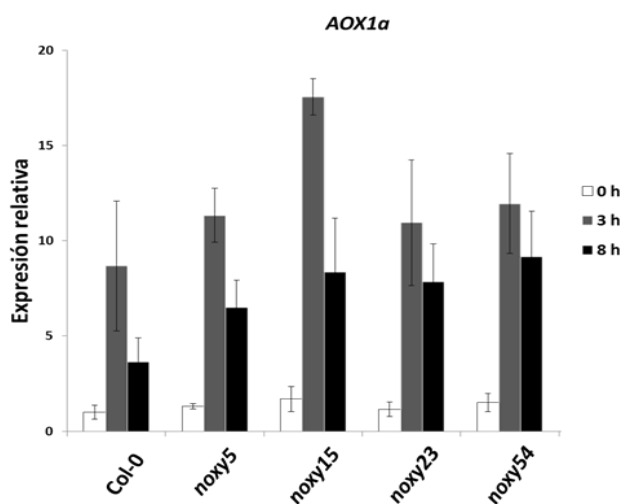
**Figura 12. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, y *noxy54* a la presencia de AA.**

(A) Fenotipo de plántulas crecidas durante 3 días en placas MS verticales y transferidas para su crecimiento durante 4 días adicionales a medio MS control o suplementado con AA (2,5 y 15 μM). Se indica con triángulos negros el tamaño de la raíz en el momento de su transferencia.

(B) Evaluación del crecimiento radicular en plántulas silvestres y mutantes en respuesta al tratamiento con AA. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de la raíz de los mutantes analizados con respecto a las plántulas silvestres (t de Student; \*, p<0,05).

Dado que las plantas integran las señales mitocondriales para regular la expresión de genes nucleares, activando la denominada señalización retrógrada (Rhoads et al., 2006), procedimos a determinar si el fenotipo de respuesta a AA de los mutantes *noxy* podría estar relacionado con un defecto en la comunicación mitocondrial al núcleo que pudiera impedir la respuesta de la planta a este agente o si, por el contrario, esta ruta podría estar activada de forma constitutiva en los mutantes *noxy* favoreciendo su adaptación y aumentando su resistencia al daño mitocondrial.

Para examinar esta posibilidad, se analizó en estos mutantes la expresión de la oxidasa alternativa mitocondrial *AOX1a*, utilizada como marcador de la señalización retrógrada en respuesta a AA (Rhoads et al., 2006). Igualmente, procedimos a examinar la expresión del gen *MSD1* que codifica una superóxido dismutasa de localización mitocondrial (*MSD1*; At3g10920) que forma parte de los mecanismos antioxidantes de la planta para limitar el estrés oxidativo en las mitocondrias (Morgan et al., 2008). El análisis de la expresión de los genes *AOX1a* y *MSD1* se realizó en plántulas de 12 días utilizando muestras de RNA extraídas a las 3 y 8 horas tras el tratamiento con AA (20  $\mu$ M). El resultado de estos análisis (Figura 13) permitió establecer que el tratamiento con AA en las plantas silvestres produce un aumento de expresión del gene *AOX1a* (~9 veces por encima del nivel basal) a las 3h de tratamiento, que disminuye ligeramente en el tiempo de 8h (4 veces sobre el nivel basal). Este mismo patrón se observó en los mutantes *noxy* analizados, aunque en todos los casos los valores de expresión alcanzados fueron mayores que en las plantas silvestres (Figura 13). Esta diferencia fue especialmente notable en el mutante *noxy15* donde se llegaron a duplicar los niveles del transcrito con respecto al nivel de las plantas silvestres, tanto a las 3h como a las 8h de tratamiento (Figura 13).

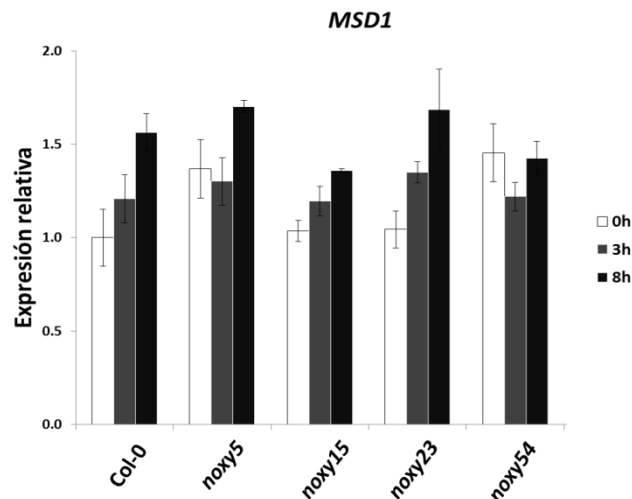


**Figura 13. Cuantificación de la expresión del gen *AOX1a* en respuesta al tratamiento con Antimicina A.** Expresión del gen *AOX1a* determinada mediante análisis de PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plántulas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23* y *noxy54* tratadas con AA (20  $\mu$ M) y recogidas a los tiempos indicados. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se utilizó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACT8 (ACTINA 8). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos en tres réplicas independientes.

El análisis del gen *MSD1*, permitió determinar la presencia basal de transcritos en todas las plantas examinadas, alcanzando niveles más altos en los mutantes *noxy5* y *noxy54*. El tratamiento con AA produjo cambios moderados en los niveles de RNAm de manera que, en las muestras de tres horas, la expresión del gen *MSD1* aumenta en los mutantes *noxy5* y *noxy23* en un 8 y 12 % respectivamente, con respecto al nivel de las plantas silvestres



(Figura 14). A las 8h de tratamiento el nivel de transcritos MSD1 en las plantas silvestres aumenta ligeramente con respecto al tiempo de las tres horas. A este tiempo, los mutantes *noxy5* y *noxy23* presentan un nivel de transcritos ligeramente superior al de las plantas control (9 y 8 %, respectivamente) mientras que en el resto de las plantas es ligeramente inferior (un 13 y 9 % en las plantas *noxy15* y *noxy54*, respectivamente).



**Figura 14. Cuantificación de la expresión del gen MSD1 en respuesta a Antimicina A.**

Expresión del gen *MSD1* determinada mediante análisis de PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plántulas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23* y *noxy54* tratadas con AA (20  $\mu$ M) y recogidas a los tiempos indicados. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se utilizó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACTINA 8 (ACT8). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos a partir del RNA procedente de tres experimentos independientes.

### 4.3 Respuesta de los mutantes *noxy* frente a la infección de patógenos

Dado que la alteración de la función mitocondrial en los mutantes *noxy2*, *noxy15* y *noxy38*, previamente caracterizados, conlleva un aumento de la susceptibilidad frente a la infección de bacterias patógenas hemibiotrofas, procedimos a ampliar estos estudios examinando la respuesta de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* frente a estos patógenos.

Además, nos planteamos examinar la respuesta de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* frente al ataque de patógenos necrotrofos, haciendo extensivo este estudio a otros mutantes *noxy* previamente caracterizados.

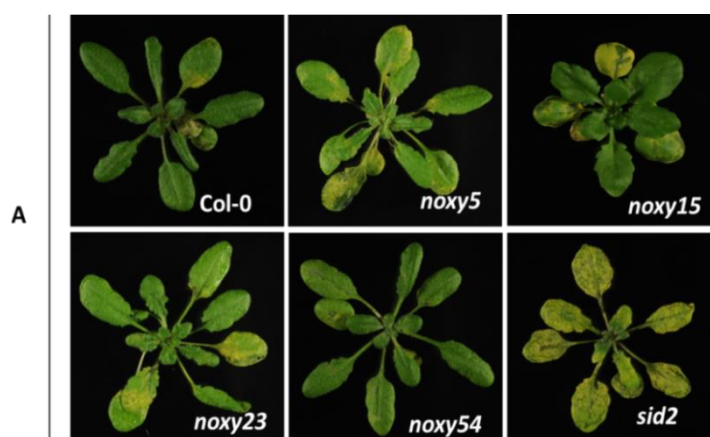
#### 4.3.2 Análisis de los mutantes *noxy* frente a la infección de la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* *pav. tomato*

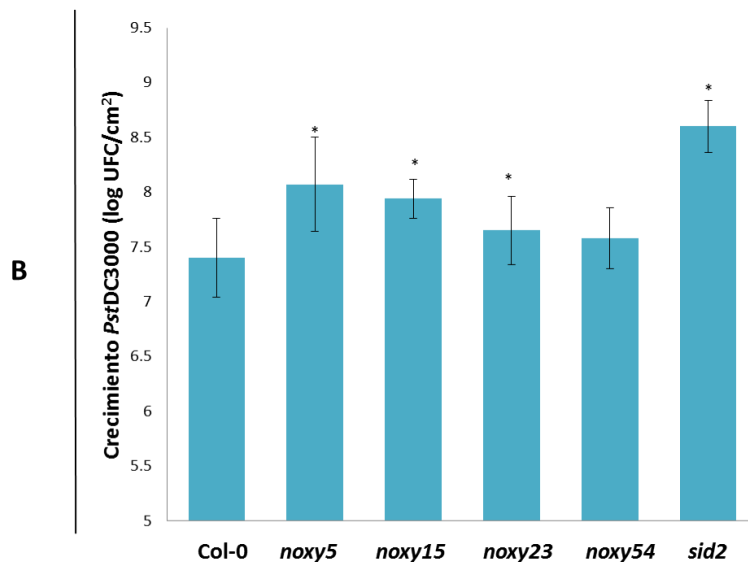
Con objetivo de evaluar el efecto de las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* en la defensa frente a patógenos biotrofos/hemibiotrofos procedimos a infectar dichas plantas con la

bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), ampliamente utilizada como sistema modelo en el estudio de la interacción planta-patógeno. En estos estudios, incluimos además dos mutantes susceptibles frente a esta cepa bacteriana, el mutante *noxy15*, insensible a la presencia de oxilipinas, y el mutante *sid2*, deficiente en la síntesis de ácido salicílico (Chen et al., 2009; Vellosillo et al., 2013). La proteína NOXY15 participa en la división de las mitocondrias y su mutación altera la función y la distribución de estos orgánulos en la célula (Figura 11; Vellosillo et al., 2013).

La respuesta a la infección de los mutantes de interés se evaluó 3 días después de la inoculación procediendo a comparar los síntomas de la infección (amarillamiento y lesiones foliares) y el crecimiento bacteriano, con los correspondientes a los de las plantas silvestres Col-0.

El mutante *noxy5* muestra lesiones más pronunciadas que las que se forman en las plantas silvestres (Figura 15A). Igualmente, el crecimiento bacteriano detectado en este mutante fue significativamente mayor al determinado en las plantas silvestres (Figura 15B). Un escenario similar se encontró al analizar la respuesta del mutante *noxy23*, que presentó síntomas de infección más acusados y una tasa de crecimiento bacteriano mayor que la de las plantas silvestres (Figura 15A y 15B). A diferencia de estos resultados, la respuesta del mutante *noxy54* fue similar a la de las plantas silvestres, tanto a nivel de síntomas como de crecimiento del patógeno, lo que implica que esta mutación no interfiere con la activación de la defensa frente a la cepa bacteriana examinada (Figura 15B). De acuerdo a lo esperado, el mutante *noxy15* presentó síntomas de infección más acusados y una tasa de crecimiento bacteriano mayor que las plantas silvestres. Finalmente, el mutante *sid2* resultó más susceptible que el resto de las plantas examinadas para los dos parámetros analizados (Figura 15A y 15B).





**Figura 15. Análisis de síntomas y del crecimiento bacteriano en plantas silvestres y mutantes *noxy* frente a la infección de *Pst* DC3000.**

(A) Ejemplos representativos de los síntomas observados en plantas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23* y *noxy54*; 3 días tras la inoculación de una suspensión de *Pst* DC3000 ( $10^8$  UFC/mL). Se incluye además el mutante *sid2* utilizado como control de susceptibilidad.

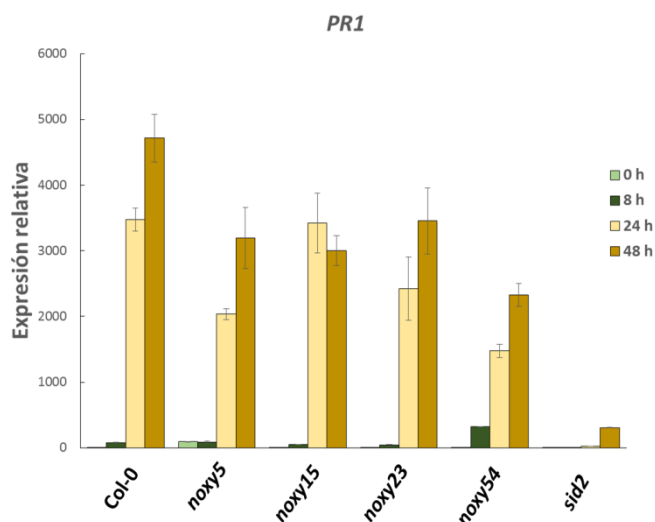
(B) Crecimiento bacteriano de la cepa *Pst* DC3000 en las plantas infectadas. Los asteriscos indican las diferencias significativas en los mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23* y *sid2* respecto al crecimiento determinado en las plantas silvestres, (t de Student; \*,  $p < 0,05$ ).

Para analizar la respuesta de las plantas mutantes en más detalle procedimos a analizar la expresión de genes marcadores de la defensa mediada por SA tales como el gen de respuesta a salicílico *PR1*, y el gen *S3H* que codifica la enzima SA 3-hidroxilasa (S3H) que cataliza la hidroxilación e inactivación del SA para regular su producción tras su inducción (Zhang et al., 2013). El gen *PR1* se activa en respuesta a SA a través de la ruta de señalización dependiente de NPR1, mientras que la inducción del gen *S3H* es independiente de NPR1, y requiere la actuación del SA sobre la maquinaria mitocondrial. Igualmente, y dada la naturaleza de las mutaciones examinadas, procedimos a examinar la expresión del gen *AOX1a*, utilizado como marcador del estrés mitocondrial en estos ensayos.

El análisis de los niveles de transcritos a los tiempos examinados (0, 8, 24 y 48 horas post-infección) reveló el aumento de la expresión del gen *PR1* en las plantas silvestres (alrededor de 2.500 veces a 24h y de 4.000 veces a 48h) en relación a los niveles basales detectados en las plantas no tratadas (Figura 16). Todos los mutantes examinados presentaron niveles de inducción más bajos que las plantas control en al menos uno de los dos tiempos analizados. En los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* la reducción de la expresión se observó tanto a las 24 como a las 48h post-inoculación, mientras que en el mutante *noxy15* la reducción de la expresión se detectó exclusivamente a las 48h de

infección (Figura 16). Los valores de reducción de transcritos a 24h fueron respectivamente del 35 y del 23% en los mutantes *noxy5* y *noxy23*, y del 25% y 32%, respectivamente, a las 48 h de infección. De acuerdo la susceptibilidad del mutante *sid2*, el nivel de transcritos en esta planta fue drásticamente inferior al del resto de las plantas examinadas (99% a las 24h y 93% a las 48h post-inoculación) (Figura 16).

A diferencia de lo que ocurre en el resto de las plantas examinadas, la expresión del gen *PR1* en las muestras obtenidas a las 8 horas de la inoculación en el mutante *noxy54* era superior (~200 veces) a la de las plantas control Col-0. El adelanto de la acumulación de transcritos *PR1* podría determinar el comportamiento de este mutante, en el que el crecimiento bacteriano alcanza niveles similares al de las plantas control, a pesar de que presenta niveles más bajos de transcritos *PR1* a las 24 y a las 48 de infección (Figura 16).

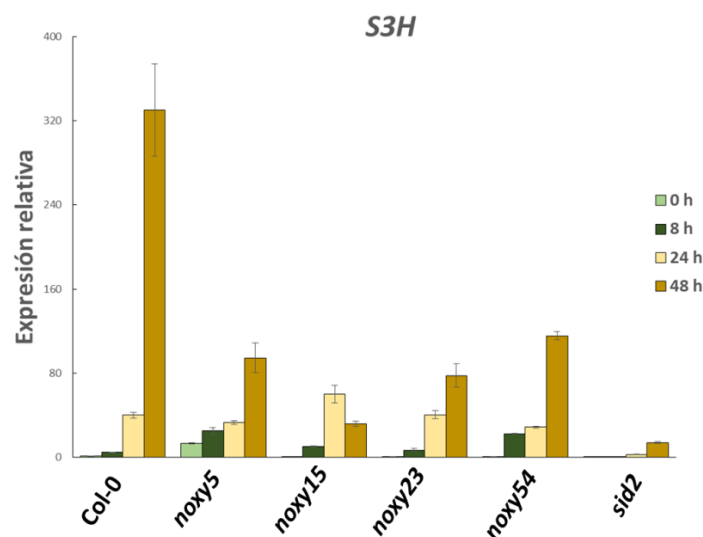


**Figura 16. Cuantificación de la expresión del gen *PR1* durante la infección de *Pst* DC3000.** Expresión del gen *PR1* determinada mediante análisis por PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *sid2*, infiltradas con *Pst* DC3000 ( $10^6$  UFC/mL) y recogidas a 0, 24 y 48h post-inoculación. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se utilizó el gen AT1G49240 que codifica la proteína ACTINA 8. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos en tres experimentos independientes.

En comparación con las plantas control, el nivel de expresión del gen *S3H* de respuesta a SA, fue inferior en todos los mutantes examinados. Como se muestra en la Figura 17, la infección de las plantas control aumenta ~300 veces (a las 48 h post-inoculación) el nivel de transcritos del gen *S3H* con respecto al nivel basal determinado en las plantas no inoculadas. Esta inducción disminuyó de forma clara en todos los mutantes *noxy*

analizados, con reducciones que oscilaban entre un 66% y un 91% en relación a los niveles de transcritos detectados en las plantas silvestres. A las 24h post-inoculación, sin embargo, los niveles de transcritos fueron similares en las plantas silvestres y en los mutantes *noxy*, con excepción del mutante *noxy15* que presentó una inducción ligeramente mayor que las plantas silvestres. En los mutantes *sid2*, tal como ocurrió para el marcador *PR1*, se detectaron niveles muy inferiores de transcritos *S3H* en comparación con las plantas silvestres (87% a las 24h y 95% a las 48h).

Los resultados de estos análisis revelan que las diferencias de expresión entre las plantas control y los mutantes *noxy* son más acusadas para el marcador *S3H* que para el gen *PR1* y sugieren que las mutaciones *noxy* examinadas provocarían un defecto de la función mitocondrial que limitaría la activación de la señalización del SA que se establece a través de estos orgánulos.

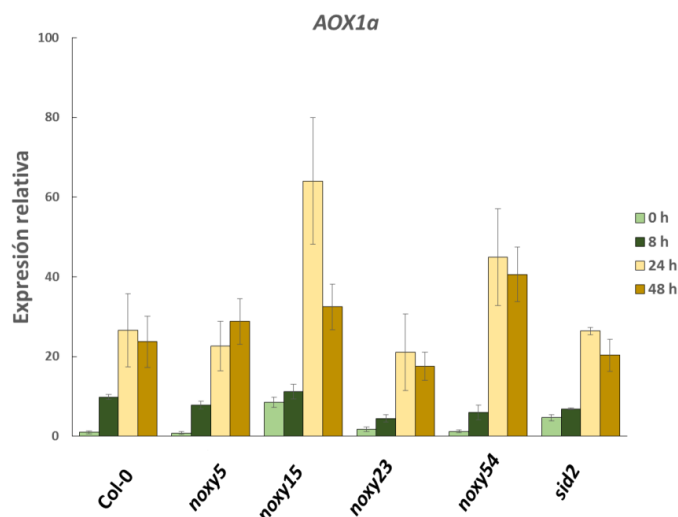


**Figura 17. Cuantificación de la expresión del gen *S3H* durante la infección con *Pst* DC3000.** Expresión del gen *S3H* determinada mediante análisis de PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *sid2*, infiltradas con *Pst* DC3000 ( $10^6$  UFC/mL) y recogidas a 0, 24 y 48h post-inoculación. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se utilizó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACTINA 8. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos en tres experimentos independientes.

Finalmente, la cuantificación de los transcritos *AOX1a* mostró que la infección de la cepa *Pst* DC3000 en las plantas silvestres provoca un aumento de  $\sim 100$  veces en los niveles de transcritos *AOX1a*, que se observa a los tiempos de 24 y 48 horas post-inoculación. En el caso de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* el nivel de expresión basal del gen *AOX1a* es similar al de las plantas silvestres, mientras que en los mutantes *noxy15* y *sid2* es ligeramente superior. Además, el análisis de los tejidos infectados permite distinguir tres

tipos de respuesta. Los mutantes *noxy15* y *noxy54* manifiesta un nivel de inducción superior al de las plantas silvestres (145% y 25% a las 24 y 48h post-inoculación, respectivamente). La expresión del gen *AOX1a* en el mutante *noxy5* muestra niveles de inducción similares a los de las plantas silvestres a las 24h post-inoculación y ligeramente superiores (28%) a las 48h de tratamiento. Finalmente, el mutante *noxy23* mostró una ligera disminución en los niveles de transcritos respecto a los detectados en las plantas silvestres (~20% menor a los dos tiempos examinados). En el caso del mutante *sid2*, la expresión del gen *AOX1a* a las 24 h post-inoculación fue similar a la de las plantas silvestres.

Estos resultados ponen de manifiesto que la infección de bacterias hemibiotrofas activa la expresión del gen *AOX1a* y, por tanto, la señalización retrógrada que informa al núcleo de una situación de estrés mitocondrial. Por otro lado, el aumento de los niveles de transcritos *AOX1a* en los mutantes *noxy15* y *noxy54*, podría ser el reflejo de una alteración de la función mitocondrial cuya activación varía con respecto a las plantas silvestres durante la infección (Figura 18).



**Figura 18. Cuantificación de la expresión del gen *AOX1a* durante la infección con *Pst* DC3000.** Expresión del gen *AOX1a* determinada mediante análisis de PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *sid2*, infiltradas con *Pst* DC3000 ( $10^6$  UFC/mL) y recogidas a 0, 24 y 48h post-inoculación. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se utilizó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACTINA 8. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos en tres experimentos independientes.

#### 4.3.3 Análisis de los mutantes *noxy* frente a la infección del hongo necrotrofo *Alternaria brassicicola*.

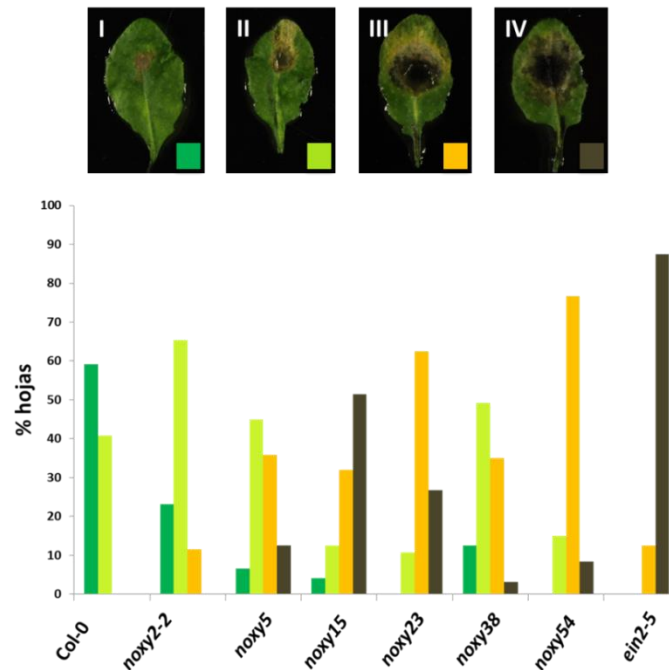
La activación de la respuesta de defensa frente a patógenos biotrofos ejerce con frecuencia, una acción antagonista sobre los mecanismos de defensa que se activan en respuesta a la infección de patógenos necrotrofos. Por ello, y una vez examinada la

respuesta de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* a la infección de la bacteria *Pst* DC3000, procedimos a examinar en dichas plantas la respuesta a la infección del hongo necrotrofo *Alternaria brassicicola*. En estos estudios se incluyeron, además, los mutantes *noxy15*, *noxy2-2* y *noxy38* en los que la alteración de la función mitocondrial conlleva un aumento en la susceptibilidad frente a patógenos biotrofos, pero en los que la respuesta frente a patógenos necrotrofos no había sido caracterizada. Igualmente, procedimos a examinar la respuesta del mutante *ein2-5* (*ethylene insensitive 2*) deficiente en la señalización regulada por etileno (ET) que participa como hormona de defensa en la protección de las plantas frente a la infección de patógenos necrotrofos.

La infección por *A. brassicicola* causa la maceración del tejido infectado en las plantas susceptibles, así como la formación de esporas que cubren el área dañada en las últimas etapas de la infección (Figura 19). La respuesta a la infección de *A. brassicicola* de las plantas de interés se evaluó en primer lugar cuantificando los síntomas producidos por el hongo a los 5 días post-inoculación, tiempo en el que la mayoría de las hojas mostraban algún tipo de síntoma. De acuerdo a la intensidad de los síntomas, se determinaron cuatro niveles de infección, designados grado I, II, III y IV y se contabilizó el número de hojas que mostraban dichos síntomas en cada una de las infecciones realizadas. En estos ensayos pudimos determinar que, mientras que los síntomas que aparecían en las hojas de las plantas silvestres se encontraban siempre dentro de los grados I (60%) y II (40%), el mutante *ein2-5*, utilizado como control de susceptibilidad, mostraba la aparición de síntomas más severos correspondientes a los grados III (10%) y IV (90%). La evaluación de los síntomas en los mutantes *noxy* reveló un aumento de susceptibilidad con respecto a las plantas silvestres, que en ningún caso llegaba a alcanzar la observada en el mutante *ein2-5*. Las plantas *noxy2-2* mostraron un ligero incremento de susceptibilidad, contabilizándose alrededor de un 10% de hojas con síntomas de nivel III y una mayor proporción de nivel II (65%) que en las plantas silvestres (Figura 19). Los mutantes *noxy5* y *noxy38* desarrollaron síntomas de nivel III en alrededor del 30% de las hojas inoculadas, a la vez que se empezaban a observar síntomas de nivel IV. Finalmente, los mutantes *noxy15*, *noxy23* y *noxy54* desarrollaron síntomas de nivel III o IV en más del 80% de las hojas, siendo por tanto, los mutantes *noxy* más susceptibles a la infección (Figura 19).

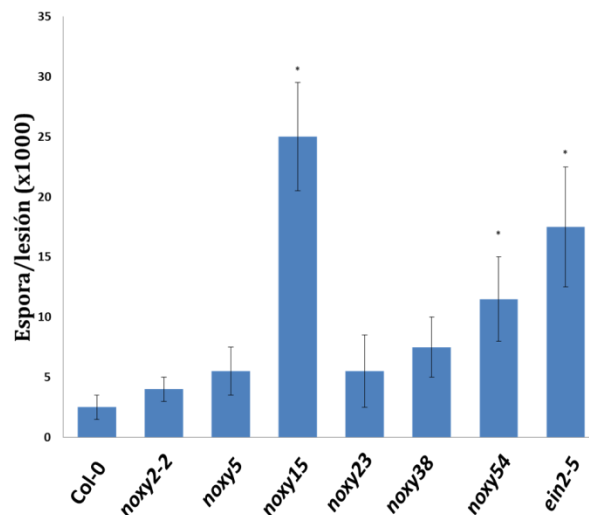
De manera paralela a la observación y evaluación de los síntomas, procedimos a cuantificar el número de esporas producidas en las hojas infectadas de cada uno de los genotipos examinados. De acuerdo a la formación de síntomas, las plantas *ein2-5* producen altos niveles de esporas (~17.000 esporas por hoja infectada) mientras que en las plantas silvestres dicho nivel (~2.000 esporas por hoja) es inferior al determinado en todos los

mutantes *noxy* examinados. Dentro de estos últimos, las plantas *noxy54* y *noxy15* muestran los niveles más altos de producción de esporas (~10.000 y 25.000 por lesión, respectivamente), siendo el valor en el mutante *noxy15* superior al determinado en el resto de los genotipos examinados, incluyendo al mutante *ein2-5*. En el resto de mutantes *noxy* la producción de esporas era superior a la de las plantas silvestres aunque, las diferencias en estos casos no fueron estadísticamente significativas (Figura 20).



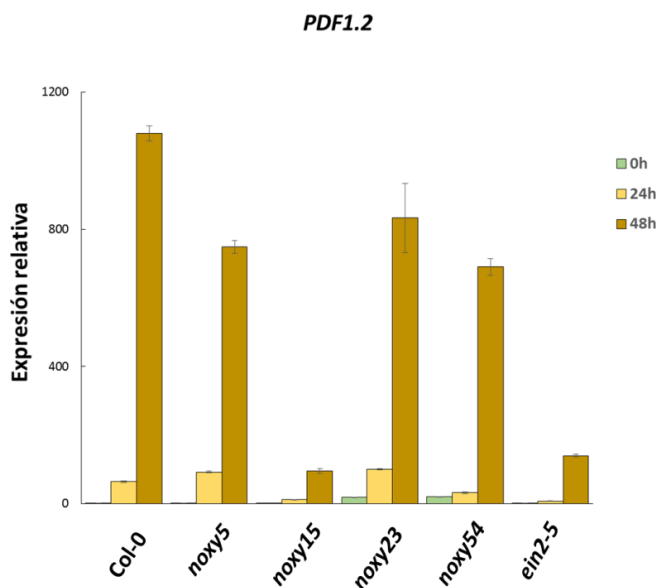
**Figura 19. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy* frente a la infección del hongo necrotrofo *Alternaria brassicicola*.** Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación del hongo *Alternaria brassicicola* ( $2.5 \times 10^6$  esporas/mL) en plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *ein2-5*. La cuantificación de los síntomas se realizó utilizando una escala de cuatro grados, designados I, II, III y IV, de acuerdo a la intensidad del daño observado. Se muestran ejemplos representativos de cada grado de la escala y los porcentajes de hojas que muestran los síntomas descritos.





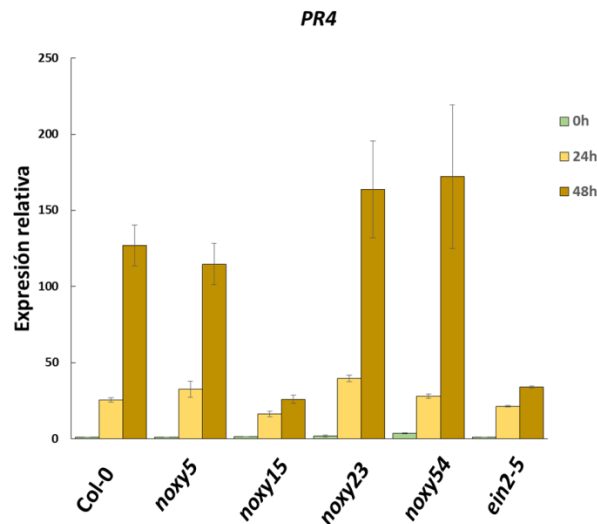
**Figura 20. Análisis del recuento de esporas en plantas silvestres y mutantes *noxy* frente a la infección del hongo necrotrofo *Alternaria brassicicola*.** Número de esporas evaluado tras la inoculación del hongo *Alternaria brassicicola* ( $2.5 \times 10^6$  esporas/mL) en plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *ein2-5*. Los asteriscos muestran diferencias significativas en los mutantes *noxy54*, *noxy15* y *ein2-5* con respecto a las plantas silvestres (t de Student; \*,  $p < 0,05$ ).

Junto al análisis de síntomas y de la producción de esporas, procedimos a examinar la expresión de genes de respuesta a etileno y jasmónico *PDF1.2* y *PR4*, cuya activación forma parte de la respuesta de defensa de la planta frente a la infección de patógenos necrotrofos. La expresión de *PDF1.2* aumentó en plantas silvestres de forma notable a las 24h (~64 veces) y en especial a las 48h (~1.080 veces) de la infección, mientras que en el mutante *ein2-5* esta inducción era drásticamente inferior (Figura 21). El nivel de activación del gen *PDF1.2* en los mutantes *noxy*, fue en todos los casos inferior al detectado en las plantas silvestres. La reducción en el nivel de transcritos fue especialmente relevante en el mutante *noxy15*, en el que la acumulación de ARN se redujo en más del 80% con respecto al nivel de las plantas silvestres, a los dos tiempos (24 y 48 h post-inoculación) examinados. Las plantas *noxy54* mostraron niveles de acumulación de transcritos inferiores (51% a las 24h y 36% a las 48h) a los detectados en las plantas silvestres, mientras que los mutantes *noxy5* y *noxy23* mostraron diferencias menores con respecto a las plantas silvestres, con una reducción de ~31% a las 48 horas, y un ligero aumento en las muestras recogidas a las 24h de la infección.



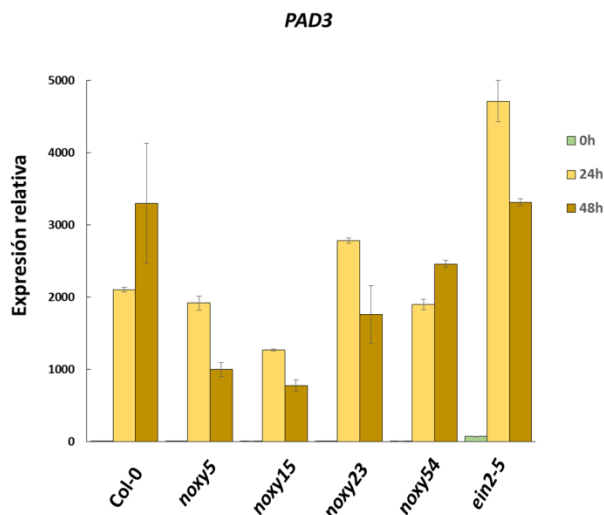
**Figura 21. Cuantificación de la expresión del gen *PDF1.2* durante la infección con *Alternaria brassicicola*.** Expresión del gen *PDF1.2* determinada mediante análisis de PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *ein2-5* inoculadas con el hongo *Alternaria brassicicola* ( $2.5 \times 10^6$  esporas/mL) y recogidas a los tiempos indicados. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se usó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACTINA 8. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE de los valores determinados en las muestras de ARN obtenidas en tres experimentos independientes.

De igual manera que para el gen *PDF1.2*, la expresión del marcador *PR4* se indujo visiblemente en las plantas silvestres ( $\sim 25$  veces a las 24 h y  $\sim 127$  veces a las 48 h post-inoculación). También en este caso, y de acuerdo a que la expresión del gen *PR4* es inducible por etileno, el nivel de transcritos *PR4* fue muy inferior en las plantas *ein2-5* que en las plantas silvestres (Figura 20). Igualmente, el nivel de transcritos *PR4* era significativamente inferior en el mutante *noxy15*, con una reducción del 40% a las 24h y del 75% a las 48h post-inoculación en comparación con las plantas silvestres. A diferencia de estos resultados, la respuesta del mutante *noxy5* fue similar a la de las plantas silvestres, mientras que la inducción del gen *PR4* fue superior en los mutantes *noxy23* y *noxy54* que en las plantas control (Figura 22).



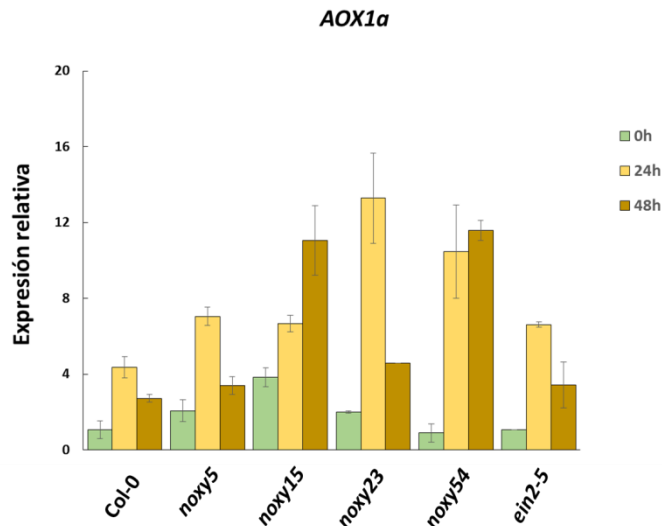
**Figura 22. Cuantificación de la expresión del gen *PR4* durante la infección con *Alternaria brassicicola*.** Expresión del gen *PR4* determinada mediante análisis de PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *ein2-5* inoculadas con el hongo *Alternaria brassicicola* ( $2.5 \times 10^6$  esporas/mL) y recogidas a los tiempos indicados. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se usó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACTINA 8. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos en tres experimentos independientes.

Además de los marcadores descritos, procedimos a examinar la expresión del gen *PAD3*, que codifica una de las enzimas de la biosíntesis de la fitoalexina camalexina, que inhibe el crecimiento de *A. brassicicola* y constituye un importante componente de la defensa de la planta frente a este patógeno. Al igual que con los marcadores anteriores, la expresión del gen *PAD3* se indujo de manera clara en las plantas silvestres tanto a 24h (>2000 veces) como a 48h (>3000 veces) post-inoculación. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el resto de los marcadores examinados, la inducción del gen *PAD3* a las 24 h post-inoculación alcanzó niveles más altos en el mutante *ein2-5* (más del doble) que en las plantas control, igualándose posteriormente a las 48 h post-inoculación. El análisis de los mutantes *noxy* reveló una disminución generalizada en los niveles de expresión, aunque era posible distinguir diferencias entre ellos. Una vez más, el mutante *noxy15* fue el que mostró una inducción menor respecto a las plantas silvestres (40% menor a las 24h y 75% inferior a las 48h). Los mutantes *noxy5* y *noxy54* mostraron un patrón de acumulación de transcritos similar a las plantas control a las 24 h post-inoculación, y mostraron una clara reducción de ARNm a las 48 h post-inoculación, que fue mayor en *noxy5* que en el mutante *noxy54*. En las plantas *noxy23* la inducción del gen *PAD3* fue ligeramente superior a las 24h (~30%) e inferior que en las plantas silvestres a las 48h post-inoculación (~50% menor) (Figura 23).



**Figura 23. Cuantificación de la expresión del gen *PAD3* durante la infección con *Alternaria brassicicola*.** Expresión del gen *PAD3* determinada mediante análisis dePCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *ein2-5* inoculadas con el hongo *Alternaria brassicicola* ( $2.5 \times 10^6$  esporas/mL) y recogidas a los tiempos indicados. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se utilizó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACTINA 8. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE obtenidos en tres experimentos independientes.

Por último, al igual que en el análisis de la infección de *Pseudomonas*, analizamos la expresión del gen *AOX1a* durante la infección de *A. brassicicola*. En las plantas silvestres se detectó una inducción del marcador de estrés mitocondrial de  $\sim 4$  veces a las 24 h post-inoculación y de  $\sim 3$  veces a las 48 h post-infección. La expresión en el mutante susceptible *ein2-5* fue ligeramente superior que en las plantas silvestres. El análisis de expresión en los mutantes *noxy* reveló en todos los casos niveles de inducción de *AOX1a* superiores a los correspondientes a las plantas control. En el caso de los mutantes *noxy5* y *noxy23*, se observó el mismo patrón de expresión con picos a las 24h que superaron al de las plantas silvestres en un 60% y 200%, respectivamente. En los mutantes *noxy5* y *noxy54* también se detectaron valores claramente mayores de expresión que en plantas silvestres a ambos tiempos, aunque en ambos casos la expresión fue más alta a las a 48h (Figura 24). Así, los valores de expresión a las 24h fueron un 68% y un 130% más altos en los mutantes *noxy15* y *noxy54* que en las plantas silvestres. Estos valores aumentaron a las 48h post-inoculación llegando a ser 4 veces más altos que los registrados en plantas silvestres.



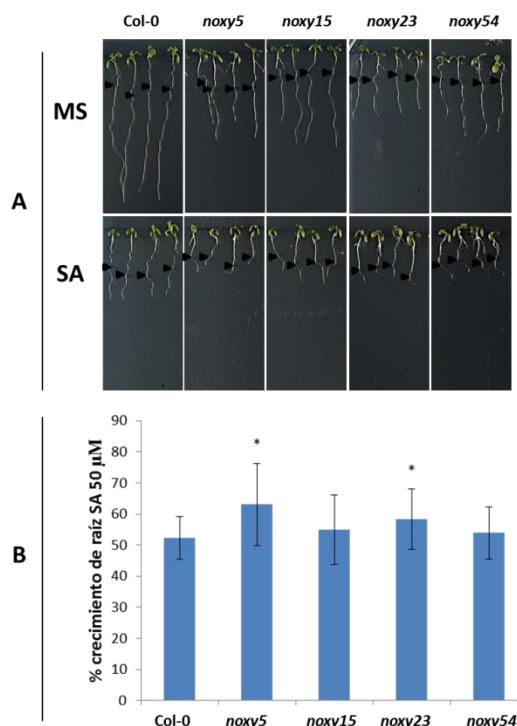
**Figura 24. Cuantificación de la expresión del gen *AOX1a* durante la infección con *Alternaria brassicicola*.** Expresión del gen *AOX1a* determinada mediante análisis de PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23*, *noxy54* y *ein2-5* inoculadas con el hongo *Alternaria brassicicola* ( $2.5 \times 10^6$  esporas/mL) y recogidas a los tiempos indicados. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se utilizó el gen AT1G49240, que codifica la proteína ACTINA 8. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos en tres experimentos independientes.

Nuestros resultados reflejan que las mutaciones *noxy* caracterizadas alteran la respuesta de la planta frente a patógenos hemibiotrofos y necrotrofos. La defensa frente a estos patógenos está en gran medida regulada por la acción de fitohormonas tales como el SA, el ET y el JA, por lo que la alteración de la respuesta de defensa de los mutantes caracterizados podría afectar a las rutas de señalización reguladas por la acción de estas hormonas. Para examinar esta posibilidad, se procedió a examinar la respuesta fenotípica de los mutantes *noxy* a la presencia de dichas hormonas en el medio de crecimiento.

En estos análisis se emplearon plántulas crecidas durante 3 días en placas con medio MS en posición vertical, que se transfirieron posteriormente a medio MS suplementado con SA ( $50 \mu\text{M}$ ), JA ( $25 \mu\text{M}$ ) o con el precursor del etileno ACC ( $1 \mu\text{M}$ ). Las concentraciones de hormonas seleccionadas afectan al crecimiento radicular provocando una disminución de la longitud radicular.

El crecimiento en presencia de SA provoca una reducción en la longitud de la raíz de todas las plantas examinadas, aunque se observan diferencias significativas entre ellas. La reducción del crecimiento en las plantas silvestres debido a la presencia de SA en el medio es del  $\sim 50\%$  en relación al crecimiento de la raíz en medio MS. Los mutantes *noxy15* y *noxy54* mostraron niveles de reducción similares a los evaluados en las plantas silvestres, mientras en los mutantes *noxy5* y *noxy23* la reducción de crecimiento debida a la presencia

de SA fue inferior que en las plantas silvestres de manera que el crecimiento radicular se reduce un 37% y 42% por efecto del SA, que se comportan por tanto como parcialmente insensibles a la presencia de SA (Figura 25).

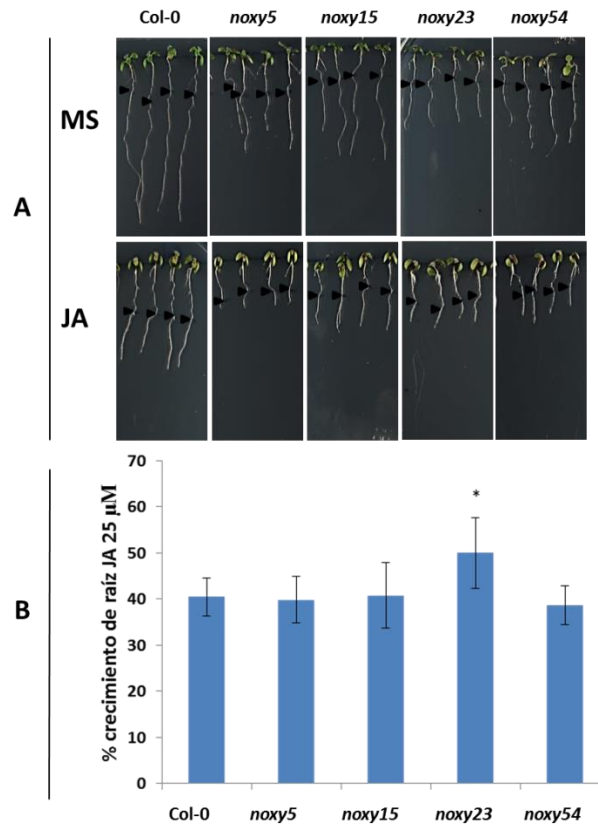


**Figura 25. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23* y *noxy54* a la presencia de SA.**

(A) Fenotipo de plántulas crecidas durante 3 días en placas MS verticales y transferidas para su crecimiento durante 4 días adicionales a medio MS control o suplementado con SA (50 µM). Se indica con triángulos negros el tamaño de la raíz en el momento del cambio de medio.

(B) Evaluación del crecimiento de la raíz en presencia de SA con respecto al crecimiento en medio control MS. Los asteriscos indican diferencias significativas en los mutante *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* con respecto a las plantas silvestres (t de Student; \*, p < 0,05).

De manera similar se evaluó el crecimiento de plántulas en medio MS suplementado con JA (25 µM). También en este caso se observó una reducción del crecimiento de raíz de las plántulas silvestres, que fue un 40% menor con respecto al crecimiento que alcanzan las plántulas en condiciones control (medio MS). Esta reducción fue estadísticamente similar a la de los mutantes *noxy5*, *noxy15* y *noxy54*, sin embargo, en el caso del mutante *noxy23* el crecimiento radicular en presencia de JA fue significativamente superior al del resto de las plantas (50% respecto a condiciones control), lo que pone de manifiesto la insensibilidad parcial del mutante *noxy23* a JA en estas condiciones (Figura 26).

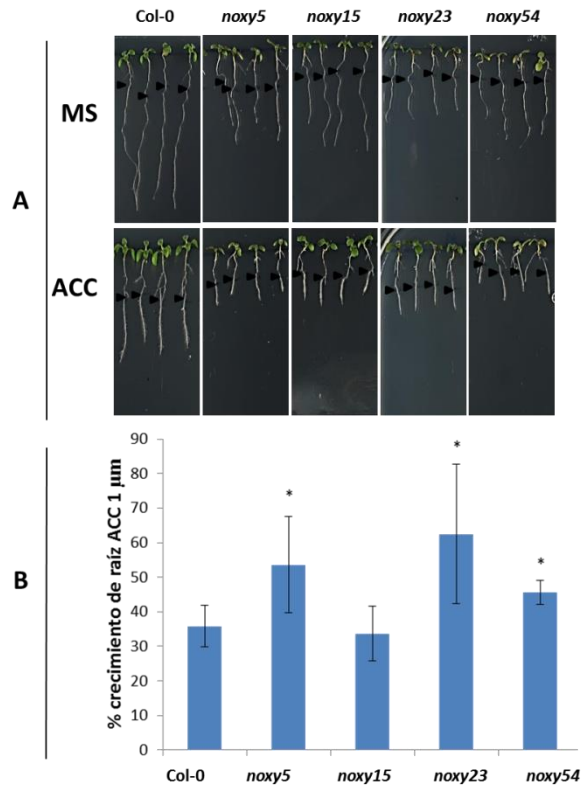


**Figura 26. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23* y *noxy54* a la presencia de JA.**

(A) Fenotipo de plántulas crecidas durante 3 días en placas MS verticales y transferidas para su crecimiento durante 4 días adicionales a medio MS control o suplementado con JA (25 μM). Se indica con triángulos negros el tamaño de la raíz en el momento del cambio de medio.

(B) Evaluación del crecimiento radicular en presencia de JA en relación al crecimiento en medio control MS. Los asteriscos indican diferencias significativas en el mutante *noxy23* con respecto a las plantas silvestres (t de Student; \*,  $p < 0,05$ ).

Finalmente, el análisis del crecimiento radicular en presencia del precursor de etileno ACC (1 μM) reveló una reducción del crecimiento del 35% en las plantas silvestres con respecto al crecimiento radicular en condiciones control, que era estadísticamente similar a la reducción evaluada en el mutante *noxy15* (Figura 27). Por su parte, los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* fueron parcialmente insensibles al tratamiento con ACC, y presentaba una reducción de la longitud radicular significativamente inferior a la correspondiente a las plantas silvestres (Figura 27).



**Figura 27. Evaluación de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy5*, *noxy15*, *noxy23* y *noxy54* a la presencia de ACC.**

(A) Fenotipo de plántulas crecidas durante 3 días en placas MS verticales y transferidas para su crecimiento durante 4 días adicionales a medio MS control o suplementado con ACC (1 μM). Se indica con triángulos negros el tamaño de la raíz en el momento del paso de medio.

(B) Evaluación del crecimiento de la raíz en presencia de ACC en relación al crecimiento de plántulas crecidas en medio control MS. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* con respecto a las plántulas silvestres (t de Student; \*, p<0,05).



# *Discusión*

---

## 5. DISCUSIÓN

Los estudios realizados con objeto de examinar la acción de las oxilipinas durante la activación de la respuesta de inmunidad vegetal frente a la infección de microorganismos patógenos, permitieron concluir que la acción defensiva de estas señales lipídicas está asociada a la generación de un estallido oxidativo y a la modificación de la pared celular (Vellosillo et al., 2007). Además, la caracterización de mutantes deficientes en la señalización de oxilipinas (*noxy*, del inglés *non-responding to oxylipins*) puso de manifiesto que la insensibilidad a estas moléculas estaba con frecuencia acompañada de una insensibilidad adicional al herbicida isoxaben, un inhibidor de la celulosa sintasa cuya aplicación provoca la detención del crecimiento de la planta y la activación de la ruta de señalización del daño en la pared, que conduce a su vez a la reparación de esta estructura celular (Vellosillo et al., 2013; Marcos et al., 2014). En el presente trabajo hemos continuado nuestros estudios dirigidos a caracterizar la actividad de las oxilipinas y los mecanismos de señalización a través de los cuales ejercen su acción defensiva. Para ello, procedimos a la identificación de tres mutaciones *noxy* designadas *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, ya caracterizar la respuesta de dichos mutantes frente a la infección de patógenos hemibiotrofos y necrotrofos.

### **5.1. Las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* alteran la funcionalidad de las mitocondrias y la respuesta de las plantas frente al daño mitocondrial**

Al igual que en otros mutantes *noxy* identificados anteriormente (Vellosillo et al., 2013), la identificación de las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* permite establecer una clara relación entre la señalización de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT con las mitocondrias. Igualmente, la insensibilidad de estos mutantes al tratamiento con ixosaben permite apoyar la participación de las mitocondrias en la señalización del daño celular (Marcos et al., 2014). El análisis de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* puso de manifiesto que el fenotipo de insensibilidad a oxilipinas e isoxaben está causado las mutaciones que se detallan a continuación:

La proteína NOXY5 forma parte de la familia de proteínas con repeticiones de Pentatricopéptidos (PPR) localizadas en mitocondrias y cloroplastos, cuya función se asocia a procesos de edición de ARNs específicos de estos orgánulos. Las proteínas PPR se clasifican en varios grupos atendiendo al tipo de motivos que presentan, que pueden ser pentatricopéptidos canónicos (P) de 35 aminoácidos, cortos (S), largos (L), y a la presencia de motivos adicionales no PPR. La proteína NOXY5 presenta un dominio deaminasa DYW en su extremo C terminal, que permite relacionarla con eventos de edición de Citosina a Uracilo en el ARNm mitocondrial (Liu et al., 2016).

La edición de ARN es un proceso de maduración que incluye la inserción, delección o modificación de nucleótidos que afectan al funcionamiento de las proteínas correspondientes (Smith, 1997). De esta forma, las proteínas PPR repercuten en un gran número de procesos fisiológicos y de desarrollo, incluyendo la fertilidad masculina citoplasmática, la fotosíntesis, la respiración y la embriogénesis (Zsigmond et al., 2008; Liu et al., 2010; Laluk et al., 2011).

La proteína NOXY23 es una proteína ribosomal de localización mitocondrial (Yanshina et al., 2006) que estaría implicada en la síntesis de proteínas que tiene lugar en estos orgánulos. La mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo, y se sintetizan en el citosol desde donde son transportadas al interior de la mitocondria. Sin embargo, un pequeño porcentaje de estas proteínas son codificadas y traducidas en el interior de estos orgánulos que debe por tanto, contener la maquinaria celular necesaria para realizar la síntesis de proteínas, un proceso poco caracterizado hasta el momento.

De forma generalizada, cabe decir que los residuos cargados son de gran importancia en las proteínas ribosomales debido a que la biogénesis de estas estructuras proteicas requiere la interacción de estas con el ARN ribosomal con carga negativa. Así, la mayoría de las proteínas ribosomales son muy básicas, con puntos isoeléctricos altos (Weijers et al., 2001). La mutación *noxy23* añade un residuo con carga positiva en lugar de uno con carga negativa que podría afectar a la interacción proteína-ARN y, por tanto, a la funcionalidad de la proteína mutante.

La proteína NOXY54 posee localización mitocondrial y tiene actividad ribonucleasa específica de poli-A participando en el metabolismo de los ARNm mitocondriales. La mutación *noxy54* produce un cambio de nucleótidos de guanina a adenina que origina un codón de parada y, por tanto, una proteína truncada. La mutación *noxy54* no afecta directamente al dominio catalítico de esta enzima (Virtanen et al., 2013), sino que trunca el extremo C-terminal de la proteína, sin función establecida, que podría causar una pérdida parcial de función.

El hecho de que los tres mutantes *noxy* identificados están involucrados, directa o indirectamente, en la modificación y/o traducción de mensajeros mitocondriales, permite establecer una estrecha relación entre la señalización de las oxilipinas y las funciones celulares específicas de estos orgánulos. La capacidad codificadora del ADNmt en distintos organismos oscila entre cerca de 100 genes en protistas flagelados, hasta sólo cinco genes en *Plasmodium*, con un promedio 40-50 genes en eucariotas (Burgeret al., 2003). En el caso de *Arabidopsis thaliana*, el genoma mitocondrial codifica unos 57 genes (Unsel et al., 1997). A pesar de que la diferencia en el número de genes mitocondriales presentes en

distintos organismos puede variar hasta 20 veces, la funcionalidad de estos genes se limita, como máximo, a cinco procesos básicos: invariablemente a la respiración y/o fosforilación oxidativa, a la traducción, y ocasionalmente a la transcripción, la maduración de ARN y la entrada de proteínas en la mitocondria. (Burgeret al.,2003).

Dentro de los procesos descritos, la naturaleza de las mutaciones *noxy* identificadas sugiere la participación, directa o indirecta, de las proteínas NOXY en la regulación de la síntesis de proteínas, cuyo defecto en estos mutantes afectaría a la funcionalidad de las mitocondrias tanto en condiciones basales, como en respuesta a estrés. La observación de los mutantes examinados revela la formación de acúmulos mitocondriales (Figura 11), similares a los descritos anteriormente en los mutantes *noxy15*, *noxy23* y *noxy38* (Vellosillo et al., 2013). Estas alteraciones morfológicas contrastan con la distribución más homogénea de las mitocondrias en las plantas silvestres y sugieren la existencia de perturbaciones en la función mitocondrial de los mutantes *noxy*. Las semejanzas de las alteraciones morfológicas observadas apuntan a que las mutaciones caracterizadas estarían afectando al mismo tipo de procesos que, dada la naturaleza de las proteínas NOXY, estarían relacionados con la edición de mensajeros y su traducción. En este contexto, y dado que el gen *NOXY15* codifica la proteína DRP3A (*Dynamain-Related Protein 3A*) que participa en los procesos de fisión de mitocondrias durante la división celular (Vellosillo et al., 2013), es posible que el defecto funcional asociado a las mutaciones *noxy* dificulte el movimiento de estos orgánulos en la célula, proceso que sería de mayor intensidad en el mutante *noxy15*, con formación de numerosos acúmulos mitocondriales, y algo más suave en los mutantes *noxy5*, y *noxy23*, en los que el número de acúmulos mitocondriales es claramente inferior que en las plantas *noxy15*.

Cabe mencionar que en el mutante *noxy54* la fluorescencia de la proteína YFP disminuye de forma significativa en gran parte de las células de la raíz. El hecho que la introducción de la construcción *35S:mtYFP* en los mutantes *noxy* se haya llevado a cabo mediante cruzamiento con plantas transgénicas Col-0, permite concluir que las diferencias en la intensidad de la fluorescencia observada en el mutante *noxy54* no serían consecuencia del proceso de transgénesis, sino que dicha reducción debería estar ligada a la mutación *noxy54* que estaría provocando la inestabilidad del ARNm o de la proteína YFP o la pérdida de su fluorescencia. El análisis mediante *northern* y *western blot* de los niveles de transcritos y de proteína YFP nos permitirá distinguir entre estas posibilidades y caracterizar en más profundidad la naturaleza de la mutación *noxy54*.

El análisis de la respuesta de las plantas al daño mitocondrial provocado por la Antimicina A, ha puesto de manifiesto diferencias importantes en el comportamiento de los mutantes *noxy* en comparación con el de las plantas silvestres (Figura 12). La Antimicina A provoca la inhibición del transporte electrónico mitocondrial y limita la disponibilidad energética de las células, por lo que cabía esperar que las alteraciones mitocondriales observadas en los mutantes *noxy* aumentaran el nivel de susceptibilidad al daño mitocondrial en comparación con el de las plantas silvestres. Sin embargo, en contra de lo esperado, los resultados de estos análisis mostraron que a las concentraciones usadas (2,5  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$ ) el crecimiento de raíz de las plantas silvestres se detenía casi por completo, mientras que el crecimiento de los mutantes *noxy* solo experimentaba una ligera reducción con respecto al observado en medio MS (Figura12).

La resistencia de los mutantes *noxy* al tratamiento con Antimicina A indicaría que la alteración de la función mitocondrial en estos mutantes podría activar una respuesta adaptativa, acompañada por ejemplo de la activación transcripcional de genes específicos dirigidos a facilitar la supervivencia de las plantas en condiciones de daño mitocondrial. Alternativamente, el hecho de que los mutantes *noxy* no detengan el crecimiento radicular podría indicar que estas mutaciones interfieren con la percepción del daño mitocondrial o la respuesta celular a dicho daño, impidiendo la generación de señales o el proceso de señalización que permite facilitar la adaptación. En este escenario, la reducción del crecimiento radicular en las plantas silvestres podría representar una respuesta adaptativa que permite a las plantas preservar los recursos energéticos disponibles.

Para examinar estas dos posibilidades procedimos a analizar la expresión del gen marcador de estrés mitocondrial *AOX1a* (*ALTERNATIVE OXIDASE 1a*) que se induce a través de la ruta de señalización retrógrada activada en respuesta al daño mitocondrial (Møller, 2001). El tratamiento con Antimicina A provoca la inhibición del transporte electrónico mitocondrial dando lugar a un exceso de ubiquinona reducida, siendo la oxidasa alternativa la responsable de oxidar el exceso de ubiquinona sin pasar por el complejo III, restituyendo el transporte electrónico hasta ese punto de la cadena y recuperando parcialmente la producción de ATP correspondiente a los complejos I y II (König, 2014).

En estos análisis pudimos comprobar que el tratamiento con Antimicina A activa la expresión del gen *AOX1a* en plantas silvestres y en los mutantes *noxy*, siendo el nivel de transcritos mayor en estos últimos (Figura 13). Estos resultados ponen de manifiesto que las mutaciones *noxy* no interfieren con la percepción del daño mitocondrial y la activación de la señalización retrógrada, al menos en la parte de la respuesta que conduce a la activación del marcador *AOX1a*. Sin embargo, estos datos no nos permiten concluir si el

nivel de activación del gen *AOX1a*, superior al determinado en las plantas silvestres, junto con el de otros marcadores de esta respuesta, podría aumentar la resistencia al daño mitocondrial causado por la Antimicina A. Las diferencias fenotípicas en la respuesta a Antimicina A de las plantas silvestres y los mutantes *noxy* requieren, por tanto, un análisis más detallado que se continúa desarrollando en el laboratorio.

## **5.2. Efecto de las mutaciones *noxy* en la activación de la respuesta de defensa vegetal**

### **5.2.1 Respuesta a la bacteria *Pseudomonas syringae pv tomato***

Las oxilipinas derivadas de las enzimas 9-LOX se acumulan en respuesta a la infección con patógenos, y juegan un papel relevante en la defensa local y sistémica que se activa en las plantas frente a la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae pv tomato Pst DC3000* (Vicente et al., 2012). No obstante, la información disponible acerca de las rutas de señalización que determinan la acción defensiva de oxilipinas es por el momento limitada. Por otro lado, hay que mencionar que trabajos recientes publicados por distintos grupos de investigación han comenzado a establecer la participación de las mitocondrias en la defensa vegetal aunque los datos al respecto son también escasos (Gleason et al., 2011; Vanstraelen & Benková, 2012; Liao et al., 2015; Whelan & Murcha, 2015; Hsieh et al., 2015; Berkowitz et al., 2016). Por todo ello, el estudio de los genes *NOXY* permite profundizar en el estudio de los procesos de señalización de las oxilipinas y en la participación de las mitocondrias en la respuesta de defensa vegetal.

En respuesta a la infección por *Pseudomonas*, los mutantes *noxy5*, *noxy23*, así como el mutante *noxy15* previamente caracterizado (Vellosillo et al., 2013) mostraron un nivel de susceptibilidad a este patógeno mayor que el de las plantas silvestres, algo que no ocurre en el caso del mutante *noxy54*, que mostraba un ligero aumento del crecimiento bacteriano pero cuyo valor no era estadísticamente significativo. De acuerdo a estos resultados, la inducción del gen marcador *PR1* es menor en los mutantes examinados que en las plantas silvestres, reducción que se hace más patente a las 48h de la infección (Figura 16). Cabe mencionar que la expresión del gen *PR1* en el mutante *noxy54* a las 24 y 48 h post-infección era también inferior que en las plantas silvestres a pesar de que este mutante no muestra un nivel de susceptibilidad superior al de las plantas silvestres. No obstante, el hecho de que la activación transcripcional del gen *PR1* en este mutante es anterior a la de las plantas silvestres (~200 veces más alta que en las plantas silvestres a las 8 horas post-inoculación) podría contribuir a detener el crecimiento bacteriano en

dicho mutante compensando así la reducción posterior en los niveles de transcritos *PR1* con respecto a los detectados en las plantas control (Figura 16).

La relación del SA con la función mitocondrial ha sido explorada en trabajos anteriores (Berkowitz et al., 2016). Se ha descrito que el SA puede provocar el desacoplamiento del transporte electrónico mitocondrial, aumentando la producción de ROS e interfiriendo con la despolimerización del regulador transcripcional NPR1 que, a su vez, afectaría al nivel expresión de los genes de respuesta a esta hormona de defensa (Zhang et al., 2014). El defecto en la regulación de la proteína NPR1 tendría un efecto generalizado en la activación de los genes de respuesta a SA, y por tanto en la defensa de las plantas frente a la infección de la bacteria examinada. En base a esta idea, y dado que la activación del gen *PR1* requiere la participación del activador NPR1, la disminución de la expresión de este marcador en los mutantes *noxy*, podría indicar que las mutaciones *noxy* estarían interfiriendo con el proceso de despolimerización del regulador NPR1.

Además del posible efecto de la producción de ROS mitocondrial sobre el regulador NPR1, el SA afecta a la maquinaria mitocondrial provocando la activación de genes nucleares a través de una ruta independiente de NPR1, entre los que se encuentra el gen *S3H* examinado en este trabajo (Gleason et al., 2011). En relación a esta acción del SA, el hecho de que las diferencias de expresión entre las plantas control y los mutantes *noxy* sean más acusadas para el marcador *S3H* que para el gen *PR1*, sugiere que las mutaciones *noxy* caracterizadas estarían afectando mayoritariamente a la vía de señalización que se establece por la acción del SA en las mitocondrias de forma independiente de NPR1.

Dado que la proteína *S3H* provoca la inactivación del SA, la disminución de su expresión, en plantas de pérdida de función, provoca un aumento de los niveles de esta hormona que conlleva, generalmente, un aumento de la resistencia de la planta frente a la infección de patógenos biotrofos (Gleason et al., 2011; Zhang et al., 2013). No obstante, el hecho de que la reducción de la expresión *S3H* en los mutantes *noxy* esté asociada a un aumento de la susceptibilidad frente a esta bacteria, sugiere que, al igual que ocurre con el gen *S3H*, la expresión de otros genes inducibles por la acción del SA en las mitocondrias, estaría también disminuida en los mutantes *noxy*, disminución que estaría provocada por la alteración de la función mitocondrial en estos mutantes.

Por otro lado, cabe mencionar que la disminución de la expresión de los marcadores *PR1* y *S3H* podría reflejar el defecto de los mutantes *noxy* en la producción de SA y/o en la respuesta de las plantas a esta hormona. La respuesta fenotípica a la presencia de SA en el medio pone de manifiesto la insensibilidad parcial de los mutantes *noxy5* y *noxy23* a esta

hormona, y por tanto, que de acuerdo al aumento de la susceptibilidad, estas plantas están afectadas en la señalización del SA (Figura 25).

De acuerdo con la participación de la mitocondria en la activación de la defensa vegetal, en nuestros análisis hemos podido observar una fuerte inducción del gen *AOX1a* (más de 100 veces a 24 y 48h de infección) en la respuesta de las plantas silvestres a la infección de la bacteria *Pst* DC3000 (Figura 18). Estos resultados apoyan la participación de las mitocondrias y de la enzima AOX en la defensa vegetal frente a patógenos biotrofos. No obstante, en el caso de los mutantes analizados la susceptibilidad encontrada no parece estar causada por un defecto en la activación de la oxidasa alternativa (Zhang et al., 2013). El hecho de que la expresión del gen *AOX1a* en el mutante *sid2*, deficiente en la síntesis de SA, no revele diferencias importantes con respecto a las plantas silvestres indica que la señalización retrógrada que conduce a la activación de los genes *AOX* no estaría afectada de forma significativa por la señalización de SA en respuesta a *Pseudomonas*, y por lo tanto que la susceptibilidad de *sid2* no está relacionada con este proceso. Algo similar ocurriría en los mutantes *noxy5* y *noxy23*, en los que la activación del gen *AOX1a* no varía con respecto a las plantas control a pesar de mostrar un aumento de susceptibilidad. Finalmente cabe destacar que los mutantes *noxy15* y *noxy54* muestran un aumento de la expresión del marcador *AOX1a* con respecto al nivel de las plantas control, algo que observamos también en la respuesta a Antimicina y a la infección con patógenos necrotrofos y que discutiremos en la siguiente sección.

### 5.2.2 Respuesta al hongo *Alternaria brassicicola*

Los resultados derivados de la infección con la bacteria *Pst* DC3000 ponen de manifiesto la participación de los genes *NOXY5* y *NOXY23* en la defensa de la planta frente a la infección de patógenos biotrofos, lo que unido a nuestros resultados previos, derivados de la caracterización de los genes *NOXY2*, *NOXY15* y *NOXY38* (Vellosillo et al., 2013) apoya la importancia de la señalización de las oxilipinas en este tipo de defensa y que dicha acción se establece, al menos en parte, a través de las mitocondrias. En comparación con la respuesta a patógenos biotrofos, la participación de las mitocondrias en la respuesta de defensa frente a la infección de patógenos necrotrofos ha sido poco explorada, por lo que los mutantes *noxy* permiten evaluar el papel de estos orgánulos en la defensa frente a este tipo de patógenos. Por ello, y con objeto de ampliar el estudio de los genes *NOXY* como componentes de la inmunidad vegetal, procedimos a examinar la respuesta de los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, identificados en este trabajo, frente a la infección de patógenos de tipo necrotrofo, y en particular del hongo *Alternaria brassicicola*. En estos estudios incluimos además, los mutantes *noxy2*, *noxy15* y *noxy38*, previamente



caracterizados como hipersusceptibles a *Pst* DC3000, pero cuya respuesta ante patógenos necrotrofos no había sido evaluada.

En estos análisis pudimos comprobar que los defectos asociados a las mutaciones caracterizadas aumentan la susceptibilidad de las plantas frente a patógenos necrotrofos y que dichos mutantes muestran síntomas de daño tisular más acusados que los producidos en las plantas silvestres. Cabe señalar sin embargo que, dentro de las plantas examinadas, los mutantes *noxy15* y *noxy54* muestran niveles más altos de susceptibilidad que se aprecian tanto en los síntomas que aparecen en los tejidos infectados, como en el recuento de las esporas recogidas en dichos tejidos. En este sentido, cabe destacar que el número de esporas producidas en el mutante *noxy15* fue superior al determinado en el mutante *ein2-5*, incluido en estos estudios por su elevada susceptibilidad a patógenos necrotrofos.

La defensa frente a patógenos necrotrofos se establece fundamentalmente a través de las rutas de señalización reguladas por la acción de las hormonas de defensa ET y JA (Catinot et al., 2015), por lo que la susceptibilidad de estos mutantes a la infección con *Alternaria* indicaría que los mutantes *noxy* podrían ser defectivos en la activación de estas rutas de señalización. Igualmente, la producción de la fitoalexina camalexina juega un papel relevante en la respuesta de defensa frente a la infección de *Alternaria*. En nuestro estudio y con objeto de determinar si la susceptibilidad de los mutantes *noxy* estaba asociada a la falta de activación de estas defensas procedimos a examinar la expresión de los marcadores *PDF1.2*, *PR4* y *PAD3*, así como el fenotipo de las plántulas en respuesta a la presencia de JA o del precursor del ET, ACC, en el medio de crecimiento de las plantas.

En estos análisis hemos podido comprobar que la infección de los mutantes *noxy* examinados produjo niveles de transcritos *PDF1.2* menores que los determinados en las plantas silvestres, reducción que fue más acusada en el mutante *noxy15* en el que la expresión del marcador *PDF1.2* fue incluso inferior a la del mutante hipersusceptible *ein2-5*. De la misma manera, la inducción del marcador *PR4* fue claramente inferior en el mutante *noxy15* que en las plantas silvestres y similar a la detectada en el mutante *ein2-5*. Igualmente, el mutante *noxy15*, muestra un nivel de inducción del marcador *PAD3* inferior al de las plantas silvestres. Todo ello, indica que la elevada susceptibilidad de estas plantas a la infección de *Alternaria* es consecuencia de un defecto en la activación de la expresión de los genes de defensa que controlan esta respuesta, y que dicho defecto está asociado con la alteración de la función mitocondrial detectada en este mutante. Es importante mencionar que el mutante *noxy15* responde al igual que las plantas silvestres a la presencia de JA o ACC en el medio de crecimiento, lo que indica que dicho mutante no

muestra un defecto en la activación de las rutas de señalización reguladas por estas hormonas, sino que por el contrario, la mutación *noxy15* podría afectar a procesos tempranos tales como el reconocimiento del patógeno y/o la producción de las hormonas ET y JA.

Al igual que en el mutante *noxy15*, el mutante *noxy54* presenta un elevado nivel de susceptibilidad frente a la infección de *Alternaria*, sin embargo, en este mutante, y a diferencia de lo que ocurre en las plantas *noxy15*, la expresión de los genes marcadores *PDF1.2*, *PR4*, y *PAD3* no difieren de las plantas silvestres de forma tan acusada. Cabe resaltar que existe, sin embargo, una característica común entre los mutantes *noxy15* y *noxy54* en relación a la expresión del marcador del daño mitocondrial *AOX1a*, que en ambos casos es superior al detectado en el resto de las plantas examinadas. Esta característica podría ser relevante en la respuesta de susceptibilidad frente a este tipo de patógenos y pone de manifiesto la relación entre la alteración de la función mitocondrial y la susceptibilidad frente a patógenos necrotrofos. En este contexto, es importante mencionar que los mutantes *noxy15* y *noxy54* presentan importantes alteraciones mitocondriales que podrían ser más fuertes que las caracterizadas en el resto de los mutantes *noxy* examinados.

De acuerdo a esta idea, la comparación de la respuesta de los mutantes *noxy5* y *noxy23* no muestra diferencias muy marcadas en la activación transcripcional de estas plantas, a pesar de que estos mutantes muestran síntomas de infección más acusados que las plantas silvestres, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que la lesión de la función mitocondrial en los mutantes *noxy5* y *noxy23*, sería de menor intensidad que la que tiene lugar en las plantas *noxy15* y *noxy54*. Independientemente de la intensidad, los resultados de nuestro trabajo permiten establecer una clara relación entre la alteración de la funcionalidad mitocondrial y la susceptibilidad frente a la infección de *Alternaria* y, por tanto, la participación de los genes *NOXY* en la defensa frente a patógenos necrotrofos, en donde estarían controlando procesos dependientes de ET/JA, así como otras respuestas independientes de estas hormonas, indicando, además, que la función de las proteínas *NOXY* estaría relacionada con procesos tempranos de reconocimiento del patógeno o de señalización.

El hecho de que en las plantas silvestres el nivel de inducción del gen *AOX1a* en respuesta a *Alternaria* sea muy inferior al observado durante la infección de *Pseudomonas*, sugiere que la ruta de señalización retrógrada que conduce a la activación de la enzima oxidasa alternativa no juega un papel relevante en la defensa de las plantas frente al

ataque de patógenos necrotrofos. Sin embargo, es importante resaltar que la inducción del gen *AOX1a* en respuesta a *Alternaria* es superior en los mutantes *noxy* que en las plantas control, y que dicho aumento está asociado a un aumento de la susceptibilidad a la infección. Por ello, y aunque la inducción de proteína AOX pudiera no ejercer un papel relevante en la defensa vegetal frente a este patógeno, el aumento de su expresión en los mutantes *noxy* podría ser consecuencia de la alteración de la función mitocondrial que estaría, a su vez, favoreciendo la infección en estos mutantes. De acuerdo a esta idea, el defecto en la función mitocondrial de los mutantes *noxy15* y *noxy54*, en los que la expresión del gen *AOX* alcanza niveles más altos en todos los tratamientos examinados, sería mayor que en el resto de las plantas examinadas, y conllevaría el aumento de susceptibilidad de estas plantas a la infección de *Alternaria*, en las que los niveles de esporulación son muy superiores a los producidos en el resto de los mutantes *noxy* caracterizados.

Como se describió en la introducción de este trabajo, las estrategias defensivas de las plantas están determinadas, en gran medida, por el estilo de vida de los patógenos, de manera que las rutas canónicas reguladas por la acción de las hormonas SA y ET/JA son generalmente antagónicas entre sí. De esta manera, es frecuente que las mutaciones que aumentan la susceptibilidad frente a un tipo de patógenos, causan a su vez un aumento en la resistencia de las plantas frente a otros patógenos (Berkowitz et al., 2016) En este sentido es especialmente relevante que los mutantes *noxy* analizados en este trabajo muestran un aumento de susceptibilidad frente a patógenos biotrofos y necrotrofos, cuya defensa se establece, respectivamente, a través de las rutas de señalización reguladas por la acción de las hormonas SA o ET/JA. El caso más singular a este respecto es el del mutante *noxy15*, que presenta los niveles más bajos de inducción de todos los marcadores de defensa analizados y es el más susceptible a la infección con los dos tipos de patógenos, *Pst* DC3000 y *A. brassicicola*, examinados en este trabajo. El gen *NOXY15* codifica la proteína DRP3A (*Dynamine-Related Protein 3A*) que participa en los procesos de fisión de mitocondrias durante la división celular (Vellosillo et al., 2013), de manera, que la pérdida de la función *NOXY15* provoca la formación de numerosos acúmulos mitocondriales que, probablemente van a interferir con el movimiento de estos orgánulos en la célula.

Estudios recientes dirigidos a examinar la participación de las mitocondrias en la respuesta inmune de las plantas, han puesto de manifiesto el movimiento de estos orgánulos hacia los puntos de infección y que este proceso contribuiría de forma activa en la inducción de una respuesta de defensa (Fuchs et al., 2015). De hecho, las mitocondrias se acumulan alrededor de los haustorios que se producen en las células infectadas con el

hongo biotrofo *Blumeria graminis* (Fuchs et al., 2015). Igualmente, se han descrito alteraciones que conllevan la formación de agregados mitocondriales y cambios en la dinámica de estos orgánulos tanto en respuesta a la presencia de MeJA (Zhang & Xing, 2008) como de 9-HOT (Vellosillo et al., 2013). En este contexto, cabe pensar que los agregados mitocondriales detectados en los mutantes *noxy* podrían afectar a la dinámica de estos orgánulos cuyo movimiento y desplazamiento en la célula parece ser necesario para la activación de la respuesta de defensa, y cuya inmovilización o limitación de movimiento provocaría un fenotipo de susceptibilidad.

Como resumen de nuestro trabajo, los resultados obtenidos ponen de relieve que la señalización mitocondrial constituye un proceso relevante para la activación de la defensa de la planta, y que la comprensión de este proceso ayudará a generar plantas resistentes frente a un amplio espectro de patógenos tanto en especies modelo, como en cultivos de importancia económica.

# *Conclusiones*

---

## 6. CONCLUSIONES:

- 1.- Los mutantes *noxy5*, *noxy23* y *noxy54* son insensibles a la acción de las oxilipinas sintetizadas por las enzimas 9-LOXs, y presentan un defecto en la activación de respuestas de defensa relacionadas con el fortalecimiento de la pared celular.
- 2.- Las mutaciones *noxy* identificadas afectan a la función de proteínas de localización mitocondrial, que participan, directa o indirectamente, en procesos de traducción de mensajeros en estos orgánulos.
- 3.- Las mutaciones *noxy5*, *noxy23* y *noxy54*, producen alteraciones en la morfología y distribución de las mitocondrias.
- 4.- Las mutaciones *noxy5*, *noxy23*, *noxy54* y *noxy15* provocan un aumento de la resistencia de la planta al daño mitocondrial.
- 5.- Las mutaciones *noxy5* y *noxy23* aumentan la susceptibilidad de las plantas frente a la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae*, mientras que la respuesta del mutante *noxy54* a esta bacteria no difiere de forma significativa de la correspondiente a las plantas control.
- 6.- La respuesta de la planta frente a la infección de patógenos biotrofos conlleva la activación de la señalización retrógrada mitocondrial y la participación de estos orgánulos en la defensa.
7. El análisis de la expresión de genes de respuesta a SA indica que las mutaciones *noxy* caracterizadas afectarían mayoritariamente a la vía de señalización que se establece por la acción del SA en las mitocondrias de forma independiente del regulador NPR1.
- 8.- Todas las mutaciones *noxy* examinadas, *noxy5*, *noxy23*, *noxy54*, *noxy2-2*, *noxy15* y *noxy38* aumentan la susceptibilidad frente a la infección del hongo *Alternaria brassicicola*.
- 9.- La susceptibilidad de los mutantes *noxy* a la infección de *Alternaria* está relacionada con el nivel de alteración de la función mitocondrial, que sería mayor en los mutantes *noxy15* y *noxy54*.

# *Bibliografía*

---

## BIBLIOGRAFIA

- Ahuja I, Kissen R & Bones AM**, (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. , 17(2).
- Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E & Whelan J**, (2009) Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 2(6), pp.1310–1324.
- Bannenberg G, Martínez M, Rodríguez MJ, López MA, Ponce de León I, Hamberg M & Castresana C**, (2009) Functional analysis of alpha-DOX2, an active alpha-dioxygenase critical for normal development in tomato plants. *Plant physiology*, 151(3), pp.1421–1432.
- Bell CJ & Ecker JR**, (1993) Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of *Arabidopsis*. *Genomics*.
- Berkowitz O, De Clercq I, Van Breusegem F & Whelan J**, (2016) Interaction between hormonal and mitochondrial signalling during growth, development and in plant defence responses. *Plant, Cell and Environment*, 39(5), pp.1127–1139.
- Blée E, Boachon B, Burcklen M, Le Guédard M, Hanano A, Heintz D, Ehrling J, Herrfurth C, Feussner I & Bessoule J-J**, (2014) The Reductase Activity of the *Arabidopsis* Caleosin RESPONSIVE TO DESSICATION2 Mediates Gibberellin-Dependent Flowering Time, Abscisic Acid Sensitivity, and Tolerance to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 166(1), pp.109–124.
- Blée E, Flenet M, Boachon B & Fauconnier ML**, (2012) A non-canonical caleosin from *Arabidopsis* efficiently epoxidizes physiological unsaturated fatty acids with complete stereoselectivity. *FEBS Journal*, 279(20), pp.3981–3995.
- Boller T & Felix G**, (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, pp.379–406.
- Boller T & He SY**, (2009) Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, 324(5928), pp.742–744.
- Bömke C & Tudzynski B**, (2009) Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*, 70(15–



16), pp.1876–1893.

**Bonardi V**, (2012) How complex are intracellular immune receptor signaling complexes ? , 3(October), pp.1–9.

**Browse J**, (2009) Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. Annual Review of Plant Biology, 60(1), pp.183–205.

**Burger G, Gray MW & Lang BF**, (2003) Mitochondrial genomes: Anything goes. Trends in Genetics, 19(12), pp.709–716.

**Catinot J, Huang JB, Huang PY, Tseng MY, Chen YL, Gu SY, Lo WS, Wang LC, Chen YR & Zimmerli L**, (2015) ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96 positively regulates Arabidopsis resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate - and ethylene-responsive defence genes. Plant Cell and Environment, 38(12), pp.2721–2734.

**Chang R, Jang CJH, Branco-Price C, Nghiem P & Bailey-Serres J**, (2012) Transient MPK6 activation in response to oxygen deprivation and reoxygenation is mediated by mitochondria and aids seedling survival in Arabidopsis. Plant Molecular Biology, 78(1–2), pp.109–122.

**Chen H, Xue L, Chintamanani S, Germain H, Lin H, Cui H, Cai R, Zuo J, Tang X, Li X, Guo H & Zhou J-M**, (2009) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in Arabidopsis. The Plant Cell, 21(8), pp.2527–2540.

**Chini A, Boter M & Solano R**, (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. FEBS Journal, 276(17), pp.4682–4692.

**Christensen SA, Huffaker A, Kaplan F, Sims J, Ziemann S, Doehlemann G, Ji L, Schmitz RJ, Kolomiets M V., Alborn HT, Mori N, Jander G, Ni X, Sartor RC, Byers S, Abdo Z & Schmelz EA**, (2015) Maize death acids, 9-lipoxygenase-derived cyclopentane(a)nonenes, display activity as cytotoxic phytoalexins and transcriptional mediators. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(36), pp.11407–11412.

**Coll NS, Eppele P & Dangl JL**, (2011) Programmed cell death in the plant immune system. Cell Death and Differentiation, 18(8), pp.1247–1256.

**Colombatti F, Gonzalez DH & Welchen E**, (2014) Plant mitochondria under pathogen attack: A

sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion*, 19(PB), pp.238–244.

- Dellaporta SL, Wood J & Hicks JB**, (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), pp.19–21.
- Denness L, McKenna JF, Segonzac C, Wormit A, Madhou P, Bennett M, Mansfield J, Zipfel C & Hamann T**, (2011) Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(3), pp.1364–1374.
- Deusch O, Landan G, Roettger M, Gruenheit N, Kowallik K V., Allen JF, Martin W & Dagan T**, (2008) Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Molecular Biology and Evolution*, 25(4), pp.748–761.
- Duque P, Barreiro MG, Arrabaca JD & Arrabac D**, (1999) Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. I. Sucrose metabolism and glycolysis. *Physiologia Plantarum*, 107(1), pp.14–23.
- Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Rotte C, Sebastiani F, Gelius-Dietrich G, Henze K, Kretschmann E, Richly E, Leister D, Bryant D, Steel MA, Lockhart PJ, Penny D & Martin W**, (2004) A genome phylogeny for mitochondria among  $\alpha$ -proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(9), pp.1643–1660.
- Farmer EE & Davoine C**, (2007) Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), pp.380–386.
- Farmer EE & Mueller MJ**, (2013) ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), pp.429–450.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C & Solano R**, (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology*, 5(5), pp.344–350.
- Fuchs R, Kopischke M, Klapprodt C, Hause G, Meyer AJ, Schwarzländer M, Fricker MD & Lipka V**, (2015) Immobilized subpopulations of leaf epidermal mitochondria mediate PEN2-dependent pathogen entry control in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 28(January), p.TPC2015-00887-RA.
- 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.

**Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernández-Barbero G, Chini A, Rathjen JP & Solano R**, (2014) The Bacterial Effector HopX1 Targets JAZ Transcriptional Repressors to Activate Jasmonate Signaling and Promote Infection in Arabidopsis. *PLoS Biology*, 12(2).

**Glazebrook J**, (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp.205–227.

**Gleason C, Huang S, Thatcher LF, Foley RC, Anderson CR, Carroll AJ, Millar AH & Singh KB**, (2011) Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), pp.10768–73.

**Gong T, Shu D, Yang J, Ding ZT & Tan H**, (2014) Sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster of abscisic acid-producing botrytis cinerea. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), pp.17396–17410.

**Gray GR, Maxwell DP, Villarimo AR & McIntosh L**, (2004) Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species. *Plant Cell Reports*, 23(7), pp.497–503.

**Gray WM**, (2002) Plant defence: A new weapon in the arsenal. *Current Biology*, 12(10), pp.352–354.

**Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W & Uchida K**, (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44(10), pp.1098–1124.

**Hamann T**, (2012) Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front Plant Sci*, 3(April), p.77.

**Hamann T, Bennett M, Mansfield J & Somerville C**, (2009) Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *Plant Journal*, 57(6), pp.1015–1026.

**Hamberg M, Sanz A, Rodriguez MJ, Calvo AP & Castresana C**, (2003) Activation of the fatty acid ??-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves: Formation of oxylipins protecting against cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), pp.51796–51805.

- Hardham AR, Jones DA & Takemoto D**, (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), pp.342–348.
- Higaki T, Kurusu T, Hasezawa S & Kuchitsu K**, (2011) Dynamic intracellular reorganization of cytoskeletons and the vacuole in defense responses and hypersensitive cell death in plants. *Journal of Plant Research*, 124(3), pp.315–324.
- Ho LHM, Giraud E, Uggalla V, Lister R, Clifton R, Glen A, Thirkettle-Watts D, Van Aken O & Whelan J**, (2008) Identification of Regulatory Pathways Controlling Gene Expression of Stress-Responsive Mitochondrial Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147(4), pp.1858–1873.
- Hsieh W-Y, Liao J-C & Hsieh M-H**, (2015) Dysfunctional mitochondria regulate the size of root apical meristem and leaf development in Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*, 10(10), p.e1071002.
- Izquierdo Y**, (2017) La proteína NOXY7 de Arabidopsis thaliana regula la activación de la inmunidad y la adaptación a estrés a través de una ruta no canónica de control de síntesis de proteínas.
- Jones J & Dangl J**, (2006) The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323–329.
- Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, Thomas CE & Dean RA**, (2004) The fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant Journal*, 39(3), pp.283–297.
- Kachroo A & Kachroo P**, (2009) Fatty Acid–Derived Signals in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), pp.153–176.
- Kapulnik Y, Yalpani N & Raskin I**, (1992) Salicylic Acid Induces Cyanide-Resistant Respiration in Tobacco Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiology*, 100, pp.1921–1926.
- Kazan K & Lyons R**, (2014) Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 26(6), pp.2285–2309.
- Kleine T, Voigt C & Leister D**, (2009) Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? *Trends in Genetics*, 25(4), pp.185–192.
- Koch E & Slusarenko A**, (1990) Arabidopsis 1 s Susceptible to Infection by a Downy Mildew Fungus. , 2(May), pp.437–445.

- Konieczny A & Ausubel FM**, (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4(2), pp.403–410.
- König AC**, (2014) Sensing and Retrograde Signalling of Mitochondrial Metabolic States in Plants.
- Laluk K, Abuqamar S & Mengiste T**, (2011) The Arabidopsis mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance. *Plant physiology*, 156(4), pp.2053–68.
- Leister D**, (2005) Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in Arabidopsis. *Gene*, 354(1–2 SPEC. ISS.), pp.110–116.
- Liao Y, Tian M, Zhang H, Li X, Wang Y, Xia X, Zhou J, Zhou Y, Yu J, Shi K & Klessig DF**, (2015) Salicylic acid binding of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase E2 affects mitochondrial oxidative phosphorylation and electron transport chain components and plays a role in basal defense against tobacco mosaic virus in tomato. *New Phytologist*, 205(3), pp.1296–1307.
- Lim G-H, Singhal R, Kachroo A & Kachroo P**, (2017) Fatty Acid– and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology Annu. Rev. Phytopathol*, 55, pp.505–36.
- Liu J, Xu Z, Lu P, Li W, Chen M, Guo C & Ma Y**, (2016) Genome-wide investigation and expression analyses of the pentatricopeptide repeat protein gene family in foxtail millet. *BMC Genomics*, pp.1–16.
- Liu J, Zhao J, Lu P, Chen M & Guo C**, (2016) The E-Subgroup Pentatricopeptide Repeat Protein Family in Arabidopsis thaliana and Confirmation of the Responsiveness PPR96 to Abiotic Stresses. , 7(December), pp.1–14.
- Liu Y, He J, Chen Z, Ren X, Hong X & Gong Z**, (2010) ABA overly-sensitive 5 (ABO5), encoding a pentatricopeptide repeat protein required for cis-splicing of mitochondrial nad2 intron 3, is involved in the abscisic acid response in Arabidopsis. *Plant J*, 63.
- Logemann J, Schell J & Willmitzer L**, (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 163(1), pp.16–20.
- van Loon LC, Rep M & Pieterse CMJ**, (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual review of phytopathology*, 44, pp.135–62.

- López MA, Vicente J, Kulasekaran S, Vellosillo T, Martínez M, Irigoyen ML, Cascón T, Bannenberg G, Hamberg M & Castresana C, (2011)** Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *Plant Journal*, 67(3), pp.447–458.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-serrano JJ & Solano R, (2003)** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell*, 15(January), pp.165–178.
- Ma KW & Ma W, (2016)** Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Molecular Biology*, 91(6), pp.713–725.
- Marcos R, (2014)** Papel de las 9-lipooxigenasas de *Arabidopsis thaliana* en respuesta al daño en la pared celular.
- Marcos R, Izquierdo Y, Vellosillo T, Kulasekaran S, Cascón T, Hamberg M & Castresana C, (2015)** 9-Lipoxygenase-derived oxylipins activate brassinosteroid signaling to promote cell wall-based defense and limit pathogen infection. *Plant Physiology*, 4(November), p.pp.00992.2015.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M & Penny D, (2002)** Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), pp.12246–12251.
- Maxwell DP, Nickels R & McIntos L, (2002)** Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant Journal*, 29(3), pp.269–279.
- Maxwell DP, Wang Y & McIntosh L, (1999)** The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), pp.8271–8276.
- Mekhedov S, de Ilárduya OM & Ohlrogge J, (2000)** Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant physiology*, 122(2), pp.389–402.
- Metraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W & Inverardi B, (1990)** Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. , 250(8), pp.8–10.

- Millar HA, Whelan J, Soole KL, Day DA, Millar AH, Whelan J, Soole KL & Day DA, (2011)** Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. Annual review of plant biology, 62(1), pp.79–104.
- Møller IM, (2001)** PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52(1), pp.561–591.
- Møller IM & Rasmusson AG, (1998)** The role of NADP in the mitochondrial matrix. Trends in Plant Science, 3(1), pp.21–27.
- Møller IM & Sweetlove LJ, (2010)** ROS signalling - specificity is required. Trends in Plant Science, 15(7), pp.370–374.
- Montillet JL, Leonhardt N, Mondy S, Tranchimand S, Rumeau D, Boudsocq M, Garcia AV, Douki T, Bigeard J, Laurière C, Chevalier A, Castresana C & Hirt H, (2013)** An Abscisic Acid-Independent Oxylipin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in Arabidopsis. PLoS Biology, 11(3), pp.13–15.
- Moore AL & Siedow JN, (1991)** The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. BBA - Bioenergetics, 1059(2), pp.121–140.
- Morgan MJ, Lehmann M, Schwarzlander M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TCR, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ & Finkemeier I, (2008)** Decrease in Manganese Superoxide Dismutase Leads to Reduced Root Growth and Affects Tricarboxylic Acid Cycle Flux and Mitochondrial Redox Homeostasis. Plant Physiology, 147(1), pp.101–114.
- Mosblech A, Feussner I & Heilmann I, (2009)** Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. Plant Physiology and Biochemistry, 47(6), pp.511–517.
- Mou Z, Fan W & Dong X, (2003)** Inducers of plant systemic acquired resistance Regulate NPR1 function through redox changes. Cell, 113(7), pp.935–944.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H & Prats E, (2008)** The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? Journal of Experimental Botany, 59(3), pp.501–520.
- Murasnige T & Skoog F, (1962)** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. Physiol. Plant, 15(3), pp.473–497.

- Mysore KS & Ryu C**, (2004) Nonhost resistance : how much do we know ? , 9(2).
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A & Hancock JT**, (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 128(January), pp.13–16.
- Nelson BK, Cai X & Nebenführ A**, (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant Journal*, 51(6), pp.1126–1136.
- Ng S, De Clercq I, Van Aken O, Law SR, Ivanova A, Willems P, Giraud E, Van Breusegem F & Whelan J**, (2014) Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. *Molecular Plant*, 7(7), pp.1075–1093.
- Norman C, Howell KA, Millar AH, Whelan JM & Day DA**, (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant physiology*, 134(1), pp.492–501.
- Pauwels L & Goossens A**, (2011) The JAZ Proteins: A Crucial Interface in the Jasmonate Signaling Cascade. *the Plant Cell Online*, 23(9), pp.3089–3100.
- Penninckx I**, (1996) Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *the Plant Cell Online*, 8(12), pp.2309–2323.
- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux J-P & Broekaert WF**, (1998) Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(December), pp.2103–2113.
- Perales M, Eubel H, Heinemeyer J, Colaneri A, Zabaleta E & Braun HP**, (2005) Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I+III2 levels and alters mitochondrial physiology in Arabidopsis. *Journal of Molecular Biology*, 350(2), pp.263–277.
- Pertry I, Vaclavikova K, Depuydt S, Galuszka P, Spichal L, Temmerman W, Stes E, Schmulling T, Kakimoto T, Van Montagu MCE, Strnad M, Holsters M, Tarkowski P & Vereecke D**, (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), pp.929–934.
- Pieterse MJ, Does D Van Der, Zamioudis C, Leon-reyes A & Wees SCM Van**, (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity.



- Ravindran R, Loebbermann J, Nakaya HI, Khan N, Ma H, Gama L, Machiah DK, Lawson B, Hakimpour P, Wang Y, Li S, Sharma P, Kaufman RJ, Martinez J & Pulendran B, (2016)** The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature*, 531(7595), pp.523–527.
- Rhoads D & McIntosh L, (1992)** Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression. *The Plant cell*, 4(September), pp.1131–1139.
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC & Siedow JN, (2006)** Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant physiology*, 141(2), pp.357–366.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V & Mysore KS, (2014)** Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 5(February), pp.1–12.
- Senthil-kumar M, (2013)** Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens : Retrospectives and Prospects.
- Shigenaga AM & Argueso CT, (2016)** No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 56, pp.174–189.
- Simons BH, Millenaar FF, Mulder L, Loon LC Van & Lambers H, (1999)** Enhanced Expression and Activation of the Alternative Oxidase during Infection of Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv tomato 1. , 120(June), pp.529–538.
- Smith HC, (1997)** A guide to RNA editing. Cambridge University Press.
- Spoel SH & Dong X, (2012)** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), pp.89–100.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Pelt JA Van, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J, Brown R, Kazan K, Loon LC Van, Dong X & Pieterse CMJ, (2003)** NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. , 15(March), pp.760–770.
- Sunderhaus S, Dudkina N V., Jänsch L, Klodmann J, Heinemeyer J, Perales M, Zabaleta E, Boekema EJ & Braun HP, (2006)** Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *Journal of*

Biological Chemistry, 281(10), pp.6482–6488.

**Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R & Miller G**, (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), pp.259–270.

**Torres MA**, (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), pp.414–429.

**Tuominen H, Overmyer K & Keina M**, (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. , pp.59–69.

**Uknes S, Dincher S, Friedrich L, Negrotto D, Williams S, Thompson-Taylor H, Potter S, Ward E & Ryals J**, (1993) Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *The Plant cell*, 5(2), pp.159–69.

**Umbach AL, Zarkovic J, Yu J, Ruckle ME, McIntosh L, Hock JJ, Bingham S, White SJ, George RM, Subbaiah CC & Rhoads DM**, (2012) Comparison of Intact *Arabidopsis thaliana* Leaf Transcript Profiles during Treatment with Inhibitors of Mitochondrial Electron Transport and TCA Cycle. *PLoS ONE*, 7(9).

**Unsel M, Marienfeld JR, Brandt P & Brennicke A**, (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*, 15(1), pp.57–61.

**Vanlerberghe GC**, (2013) Alternative oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), pp.6805–6847.

**Vanlerberghe GC & McIntosh L**, (1994) Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiology*, 105, pp.867–874.

**Vanlerberghe GC, Vanlerberghe AE & McIntosh L**, (1994) Molecular Genetic Alteration of Plant Respiration (Silencing and Overexpression of Alternative Oxidase in Transgenic Tobacco). *Plant physiology*, 106(4), pp.1503–1510.

**Vanstraelen M & Benková E**, (2012) Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 28, pp.463–87.

**Vellosillo T, Aguilera V, Marcos R, Bartsch M, Vicente J, Cascón T, Hamberg M & Castresana C**, (2013) Defense Activated by 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Requires Specific

Mitochondrial Proteins 1 [ W ]. *Plant Physiology*, 161(February), pp.617–627.

**Vellosillo T, Martínez M, López MA, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M & Castresana C,** (2007) Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in Arabidopsis Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade. *The Plant Cell*, 19(3), pp.831–846.

**Vicente J, Cascón T, Vicedo B, García-Agustín P, Hamberg M & Castresana C,** (2012) Role of 9-lipoxygenase and  $\alpha$ -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Molecular Plant*, 5(4), pp.914–928.

**Virtanen A, Henriksson N, Nilsson P & Nissbeck M,** (2013) Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(2), pp.192–209.

**Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chételat A & Farmer EE,** (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant Journal*, 24(4), pp.467–476.

**Walper E, Weiste C, Mueller MJ, Hamberg M & Dröge-Laser W,** (2016) Screen identifying arabidopsis transcription factors involved in the response to 9-lipoxygenase-derived oxylipins. *PLoS ONE*, 11(4), pp.1–17.

**Van Wees SC, Van der Ent S & Pieterse CM,** (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), pp.443–448.

**Weijers D, Franke-van Dijk M, Vencken RJ, Quint A, Hooykaas P & Offringa R,** (2001) An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development (Cambridge, England)*, 128(21), pp.4289–99.

**Weingart H, Ullrich H, Geider K & Völksch B,** (2001) The Role of Ethylene Production in Virulence of *Pseudomonas syringae* pvs. *glycinea* and *phaseolicola*. *Phytopathology*, 91(5), pp.511–518.

**Weingart H & Völksch B,** (1997) Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), pp.156–161.

**Whalen MC, Innes RW, Bent AF & Staskawicz BJ,** (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *The Plant cell*, 3(1), pp.49–59.

- Whelan J & Murcha MW**, (2015) *Plant Mitochondria: Methods and Protocols*, Springer.
- Wood EJ**, (1983) *Molecular cloning. A laboratory manual* by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. \$48 ISBN 0-87969-136-0. *Biochemical Education*, 11(2), pp.82–82.
- Woodson JD & Chory J**, (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics*, 9(5), pp.383–395.
- Xu F, Yuan S & Lin HH**, (2011) Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals. *Plant signaling & behavior*, 6(1), pp.55–58.
- Yanshina DD, Malygin AA & Karpova GG**, (2006) MOLECULAR BIOLOGY Binding of Human Ribosomal Protein S5 with 18S rRNA Fragment 1203 – 1236 / 1521 – 1698. , 40(3), pp.406–412.
- Yi H, Juergens M & Jez JM**, (2012) Structure of Soybean -Cyanolalanine Synthase and the Molecular Basis for Cyanide Detoxification in Plants. *The Plant Cell*, 24(6), pp.2696–2706.
- Zhang B, Aken O Van, Thatcher L, Clercq I De, Duncan O, Law SR, Murcha MW, van der Merwe M, Seifi HS, Carrie C, Cazzonelli C, Radomiljac J, Höfte M, Singh KB, Breusegem F Van & Whelan J**, (2014) The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, pp.709–727.
- Zhang K, Halitschke R, Yin C, Liu C & Gan S**, (2013) Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. , 110(36), pp.14807–14812.
- Zhang L & Xing D**, (2008) Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), pp.1092–1111.
- Zipfel C**, (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), pp.10–16.
- Zsigmond L, Rigó G, Szarka A, Székely G, Ötvös K, Darula Z, Medzihradzky KF, Koncz C, Koncz Z & Szabados L**, (2008) *Arabidopsis* PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol*, 146.