

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y FUNCIONAL DE
OXILIPINAS INVOLUCRADAS EN DEFENSA
FRENTE A PATÓGENOS**

TESIS DOCTORAL

Jorge Vicente Conde

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y FUNCIONAL DE
OXILIPINAS INVOLUCRADAS EN DEFENSA
FRENTE A PATÓGENOS**

TESIS DOCTORAL

Jorge Vicente Conde

Madrid, 2012

ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y FUNCIONAL DE OXILIPINAS INVOLUCRADAS EN DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS

Memoria presentada para optar al grado de

Doctor en Ciencias,

por,

Jorge Vicente Conde

Universidad Autónoma de Madrid

Noviembre de 2011

Vº Bº del Director de Tesis:

Vº Bº del Tutor de Tesis:

Dra. Carmen Castresana Fernández

Dra. Soledad Sanz Alférez

El Doctorando

Jorge Vicente Conde

“Todos tenemos lo que nos buscamos.
Que no coincida con lo que nos merecemos, no exime de hacerlo”

Benjamín Vicente Mayoral

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

A continuación quiero expresar mi reconocimiento a todas las personas que han contribuido a la consecución del trabajo presentado en esta tesis:

A la Dra. Carmen Castresana, por su dirección, orientación, consejo y apoyo durante el tiempo que ha llevado hacer esta tesis.

A la Dra. Soledad Sanz, por aceptar ser el tutor de esta tesis y por su disponibilidad para cualquier duda que se le ha presentado.

Al Profesor Mats Hamberg por facilitarnos las oxilipinas utilizadas en este trabajo.

Al Profesor Murray Grant por cedernos la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrpA*.

A la Dra. Brigitte Mauch-Mani por cedernos las cepas *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinerea*.

Al Dr. Pedro L. Rodríguez por cedernos semillas del mutante *abi1.2*.

A todos los miembros del laboratorio 315 por revelarse como un pilar básico para que esta tesis llegase a buen término.

Al personal del Departamento de Genética Molecular de Plantas por su total disposición en la resolución de dudas y/o problemas y por su apoyo en la consecución de determinados ensayos.

A los Drs. Pilar García, Begonya Vicedo y Víctor Flors por los análisis de hormonas.

A los Drs. José Manuel Franco-Zorrilla y José Antonio Abelenda por su inestimable ayuda en la resolución de dudas.

A la Dr. María Maite Sanmartín por su consejo incondicional durante la realización de esta tesis y por la lectura crítica de la misma.

A la Dr. Mónica Chagoyen por su ayuda en el análisis de secuencias.

Al Dr. José Ramón Valverde por su ayuda con los análisis estadísticos.

Al servicio de cultivo *in vitro* por la inestimable ayuda en la preparación de medios y siembra de plantas.

Al servicio de Genómica por los análisis transcriptómicos presentados en este trabajo.

A Inés Poveda, por las fotos realizadas.

Al servicio de invernadero por su ayuda en la siembra y mantenimiento de plantas.

A los servicios de Mantenimiento e Instrumentación por la resolución de cualquier problema técnico que se les ha presentado.

A los departamentos de Personal y Administración por su ayuda en toda clase de trámites y dudas administrativas.

AGRADECIMIENTOS

Gracias, muchas gracias. Hasta aquí todo fácil. El problema es que al intentar encuadrar todas y cada una de las situaciones en las que quiero expresar sinceramente “gracias” con todas y cada una de las personas que merecen ese “gracias”, se genera una red de interacciones cuya complejidad, derivada de la redundancia de todos vosotros en varias situaciones, hacen que el reflejarlo aquí sea un estudio de dimensiones titánicas. Por ello, paso a relatar personas y situaciones, por separado. En la próxima tesis descifraré esa red.

Situaciones:

Ayudarte con un experimento, regalar una buena sonrisa un mal lunes, arreglarte un follón con un papel no presentado, montar una buena partida de cartas, acompañarte en una juerga “de aúpa”, un paseo reparador, darte una beca, un viaje en Sandokan, compartir unas cañas, dar un buen consejo, un tupper con un guiso de muerte, abrirte los ojos ante un error (científico o no), un concierto de jazz y 88 Pivons, hacerte reír hasta que te duela todo el cuerpo, unas empanadillas de carne, estar ahí pase lo que pase, una discusión sobre lo divino y lo humano,....

Vosotros:

Carmen, Tomás, Tamara, Satish, Marta, Verónica, Ruth, Miguel Ángel, Raquel, Gerard, Angeloto, Juan Ignacio, Inés, Mari Jose, Marta B., Marta P., Emilio, Michael, Xavi, Juani, Maite, Lola, Maremoto, gente del 311, gente del 312, gente del 313, gente del 314, gente del 316, gente del 317, gente del 318, gente del 370, gente del 20B, *in vitro* girls, los genómicos, Inés Foto, Gloria y Ángel, Javi, Pilar, Benjamín, Teresa, Benyi, Rosi, Mari Tere, Charito, Vito, Maribel, Abuelo Jesús, Asún, Antonio, Arsenio, Mari Carmen, Mari Carmen, Jesús, Ana, Javi, Don Pablo, Lourdes, Sara, María, Alejandro, Javier, Arancha, Pompita, Gustavo, Almudena, Oso, Juan, Beltro, Ann Marie, Laura, Patricia, María, Chiti, Malena, Sara, Noela, Merche, Alicia, Elena, Quinino, Manu, Jaime, Valdés, Alberto, Gonzalo, Álvaro, Óscar, Don Carlos, Alfonso, Sergio, Kike, Tallo, Alex, Cote, Dani, Huevis, Tito, Anita, Menchu, Clara, Guada, María, Lara, Silvia, Anita Telepi, Pumu, Pableras, Ángel, Raúl, Pablo, Carlos, Alex, Carlos, Vicente, Anselmo y Ramón...

A tener en cuenta:

- Son todos los que están, pero no están todos los que son. Limitaciones de memoria.
- El orden de los sumandos NO altera el valor de la suma.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aa:	aminoácido
ABA:	ácido abscísico
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario
AOS:	aleno óxido sintasa
ARN:	ácido ribonucleico
avr:	gen de avirulencia
BAC:	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BLAST:	<i>basic local alignment research tool</i>
BrEt:	bromuro de etidio
CAP:	<i>cleaved amplified polymorphic sequences</i>
Col-0:	Columbia-0
DAMP:	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DES:	divinil éter sintasa
DO:	densidad óptica
DOX:	dioxigenasa
EAS:	epoxi alcohol sintasa
EDTA:	ácido etilen-diamino-tetra-acético
EMS:	metano sulfonato de etilo
ET:	etileno
ETI:	effector-triggered immunity
GO:	<i>Gene Ontology</i>
H₂O₂:	peróxido de hidrógeno
HPL:	hidroperóxido liasa
HR:	respuesta hipersensible
JA:	ácido jasmónico
Kb:	kilobase
KB:	medio King's B
LB:	medio Luria-Bertani

LOX:	lipoxigenasa
LRR:	leucine-rich repeat
MAMP:	<i>microbial-associated molecular pattern</i>
MgCl₂:	cloruro de magnesio
MS:	medio Murashige y Skoog
NB:	nucleotide binding
NCBI:	<i>national center of biotechnology information</i>
noxy:	<i>non responding to oxylipin</i>
¹O₂:	singlete de oxígeno
O₂⁻:	ion superóxido
OH[·]:	radical hidroxilo
PAMP:	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS:	tampón fosfato salino
PCD:	<i>programmed cell death</i>
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PDF:	defensina
PXG:	peroxigenasa
PR:	<i>pathogenesis related protein</i>
PRR:	<i>pattern recognition receptor</i>
<i>Pst</i>:	<i>Pseudomonas syringae pv tomato</i>
PTI:	<i>PAMPs-triggered immunity</i>
R:	gen de resistencia
ROS:	especies reactivas de oxígeno
RT-PCR:	transcripción reversa seguida de PCR
SA:	ácido salicílico
SAR:	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS:	dodecil sulfato sódico
SSC:	solución NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM
SSLP:	<i>simple sequence length polymorphism</i>
TAIR:	<i>the Arabidopsis information resource</i>
TBE:	tampón Tris-ácido bórico 90 mM, NA ₂ -EDTA 2 mM pH8

ADN-T:	ADN transferente
Tris:	tris-(hidroximetil)-aminometano
TTSS:	<i>type three secretion system</i>
ufc:	unidades formadoras de colonias

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	9
1.2. RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL	10
1.2.1. Resistencia basal	10
1.2.2. Resistencia inducida.....	12
1.2.3. Resistencia Sistémica Adquirida	13
1.2.4. Rutas de señalización y hormonas vegetales implicadas en la regulación de la defensa vegetal.....	15
1.2.5. Sistema de secreción bacteriano	17
1.3. OXILIPINAS	18
1.3.1. Síntesis de oxilipinas	19
1.3.2. Funciones de las oxilipinas	21
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO, CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO	31
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	31
3.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.1.3. Estirpes bacterianas fitopatógenas	31
3.1.4. Especies fúngicas fitopatógenas.....	31
3.1.5. Medios de cultivo para microorganismos.....	31
3.1.5.1. Medios de cultivo para bacterias	31
3.1.5.2. Medio de cultivo para hongos.....	32
3.1.6. Mantenimiento de los microorganismos.....	32
3.1.6.1. Mantenimiento de cepas bacterianas.....	32

3.1.6.2.	Mantenimiento de hongos	32
3.2.	MANIPULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	32
3.2.1.	Obtención de células competentes	32
3.2.2.	Transformación bacteriana.....	33
3.3.	MATERIAL VEGETAL.....	33
3.3.1.	Crecimiento y mantenimiento de plantas	33
3.4.	VECTORES DE CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN	34
3.5.	TRATAMIENTOS EN PLANTAS	34
3.5.1.	Inoculación de plantas con bacterias fitopatógenas	34
3.5.2.	Curvas de crecimiento bacteriano.....	35
3.5.3.	Inoculación de las plantas con hongos fitopatógenos	35
3.5.4.	Medida del daño celular	36
3.5.5.	Tratamiento con oxilipinas <i>in vivo</i>	36
3.5.6.	Tratamientos <i>in vitro</i>	36
3.6.	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	37
3.6.1.	Tinción de calosa.....	37
3.6.2.	Tinción de ión superóxido.....	37
3.6.3.	Tinción de agua oxigenada	37
3.6.4.	Tinción de muerte celular	37
3.7.	CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS Y 9-KOT	38
3.7.1.	Cuantificación de hormonas vegetales	38
3.7.2.	Cuantificación de 9-KOT	38
3.8.	PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	38
3.8.1.	Aislamiento y preparación de plásmidos.....	38
3.8.2.	Preparación de ADN genómico de plantas	38
3.8.3.	Preparación de ARN total de plantas.....	39
3.8.4.	Tratamiento enzimático del ADN.....	39
3.8.5.	Ligación de fragmentos de ADN	39

3.8.6.	Elución de fragmentos de ADN	39
3.8.7.	Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
3.8.8.	Sistema Gateway de Clonación	40
3.8.9.	Amplificación de los extremos 5' y 3' de ADNc.....	40
3.8.10.	RT-PCR	40
3.8.11.	PCR Cuantitativa	40
3.8.12.	Síntesis de oligonucleótidos.....	41
3.8.13.	Secuenciación de ADN.....	41
3.8.14.	Técnicas electroforéticas y transferencia de ácidos nucleicos.....	41
3.8.15.	Marcaje radiactivo e hibridación de ácidos nucleicos.....	41
3.9.	AISLAMIENTO DE LÍNEAS DE INSERCIÓN DE ADN-T EN HOMOCIGOSIS..	42
3.10.	ANÁLISIS DE PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS	42
3.11.	ANÁLISIS GENÉTICO.....	44
3.12.	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LA MUTACIÓN <i>noxy1</i>.	44
3.13.	COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN <i>noxy1</i>.....	45
3.14.	TRANSFORMACIÓN DE <i>A. thaliana</i>.....	45
3.14.1.	Selección de líneas transgénicas.....	45
3.15.	APLICACIONES BIOINFORMÁTICAS.....	45
4.	RESULTADOS	51
4.1.	PARTICIPACIÓN DE LOS GENES <i>9-LOX</i> Y <i>α-DOX</i> EN LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL	51
4.1.1.	Los enzimas LOX1 y α -DOX1 se inducen de forma local durante la respuesta de la planta frente a la infección de bacterias biotrofas.....	51
4.1.2.	Los enzimas LOX1 y α -DOX1 participan en la activación de la defensa local.....	53
4.1.3.	Los enzimas LOX1 y α -DOX1 participan en la activación de la defensa sistémica.....	56

4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS OXILIPINAS EN LA DEFENSA FRENTE A LA INFECCION DE PATÓGENOS BACTERIANOS	58
4.2.1. El pre-tratamiento con oxilipinas generadas por los enzimas LOX-1 y α -DOX1 protege a las plantas frente a infecciones bacterianas	58
4.2.2. Análisis del papel del 9-KOT en la defensa vegetal	62
4.2.2.1. Análisis de los cambios transcripcionales en respuesta a 9-KOT.....	63
4.2.2.2. Efecto del 9-KOT en la respuesta transcripcional a infecciones bacterianas.....	67
4.2.2.3. El pre-tratamiento con 9-KOT altera la homeostasis hormonal durante una infección de <i>Pst</i> DC3000	69
4.2.2.4. La acción del 9-KOT contrarresta la estrategia de virulencia empleada por <i>Pst</i> DC3000.....	70
4.3. LA PÉRDIDA DE LAS FUNCIONES LOX1 y α-DOX1 PROVOCA LA ALTERACIÓN DEL BALANCE HORMONAL DURANTE LA INFECCIÓN BACTERIANA.	72
4.3.1. Los enzimas α -DOX1 y LOX1 participan en la respuesta de la planta a la producción y/o señalización de ABA	73
4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE <i>noxy1</i>	76
4.4.1. El mutante <i>noxy1</i> es insensible a la aplicación de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT y del herbicida isoxaben.....	76
4.4.2. Respuesta del mutante <i>noxy1</i> frente a la infección de patógenos	78
4.4.2.1. La mutación <i>noxy1</i> aumenta la resistencia a la infección local de bacterias biotrofas.....	78
4.4.2.2. La mutación <i>noxy1</i> provoca una disminución en el nivel de daño celular asociado a la activación de una reacción hipersensible.	80
4.4.2.3. La mutación <i>noxy1</i> aumenta la resistencia de los tejidos sistémicos a la infección de bacterias biotrofas	81
4.4.2.4. La mutación <i>noxy1</i> provoca un aumento en la susceptibilidad a la infección de hongos necrotrofos.....	82
4.5. CLONAJE POSICIONAL DEL GEN <i>NOXY1</i>.....	84
4.6. COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN <i>noxy1</i>.....	86
4.7. CARACTERIZACIÓN DEL LOCUS <i>At1g43980</i>.....	87

4.8. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DEL MUTANTE <i>noxy1</i> EN RESPUESTA A LUZ BAJA	89
4.8.1. La mutación <i>noxy1</i> produce lesiones necróticas espontáneas durante al desarrollo foliar	89
4.8.2. Análisis de los cambios transcriptómicos asociados a la formación de lesiones en el mutante <i>noxy1</i>	91
4.9. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA DEL MUTANTE <i>noxy1</i> A ESTRÉS OSMÓTICO Y ESTRÉS OXIDATIVO	94
4.10. LA PÉRDIDA DEL GEN <i>NOXY1</i> PROVOCA ALTERACIONES EN LA RESPUESTA HORMONAL	95
5. DISCUSIÓN	99
6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFÍA	119
8. ANEXO	135

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Determinación del nivel de transcritos 9-LOX y α -DOX1 mediante PCR cuantitativa.....	52
Figura 2. Obtención y caracterización de los mutantes <i>lox1</i> y <i>dox1</i>	54
Figura 3. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes <i>lox1</i> , <i>dox1</i> y <i>lox1 dox1</i> a infecciones bacterianas.....	55
Figura 4. Activación de la defensa sistémica en plantas silvestres y mutantes <i>lox1</i> , <i>dox1</i> y <i>lox1 dox1</i>	57
Figura 5. Esquema de las rutas de síntesis de las oxilipinas usadas en este estudio.....	60
Figura 6. Actividad protectora de las oxilipinas frente a la infección de <i>Pst</i> DC3000.....	61
Figura 7. Niveles de 9-KOT en hojas de plantas silvestres y mutantes <i>lox1</i> , <i>dox1</i> y <i>lox1 dox1</i> infectadas con <i>Pst</i> DC3000.....	63
Figura 8. Efecto de la aplicación de 9-KOT en el crecimiento de la cepa <i>Pst</i> DC3000.....	64
Figura 9. Análisis de los cambios transcriptómicos producidos en respuesta al tratamiento con 9-KOT.....	65
Figura 10. Análisis de los genes reprimidos en hojas pre-tratadas con 9-KOT tras la infección de <i>Pst</i> DC3000.....	68
Figura 11. Determinación de los niveles de ABA, JA y SA durante la infección de <i>Pst</i> DC3000 en hojas de plantas silvestres pre-tratadas con agua y 9-KOT.....	70
Figura 12. Efecto del 9-KOT en el crecimiento de distintas cepas de <i>Pseudomonas syringae pv tomato</i>	71
Figura 13. Determinación de los niveles de ABA, JA y SA en hojas de plantas silvestres y <i>lox1 dox1</i> durante una infección bacteriana.....	73
Figura 14. Alteraciones fenotípicas en plántulas silvestres y mutantes de oxilipinas crecidas <i>in vitro</i> en presencia de SA y JA.....	74
Figura 15. Alteraciones fenotípicas en plantas silvestres, <i>lox1 dox1</i> , <i>lox1</i> , <i>dox1</i> y <i>abi1-2</i> crecidas en un medio con ABA.....	75
Figura 16. Caracterización fenotípica del mutante <i>noxy1</i>	77
Figura 17. Respuesta del mutante <i>noxy1</i> a la aplicación de 9-KOT e isoxaben.....	77
Figura 18. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes <i>noxy1</i> a infecciones bacterianas.....	79
Figura 19. Medida de la conductividad en hojas de plantas silvestres y mutantes <i>noxy1</i> inoculadas con la bacteria <i>Pst</i> DC3000 <i>avrRpm1</i>	81
Figura 20. Activación de la defensa sistémica en plantas silvestres y mutantes <i>noxy1</i>	82
Figura 21. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes <i>noxy1</i> a infecciones por hongos necrotrofos.....	83

Figura 22. Cartografiado y análisis de la secuencia del gen <i>NOXY1</i>	85
Figura 23. Análisis de la complementación del fenotipo <i>noxy1</i>	86
Figura 24. Representación de los dominios identificados en la proteína <i>NOXY1</i> y expresión del gen <i>NOXY1</i>	88
Figura 25. Fenotipo de plantas mutantes <i>noxy1</i>	89
Figura 26. Análisis fenotípico de plantas silvestres y mutantes <i>noxy1</i> crecidas en condiciones de baja intensidad lumínica.....	90
Figura 27. Análisis de los cambios transcriptómicos que acompañan a la formación de lesiones necróticas en el mutante <i>noxy1</i> crecido en condiciones de baja intensidad lumínica.....	92
Figura 28. Análisis de los cambios transcriptómicos que acompañan a la formación de lesiones necróticas en el mutante <i>noxy1</i> crecido en condiciones de baja intensidad lumínica.....	93
Figura 29. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes <i>noxy1</i> a tratamiento de estrés oxidativo y estrés abiótico.....	95
Figura 30. Análisis de las alteraciones fenotípicas producidas en plantas silvestres y mutantes <i>noxy1</i> crecidas en presencia de las hormonas ABA, SA y JA.....	96
Tabla 1. Cebadores específicos utilizados para analizar la expresión génica por RT-PCR y PCR cuantitativa.....	47
Tabla 2. Información de las líneas de ADN-T de los genes <i>LOX1</i> y <i>α-DOX1</i> y los cebadores usados para identificar las inserciones.....	47
Tabla 3. Marcadores tipo CAPs diseñados, y cebadores empleados en la resolución de los mismos.....	48
Tabla 4. Oxilipinas usadas en este estudio.....	59

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Las oxilipinas constituyen una amplia familia de metabolitos secundarios, de diversas estructuras y actividades biológicas, que se originan mediante la oxidación de ácidos grasos, predominantemente, linoleico y linolénico, por la acción de enzimas con actividad α -dioxigenasa (α -DOX) y lipoxigenasa (9- y 13-LOXs).

Como parte del creciente interés en el estudio de esta familia de metabolitos, nuestro trabajo está dirigido al estudio de las rutas biosintéticas iniciadas por la acción de las α -DOXs y 9-LOXs, en la respuesta de defensa vegetal frente a la infección de microorganismos patógenos. Con este objeto hemos desarrollado una estrategia genética que nos ha permitido obtener y caracterizar plantas mutantes deficientes en la síntesis de oxilipinas y en la ruta de señalización que controla la respuesta de las plantas a dichos compuestos. De forma paralela, hemos utilizado una colección de oxilipinas puras, producidas a través de las rutas biosintéticas examinadas, con objeto de determinar su participación en la defensa de la planta.

Los resultados de nuestro trabajo han puesto de manifiesto la participación de los enzimas α -DOX1 y LOX1 en los mecanismos de defensa de las plantas frente a la infección de bacterias biotrofas, en donde la actuación coordinada de ambos enzimas determina la activación de una respuesta eficaz, con capacidad para limitar el crecimiento patogénico. La participación de ambos enzimas se requiere tanto durante la activación de la defensa local, como de la defensa sistémica, en tejidos alejados de los puntos de infección. La acción de los enzimas α -DOX1 y LOX1 en la defensa vegetal se concluye, además, a partir de los resultados que demuestran que la aplicación de oxilipinas activa un estado defensivo en la planta que protege a los tejidos vegetales frente a la infección de bacterias virulentas, entre las que el ácido 9-cetohidroxi linolénico (9-KOT) es el compuesto que ejerce una acción protectora más intensa. El efecto del 9-KOT provoca la alteración de la homeostasis hormonal, reduciendo los niveles de ABA y JA durante la infección de *Pst* DC3000, e interfiere con mecanismos de virulencia bacterianos, como la liberación de efectores al interior celular.

Finalmente, la caracterización del mutante *noxy1*, insensible a la aplicación de 9-HOT y 9-KOT, reveló que la mutación del gen NOXY1 provoca la aparición de lesiones espontáneas, cuya intensidad varía de acuerdo a las condiciones de luz. La formación de lesiones conlleva el aumento de la resistencia de la planta frente a la infección de patógenos biotrofos, así como la susceptibilidad a patógenos necrotrofos y a distintos tratamientos de estrés abiótico. Independientemente de las diferencias detectadas en la respuesta de defensa, los mutantes caracterizados, *lox1 dox1* y

noxy1, muestran una respuesta de hipersensibilidad a ABA que podría afectar, a su vez, a la regulación del estrés oxidativo que acompaña a la respuesta de la planta frente a la infección de patógenos.

ABSTRACT

Oxylipins are a large family of lipid derivatives whose production contributes to activate the immune response of plants to control pathogen infection. The synthesis of oxylipins is initiated from the oxidation of fatty acids, preferentially linoleic and linolenic acids, by the action of α -dioxygenases (α -DOX) and lipoxygenases (9- and 13-LOXs). As part of the increasing interest in studying the role of these metabolites, we have focused our research in examining the action of the α -DOX1 and LOX1 (encoding one of the two 9-LOX enzymes of Arabidopsis) genes in plant defense. To this end, we followed a genetic strategy allowing us to generate mutants deficient in these enzymatic activities as well as in the signaling processes activated by specific 9-LOX derivatives. In parallel to examining the response of these mutants to pathogen infection, we used a collection of pure α -DOX and 9-LOX derivatives to investigate the effect of these compounds in plant defense.

The results of these studies revealed the participation of the two enzymatic activities investigated in plant defense, in which their coordinated action is required to achieve full protection against biotrophic pathogens. Moreover, we found that the action of these enzymatic activities contribute to induce local defense in infected leaves, as well as to trigger a systemic defense response in distant tissues. The role of these enzymatic activities in plant defense was supported by the results showing that the application of specific α -DOX1 and 9-LOX derivatives prior bacterial infection, exerted a protective action reducing bacterial growth and tissue damage. Among tested compounds, the 9-LOX derivative 9-ketooctadecatrienoic acid (9-KOT) showed the strongest activity. The effect of 9-KOT modifies hormone homeostasis, reducing the levels of ABA and JA, during *Pst* DC3000 infection, and interferes with bacterial virulence mechanisms, as the release of effectors into the plant cell.

In contrast to the results with *lox1 dox1* mutants, we found that the 9-KOT insensitive mutant *noxy1* showed enhanced resistance to biotrophic pathogens. Moreover, this mutant showed spontaneous formation of lesions when grown under low light intensity or short day conditions.

Independently of their response to pathogen infection, we found that both mutants, *lox1 dox1* and *noxy1*, showed hypersensitivity to ABA. This alteration could in turn affect the regulatory process controlling oxidative stress during the response to pathogen infection and plant development and thus be the cause of the phenotypic alteration associated with these mutations.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

A lo largo de la evolución las plantas han establecido mecanismos de defensa frente a situaciones ambientales desfavorables, tales como sequías, temperaturas extremas, salinidad, limitación de elementos esenciales en el suelo, así como las derivadas de la interacción con microorganismos patógenos, capaces de infectar tejidos vegetales produciendo una enfermedad.

Las distintas interacciones que se establecen entre las plantas y los microorganismos patógenos se agrupan en dos tipos, denominadas compatibles e incompatibles. Las interacciones incompatibles son aquellas en las que los microorganismos, ya sean bacterias, hongos, virus o viroides, no logran progresar dentro de la planta, ni producir una enfermedad, y se comportan, por tanto, como avirulentos. Este tipo de interacción puede generarse bien porque la planta no aporta al patógeno los requerimientos nutritivos necesarios para su desarrollo, o bien porque la planta activa un sistema de defensa suficientemente efectivo para limitar la infección del patógeno (Kombrink y Somssich, 1995). Por el contrario, en las interacciones compatibles, el patógeno establece un punto inicial de infección a partir del cual progresa e invade los tejidos de la planta y se comporta, por tanto, como virulento (Hammond-Kosack y Jones, 1997). En este caso, la planta responde a la infección activando una respuesta de defensa que, sin embargo, no es suficientemente efectiva para controlar la infección e impedir el crecimiento del patógeno, que se desarrolla en la planta provocando una enfermedad (Greenberg, 1996).

Por otro lado, y dependiendo de las estrategias utilizadas durante su infección, se pueden distinguir dos tipos de patógenos (Glazebrook, 2005). Así, se denominan patógenos biotrofos a aquellos que se alimentan de tejidos vegetales vivos, pudiendo llegar a desarrollar una estrecha relación con su hospedador y a evolucionar a biotrofos obligados, incapaces de crecer en medios sintéticos. Muchos patógenos biotrofos viven en los espacios intercelulares del mesófilo de las hojas. Además, algunos de ellos producen estructuras especializadas, denominadas haustorios, en las que, mediante la invaginación de la membrana plasmática del hospedador, los patógenos pueden crear un microambiente específico, que les permite captar nutrientes a partir de la célula vegetal. El segundo tipo de patógenos, denominados necrotrofos, utiliza medios menos especializados durante su infección, y establece una interacción menos estrecha con la planta. Este segundo tipo de patógenos se

desarrolla sobre tejidos vegetales muertos o senescentes y, normalmente, producen toxinas que dañan el tejido vegetal para favorecer su colonización.

Por su parte, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para defenderse del ataque de los microorganismos patógenos que, en la actualidad, y dada su complejidad, se engloban dentro de lo que se denomina como sistema inmune vegetal. Este sistema de defensa incluye la presencia de barreras físicas (cutículas y pared secundaria) y químicas (compuestos antimicrobianos) preformadas, así como mecanismos activos en los que, a través de la activación de rutas específicas de señalización, se induce la producción de numerosos compuestos antimicrobianos, y se provoca la modificación y el reforzamiento de la pared celular, que van contribuir, en último término, a dificultar el desarrollo y la progresión del patógeno en la planta (Dangl y Jones, 2001; Thomma y col., 2001; Hammond-Kosack y Parker, 2003; Kachroo y Kachroo, 2009).

1.2. RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL

La respuesta de inmunidad vegetal engloba a todos aquellos mecanismos de defensa que se activan en la planta en respuesta a la presencia de patógenos y se agrupan en dos categorías, denominadas resistencia basal y resistencia inducida.

1.2.1. Resistencia basal

La resistencia basal se desencadena en los puntos de infección como consecuencia del reconocimiento, a través de receptores vegetales denominados PRR (del inglés pattern recognition receptor) de moléculas del patógeno, comunes a distintos microorganismos, denominadas MAMPs (del inglés, microbial-associated molecular pattern). Los receptores PRR se encuentran mayoritariamente localizados en la superficie de la célula vegetal, y poseen un dominio transmembrana y un dominio extracelular que participa en el reconocimiento. Además, se pueden distinguir dos grandes grupos de receptores PRR, dependiendo de que contengan o no un dominio quinasa intracelular que participa en la señalización (Lehti-Shiu y col., 2009). A su vez, los MAMPs constituyen moléculas de naturaleza variable, estructuralmente conservadas que, generalmente, son indispensables para el desarrollo del patógeno (Nürnberg y col., 2004) y poseen funciones enzimáticas o estructurales (Zipfel, 2008, Boller y Felix, 2009).

La activación de la resistencia basal conlleva la inducción de numerosas respuestas celulares dirigidas a contener la infección del patógeno y que se describen brevemente a continuación:

- Alteración del flujo iónico: el reconocimiento de un patógeno por los receptores PRR provoca la alteración del flujo de iones a través de la membrana plasmática. Esta respuesta ocurre durante los 30 segundos y los dos primeros minutos tras la activación del receptor, y conlleva la entrada de H^+ y Ca^{2+} al interior de la célula vegetal, y la salida de K^+ y aniones, en particular de nitrato, a los espacios extracelulares. La alteración del flujo iónico provoca la despolarización de la membrana, que contribuye, a su vez, a regular el intercambio iónico (Granda y col., 1995; Nürnberger y col., 2004; Shabala y col., 2010).
- Estallido oxidativo: como consecuencia de la despolarización de la membrana plasmática se produce un estallido oxidativo, que da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ión superóxido (O_2^-), el singlete de oxígeno (1O_2), el radical hidroxilo (OH^-) y las especies reactivas del óxido nítrico (Lamb y Dixon, 1997; Apel y Hirt, 2004; Laloi y col., 2004; Gechev y col., 2006; Triantaphylidés y Havaux, 2009; Nanda y col., 2010). La generación de estas especies reactivas puede ocurrir en distintos compartimentos celulares tales como las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas y los espacios extracelulares, siendo esta última localización la que está inicialmente implicada en la activación de la defensa vegetal. Las especies reactivas de oxígeno ejercen distintas funciones en relación con la defensa vegetal, así, dada su toxicidad, pueden actuar como compuestos antimicrobianos y contribuir a la muerte de las células infectadas. Además, la producción de ROS, contribuye al reforzamiento de la pared celular que dificulta la progresión del patógeno en los tejidos infectados, y a la activación de los genes de defensa de la planta (Lamb y Dixon, 1997; Apel y Hirt, 2004; Laloi y col., 2004; Gechev y col., 2006; Triantaphylidés y Havaux, 2009; Nanda y col., 2010).
- Activación de MAPKs: la activación de MAP quinasas constituye otro de los procesos tempranos que contribuyen a la activación de la resistencia basal. La acción de las MAP quinasas permite activar las cascadas de fosforilación que traducen la señalización y la activación de proteínas, tales como factores de transcripción, componentes del citoesqueleto y otras quinasas, incluyendo a otras MAPKs.

- Deposición de calosa: la calosa constituye uno de los polímeros de glucosa (β -1,3-glucano) que integran la pared secundaria de la célula vegetal, y su deposición en forma de vesículas o depósitos, dentro y alrededor del área de infección, forma parte de la respuesta de defensa de la planta. La función biológica de estos depósitos no está claramente definida, aunque su formación está generalmente asociada a la defensa de la planta, en donde podría favorecer el confinamiento del patógeno en el área infectada, limitando así su propagación (Jacobs y col., 2003; Nishimura y col., 2003; Ausubel, 2005; Boller y Felix, 2009; Nguyen y col., 2010).
- Activación de los genes de defensa vegetal: los procesos de señalización que se activan tras el reconocimiento de un patógeno conducen, en último término, a la inducción de los genes de defensa vegetal, cuyos productos de expresión determinarán la capacidad de la planta para controlar y limitar el crecimiento de los patógenos. La activación de los genes de defensa está acompañada de un proceso de reprogramación celular, en el que el metabolismo de la célula vegetal debe modificarse, desde una actividad dirigida a satisfacer las necesidades relacionadas con el crecimiento y el desarrollo de la planta, hasta una situación en la que se dirige a una producción masiva de compuestos de defensa, preferentemente proteínas. Este proceso de reprogramación celular conlleva la activación de una compleja red de señalización, cuya regulación es esencial para la planta y determinará el resultado de la interacción planta-patógeno (Fujiwara y col., 2004; Jones y Dangl, 2006; Truman y col., 2007).

1.2.2. Resistencia inducida

La resistencia basal permite contener la infección en muchas interacciones planta-patógeno, sin embargo y, dado que esto no ocurre en todos los casos, las plantas han desarrollado un segundo nivel de reconocimiento, que activa una respuesta de defensa más eficaz e intensa, denominada resistencia inducida. Este segundo nivel de reconocimiento, es altamente específico y se establece mediante la interacción de los productos de los genes de resistencia de la planta (*R*), localizados fundamentalmente en el interior de la célula, con moléculas específicas del patógeno, denominadas efectores, que se liberan al interior de la célula vegetal durante la infección. La activación de la resistencia inducida está frecuentemente acompañada de la activación de un proceso de muerte celular local, en los puntos de infección, que da lugar a la formación de lesiones necróticas y se conoce como reacción hipersensible o HR (Jones y Dangl, 2006, Rosebrock y col., 2007). Cabe mencionar,

que la reacción hipersensible se induce preferentemente en respuesta a la infección de patógenos biotrofos. De hecho, y dado el modo de vida de los patógenos necrotrofos, la activación de una reacción hipersensible podría conducir a un aumento de la susceptibilidad de la planta frente a este tipo de patógenos.

La mayoría de las proteínas R (también llamadas proteínas NB-LRR) contienen un sitio central de unión a nucleótidos (NB), y un dominio C-terminal con repeticiones ricas en leucinas (LRR) que pueden interactuar, directa o indirectamente, con las moléculas efectoras del patógeno que, en este caso, reciben el nombre de efectores de avirulencia (Jones y Dangl, 2006).

Los procesos de reprogramación celular inducidos tras el reconocimiento que se establece por la acción de las proteínas R y los efectores de avirulencia, son similares a los descritos anteriormente para la resistencia basal, aunque existen diferencias entre ellos referentes a los primeros procesos de señalización, así como a la intensidad y el tiempo de inducción de la respuesta (Jones y Dangl, 2006; Tsuda y col, 2009; Tsuda y Katagiri, 2010).

En términos evolutivos se postula que la resistencia basal, por el hecho de activarse en respuesta a moléculas patogénicas conservadas, es anterior a la aparición de la resistencia inducida. Esta idea se basa en el hecho de que, en la mayoría de los casos, los MAMPs se corresponden con moléculas esenciales para la supervivencia del patógeno, mientras que los efectores que participan en la activación de la defensa inducida, actúan de forma específica interfiriendo con el metabolismo de la planta para facilitar la infección (Zipfel, 2009).

1.2.3. Resistencia Sistémica Adquirida

La activación de la respuesta de defensa de la planta afecta, también, a los tejidos sistémicos alejados del punto de infección, en los que, al igual que en las zonas infectadas, se induce una respuesta inmune, denominada resistencia sistémica adquirida o SAR (del inglés *systemic acquired resistance*), que protege a la planta frente a infecciones secundarias. El establecimiento de la respuesta SAR confiere a la planta un estado fisiológico, conocido como “priming”, que le permite responder de forma más rápida e intensa ante una nueva situación de estrés biótico, y que potencia de forma eficaz su capacidad para restringir la infección y la progresión de los patógenos en la planta (Durrant y col., 2004; Grant y Lamb, 2006; Shah, 2009; Carr y col., 2010). La defensa sistémica puede ser activada por la acción de distintos tipos de patógenos, tanto biotrofos como necrotrofos, así como por microorganismos no patogénicos e incluso por la aplicación directa de MAMPs (Mishina y Zeier, 2007).

Independientemente del modo de inducción, la activación de la respuesta SAR está asociada con el incremento en los niveles de la hormona de defensa ácido salicílico, tanto en los tejidos locales, en los que tiene lugar la infección, como en los tejidos distales en los que se induce (Van Loon y col., 2006).

La respuesta SAR se inicia en los tejidos infectados en los que, presumiblemente, se genera una señal móvil, que se transfiere y percibe en los tejidos distales, no infectados, en los que se activa la resistencia. Esta idea se sustenta en los resultados que demuestran que la aplicación de los exudados recogidos de hojas infectadas pueden inducir resistencia en plantas no infectadas (Maldonado y col., 2002; Chaturvedi y col., 2008). El interés por dilucidar la naturaleza de la señal móvil, inductora de la respuesta SAR, ha generado una intensa actividad investigadora que ha permitido revelar la acción de distintas moléculas como señales inductoras, entre las que se incluyen el metil-salicilato, los jasmonatos, el ácido azelaico, el glicerol-3-fosfato y la proteína DIR1 implicada en el transporte de lípidos, siendo importante resaltar que una parte significativa de los compuestos identificados son de naturaleza lipídica (Maldonado y col., 2002; Chaturverdi y col., 2008; Vlot y col., 2008; Sun Jae Kwon y col., 2009; Bidisha Chanda y col., 2011; Truman y col., 2007; Jung y col., 2009; Buhot y col., 2004). Por otro lado, y apoyando esta idea, cabe mencionar que los mutantes *sfd1* (*suppressor of fatty acid desaturase deficiency*) y *dir1* (*defective in induced resistance*), afectados en el metabolismo de lípidos, son deficientes en el establecimiento de la respuesta SAR, y que el defecto de estos mutantes contrasta con su fenotipo silvestre durante la activación de resistencia local frente a la infección de patógenos bacterianos (Maldonado y col., 2002; Nandi y col., 2004; Suzuki y col., 2004).

Finalmente cabe decir, que si bien se ha asumido que la activación de una respuesta SAR forma parte de la respuesta de defensa inducida, existen ejemplos recientes que demuestran que algunos PAMPs, tales como es el caso de las proteínas harpin procedentes de distintos microorganismos, la flagelina y determinados lipopolisacáridos, poseen la capacidad de activar tanto una respuesta de defensa basal en los tejidos tratados, como una respuesta SAR en tejidos distales al punto de aplicación de los compuestos mencionados (Ron y Avni, 2004; Naito y col., 2007, 2008; Mishina y Zeier, 2007).

1.2.4. Rutas de señalización y hormonas vegetales implicadas en la regulación de la defensa vegetal

Los estudios realizados con objeto de identificar las hormonas vegetales que regulan las rutas de señalización que se activan en respuesta a la presencia de los patógenos, han permitido demostrar la participación del ácido salicílico (SA), los jasmonatos (JAs) y el etileno (ET) como las principales moléculas señalizadoras de la respuesta de defensa vegetal (Thomma y col., 2001; Pieterse y col., 2009). La ruta de señalización regulada por la acción del SA está asociada, fundamentalmente, con la resistencia a patógenos biotrofos, mientras que las rutas de transducción en las que intervienen el JA y el ET median, normalmente, la resistencia a microorganismos necrotrofos, indicando que la activación de las rutas de defensa depende, en gran parte, de la forma de vida del patógeno y de su modo de infección.

El SA constituye una de las moléculas esenciales de la resistencia vegetal frente a patógenos, desempeñando un papel relevante en respuestas tales como la activación de la resistencia inducida (Feys y col., 2001; Loake y Grant, 2007), el establecimiento de la HR, la limitación del crecimiento de patógenos virulentos (Clarke y col., 2001; Álvarez, 2000; Vlot y col., 2009) y la inducción de la respuesta SAR (Vlot y col., 2009). El aumento en los niveles endógenos de SA, tras el reconocimiento de un patógeno, provoca cambios esenciales en el potencial redox de la célula que dirigen importantes procesos de señalización. Dentro de los cambios caracterizados, cabe resaltar que la reducción de la proteína NPR1, esencial en esta ruta de señalización, provoca su desagregación en el citoplasma celular, donde se encuentra formando oligómeros, a su forma monomérica activa, en la que se trasloca al núcleo para actuar como coactivador transcripcional, potenciando la unión de factores de transcripción del tipo TGA a los elementos reguladores de los promotores de los genes de respuesta a SA (Dong, 2004; Spoel y col., 2009).

Al igual que el SA, el JA regula la inducción de un importante número de genes de defensa. Estudios recientes han permitido determinar que la activación de la señalización dependiente del JA ocurre tras la interacción de esta hormona con la proteína COI1 del complejo de ubiquitinación SCF^{COI1}. Esta interacción dirige la degradación de los represores JAZ, y la liberación de factores de transcripción tales como las proteínas MYC2, ERF1 o ORA59, que actuarán a su vez modificando la expresión de los genes de defensa correspondientes (Staswick, 2008; Fonseca y col., 2009; Koo y Howe, 2009; Browse, 2009; Wu y Baldwin, 2010).

Finalmente, podemos mencionar que la ruta de señalización dependiente del ET ha sido ampliamente caracterizada (Guo y Ecker, 2003; Guzmán y Ecker, 2003;

López y col., 2008; Wang y col., 2004) y que esta hormona actúa de manera coordinada (Onkokesung y col., 2010), generalmente de forma sinérgica, con el JA (Penninckx y col. 1998). La percepción del ET se establece a través de receptores, como el ETR1, localizados en la membrana del retículo endoplasmático (Kendrick y Chang, 2008), que en ausencia de la hormona actúan como reguladores negativos de la señalización. Dicha represión, se libera al aumentar la concentración de ET en la célula, permitiendo la señalización aguas abajo a través de la activación de la proteína EIN2, que controla la mayor parte de las respuestas reguladas por esta hormona. Posteriormente, la estabilización de EIN3 conduce a la activación de un número importante de factores transcripcionales, tanto activadores como represores, que serán en último término los responsables de regular la expresión de los genes dependientes de ET (Broekaert y col., 2006; Kendrick y Chang, 2008; Yoo y col., 2009).

Numerosos estudios dirigidos a examinar la activación y el papel de las rutas de defensa han puesto de manifiesto, que dichas respuestas interactúan entre sí estableciendo una compleja red de señalización, cuya coordinación juega un papel esencial en la activación de una respuesta de defensa eficaz que varía en respuesta a la infección de diferentes tipos de patógenos. (Robert-Seilaniantz y col., 2007; López y col., 2008; Koornneef y Pieterse, 2008; Spoel y Dong, 2008; Kazan y Manners, 2008; Tsuda y col., 2009).

Además de las hormonas de defensa descritas, estudios recientes han demostrado que la participación de otras fitohormonas, tales como brasinoesteroides, auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido abscísico, juega un papel relevante en la activación de una respuesta de defensa vegetal. Así, la acción de estas hormonas no estaría directamente dirigida a limitar el crecimiento del patógeno, sino destinada a regular procesos igualmente críticos para la supervivencia de la planta, tales como la redistribución de recursos, el control de la muerte celular, la regulación del estrés por agua, etc., (Melotto y col., 2006; Robert-Seilaniantz y col., 2007; López y col., 2008; Navarro y col., 2008).

Las interacciones entre estas rutas de señalización, a través de redes complejas de señalización, representan una importante ventaja adaptativa para las plantas, que les permite regular de forma precisa la respuesta frente a distintos patógenos. Sin embargo, este sistema de regulación es, con frecuencia, utilizado por los patógenos para interferir con los mecanismos de defensa de la planta. De hecho, los patógenos han desarrollado la capacidad de producir hormonas vegetales y compuestos funcionalmente homólogos a éstas, que les permiten manipular la homeostasis hormonal de la planta. Así, se ha descrito la producción de ET por parte

del hongo necrotrofo *Botrytis cinerea* (Cristescu y col., 2002), de auxinas en el caso de bacterias patógenas (Nomura y col., 2005) y de giberelinas por parte del hongo necrotrofo *Gibberella fujikuroi* (Robert-Seilaniantz y col., 2007). Igualmente, existen numerosos trabajos que demuestran que la toxina coronatina, producida por la bacteria *Pseudomonas syringae*, actúa mimetizando la acción del JA para interferir con la activación de la ruta de señalización dependiente de SA (Brooks y col. 2005; Uppalapati y col., 2007). Además de la producción de hormonas vegetales, los patógenos actúan modificando las rutas de señalización de la planta a través de los llamados efectores que, tras su liberación a la célula vegetal, poseen la capacidad de modular y reprogramar el metabolismo de la planta y redirigirlo para favorecer su desarrollo e interferir con la activación de la defensa. Uno de los ejemplos mejor documentados en este sentido han sido los trabajos en los que se demuestra que la liberación de efectores, procedentes de la bacteria *Pseudomonas syringae*, provoca un aumento de la producción de ABA en la planta que, a su vez, interfiere con la activación de la ruta de defensa dependiente del SA, favoreciendo así la infección (Flors y col., 2008; de Torres Zabala y col., 2009).

1.2.5. Sistema de secreción bacteriano

Según indicamos en las secciones anteriores, los patógenos, durante su evolución han desarrollado sofisticados mecanismos para escapar o suprimir el proceso de reconocimiento, que permite a la planta detectar su presencia. Como parte de estos mecanismos cabe resaltar que, la liberación de efectores desde el patógeno hasta la planta, constituye una de las estrategias de virulencia más eficaces para interferir con la defensa de la planta. La liberación de efectores ha sido ampliamente examinada, en el caso de los patógenos bacterianos, en los que se han caracterizado diversos sistemas de secreción, responsables de la liberación de distintos tipos de moléculas. Así el sistema de secreción Tipo II, permite a las bacterias del género *Erwinia* liberar enzimas con capacidad para degradar la pared celular (Cianciotto, 2005), mientras que el sistema de secreción Tipo IV lo utiliza *Agrobacterium tumefaciens* para transferir las proteínas y el ADN que se integrará en el genoma de la planta, como parte de la estrategia de virulencia de este patógeno (Juhás y col., 2008). Dentro de los sistemas de secreción caracterizados, el denominado Tipo III (TTSS) empleado por bacterias del género *Pseudomonas*, ha sido examinado en mayor detalle. El sistema de secreción Tipo III constituye un complejo multiprotéico en forma de pilus, que actúa inyectando un número importante de proteínas en el interior de la célula vegetal (McCann y Guttman, 2008; Block y col., 2008). La estructura del sistema

de secreción TTSS es similar a la correspondiente al cuerpo basal de los flagelos bacterianos, aunque contiene componentes adicionales que facilitan el contacto con la célula hospedadora. Así, el pilus forma un conducto entre la bacteria y la membrana vegetal, en la que genera un poro a través del que se facilita la translocación de las proteínas efectoras a la célula hospedadora. A este efecto, los patógenos deben atravesar primero la pared celular vegetal, rica en lipopolisacáridos, para establecer contacto con la membrana plasmática, ayudándose para ello de proteínas específicas, denominadas helper, que facilitan la degradación de la pared celular vegetal (Hauser, 2009).

Se ha descrito que los efectores liberados a la célula vegetal, mediante el sistema de secreción TTSS, pueden realizar distintas acciones para interferir con la defensa de la planta, tales como la inhibición de la formación y de la deposición de calosa, la manipulación de la señalización mediada por las hormonas vegetales, la supresión de la muerte celular programada, la alteración de la actividad de determinadas proteínas de defensa, principalmente proteínas R y quinasas, y la modificación de la actividad transcripcional del huésped (Shang y col., 2006; Jelenska y col., 2007; Robert-Seilantantz y col., 2007; Lewis y col., 2009; Jamir y col., 2004; Büttner y Bonas, 2010).

1.3. OXILIPINAS

La generación de compuestos lipídicos, a partir de los ácidos grasos de la membrana celular, ha sido descrita tanto en células animales como vegetales, en las que dichos compuestos juegan un importante papel en la activación de la respuesta inmune. Además, los ácidos grasos y sus derivados constituyen, no sólo una importante fuente de energía, sino que su actuación como señales celulares contribuye a la regulación de procesos relacionados con el desarrollo de las plantas, así como en la adaptación de éstas a distintas condiciones de estrés (Feussner y Wasternack, 2002; Shah, 2005; Howe y Jander, 2008). Igualmente, los lípidos constituyen uno de los componentes esenciales de la membrana celular, formando parte de polímeros estructurales, tales como suberina y las ceras, que actúan como barreras de protección frente a patógenos y a condiciones ambientales adversas (Beisson y col., 2007; Iba, 2002).

1.3.1. Síntesis de oxilipinas

Dentro de los derivados lipídicos caracterizados, las oxilipinas constituyen una familia de metabolitos secundarios, con estructuras y actividades biológicas diversas, que se originan mediante la oxidación de ácidos grasos, predominantemente los ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3).

La oxidación de ácidos grasos ocurre, preferentemente, de forma enzimática mediante la acción de los enzimas lipoxigenasa y α -dioxigenasa (Hamberg y col., 1999; Feussner y Wasternack, 2002). Además, la incorporación de oxígeno en los ácidos grasos puede ocurrir mediante oxidación química, como consecuencia de su interacción con especies reactivas de oxígeno, tales como los radicales hidroxilo y el singlete de oxígeno. La oxidación no enzimática de ácidos grasos da lugar a la producción de un grupo específico de oxilipinas, entre las que los denominados fitoprostanos han sido los más caracterizados (Mueller and Berger, 2009).

Los enzimas α -DOXs actúan sobre ácidos grasos de distinto tamaño y grado de saturación, generando un primer producto, altamente reactivo, que contiene un grupo hidroperóxido en el carbono α de la molécula (Hamberg y col., 1999). Este producto primario, se modifica de forma espontánea dando lugar a tres tipos de derivados, un hidroxiácido con el mismo número de carbonos que el ácido graso utilizado como sustrato, y un aldehído y un ácido graso con un carbono menos, que se generan mediante descarboxilación y oxidación de los hidroperóxidos primarios (Hamberg y col., 2003).

Al igual que en el caso de las α -DOXs, la oxidación de ácidos grasos catalizada por los enzimas lipoxigenasa da lugar a la formación de hidroperóxidos. Existe, sin embargo, una diferencia importante entre estos dos tipos de enzimas. Así, mientras que como indicamos anteriormente, los enzimas α -DOX pueden utilizar una amplia variedad de ácidos grasos como sustrato, los enzimas lipoxigenasas actúan exclusivamente sobre ácidos grasos poliinsaturados, que contengan dobles enlaces conjugados en su molécula, como es el caso de los ácidos linolénico y linoleico, que constituyen los principales sustratos de este tipo de enzimas. Dentro de los enzimas con actividad lipoxigenasa se distinguen dos grupos de isoenzimas, denominadas 9-LOXs y 13-LOXs, dependiendo de que la incorporación de oxígeno ocurra en el carbono 9 o 13 del ácido graso. Los hidroperóxidos derivados de la acción de las lipoxigenasas son modificados posteriormente por la acción de actividades enzimáticas secundarias, tales como aleno óxido sintasas (AOS), divinil éster sintasas (DES), hidroperóxido liasas (HPL), peroxigenasas (PXG), epoxi alcohol sintasas

(EAS), las propias LOX y peroxigenasas/epóxido hidrolasas (Bleé, 1998; Mosblech y col., 2009).

El análisis de las actividades enzimáticas descritas ha permitido comprobar que, en la mayoría de los casos, están codificadas por familias multigénicas cuya identificación es indispensable para analizar su funcionalidad. Los estudios realizados con objeto de identificar los genes que codifican los enzimas α -DOXs y LOXs en plantas de *Arabidopsis* nos han permitido identificar la presencia de dos genes α -DOX, denominados como α -DOX1 y α -DOX2, así como de 6 genes lipoxigenasa de los que los designados como LOX1 y LOX5 codifican enzimas con actividad 9-lipoxigenasa, mientras que las cuatro restantes (LOX2, LOX3, LOX4 y LOX6) corresponden a enzimas con actividad 13-lipoxigenasa (Bannenberg y col., 2009a). La actividad LOX en plantas de *Arabidopsis* está principalmente asociada a la envoltura y al estroma de los cloroplastos, mientras que, por el momento, se desconoce la localización celular de los enzimas α -DOXs.

Al igual que ocurre con los enzimas α -DOX y LOX, existen numerosos estudios dirigidos a identificar los genes que codifican cada una de las actividades enzimáticas involucradas en la modificación y síntesis de las diferentes oxilipinas que se sintetizan en la planta. Los resultados de estos estudios han permitido comprobar que estos enzimas están también codificados por familias génicas, y que no todas las actividades enzimáticas están presentes en todas las especies vegetales. En este sentido cabe mencionar la ausencia de la actividad divinil éter sintasa (CYP74D) en el genoma de *Arabidopsis*.

Finalmente, es importante resaltar que el estudio de las rutas biosintéticas involucradas en la síntesis de oxilipinas y la cuantificación de los productos derivados han puesto de manifiesto que las rutas caracterizadas no son independientes, sino que interaccionan entre sí, estableciendo una red metabólica que aumenta la flexibilidad de las plantas en su respuesta frente a distintos estímulos. Esta circunstancia, aunque beneficiosa para la adaptación de las plantas a distintas situaciones de estrés, dificulta de forma significativa la asignación de una función específica a cada una de las rutas y enzimas caracterizadas (Hamberg y col., 2003; Halitschke y col., 2004; Velloso y col., 2007). En este sentido cabe destacar, la interacción de los enzimas 9-LOX y α -DOX, que actúan de forma coordinada durante la síntesis de derivados lipídicos doblemente oxigenados, y que también antagonizan entre sí mediante la competición por un sustrato común y por los derivados oxigenados producidos por la acción de cada una de ellas (Hamberg y col., 2003; Velloso y col., 2007).

1.3.2. Funciones de las oxilipinas

El reciente interés en el estudio de la función de las oxilipinas, y de su relación con la respuesta de las plantas frente a distintas situaciones de estrés, ha provocado un importante avance en nuestro conocimiento sobre la naturaleza de dichas moléculas, su producción y las acciones que realizan. Los resultados de estos trabajos han permitido determinar que la expresión de una gran parte de los genes involucrados en la síntesis de oxilipinas se induce en la planta en respuesta a la infección por distintos patógenos, dando lugar a la acumulación de los compuestos correspondientes (Göbel y col., 2001; Ponce de León y col., 2002; Andersson y col., 2006).

De forma generalizada, la caracterización funcional de oxilipinas durante la defensa de la planta, ha permitido distinguir la capacidad de determinados derivados para ejercer tres tipos de actividades: una actividad señalizadora que conduce a la inducción de genes específicos de la planta, una actividad reguladora del proceso de muerte celular que acompaña a la inducción de la respuesta de defensa vegetal y, finalmente, una acción directa como moléculas con actividad antimicrobiana. (Vollenweider y col., 2000; Stintzi y col., 2001; Montillet y col., 2005; Prost y col., 2005; Andersson y col., 2006; Kishimoto y col., 2008).

Según indicamos anteriormente, dentro de esta familia de metabolitos, los jasmonatos han sido extensamente caracterizados y su participación en distintas respuestas, tales como la defensa frente a necrotrofos, la respuesta a herida mecánica, la protección frente a insectos y la maduración del polen, ha sido ampliamente demostrada (Staswick, 2008; Fonseca y col., 2009; Koo y Howe, 2009; Wu y Baldwin, 2010; Browse, 2009). Además, los estudios realizados han permitido asignar funciones relevantes a otras oxilipinas generadas tanto a través de la ruta iniciada por la acción de los enzimas 13-LOX, así como a través del resto de las rutas involucradas en la síntesis de oxilipinas. Así, una parte de los compuestos sintetizados a través de la ruta de las 13-LOXs, tales como el 12-OxoPDA, precursor del JA, y otros derivados C6 producidos por la acción de la 13-HPL, actúan como reguladores de la expresión de genes de defensa (Farmer y col., 2003), mientras que los correspondientes KOTs y KODs contribuyen tanto a la inducción de genes de defensa, como a la activación de procesos de muerte celular. Por otro lado, los derivados 13-HPOT y 13-HOT actúan también como inductores de la expresión génica y como compuestos antimicrobianos, inhibiendo el crecimiento de patógenos vegetales (Weichert y col., 1999; Vollenweider y col., 2000; Graner y col., 2003; Prost y col., 2005). Otros ejemplos de oxilipinas con actividad antimicrobiana son el *cis*-3-hexenol y

el *trans*-2-hexenal, derivados igualmente de la ruta iniciada por la acción de las 13-LOX (Croft y col., 1993; Prost y col., 2005).

Además, existen datos recientes que demuestran la participación de las rutas iniciadas por la acción de las α -DOXs y 9-LOXs, así como de los productos sintetizados a través de dichas rutas en la defensa vegetal. Así, el estudio de los enzimas α -DOX reveló la participación de la proteína α -DOX1 en la defensa de la planta frente a la infección de patógenos biotrofos, y su función en el control del daño celular asociado con la generación del estrés oxidativo, que acompaña a la inducción de la defensa vegetal frente a este tipo de patógenos (Sanz y col., 1998; Ponce de León y col., 2002; Hamberg y col., 2003). Igualmente, el estudio de esta actividad enzimática ha puesto de manifiesto su participación en la respuesta de las plantas frente al ataque de insectos (Steppuhn y col., 2010). Del mismo modo, el papel de la ruta 9-LOX en la defensa de tabaco y *Arabidopsis* se ha puesto de manifiesto mediante la utilización de plantas transgénicas, alteradas en los niveles de expresión de los genes correspondientes, y de plantas mutantes, carentes de dichas actividades enzimáticas (Rancé y col., 1998; Mene-Saffrane y col., 2009; Andersson y col., 2006; Vellosillo y col., 2007; Hwang y Hwang, 2010; López y col., 2011). Al igual que se describe anteriormente, los compuestos derivados de estas rutas biosintéticas actúan como reguladores de la expresión génica y como compuestos antimicrobianos (Bleé, 1998; Göbel y col., 2002; Weber y col., 1999; Prost y col., 2005; Vellosillo y col., 2007; Hwang y Hwang, 2010; López y col., 2011). Igualmente, estudios adicionales han demostrado el papel de estos derivados en la formación de los síntomas que se producen como resultado de la infección (Hamberg y col., 2003).

Además de su papel en la respuesta de defensa y, al igual que en el caso de las oxilipinas derivadas de la actividad 13-LOX, la caracterización de los enzimas α -DOX y 9-LOX ha puesto de manifiesto su participación en procesos de desarrollo. En concreto el papel del enzima α -DOX2 en el desarrollo de las plantas de tomate se concluye de los resultados que demuestran que la falta de este enzima provoca graves alteraciones fenotípicas, que afectan a todos los estadios del desarrollo de la planta. Una situación semejante ocurre en las plantas de *Arabidopsis*, en donde la expresión del gen α -DOX2 no se activa en respuesta a patógenos, sino que varía de acuerdo al estado de desarrollo de la planta, aunque a diferencia de lo que ocurre en plantas de tomate, la falta de actividad α -DOX2 en *Arabidopsis* no está acompañada de alteraciones fenotípicas visibles. Finalmente, cabe mencionar el papel de los enzimas 9-LOX en el desarrollo radicular en donde su actividad contribuye a regular el proceso de emergencia de las raíces laterales (Vellosillo y col., 2007).

Los resultados descritos ponen de manifiesto que, a pesar de los recientes avances en el estudio de las rutas de oxilipinas iniciadas por la acción de los enzimas α -DOX y 9-LOX, así como de sus derivados, el conocimiento de estos compuestos y de la acción que realizan, es todavía limitado. Por ello en el presente trabajo nos propusimos profundizar en el estudio de estas rutas con objeto de determinar su función, así como la de los compuestos derivados correspondientes. Para desarrollar estos objetivos hemos desarrollado una estrategia genética en la que hemos procedido a aislar y caracterizar plantas mutantes carentes de dichas actividades enzimáticas y, por tanto, de las oxilipinas procedentes de la acción de las mismas y, por otro, plantas mutantes afectadas en los procesos de señalización que regulan la respuesta de las plantas a la aplicación de oxilipinas específicas. En nuestros estudios hemos examinado la respuesta de ambos tipos de mutantes frente a distintos patógenos y la acción de oxilipinas específicas como agentes protectores frente a la infección de patógenos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El interés de este trabajo está dirigido a profundizar en el conocimiento del papel de las oxilipinas derivadas de la acción de los enzimas α -DOX y 9-LOX en la respuesta de defensa vegetal frente a patógenos. Para ello se han realizado tres aproximaciones diferentes: i) la generación y caracterización de plantas mutantes deficientes en la síntesis de las oxilipinas de interés, ii) el estudio funcional de las oxilipinas producidas a través de las rutas 9-LOX y α -DOX, utilizando para ello derivados puros y examinando el efecto de dichos compuestos en la respuesta de defensa de la planta, y iii) la caracterización del mutante *noxy1*, afectado en la ruta de señalización que se activa en respuesta a la presencia de oxilipinas derivadas de la acción de los enzimas 9-LOX. En estos estudios hemos procedido a examinar la interacción de las plantas descritas con distintos tipos de patógenos, tanto a nivel local, como sistémico, y a determinar la acción de las oxilipinas en esta respuesta. Las respuestas examinadas han sido caracterizadas en detalle utilizando metodologías diversas, que nos han proporcionado nuevos datos acerca de la participación de las rutas examinadas en la defensa de la planta, así como de los mecanismos moleculares que determinan la acción de las oxilipinas de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO, CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO

3.1.1. *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa DH5 α (Hanahan, 1983) para la propagación y purificación de plásmidos. Las bacterias se cultivaron a 37°C en medio LB (Sambrook y col., 1989).

3.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido pGV2260, se empleó para la transformación de las plantas con las construcciones de interés (Daebelaere y col., 1985). Las bacterias se cultivaron a 28°C en medio LB con rifampicina (100 mg/L) como antibiótico de selección.

3.1.3. Estirpes bacterianas fitopatógenas

Para los ensayos de patogenicidad se utilizaron las cepas bacterianas fitopatógenas *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1* (Debener y col., 1991; Innes y col.; 1993), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Whalen y col., 1991), y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrpA*, suministrada por el Profesor M. Grant (University of Exeter).

3.1.4. Especies fúngicas fitopatógenas

Los hongos utilizados en los ensayos de patogenicidad fueron *Alternaria brassicicola* (cepa MUCL20297), y *Botrytis cinerea* (cepa BMM1), ambos suministrados por la Dra. Brigitte Mauch-Mani (Universidad de Fribourg).

3.1.5. Medios de cultivo para microorganismos

3.1.5.1. Medios de cultivo para bacterias

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (para *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*): 1% de bacto triptona, 0,5% de extracto de bacto levadura y 1% de NaCl.

- **Medio King's B (KB)** (para cultivos de bacterias fitopatógenas): 2% proteosa peptona, 2% glicerol, 6,5 mM K₂HPO₄ y 6 mM MgSO₄-7H₂O.

- **Medio SOB** (para la transformación de *E. coli*): 2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,05% de NaCl y KCl 250 mM.

- **Medio SOC** (para la transformación de *E. coli*): 97% de medio SOB, 2% de glucosa 1 M y 1% de Cl₂Mg 1 M.

3.1.5.2. Medio de cultivo para hongos

- **Medio PDA**: 20% potato, 2% dextrosa, 15 g/L agar (Disco).

- **Medio PDB**: 24 g de potato dextrosa y 1 L de agua destilada.

3.1.6. Mantenimiento de los microorganismos

3.1.6.1. Mantenimiento de cepas bacterianas.

E. coli se cultivó a 37°C en medio LB, añadiendo 15 g/L de agar para cultivos en medio sólido.

Los cultivos de *Pseudomonas* se crecieron en medio King's B (King y col., 1954), a una temperatura de 28°C.

Las cepas originales de *E. coli* así como las bacterias fitopatógenas utilizadas se mantuvieron, 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 una solución de glicerol al 40%, manteniéndolas a una temperatura de -80°C.

3.1.6.2. Mantenimiento de hongos

Los hongos se crecieron durante 8 días en placas de medio PDA, a temperatura ambiente y 100% de humedad. Para el mantenimiento de estos microorganismos, las esporas se resuspendieron en una solución de glicerol al 10%, y se almacenaron a -80°C.

3.2. MANIPULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

3.2.1. Obtención de células competentes

La obtención de células competentes DH5 α de *E. coli* se realizó siguiendo el método descrito por Inoue y col. (1990).

3.2.2. Transformación bacteriana.

La transformación de células competentes DH5 α de *E. coli* se llevó a cabo mediante choque térmico a 42°C, según el protocolo descrito en Sambrook y col. (1989). Las células transformadas se sembraron en medio LB, junto con los antibióticos necesarios según el plásmido utilizado, y se incubaron una noche a 37°C.

Para la transformación de células competentes de *A. tumefaciens* se descongeló una alícuota de 200 μ l en hielo a la que se le añadió 0,1-1 μ g de ADN plasmídico de interés. Las células se mantuvieron 5 minutos en hielo, 5 minutos en nitrógeno líquido y otros 5 minutos a 37°C. Se les añadió 1 mL de medio LB, se incubaron durante 1 hora a 28°C (con agitación) y se plaquearon 200 μ l en placas con medio LB más los antibióticos de selección. Las placas se incubaron 2 días a 28°C.

3.3. MATERIAL VEGETAL

En este trabajo se han utilizado los ecotipos silvestres Columbia (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler) de la especie vegetal *Arabidopsis thaliana*.

Se utilizaron los mutantes de inserción de ADN-T SALK_059431 (*lox1-1*) y SALK_005633 (α -*dox1-1*), pertenecientes a la colección de líneas de ADN-T del Salk Institute (Alonso y col., 2003), que fueron proporcionados por el NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center).

Otros mutantes utilizados en este trabajo fueron: *coi1-1*, alelo mutante del locus At2g39940; *abi1.2*, alelo mutante del locus At4g26080, cedido por P. L. Rodríguez (IBMCP-CSIC); y el mutante *npr1*, alelo mutante del locus At1g64280, suministrado por el NASC.

3.3.1. Crecimiento y mantenimiento de plantas

Para su germinación en tierra, las semillas se vernalizaron en oscuridad a 4°C y se cubrieron con plástico para mantener niveles altos de humedad. La vernalización de las semillas se realizó en alveolos sobre tierra que contenía vermiculita en proporción 3:1. Tras tres días de vernalización, los alveolos se pasaban al invernadero, o a cámaras de crecimiento, para favorecer el crecimiento vegetal en condiciones de luz variable. De forma generalizada, las plantas se desarrollaban bajo una iluminación de 6000 luxes de intensidad, 14 horas de luz, 21°C y 60% de humedad relativa. Para la caracterización del mutante *noxy1* se utilizaron intensidades de 500 y 3500 luxes, sin variaciones en el resto de los parámetros. En la mayoría de los casos las plantas se analizaban a las 3-4 semanas de crecimiento.

Para experimentos *in vitro*, las semillas se esterilizaron con lejía al 5% con 0,001% de Tween 20, durante 7 minutos. A continuación, las semillas se lavaron exhaustivamente en agua estéril y se estratificaron en tubos con agua durante 3 días a 4°C y en oscuridad. Dichas semillas se sembraron en medio MS (4,4 g/L, Murashige y Skoog, 1962) con 1% de sacarosa y 0,7% de agar. El medio se ajustó a pH 5,7. Las placas se sellaron con cinta Micropore porosa (3M Health Care, St. Paul, MN) y se crecieron en cámaras climáticas a una temperatura de 22°C y una humedad relativa de 50%.

3.4. VECTORES DE CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

Los vectores descritos a continuación se utilizaron a lo largo de este estudio:

- pGEMT-Easy (Promega): utilizado para la clonación de fragmentos de ADN obtenidos por PCR. El vector comercial posee timinas desapareadas en sus extremos 5' que hibridan con las adeninas incorporadas en las reacciones de amplificación por el enzima *Taq* polimerasa. El vector contiene el gen de resistencia a ampicilina y el gen *lacZ* que permite la selección azul-blanca de las cepas transformantes.
- pDONR201 (Invitrogen): utilizado para la clonación de fragmentos de ADN mediante el sistema Gateway, que permite la incorporación de fragmentos de ADN mediante recombinación homóloga, gracias a la presencia de las secuencias *attP1* y *attP2*. Este vector se denomina “de entrada” y se usa para clonar un inserto desde donde será, posteriormente, transferido, también mediante recombinación homóloga, a los denominados vectores “destino”. Posee los genes que confieren resistencia a los antibióticos cloramfenicol y kanamicina.
- pGWB1: utilizado como vector destino al que se transfieren los fragmentos de ADN de interés desde los vectores de entrada usados en el sistema Gateway de clonación. Este vector permite realizar clonajes simples sin incorporar secuencias o elementos reguladores adicionales al fragmento de ADN procedente del vector de entrada. Este vector es binario y contiene genes de resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina (Nakagawa y col., 2007).

3.5. TRATAMIENTOS EN PLANTAS

3.5.1. Inoculación de plantas con bacterias fitopatógenas

La infección de plantas con bacterias fitopatógenas se realizó mediante inyección de un inóculo bacteriano sobre el envés de la hoja, utilizando jeringuillas de

1 mL plastipak (Becton Dickinson) estériles y presionando suavemente sobre la superficie foliar.

El inóculo se prepara a partir de un cultivo fresco en una placa Petri, con el que se procede a inocular una segunda placa en la que la bacteria crecerá, formando un césped, en presencia de los antibióticos de selección apropiados. Tras 24 h de crecimiento, el césped bacteriano se recoge con una espátula y se resuspende en una solución de Cl_2Mg 10 mM. La densidad del cultivo se ajusta mediante lectura en espectrofotómetro a $\text{OD}_{595\text{nm}}$, de manera que las densidades ópticas de 0,1, 0,01 o 0,001, corresponden a densidades de 10^7 , 10^6 y 10^5 unidades formadoras de colonia (ufc/mL), respectivamente, que se emplean según el ensayo que se vaya a realizar. Así, para la realización de curvas de crecimiento la densidad del inóculo empleado es de 10^5 ufc/mL, mientras que la formación de síntomas y el análisis de la expresión génica se utilizó un inóculo de 10^6 ufc/mL. Finalmente, para la activación de la respuesta sistémica se emplearon inóculos más concentrados de 10^7 ufc/mL.

3.5.2. Curvas de crecimiento bacteriano

La determinación del crecimiento bacteriano, en las hojas de las plantas inoculadas, se realizó según el protocolo descrito por Whalen y col., (1991). Para ello, se inocularon hojas sanas de la roseta basal, de plantas de 4 semanas, con una suspensión bacteriana que contenía 10^5 ufc/mL. A los tiempos apropiados (2, 3, 4 días), se cortaron discos de 0,6 cm de diámetro de las zonas inoculadas, que se homogenizaron en MgCl_2 10 mM, mediante el uso del robot MM300 (Retsch). Para cada tiempo analizado, se utilizaron 6 muestras independientes conteniendo, cada una de ellas, 3 discos de las hojas infectadas, seleccionadas al azar entre las plantas tratadas, con el fin de reducir la variabilidad que pudiese existir entre diferentes plantas de una misma línea. 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.

3.5.3. Inoculación de las plantas con hongos fitopatógenos

La respuesta de las plantas a la infección de hongos fitopatógenos se realizó preparando un inóculo en medio PDB, conteniendo una concentración de 7×10^5 esporas/mL, que se inoculó depositando una gota de 10 μL en 3 hojas distintas de cada una de las plantas examinadas. La respuesta de la planta a los hongos A.

brassicicola y *Botrytis cinerea* se valoró calculando el porcentaje de hojas que mostraban los síntomas de infección.

3.5.4. Medida del daño celular

La cuantificación del daño celular en los tejidos infectados se determinó midiendo la conductividad de los tejidos tratados, utilizando un conductímetro (Basic 30, Crisol). En este ensayo, se inocularon tres hojas por planta y ocho plantas por cada tiempo examinado. A partir de las hojas inoculadas se obtienen discos de 0,6 cm de diámetro (un disco/hoja), que se sumergen en 5 mL de agua milliQ (24 discos) y se mantienen en agitación y temperatura ambiente durante 6 h, antes de cuantificar la conductividad. Al igual que en casos anteriores, para cada planta y tiempo examinados, se realizaron al menos tres ensayos independientes y se determinó la media de los datos obtenidos en cada uno de ellos.

3.5.5. Tratamiento con oxilipinas *in vivo*

Las oxilipinas utilizadas a lo largo de nuestro estudio fueron proporcionadas por el Profesor Mats Hamberg (Instituto Karolinska, Suecia) y se mantienen a -80° hasta el momento de su utilización. Estos compuestos se inyectaron en la superficie del envés foliar a una concentración de 150 μM , salvo en el caso del 9-KOT con el que se ensayaron distintas concentraciones.

3.5.6. Tratamientos *in vitro*

El análisis de la respuesta de las plantas examinadas a la presencia de oxilipinas, hormonas vegetales y otros compuestos de interés se realizó mediante ensayos *in vitro*, en los que las semillas, previamente esterilizadas y vernalizadas, se crecieron en medio MS (Murashige-Skoog, pH 6, 1,5% de sacarosa y 1,5% de agar Bacto Agar; Becton Dickinson) conteniendo los productos de interés. Las condiciones de crecimiento fueron de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 22°C y una intensidad lumínica de $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (7000 luxes). En la mayor parte de los experimentos, las semillas se germinaron verticalmente en placas cuadradas y se transfirieron 4 días después a placas que contenían los compuestos objeto de estudio a las concentraciones seleccionadas (9-HOT, 25 μM ; 9-KOT, 25 y 50 μM ; isoxaben, 20 nM; SA, 50 μM ; JA, 10 μM y ABA 20 μM ; Rosa Bengala 5 μM ; Paraquat, 50 nM; H_2O_2 , 4 mM; Glicerol, 50 mM; Sorbitol, 100 mM y NaCl, 100 y 150 mM).

3.6. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.6.1. Tinción de calosa

La presencia de calosa en las hojas y raíces, sometidas a distintos tratamientos, se analizó mediante tinción con azul de anilina. Las muestras se destiñeron con etanol (96%) y posteriormente se rehidrataron con agua (sólo en el caso de las hojas). La tinción se realizó con una solución de azul de anilina (0,1%) durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua y se observaron al microscopio con luz UV.

3.6.2. Tinción de ión superóxido

Las plántulas de interés se sumergieron en una solución de NBT (azul nitro-tetrazolio cloruro, Promega) 0,5 mg/mL en fosfato potásico 0,1M pH 7, durante 30 minutos. En el caso de las plántulas, y para evitar el daño asociado a su manipulación, los tejidos vegetales se tiñeron directamente en la placa de cultivo donde se habían crecido (Carol y col., 2005). Una vez transcurrido el tiempo de tinción se paró la reacción con etanol del 96% y se observó la formación de depósitos azules con la ayuda del microscopio.

3.6.3. Tinción de agua oxigenada

La producción de H_2O_2 se examinó en hojas infectadas 48 h después de la inoculación con las distintas cepas bacterianas analizadas. La acumulación de H_2O_2 se visualizó mediante tinción con 3,3'-diaminobencidina tetracloruro (DAB) (Sigma-D-8001), según se describe en Thordal-Christensen y col. (1997). Las hojas se sumergieron en una solución de 1 mg/mL pH 3,8 de DAB durante unas 12 h a 25°C, tras lo cual se decoloraron con etanol del 96%.

3.6.4. Tinción de muerte celular

La muerte celular producida durante las infecciones bacterianas, o como consecuencia de la aparición espontánea de lesiones, se tiñó con una solución de Azul de tripano (10 mL de ácido láctico al 85%, 10 g de fenol, 10 mL de glicerol 98%, 10 mL de agua destilada y 20 mg de azul de tripano). Las hojas se hirvieron en un microondas durante 5 segundos y se clarificaron con una solución de cloral hidrato (50 g en 20 mL de agua destilada).

3.7. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS Y 9-KOT

3.7.1. Cuantificación de hormonas vegetales

Para los análisis hormonales se recogieron 0,5 g de material fresco por muestra, que se conservan liofilizados hasta su uso. El tejido seco se homogeneizó en agua milliQ y se le añadió una mezcla de estándares internos antes de realizar la extracción según el protocolo descrito en Flors y col. (2008). Se inyectó una alícuota de 20 μ l en un HPLC (Waters Alliance 2690 HPLC system, Milford, MA. U.S.A). Los niveles de hormonas se midieron en tejidos infectados local y sistémicamente con una suspensión bacteriana de 10^6 ufc/mL.

Para el examen de la acumulación de hormonas en respuesta al 9-KOT, las muestras se recogieron a distintos tiempos en hojas inoculadas con *Pst* DC3000 que, 48 h antes, habían sido pre-tratadas con 9-KOT o agua.

3.7.2. Cuantificación de 9-KOT

Para la determinación de los niveles de 9-KOT en los tejidos inoculados con las diferentes cepas se recogieron 0,4-0,7 g de tejido fresco, por muestra y tiempo examinado. Una vez congelados los tejidos, se homogenizaron en 10 mL de una solución de hidroxiclورو 0-metilhidroxilamina 30 mM en metanol. Las muestras se enviaron al laboratorio del Profesor Mats Hamberg (Instituto Karolinska, Suecia) para su análisis.

3.8. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.8.1. Aislamiento y preparación de plásmidos

Para la purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (5 mL de cultivo bacteriano) se utilizó el método de lisis alcalina con el kit "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen). Las preparaciones a gran escala (100 mL) se realizaron por cromatografía, utilizando el kit "Plasmid Midi Kit" (Qiagen).

3.8.2. Preparación de ADN genómico de plantas

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

Para la obtención de ADN a partir de un número elevado de muestras se utilizó el kit “BioSprint DNA Plant” (Quiagen), basado en la tecnología de partículas magnéticas, y el robot BioSprint 96, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8.3. 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 Logermann y col. (1987), y se cuantificó mediante espectrofotometría a una $\lambda=260$ nm (DO=1 equivale a 40 mg/mL).

3.8.4. Tratamiento enzimático del ADN

La manipulación enzimática del ADN, con enzimas de restricción u otras enzimas modificadoras, se hizo atendiendo a las especificaciones del proveedor y de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y col. (1989). Posteriormente, las enzimas se retiraron de la reacción mediante extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1).

3.8.5. Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN, obtenidos por digestión con enzimas de restricción, se llevaron a cabo utilizando el enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8.6. Elución de fragmentos de ADN

El aislamiento de fragmentos de ADN de interés se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior elución mediante el empleo del kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen).

3.8.7. 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 (Saiki y col., 1985) se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Perkin Elmer.

3.8.8. Sistema Gateway de Clonación

La tecnología Gateway permite la clonación de fragmentos de ADN mediante recombinación homóloga en vectores preparados específicamente para ello. Siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen), los fragmentos de interés se amplificaron mediante PCR usando los cebadores seleccionados, a los que se les añaden los extremos *attB1* (5'-GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN (secuencia específica)-3') y *attB2* (5'-GGG-GAC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN (secuencia específica)-3'), que proporcionan al fragmento amplificado los sitios de recombinación *attB*. Los fragmentos amplificados se introdujeron, utilizando la clonasa BP, en el vector de entrada pDONR201, de donde fueron transferidos posteriormente al vector destino pGWB1, mediante la clonasa LR.

3.8.9. Amplificación de los extremos 5' y 3' de ADNc

Para comprobar la secuencia correcta del ADNc del gen *NOXY1* se utilizaron los kits "5' y 3' Rapid Amplification cDNA ends" (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8.10. RT-PCR

El análisis semicuantitativo de la expresión génica de los genes *LOX1*, *α -DOX1* y *NOXY1* se llevó a cabo mediante ensayos de RT-PCR empleando los kits "DNase TURBO DNA-free" (Ambion), para eliminar posibles contaminaciones de ADN en las muestras, y "Titan One Tube RT-PCR System" (Roche Applied Science), para la reacción de retrotranscripción del ARN. Los fragmentos de interés se amplificaron utilizando los cebadores especificados en la Tabla 1. Como control interno de carga se usó el gen At1g43170 que codifica la proteína ribosomal 60S L3 (RPL3A), usando para su amplificación los cebadores mostrados en la misma tabla.

3.8.11. 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 μ g 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). Se usó como control interno el gen At1g43170. Los cebadores utilizados así como la longitud de los amplicones están descritos en la Tabla 1 (incluida en Materiales y Métodos).

3.8.12. Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR y en las secuenciaciones se obtuvieron de las casas comerciales Roche Molecular Biochemicals y Sigma Aldrich.

3.8.13. Secuenciación de ADN

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

3.8.14. Técnicas electroforéticas y transferencia de ácidos nucleicos

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 (Sambrook y col. 1989).

La resolución de ARN se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,5% conteniendo formaldehído a la concentración final del 6%, según se describe en Sambrook y col., (1989), y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los ácidos nucleicos se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon Hybond-N (Amersham), siguiendo el protocolo de la firma comercial. Los ácidos nucleicos se fijaron posteriormente a la membrana por exposición a luz UV (700 mJ/cm²).

3.8.15. Marcaje radiactivo e hibridación de ácidos nucleicos

Las sondas de ARN radiactivo utilizadas en los ensayos tipo northern, se sintetizaron mediante transcripción *in vitro*, en presencia de α -[³²P]CTP, utilizando el kit de transcripción de ARN de Stratagene. Los ADN molde se encontraban clonados en plásmidos que, previamente al marcaje, se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso.

Las membranas con el ARN transferido se prehibridaron durante al menos 2 horas en una solución de 5X SSC, 50% formamida, 5X Denhart's ó 0,25 g de leche en polvo, 0,5% SDS y 20 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las prehibridaciones e hibridaciones se realizaron a 68°C. Tras hibridar los filtros durante un período de 8 a 15 horas, se lavaron por períodos de tiempo de 25 minutos en soluciones de 5X SSC, 0,1% SDS y 2X SSC, 0,1% SDS y, por último, durante 10-15 minutos con 0,1X SSC, 0,1% SDS. Todos los lavados se efectuaron a 68°C. Los filtros se dejaron secar y se expusieron a películas de autoradiografía Hyperfilm de la casa Amersham. En algunos casos, los filtros se revelaron mediante el sistema Molecular Dynamics versión 4.1STORM860 PhosphorScreen.

3.9. AISLAMIENTO DE LÍNEAS DE INSERCIÓN DE ADN-T EN HOMOCIGOSIS

Para genotipar las plantas de la población segregante perteneciente a cada una de las líneas de inserción de ADN-T utilizadas, se preparó ADN genómico de al menos 20 plantas independientes y se procedió a efectuar dos PCR diferentes. Para la primera de ellas se usaron dos cebadores específicos del gen de interés, mientras que en la segunda, se utilizó un cebador específico de la secuencia de ADN-T (LBA1). El análisis de las plantas que contenían la inserción de ADN-T en homocigosis, permitía observar una banda en la segunda PCR y ninguna en la primera (debido a que el tamaño del ADN-T excede la procesividad de la polimerasa). En las plantas en las que la inserción de ADN-T se encontraba en heterocigosis se observaba una banda en la primera PCR. La información referente a los cebadores utilizados para genotipar las líneas analizadas se describen en la Tabla 2 (incluida en Materiales y Métodos).

3.10. ANÁLISIS DE PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS

Se realizaron tres análisis transcriptómicos independientes según se describe a continuación:

- 1) se examinaron los perfiles transcriptómicos en hojas de plantas silvestres tratadas, durante 30 minutos, 2, 8, 24 y 48 h, con 9-KOT, en comparación con los perfiles correspondientes a hojas de las mismas plantas tratadas con agua durante los mismos intervalos de tiempo.
- 2) se examinaron los perfiles transcriptómicos a 24 y 48 h de la inoculación de *Pst* DC3000 (a una concentración de 10^6 ufc/mL) en hojas de plantas silvestres, pre-tratadas 48 h antes con 9-KOT o agua.

- 3) se comparó la respuesta de plantas mutantes *noxy1* y de plantas silvestres en las condiciones de luz que favorecen la formación de lesiones espontáneas en el mutante *noxy1*. Para ello, se procedió a crecer las plantas objeto de estudio bajo un fotoperiodo de 14 h de luz y una intensidad lumínica de 6000 luxes hasta las tres semanas de desarrollo, momento en el que se bajó la intensidad lumínica a 500 luxes y se procedió a extraer ARN 3 y 5 días después, cuando la formación de lesiones en el mutante *noxy1* era claramente visible.

En cada uno de los ensayos descritos se prepararon 4 réplicas biológicas de ARN, que se hibridaron, independientemente, en cuatro experimentos distintos utilizando las micromatrices de Agilent Arabidopsis Oligo Microarrays 4x44K (ref. 021169). Como paso previo a la hibridación, las muestras de ARN se purificaron con el kit "RNAeasy mini kit" (Quiagen) y se cuantificaron con un Nanodrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (Nanodrop Technology Inc.). La calidad del ARN se verificó mediante el uso de un Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). Para la hibridación se empleó "Gene Expression Hybridization kit" (Agilent) y los lavados se realizaron con "Gene Expression Wash Buffer kit" (Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso. El escaneo se realizó con Gene Pix 400B (Molecular Devices) a una resolución de 5 μm y las imágenes se cuantificaron con Gene Pix Pro 5.1 (Axon). Los transcritos expresados diferencialmente se analizaron estadísticamente utilizando el método "Rank product" (Breitling y col., 2004). Para controlar la tasa de falsos positivos (FDR), los valores P se corrigieron usando el método descrito en Benjamini y Hochberg (2001) y Reiner y col. (2003). Los estudios estadísticos y la visualización gráfica de los datos se llevó a cabo con la herramienta informática FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>).

Los transcritos inducidos y reprimidos significativamente obtenidos en cada comparación (a un FDR menor del 5%) se muestran en las Tablas S1, S3 y S5 (incluidas como Material Suplementario en el CD adjunto). La expresión diferencial de los genes en las distintas comparaciones realizadas se ha representado como "veces de cambio" de cada sonda. El ordenamiento jerárquico de los términos significativos (*p-value* ajustado de 0,05) se llevó a cabo mediante el programa Multiexperiment Viewer (MeV) v.s. 4.3 software (www.tm4.org), tomando como parámetros distancia euclídea y ordenamiento por media de unión (Saeed y col., 2003).

El análisis de los términos funcionales enriquecidos de los genes diferencialmente expresados, que se muestran en las Tablas S2, S4 y S6 (incluidas como Material Suplementario en el CD adjunto), se llevó a cabo mediante el uso de la aplicación FATIGO (Al-Shahrour y col., 2004) a través del servidor del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España). Los resultados de los

microordenamientos se compararon con una colección de datos públicos de microordenamientos, mediante el uso de la aplicación Bio-Array-Resource (<http://bar.utoronto.ca/>).

3.11. ANÁLISIS GENÉTICO

Los cruzamientos llevados a cabo para realizar el análisis genético de las plantas mutantes seleccionadas 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 las 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.

Con el fin de determinar el carácter dominante o recesivo de la mutación *noxy1*, así como para eliminar otras mutaciones adicionales que pudieran interferir con la mutación de interés, procedimos a cruzar las plantas mutantes con plantas silvestres Col-0, recaptándose el fenotipo en la progenie F1 y F2.

Además, con objeto de localizar en el genoma de *A. thaliana* la mutación *noxy1*, las plantas mutantes se cruzaron con plantas silvestres del ecotipo Landsberg *erecta* y se seleccionaron plantas con fenotipo mutante en la población F2 recombinante.

3.12. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LA MUTACIÓN NOXY1.

Se utilizaron marcadores moleculares tipo SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms; Bell y Ecker, 1994) y CAPs (Codominant Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; Konieczny y Ausubel, 1993), presentes en las bases de datos de *A. thaliana* TAIR y TIGR. En otros casos fue necesaria la identificación de nuevos marcadores, de tipo CAP, que recibieron el nombre asignado en las bases de datos al cambio nucleotídico a partir del cual se identificaron. Las secuencias correspondientes a los marcadores utilizados en este estudio se recogen en la Tabla 3 (incluida en Materiales y Métodos).

3.13. COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN *NOXY1*

Utilizando cebadores diseñados en base a la secuencia genómica correspondiente al locus At1g43980 que contenían, además, las secuencias necesarias para su utilización en el sistema Gateway (5'-*attB1*AT-CCACTTTGAGTCATCATC-3' y 5'-*attB2*T-AACTTTGGAGTTCTCTCAC-3'), se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 2937 pb a partir del ADN genómico de plantas silvestres Col-0, que contenía tanto el gen de interés como su promotor. El fragmento obtenido se clonó en primer lugar en el vector pGEM-T para comprobar su secuencia, a partir de donde se pasó al vector de entrada pDONR201 y, posteriormente, al vector destino pGWB1, generando la construcción *NOXY1:NOXY1* que se introdujo en células de *A. tumefaciens* y se utilizó para transformar plantas mutantes *noxy1* y plantas silvestres Col-0.

3.14. TRANSFORMACIÓN DE *A. THALIANA*

La transferencia de las construcciones preparadas, desde *A. tumefaciens* hasta el genoma de *Arabidopsis thaliana*, se llevó a cabo según el protocolo de transformación de Bechtold y Pelletier (1993) y con las modificaciones que del mismo hicieron los citados autores (1998).

3.14.1. Selección de líneas transgénicas

Las semillas transgénicas T1 se sembraron en placas Petri con medio MS y en presencia del antibiótico de selección, kanamicina o higromicina, y de claforán (500 mg/ml) para evitar el crecimiento de *A. tumefaciens*. Las plántulas resistentes fueron seleccionadas y crecidas en tierra hasta la formación de semillas. Las semillas T2 se crecieron en presencia de antibiótico para seleccionar las líneas que presentaban una segregación 3:1 y que contenían, por tanto, una única inserción de ADN-T. Las semillas T2 resistentes, se transfirieron a tierra para recoger semillas T3 e identificar las plantas homocigotas con las que se realizarían los estudios correspondientes.

3.15. APLICACIONES BIOINFORMÁTICAS

Los programas bioinformáticos o bases de datos utilizados en esta Tesis han sido:

- TAIR, The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>) base de datos que nos ha proporcionado información sobre el genoma de *Arabidopsis*.
- Chromas: para el análisis de secuencias.
- Genomatrix (<http://www.genomatrix.de/cgi-bin/dialig.pl>): utilizado para el alineamiento de secuencias.
- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): utilizado para comparar tanto secuencias de nucleótidos como de aminoácidos en la base de datos de NCBI.
- T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>): para la búsqueda de mutantes de inserción de ADN-T en los genes de interés (Alonso y col., 2003).
- Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>): utilizado para comparar patrones de expresión de los genes analizados en este trabajo. Está basado en los datos obtenidos de micromatrices de oligonucleótidos (Zimmermann y col., 2004).
- dCAPS Finder (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>): utilizado para buscar dianas de restricción polimórficas entre dos secuencias.
- FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>): utilizado para realizar el estudio estadístico y la visualización de los resultados de los microordenamientos.
- BABELOMICS (<http://babelomics3.bioinfo.cipf.es/>): utilizado para análisis de los términos funcionales enriquecidos de los genes diferencialmente expresados en los microordenamientos.
- BAR (<http://142.150.214.117/welcome.htm>): contiene una colección de datos públicos de microordenamientos con los que se compararon los realizados en esta Tesis.
- TRPpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/trpred>): utilizado para identificar las repeticiones tipo PPR en la secuencia de gen *NOXY1*.

TABLAS

Tabla 1. Cebadores específicos utilizados para analizar la expresión génica por RT-PCR y PCR cuantitativa.

LOCUS	GEN	SECUENCIA CEBADORES	LONGITUD AMPLICÓN (pb)
At1g55020	<i>LOX1</i>	5'-TTTGGATGGACTCACTGTTGAAG-3' 5'-GTCCCAAGTATGGCATCAGTGT-3'	89
At3g01420	<i>α-DOX1</i>	5'-CCCGTCGATCAGAAATCAAAGT-3' 5'-ACTTTTTCCTTCCTAATAGTTTTGTGC-3'	76
At3g22400	<i>LOX5</i>	5'-GGCTTGGAGGACTGACGAA-3' 5'-TTTGCAGAGTCCAGACAGCTC-3'	111
At1g43980	<i>NOXY1</i>	5'-GTGTGGAAGTCTGTTATGGA-3' 5'-AACTGATCCAAAGCCACTTC-3'	158
At1g43170	<i>RPL3A</i>	5'-GTCTCACAGGAAGTTTGAGCACC-3' 5'-CCTTAGGGAACGCCTTCACC-3'	101

Tabla 2. Información de las líneas de ADN-T de los genes *LOX1* y *α -DOX1* y los cebadores usados para identificar las inserciones.

LOCUS	GEN	LÍNEA DE INSERCIÓN	LOCALIZACIÓN DE LA INSERCIÓN	SECUENCIA CEBADORES	LONGITUD AMPLICÓN (pb)
At1g55020	<i>LOX1</i>	SALK_059431	Exón 8	5'-CAAACCGACACAGAGCTCCAAGCC-3' 5'-CCCTGCCGGTGACTCCGCCTTCAC-3'	576
At3g01420	<i>α-DOX1</i>	SALK_005633	Intrón 1	5'-TTTGATTTCTGATCGACGGGG-3' 5'-TCCGATACAACACAGGATACCCAA-3'	906

Tabla 3. Marcadores tipo CAPs diseñados y cebadores empleados en la resolución de los mismos.

MARCADOR	TIPO	SECUENCIA CEBADORES
PERL0133604	CAP (MbolI)	5'-AATTGATCCGCCTAGAGAAG-3' 5'-GGCACAGACTCTCATGATTA-3'
PERL0137459	CAP (AclI)	5'-CCGGCGATGAAAACCTTAAA-3' 5'-TATTGGGAGAGAAGACTCAC-3'
PERL0138337	CAP (MaeIII)	5'-TGAAC TTTCAACTTCCCAGT-3' 5'-TAGGGG TTTTGATAACATGC-3'
PERL0140928	CAP (DdeI)	5'-AGCAGGAGAAAAGCAATCTTA-3' 5'-AGAGTTGAGGATAGAGTTGT-3'
PERL0142458	CAP (HphI)	5'-CTTCTCATTCC TTGCTTTCC-3' 5'-TACGGAAGAGAGGGATTAAT-3'
PERL0144821	CAP (DdeI)	5'-GCTTCACATCGATCTCATCA-3' 5'-CCAAAAGTTTGAGGTTGAGG-3'
PERL0144877	CAP (SspI)	5'-TTCGGGTATGATCCTATCGA-3' 5'-CACACCTAGTTTTCCCTTGT-3'

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. PARTICIPACIÓN DE LOS GENES 9-LOX Y α -DOX EN LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL

4.1.1. Los enzimas LOX1 y α -DOX1 se inducen de forma local durante la respuesta de la planta frente a la infección de bacterias biotrofas

Los estudios realizados en el laboratorio, con objeto de examinar la participación de las rutas de biosíntesis de oxilipinas iniciadas por la acción de los enzimas 9-LOX y α -DOX en la respuesta de defensa vegetal, indicaban que ambas actividades enzimáticas se activan tras la inoculación de *Pseudomonas* en hojas de plantas de tabaco y *Arabidopsis* (Sanz y col., 1999; Ponce de León y col., 2002; López y col., 2011), y que estas dos actividades enzimáticas, durante su acción sobre el ácido linolénico y sus productos oxigenados, establecen una interacción metabólica generando productos doblemente oxigenados, derivados de la acción coordinada de ambas actividades enzimáticas (Hamberg y col., 2003; Vellosillo y col., 2007). Estos resultados ponían de manifiesto la participación de ambas rutas metabólicas en la defensa vegetal y sugerían su actuación coordinada en este proceso. Con objeto de profundizar en el estudio de estas rutas metabólicas, así como de las oxilipinas derivadas de su inducción, nos propusimos examinar la respuesta de mutantes individuales, deficientes en la actividad de los enzimas de interés, así como de dobles mutantes, deficientes en ambas actividades enzimáticas, a la infección de las bacterias modelo *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000 *avrRpm1* (avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000 (virulenta), Ambas bacterias difieren, exclusivamente, en la presencia del gen *avrRpm1* en la cepa avirulenta, cuya liberación al citoplasma de la célula vegetal, seguida de su interacción con el gen de resistencia *RPM1*, presente en la planta, activa una reacción hipersensible HR, que constituye una defensa efectiva capaz de limitar el crecimiento bacteriano y la progresión de la infección en la planta (Jones y Dangl, 2006; Rosebrock y col., 2007).

La identificación y caracterización de los enzimas 9-LOX y α -DOX en *Arabidopsis* (Bannenberg y col., 2009a) había puesto de manifiesto la presencia de dos genes 9-LOX, designados *LOX1* y *LOX5*, así como de dos genes α -DOX, designados α -DOX1 y α -DOX2 (Bannenberg y col., 2009b). De los dos genes 9-LOX identificados, el gen *LOX1* alcanzaba mayores niveles de inducción tras la infección bacteriana (López y col., 2011) y fue seleccionado para este estudio. Por otro lado, de los dos genes α -DOX presentes en *Arabidopsis*, la expresión del gen α -DOX2 no

respondía al ataque de patógenos (Bannerberg y col., 2009b), mientras que el α -DOX1 se activaba de manera significativa tras la infección bacteriana (Ponce de León y col., 2002). El análisis de la expresión de los genes *LOX1*, *LOX5* y α -DOX1 mediante PCR-cuantitativa (utilizando los cebadores descritos en la Tabla 1) permitió confirmar los resultados descritos, revelando la activación de su expresión en respuesta a la inoculación de las dos cepas bacterianas utilizadas (Figura 1). De los tres transcritos caracterizados, los correspondientes al gen α -DOX1 alcanzan mayores niveles de acumulación, mientras que la comparación de la expresión de los dos genes 9-LOX, *LOX1* y *LOX5*, indicó que los transcritos derivados del gen *LOX1* alcanzan mayores

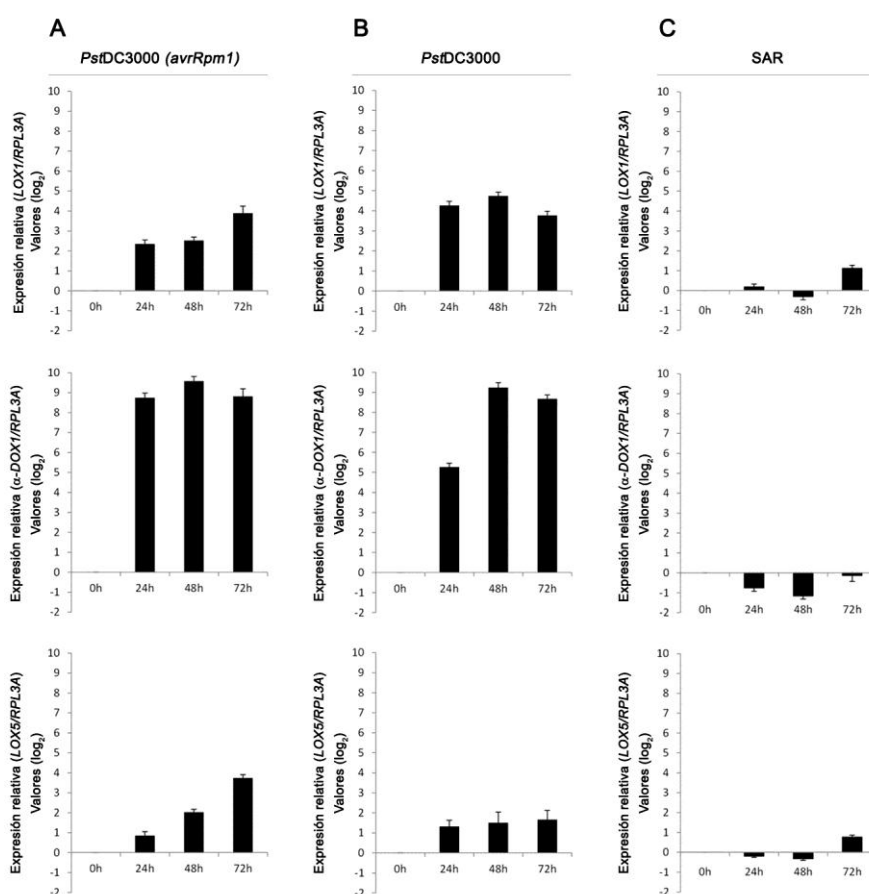


Figura 1. Determinación del nivel de transcritos 9-LOX y α -DOX1 mediante PCR cuantitativa.

(A) Nivel de expresión de los genes *LOX1*, *LOX5* y α -DOX1 en hojas de plantas silvestres inoculadas con la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^6 cfu/mL).

(B) Nivel de expresión génica en hojas de plantas silvestres inoculadas con la cepa virulenta *Pst* DC3000 (10^6 cfu/mL).

(C) Nivel de expresión génica en hojas distales de plantas silvestres inoculadas en hojas basales con la cepa *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^7 cfu/mL).

La expresión génica se examinó en muestras de ARN extraídas a diferentes intervalos de tiempo tras la inoculación bacteriana. El nivel de acumulación del gen At1g43170 que codifica la proteína ribosomal RPL3A se usó para normalizar los niveles de transcritos en cada muestra. Se muestran las medias y los errores estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

niveles de acumulación, en particular en las muestras de ARN obtenidas a partir de tejidos infectados con la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1*.

Además de en los tejidos infectados, y dada la reciente implicación de distintos genes relacionados con el metabolismo de lípidos en la activación y el establecimiento de una respuesta de defensa sistémica o SAR (Maldonado y col., 2002; Chaturverdi y col., 2008; Sun Jae Kwon y col., 2009; Chanda y col., 2011), procedimos a examinar la expresión de los genes *LOX1*, *LOX5* y α -*DOX1* en hojas no inoculadas de plantas infectadas (respuesta sistémica). Con este fin, se inocularon las hojas basales de las plantas con *Pst* DC3000 *avrRpm1* y se procedió a extraer ARN a partir de hojas distales, localizadas en niveles superiores a las hojas inoculadas, en las que se procedió a determinar el nivel de expresión de los genes de interés. Los resultados de estos análisis (Figura 1) permitieron comprobar que, a diferencia de lo que ocurre en la respuesta local, la expresión de los genes examinados no se induce de forma sistémica en tejidos alejados de la zona de infección.

4.1.2. Los enzimas *LOX1* y α -*DOX1* participan en la activación de la defensa local

En base a los resultados descritos en el apartado anterior, los genes *LOX1* y α -*DOX1* fueron seleccionados con objeto de evaluar la acción conjunta de las actividades enzimáticas correspondientes y, por tanto, de los derivados lipídicos sintetizados a través de las rutas biosintéticas iniciadas por la acción de ambas enzimas en la defensa vegetal. A este objeto, procedimos a caracterizar la respuesta a la infección con patógenos bacterianos de plantas deficientes en dichas actividades, en comparación con la respuesta de plantas silvestres frente a los mismos patógenos. Para ello, utilizamos los mutantes individuales *lox1-1* y α -*dox1-1*, conteniendo una inserción de ADN-T en cada uno de dichos genes, cuya estructura genómica se muestra en la Figura 2, y procedimos a generar un doble mutante *lox1-1* α -*dox1-1* que se obtuvo mediante el cruzamiento de los mutantes individuales. La selección de dichos mutantes se realizó mediante PCR utilizando ADN genómico de cada uno de los mutantes preparados, y los cebadores correspondientes, mostrados en la Tabla 2. La validación de dichos mutantes se realizó mediante RT-PCR en la que se examinó la expresión de los genes *LOX1* y α -*DOX1* en muestras de ARN obtenidas a partir de cada uno de los mutantes. Los resultados de dichos análisis permitieron confirmar la ausencia del ARN derivado del gen *LOX1* en el mutante *lox1-1* y en el doble mutante *lox1-1* α -*dox1-1*, así como del ARN derivado del gen α -*DOX1*, en el mutante α -*dox1-1* y en el doble mutante *lox1-1* α -*dox1-1*. Estos resultados permitieron confirmar la

ausencia de expresión de los genes de interés en los mutantes seleccionados, a los que nos referiremos en este trabajo como *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1*, respectivamente (Figura 2).

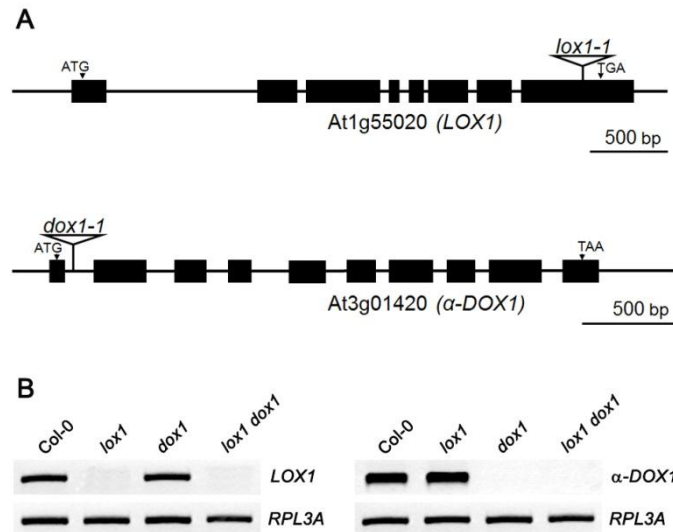


Figura 2. Obtención y caracterización de los mutantes *lox1* y *dox1*.

(A) Representación esquemática de las estructuras genómicas correspondientes a los genes *LOX1* y α -*DOX1*. Los exones están representados como cajas negras. Se indica la posición de las inserciones de ADN-T.

(B) RT-PCR semicuantitativa realizadas sobre muestras de ARN obtenidas a partir de hojas de plantas silvestres y de los mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1*. El nivel de acumulación de los transcritos derivados del gen At1g43170 fue utilizado como control en estos experimentos

La respuesta de los mutantes generados a la infección se realizó mediante la cuantificación del crecimiento bacteriano alcanzado en cada uno de ellos. Como se muestra en la Figura 3A, el nivel de crecimiento de la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1* en los mutantes analizados, no manifiesta diferencias significativas con respecto a los valores de crecimiento alcanzados en las plantas silvestres. A diferencia de estos resultados, el análisis de la respuesta a la infección de la bacteria virulenta *Pst* DC3000, reveló un incremento del crecimiento de 3,5, 1,5 y 4,5 veces en los mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1*, respectivamente, con respecto al crecimiento de dicha cepa en hojas de plantas silvestres, utilizadas como control en estos experimentos (Figura 3C).

Además del crecimiento bacteriano, y con objeto de caracterizar en mayor profundidad la respuesta de los mutantes de interés, procedimos a evaluar los síntomas producidos en respuesta a la infección de las dos cepas bacterianas descritas. Como se observa en la Figura 3B, las plantas control tratadas con *Pst* DC3000 *avrRpm1* producen, en el área infectada, una respuesta necrótica

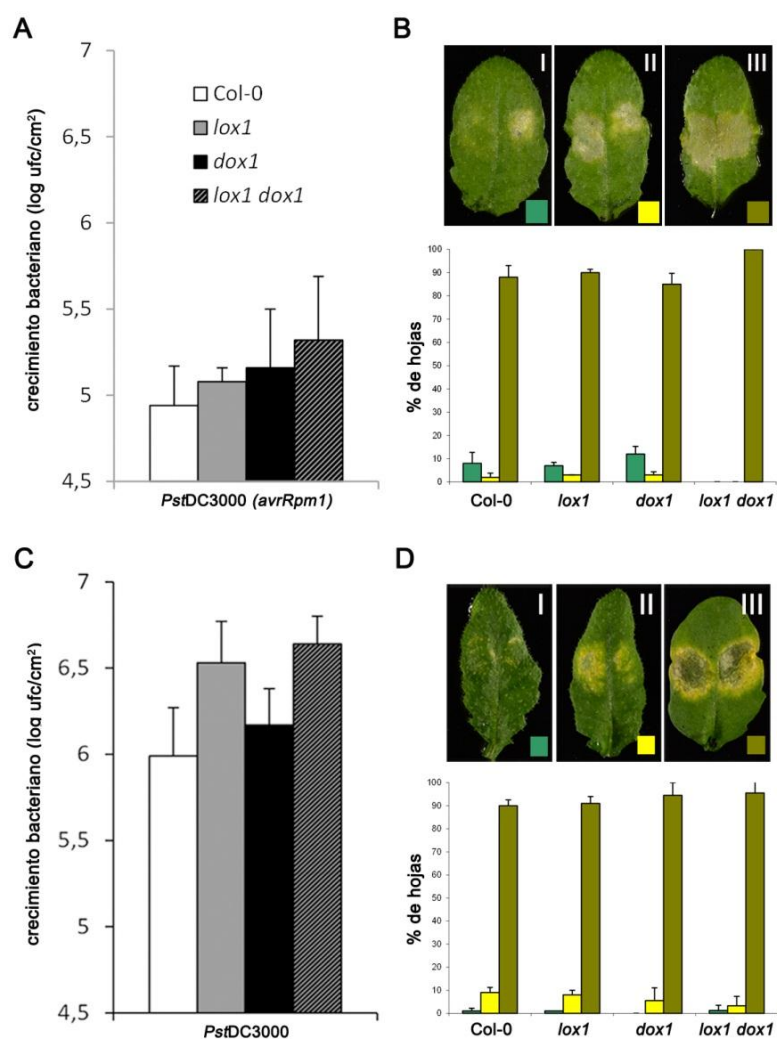


Figura 3. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1* a infecciones bacterianas.

(A) Nivel de crecimiento alcanzado por la cepa *Pst DC3000 avrRpm1* (10^5 ufc/mL) en plantas silvestres y los mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1*, a los 4 días de infección. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes.

(B) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación de la cepa *Pst DC3000 avrRpm1* (10^6 cfu/mL). La cuantificación de los síntomas se realizó utilizando una escala de tres puntos, designados I, II y III, de acuerdo a su intensidad. Se muestran ejemplos representativos de cada punto de la escala y los porcentajes de hojas que muestran los síntomas descritos.

(C) Nivel de crecimiento alcanzado por la cepa *Pst DC3000* (10^5 ufc/mL) en plantas silvestres y los mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1*, a los 4 días de infección. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes.

(D) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación de la cepa *Pst DC3000* (10^6 cfu/mL). Aspecto de las lesiones producidas por la bacteria *Pst DC3000* (10^6 cfu/mL) a los tres días de la infección. La cuantificación de los síntomas se realizó utilizando una escala de tres puntos, designados I, II y III, de acuerdo a su intensidad. Se muestran ejemplos representativos de cada punto de la escala y los porcentajes de hojas que muestran los síntomas descritos.

característica de una reacción de defensa hipersensible, visible con claridad a las 48 h de la inoculación. En el caso de la cepa *Pst DC3000*, las lesiones producidas consisten en una zona necrótica, rodeada de un halo clorótico, visibles a las 72 h de la inoculación de la suspensión bacteriana (Figura 3D). Con objeto de proceder a su

cuantificación, los síntomas generados por cada una de las bacterias examinadas se agruparon en tres niveles, designados como I, II y III, de acuerdo con su severidad (Figura 3B y 3D). Los resultados de estos análisis no revelaron diferencias significativas en los síntomas producidos por las bacterias examinadas en los mutantes analizados, en los que los porcentajes de hojas que mostraban cada uno de los síntomas cuantificados no mostraron diferencias más allá de un 10%, con respecto a los correspondientes a las plantas silvestres, aunque, sin embargo, era posible apreciar una ligera tendencia hacia un mayor daño en los mutantes que en las plantas control.

Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto la participación de los enzimas LOX1 y α -DOX1 en la respuesta de defensa de la planta frente a la infección de la bacteria virulenta *Pst* DC3000, así como la acción conjunta de ambas actividades enzimáticas durante la activación de una respuesta de defensa eficaz, con capacidad para limitar el crecimiento bacteriano. Además, mientras que la acción de ambas enzimas afecta a la tasa de crecimiento bacteriano, la falta de dichas actividades no provoca un efecto apreciable en la formación de síntomas.

4.1.3. Los enzimas LOX1 y α -DOX1 participan en la activación de la defensa sistémica

Al igual que en la respuesta local, la caracterización de la respuesta sistémica se realizó analizando el crecimiento de la bacteria *Pst* DC3000, así como la formación de síntomas, en los tejidos sistémicos (no inoculados) de plantas sometidas, 48 h antes, a una primera inoculación con la bacteria avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1* en las hojas basales de la planta. Como control de estos experimentos, la respuesta de las plantas a la infección de la bacteria *Pst* DC3000, se comparó con la observada en plantas pre-tratadas con una solución de $MgCl_2$.

De acuerdo con la activación de una respuesta de defensa sistémica, el crecimiento de la bacteria *Pst* DC3000 reveló una importante reducción en las plantas silvestres pre-tratadas con la bacteria avirulenta, en comparación al alcanzado en plantas pre-tratadas con $MgCl_2$ (Figura 4A). A diferencia de estos resultados, el análisis de los mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1* reveló, que la reducción del crecimiento de la bacteria *Pst* DC3000 asociada a la activación de la defensa sistémica, era claramente inferior a la alcanzada en las plantas silvestres. Así, mientras que la tasa de crecimiento de la bacteria *Pst* DC3000 en tejidos sistémicos de plantas silvestres experimentaba una reducción del 50% con respecto al alcanzado en

las muestras control, en el caso de los mutantes *lox1* y *dox1* la reducción disminuía un 37% y 32%, respectivamente, y únicamente un 5,7% en el doble mutante *lox1 dox1*.

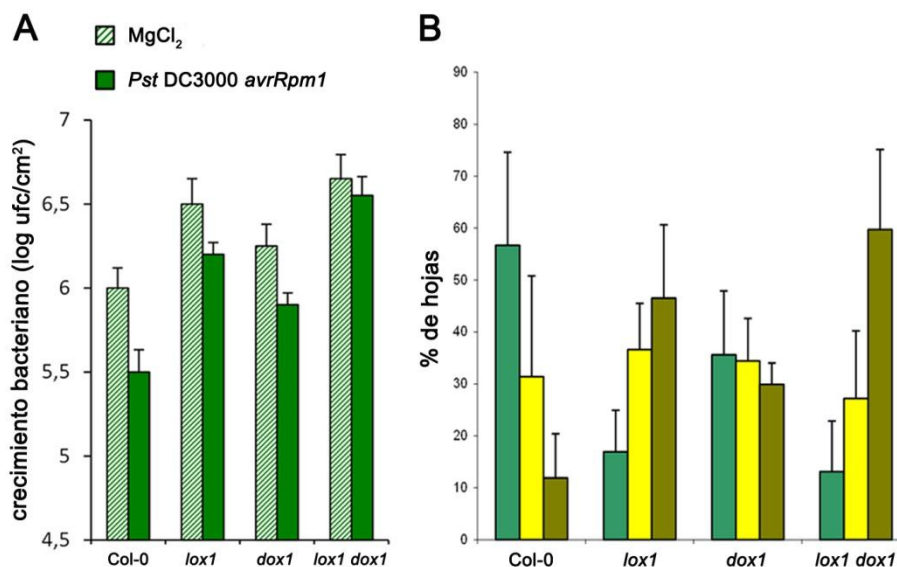


Figura 4. Activación de la defensa sistémica en plantas silvestres y mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1*.

(A) Nivel de crecimiento de la cepa *Pst* DC3000 (10^5 ufc/mL) a los 4 días de infección en hojas distales de plantas silvestres y mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1*, sometidas 48 h antes a la inoculación de la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^7 ufc/mL) (barras rellenas) o $MgCl_2$ (barras rayadas), en las hojas basales de la planta. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes.

(B) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación con la cepa *Pst* DC3000 (10^6 ufc/mL) en hojas distales de plantas silvestres y mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1* pre-tratadas 48 h antes con la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^7 ufc/mL), en las hojas basales de la planta. Se muestran los porcentajes de hojas que desarrollan cada uno de los síntomas evaluados según se describe en la Figura 3D.

Al igual que los resultados derivados del análisis del crecimiento bacteriano, la cuantificación de los síntomas producidos durante la infección de los tejidos sistémicos revelaba la misma tendencia hacia una reducción en la capacidad de los mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1* para activar la respuesta de defensa sistémica (Figura 4B). Así, mientras que en las plantas silvestres la activación de la protección asociada a la inducción de SAR estaba acompañada de una importante reducción del número de hojas que mostraban síntomas de infección del tipo III (desde un 88% en la respuesta local, a un 12% en los tejidos sistémicos), dicha protección era significativamente menor en los mutantes *lox1* y *dox1*, en los que el porcentaje de hojas que mostraban síntomas de infección tipo III disminuía, respectivamente, desde el 90% y el 95%, determinado en la respuesta local, al 45% y al 28%, en los tejidos sistémicos.

El defecto en la activación de la respuesta SAR era aún más acusado en el doble mutante *lox1 dox1*, para el que el número de hojas con síntomas tipo III disminuía solamente hasta el 58%. De hecho, la proporción de hojas que mostraban

cada uno de los síntomas cuantificados, era prácticamente la opuesta en el doble mutante *lox1 dox1* que la caracterizada en las plantas silvestres (Figura 4B).

Estos resultados pusieron de manifiesto que la pérdida de las actividades LOX1 y α -DOX1 provocaba un descenso en la capacidad de la planta para activar la defensa sistémica, y que el defecto asociado a la pérdida de dichas actividades era claramente mayor en aquellas plantas en las que ambas actividades estaban ausentes de forma simultánea.

4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS OXILIPINAS EN LA DEFENSA FRENTE A LA INFECCION DE PATÓGENOS BACTERIANOS

4.2.1. El pre-tratamiento con oxilipinas generadas por los enzimas LOX-1 y α -DOX1 protege a las plantas frente a infecciones bacterianas

Basándonos en los resultados que mostraban que la mutación de los genes *LOX1* y *α -DOX1* y, por tanto, la falta de los compuestos derivados de dichas actividades, producía un aumento en la susceptibilidad de la planta frente a la infección de la bacteria patógena *Pst* DC3000, tanto en tejidos locales como sistémicos, nos propusimos examinar si las oxilipinas sintetizadas a través de esas rutas biosintéticas podrían ejercer un efecto de protección frente al ataque de dicha bacteria. Para ello, utilizamos un total de 21 compuestos distintos, que fueron seleccionados en base a su estructura molecular y a las reacciones enzimáticas requeridas para su síntesis. La colección de oxilipinas analizadas se muestra en la Tabla 4, e incluía doce derivados sintetizados a través de la ruta iniciada por la acción de las 9-LOXs y tres oxilipinas derivadas de la actividad α -DOX. Además, se incluyeron cuatro oxilipinas sintetizadas por la acción de peroxigenasas y citocromo P-450 epoxigenasas sobre los hidróxidos derivados de la actividad 9-LOX, así como dos compuestos adicionales, el ácido azelaico (ácido 1,9-nonanedioico), cuyo origen se desconoce pero que podría sintetizarse a través de la ruta iniciada por la acción de las 9-LOXs, y su derivado 2-hidroxilado generado por la acción de las α -DOXs. En la Figura 5 se muestra de forma esquemática las rutas bioquímicas y actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de las oxilipinas analizadas.

La actividad de las oxilipinas seleccionadas en la defensa de la planta frente a la infección de la bacteria *Pst* DC3000, se examinó utilizando plantas silvestres en las que se evaluó el nivel de infección en hojas pre-tratadas 48 h antes, con las oxilipinas de interés, en comparación con el alcanzado en hojas pre-tratadas con agua, utilizadas como control de estos experimentos. Además del posible efecto de las

Tabla 4. Oxilipinas usadas en este estudio

Oxilipinas	Nombre corto
Derivados α-DOX	
Ácido 2(<i>R</i>)-Hidroxi-9(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoico	2-HOT
Ácido 2(<i>R,S</i>)-Hidroxi-9(<i>Z</i>)-octadecenoico	2-HOE
8(<i>Z</i>),11(<i>Z</i>),14(<i>Z</i>)-Heptadecatrienal	17:3-al
Ácido 2(<i>R</i>)-Hidroxi-azelaico	2-HO-Azelaic
Derivados 9-LOX	
Ácido 9(<i>S</i>)-Hidroxi-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadienoico	9-HOD
Ácido 9(<i>S</i>)-Hidroxi-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoico	9-HOT
Ácido 9-Keto-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadienoico	9-KOD
Ácido 9-Keto-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoico	9-KOT
2(<i>E</i>)-Nonenal	2-Nonenal
3(<i>Z</i>)-Nonenal	3-Nonenal
Ácido 9-Oxononanoico	9-Oxo-C ₉
Ácido Azelaico	Azelaic
10(<i>S</i>),11(<i>S</i>)-Epoxy-9(<i>S</i>)-Hidroxi-12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoato ^a	9,10,11-EHOD
Ácido 9(<i>S</i>),10(<i>S</i>),11(<i>R</i>)-Trihidroxi-12(<i>Z</i>)-octadecenoico	9,10,11-THOE
Ácido 9(<i>S</i>),12(<i>S</i>),13(<i>S</i>)-Trihidroxi-10(<i>E</i>)-octadecenoico	9,12,13-THOE
Ácido 9(<i>S</i>),12(<i>S</i>),13(<i>S</i>)-Trihidroxi-10(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoico	9,12,13-THOD
Ácido 9-Hidroxi-10-oxo-12(<i>Z</i>)-octadecenoico	9,10-KHOE
Derivados Peroxigenasa/Epoxigenasa	
Ácido <i>cis</i> -9,10-Epoxyoctadecanoico	9,10-EO
Ácido 9(<i>R</i>),10(<i>S</i>)-Epoxy-12(<i>Z</i>)-octadecenoico	9,10-EOE
Ácido (\pm)- <i>threo</i> -9,10-Dihidroxi-12(<i>Z</i>)-octadecenoico	9,10-DHOE
Ácido (\pm)- <i>threo</i> -9,10-Dihidroxi-12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoico	9,10-DHOD

^aMetil ester

oxilipinas en las hojas tratadas, se procedió igualmente a determinar si la inoculación de oxilipinas provocaba alguna alteración en la respuesta de los tejidos sistémicos (situados por encima de las hojas tratadas) frente a la infección de la bacteria *Pst* DC3000.

En ambas respuestas (respuesta local y sistémica) y al igual que en casos anteriores, el efecto de las oxilipinas, en el proceso de infección, se determinó mediante la evaluación de la tasa de crecimiento bacteriano y la formación de síntomas en los tejidos de interés.

Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 6, en la que los datos derivados del estudio de los síntomas producidos durante la infección, tanto en hojas locales como en tejidos sistémicos, han sido organizados y representados usando un programa informático de agrupación jerárquica. Al igual que en apartados anteriores, la cuantificación de los síntomas se realizó utilizando una escala de tres puntos, de acuerdo a la severidad de las lesiones producidas en las hojas como consecuencia de la infección. Los resultados de estos análisis permitieron comprobar el efecto protector de parte de las oxilipinas testadas, entre las que los compuestos 3-nonenal, 9,12,13-TriHOE, 9,10-DHOD, 17:3-al y 9-KOT, fueron las que mostraron mayor nivel de actividad (Figura 6A). Así, la aplicación de 3-nonenal produjo una reducción en el nivel de hojas que mostraba síntomas de infección tipo III, desde un 81% (correspondiente al control, pre-tratado con agua) a un 15% del total de hojas infectadas. Los efectos

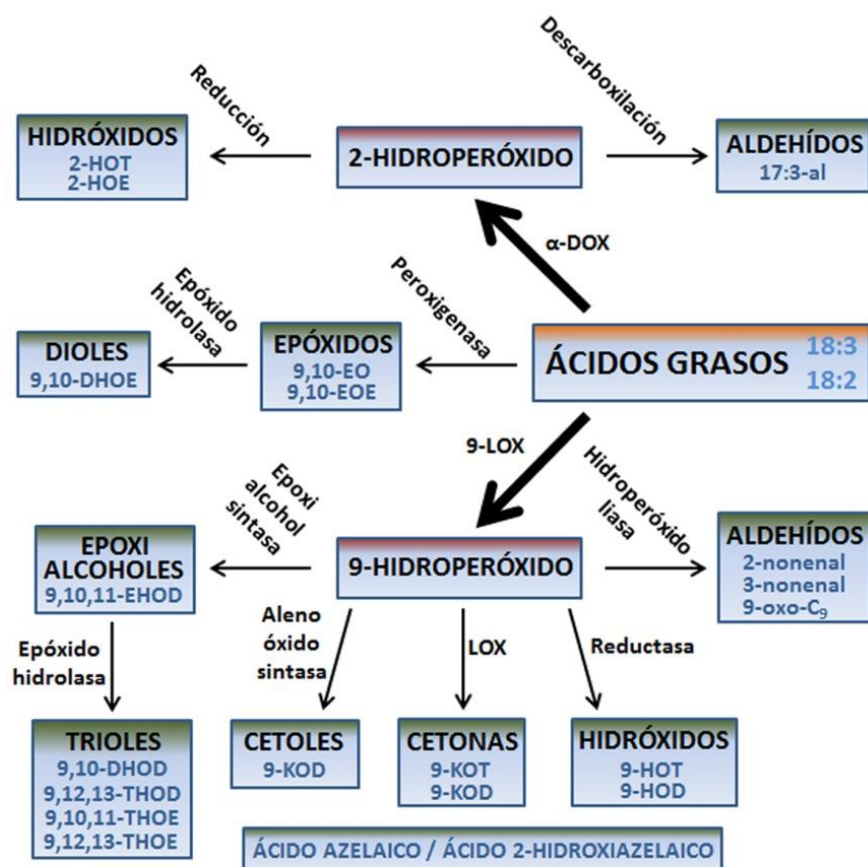


Figura 5. Esquema de las rutas de síntesis de las oxilipinas usadas en este estudio.

Se muestran las oxilipinas empleadas en el análisis de protección contra infecciones bacterianas en plantas de *Arabidopsis*. Se indica la abreviatura asignada a cada uno de los compuestos examinados, así como las actividades enzimáticas que participan en su síntesis.

derivados de la acción de las cuatro oxilipinas restantes, 9,12,13-TriHOE, 9,10-DHOD, 17:3-al y 9-KOT, fueron inferiores, aunque igualmente significativos, reduciendo el porcentaje de síntomas de tipo III a un 30%, 35%, 37% y 40%, respectivamente.

Al igual que en las hojas locales, el análisis de las lesiones producidas en los tejidos sistémicos reveló la capacidad de las oxilipinas testadas para reducir la severidad de los síntomas, aunque los niveles de protección fueron en todos los casos inferiores a los observados en tejidos locales (Figura 6B). Así, los resultados de este estudio reflejaron una reducción de los síntomas tipo III desde un 85% (en plantas tratadas con agua) a un 32%, 33%, 35%, 45%, 47% y 50% en el caso de los pre-tratamientos realizados con las oxilipinas 9-10-EO, 3-nonenal, 9-10-DHOD, 9,10-DHOE, 9-KOT y 2-HOT, respectivamente.

Con respecto al resto de las oxilipinas examinadas es posible mencionar que, aunque algunas de ellas ejercen también un efecto protector, dicho efecto era inferior, en todos los casos, al ejercido por las oxilipinas descritas anteriormente.

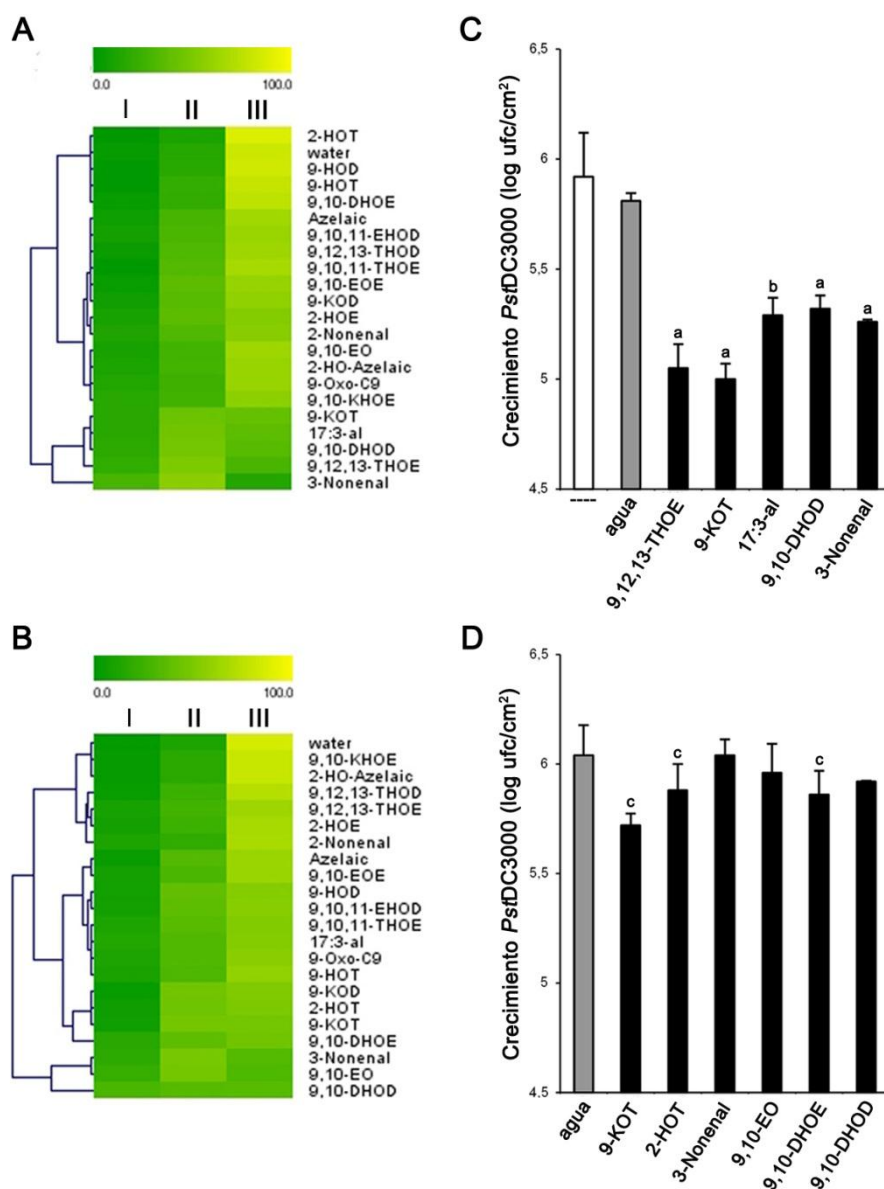


Figura 6. Actividad protectora de las oxilipinas frente a la infección de *Pst* DC3000.

(A) Organización jerárquica de los síntomas desarrollados tras la infección de *Pst* DC3000 en hojas de plantas silvestres pre-tratadas durante 48 h con las oxilipinas indicadas. La cuantificación de los síntomas se realizó utilizando una escala de tres puntos, designados I, II and III, según se muestra en la Figura 3D.

(B) Organización jerárquica de los síntomas desarrollados tras la infección de *Pst* DC3000 (10^6 ufc/mL) en hojas distales de plantas pre-tratadas en sus hojas basales con oxilipinas 48 h antes de la inoculación bacteriana. La cuantificación de los síntomas se realizó según se describe en el panel A.

(C) Nivel de crecimiento de la cepa *Pst* DC3000 (10^5 ufc/mL) alcanzado en hojas pre-tratadas con las oxilipinas que produjeron una reducción mayor en la intensidad de las lesiones formadas como consecuencia de la infección bacteriana.

(D) Nivel de crecimiento de la cepa *Pst* DC3000 (10^6 ufc/mL) en hojas distales de plantas pre-tratadas con las oxilipinas que confirieron mayores niveles de protección en la formación de síntomas.

Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes. Las letras encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de crecimiento bacteriano de las muestras control, tratadas con agua, y los tejidos tratados con oxilipinas. ($P < 0.001$ [a], $0.001 < P < 0.01$ [b], $0.01 < P < 0.05$ [c]).

El estudio de la acción de las oxilipinas, sobre la infección de la bacteria virulenta *Pst* DC3000, se completó examinando el efecto de dichos compuestos sobre la tasa de crecimiento bacteriano. Al igual que se describe anteriormente, la acción de las oxilipinas sobre el crecimiento bacteriano se examinó en tejidos locales, pre-tratados con oxilipinas, así como en tejidos sistémicos situados a cierta distancia de los tejidos tratados. Las oxilipinas que habían mostrado un efecto más acusado en la reducción de los síntomas asociados a la infección fueron seleccionadas para este experimento.

Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 6C, en la que se observa que el 9-KOT es el compuesto que provoca mayor reducción del crecimiento bacteriano (~8 veces), mientras que la infiltración de los compuestos 9,12,13-TriHOE, 3-nonenal, 17:3-al y 9,10-DHOD, ejercen efectos más débiles (entre 3 y 6 veces de reducción). Por otro lado, al igual que en los tejidos locales, la aplicación de 9-KOT provocó la mayor reducción, de ~2 veces, en la tasa de crecimiento bacteriano en los tejidos distales mientras que el resto de los compuestos examinados, 9,10-DHOE, 2-HOT, 3-nonenal, 9-10-DHOD y 9-10-EO, producían efectos menores (Figura 6D).

Los resultados de estos experimentos pusieron de manifiesto la acción protectora de una parte de las oxilipinas testadas, entre las que encontramos derivados procedentes de las dos rutas biosintéticas, 9-LOX y α -DOX, examinadas. Dentro de los compuestos activos identificados, el 9-KOT, derivado de la acción de las 9-LOX, muestra un efecto protector más intenso que afecta, tanto a la reducción de síntomas, como al crecimiento bacteriano, y se observa, tanto en los tejidos tratados, como en aquellos localizados a distancia de ellos, aunque la acción protectora de este compuesto era claramente mayor en los tejidos locales.

4.2.2. Análisis del papel del 9-KOT en la defensa vegetal

Análisis previos realizados con objeto de caracterizar los derivados lipídicos generados por la acción de los enzimas 9-LOXs en la raíz de *Arabidopsis* revelaron la acumulación de 9-KOT, siendo éste uno de los compuestos más abundantes en este tejido (Vellosillo y col., 2007). Por ello, y dado el efector protector de este compuesto en hojas de *Arabidopsis* frente a la infección de la bacteria *Pst* DC3000, nos propusimos examinar si, al igual que en la raíz, el 9-KOT se acumulaba en la planta en respuesta a la infección bacteriana. Para ello, procedimos a determinar la presencia de 9-KOT y a cuantificar su acumulación en hojas de plantas silvestres sometidas a la inoculación con la cepa *Pst* DC3000. Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto el aumento en los niveles de 9-KOT en los tejidos infectados (Figura 7). A

diferencia de lo que ocurre en las plantas silvestres, y de acuerdo con la falta de función del gen *LOX1* en los mutantes *lox1* y *lox1 dox1*, la generación del 9-KOT en estos mutantes experimentaba una drástica reducción en comparación con los niveles

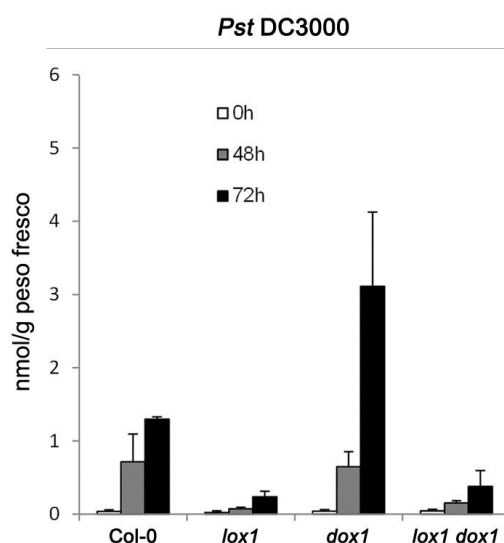


Figura 7. Niveles de 9-KOT en hojas de plantas silvestres y mutantes *lox1*, *dox1* y *lox1 dox1* infectadas con *Pst* DC3000.

Acumulación de 9-KOT en plantas silvestres y mutantes de oxilipinas en respuesta a la inoculación de la cepa *Pst* DC3000 (10^6 ufc/mL). Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes.

detectados en las plantas silvestres. Por el contrario, el análisis de las plantas mutantes *dox1*, reveló niveles de 9-KOT claramente superiores a los detectados en las plantas silvestres. Estos resultados ponían de manifiesto la interacción metabólica entre ambas actividades enzimáticas, en la que la ausencia de una de dichas actividades, en este caso la actividad α -DOX1 en el mutante *dox1*, provoca el aumento de los productos generados por la acción del enzima LOX1.

4.2.2.1. Análisis de los cambios transcripcionales en respuesta a 9-KOT.

Basándonos en los resultados descritos anteriormente, en los que se demuestra la actividad del 9-KOT en la protección de los tejidos vegetales frente a la infección de la bacteria *Pst* DC3000, así como su acumulación en los tejidos infectados, nos propusimos examinar la acción del 9-KOT en mayor profundidad mediante el análisis de los cambios transcriptómicos que pudieran ocurrir en los tejidos vegetales en respuesta a su aplicación. Como paso previo a estos análisis, y con objeto de determinar la concentración de 9-KOT empleada, procedimos a examinar el nivel de crecimiento bacteriano en hojas de plantas silvestres pre-tratadas con distintas concentraciones de 9-KOT (Figura 8). Los resultados de estos análisis

permiten comprobar la acción protectora del 9-KOT a concentraciones de 37 μM , en las que se produce una reducción de 2,4 veces en el nivel de crecimiento bacteriano, en comparación al que ocurre en el tratamiento control (pre-tratamiento con agua). El nivel de protección del 9-KOT aumenta al aumentar su concentración, llegando a provocar una reducción del crecimiento del 85% cuando se aplica a la concentración de 150 μM , que fue, por tanto, la concentración seleccionada para este estudio.

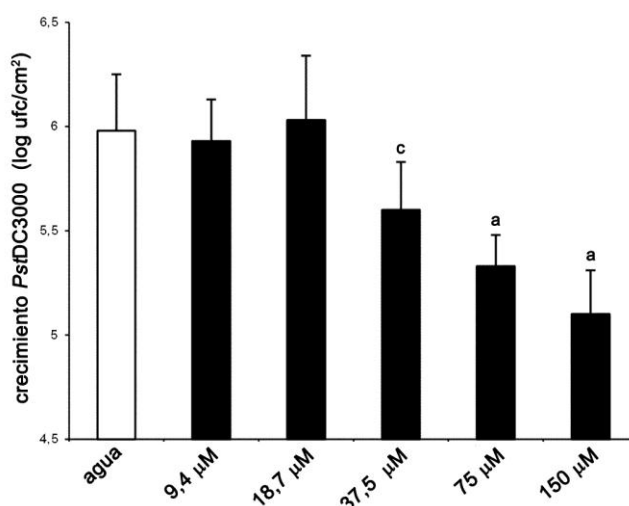


Figura 8. Efecto de la aplicación de 9-KOT en el crecimiento de la cepa *Pst* DC3000.

El crecimiento de la cepa *Pst* DC3000 (10^5 ufc/mL) se evaluó en hojas pre-tratadas durante 48 h con 9-KOT. Se muestran las medias de los valores obtenidos en hojas pre-tratadas con agua, utilizados como control de estos experimentos, y con diferentes concentraciones de 9-KOT. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes. Las letras situadas encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los tejidos tratados con oxilipinas. ($P < 0.001$ [a], $0.01 < P < 0.05$ [c]).

El análisis de los cambios transcripcionales producidos en respuesta a la aplicación de 9-KOT se examinó en muestras de ARN obtenidas a 30 min, 2, 8, 24 y 48h, tras la infiltración de este compuesto, en comparación con los producidos, a los tiempos indicados, en hojas tratadas con agua, utilizados como control. Para cada uno de los tiempos y tratamientos ensayados, y según se describe en el apartado de métodos, se prepararon cuatro muestras de ARN independientes que, tras los tratamientos adecuados, se hibridaron en cuatro experimentos independientes, utilizando micromatrices de Agilent (4x44K). Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla S1 (incluida como Material Suplementario en el CD adjunto), en los que se reflejan los cambios de expresión observados en cada uno de los tiempos examinados, a excepción del tiempo de 48 h, en donde no se apreciaron diferencias significativas entre los perfiles transcriptómicos de las muestras de ARN obtenidas a partir de hojas tratadas con 9-KOT o con agua.

En estos estudios pudimos observar que el tratamiento con 9-KOT permitía identificar 114 genes cuya expresión se induce más de dos veces con respecto a las muestras control, y 64 cuya expresión disminuye (más de dos veces) en respuesta a la aplicación de 9-KOT. El ordenamiento jerárquico de los genes que responden a 9-KOT (Figura 9A) permite distinguir un grupo de 79 genes (cluster 1), cuya expresión aumenta preferentemente a las dos horas del tratamiento, y de un segundo grupo de

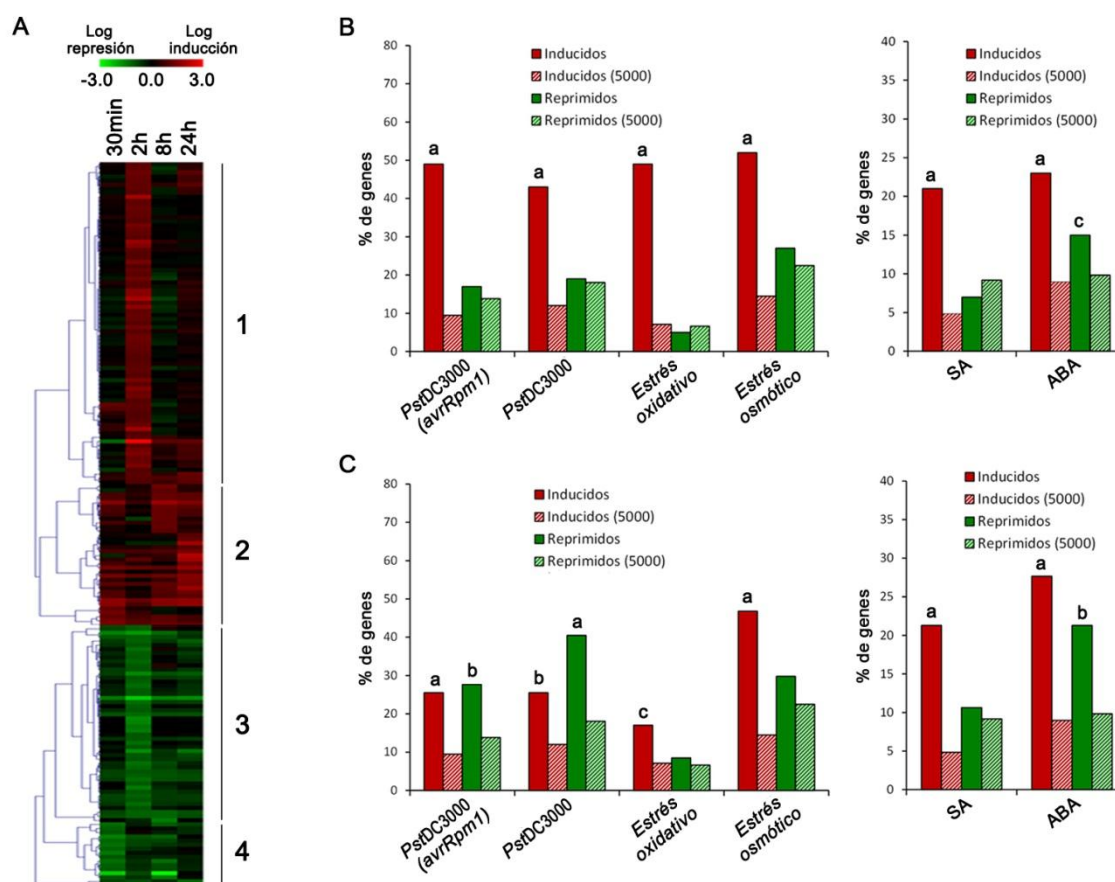


Figura 9. Análisis de los cambios transcriptómicos producidos en respuesta al tratamiento con 9-KOT.

(A) Ordenamiento jerárquico de genes cuya expresión varía en hojas de plantas silvestres en respuesta al tratamiento con 9-KOT en comparación con los producidos en tejidos infiltrados con agua, utilizados como control en estos experimentos. Se examinaron los cambios transcriptómicos a distintos intervalos de tiempo y se seleccionaron los genes cuya expresión varía 2 veces en respuesta al tratamiento con 9-KOT con respecto al tratamiento control. Los cluster 1 y 2 contienen los genes inducidos y los clusters 3 y 4 los reprimidos.

(B) Comparación de los perfiles transcriptómicos obtenidos en respuesta al 9-KOT con los resultados disponibles en las bases de datos. Se muestran los estímulos con los que se encuentra mayor nivel de correspondencia. Las barras rojas y verdes indican la correspondencia con genes inducidos o reprimidos, respectivamente, para cada estímulo particular. Como control de estos análisis se utilizó un grupo de 5000 genes seleccionados al azar (barras rayadas), con los que se analizó la correspondencia con aquellos estímulos para los que los genes de respuesta a 9-KOT mostraban altos niveles de correspondencia

(C) Análisis de los genes reprimidos en respuesta a 9-KOT según se describe en el apartado B.

Las letras situadas encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los genes que responden a 9-KOT y el grupo de 5000 genes utilizados para validar estos análisis, usando un test binomial ($P < 0.001$ [a], $0.001 < P < 0.01$ [b], $0.01 < P < 0.05$ [c]).

35 genes (cluster 2), cuya inducción se mantuvo en varios de los tiempos analizados. Igualmente, y dentro de los genes reprimidos por 9-KOT, se definió un agrupamiento (cluster 3) con 48 genes, cuya expresión disminuía preferentemente a las dos horas de tratamiento, y un segundo grupo de 16 genes (cluster 4), cuya reducción se observaba en varios de los tiempos analizados.

La función biológica de los genes que responden a 9-KOT se examinó mediante el programa Gene Ontology (GO), en el que los genes de interés se agrupan de acuerdo a su correspondencia con determinadas funciones biológicas, denominadas términos. Los resultados de este análisis revelaron el enriquecimiento de los genes correspondientes al grupo 1, en términos asociados con modificación de la pared celular y la respuesta a estrés biótico, mientras que los genes pertenecientes al grupo 2, aparecían enriquecidos en términos asociados con la biosíntesis y el metabolismo de lípidos. Al igual que en el caso del grupo 1, los genes encuadrados dentro del grupo 3, aparecían enriquecidos en términos relacionados con la respuesta de la planta a estrés biótico. Los datos derivados de estos análisis aparecen recogidos en la Tabla S2 (incluida como Material Suplementario en el CD adjunto).

La funcionalidad de los genes de respuesta a 9-KOT se examinó, igualmente, mediante su comparación con otros perfiles transcriptómicos, disponibles en las bases de datos. Estos análisis revelaron un alto nivel de correspondencia (50%) entre los genes inducidos por 9-KOT y los genes que se inducen durante la respuesta a la infección de las bacterias *Pst* DC3000 *avrRpm1* y *Pst* DC3000. Igualmente, los genes inducibles con 9-KOT compartían un alto nivel de correspondencia con genes de respuesta a estrés oxidativo y a estrés osmótico (55% y 50%, respectivamente). Por otro lado, el 22% de los genes inducidos por 9-KOT correspondía a genes inducibles por SA, mientras que el 38% de ellos correspondían a genes de respuesta a ABA, tanto inducidos como reprimidos por esta hormona (Figura 9B). Los resultados derivados del análisis de los genes pertenecientes a los grupos 3 y 4, mostraron su correspondencia con genes de respuesta a infecciones bacterianas, estrés osmótico, ABA y SA (Figura 9C). La validez de estos análisis se sustentó con los resultados obtenidos mediante la comparación de un grupo de 5000 genes, seleccionados al azar, con las mismas bases de datos que las utilizadas para examinar los genes de respuesta a 9-KOT, y en la que se comprobó, que la correspondencia de estos genes, con los genes de respuesta a los estímulos analizados, no superaba, en ninguno de los casos, el 13% (Figura 9B y 9C).

4.2.2.2. Efecto del 9-KOT en la respuesta transcripcional a infecciones bacterianas

Con objeto de profundizar en el estudio de la acción protectora del 9-KOT se realizó un segundo ensayo transcriptómico, en el que procedimos a comparar los cambios de expresión producidos en respuesta a la infección por *Pst* DC3000, en hojas pre-tratadas con 9-KOT y en hojas pre-tratadas con agua. A tal efecto, se compararon los perfiles transcripcionales de muestras de ARN, obtenidas a 24 y 48 h tras la inoculación de la cepa bacteriana, sobre hojas que habían sido pre-tratadas con 9-KOT o con agua, 48 h antes. Al igual que se describe en el apartado anterior, se prepararon cuatro muestras de ARN independientes, para cada uno de los tiempos y tratamientos ensayados, que se hibridaron en cuatro experimentos independientes.

Los resultados de estos análisis se recogen en la Tabla S3 (incluida como Material Suplementario en el CD adjunto), en la que se muestran los genes cuya expresión varía durante la infección como consecuencia del pre-tratamiento con 9-KOT. Los perfiles transcriptómicos derivados de estos estudios revelaron que la aplicación de 9-KOT producía un número reducido de cambios de expresión en las muestras recogidas a las 24 h de la infección, mientras que las variaciones detectadas aumentaban, de forma significativa, a las 48 h, en donde se observó el cambio en los niveles de ARN en 580 genes distintos, de los que, la mayoría de ellos (538), reducían su expresión como consecuencia del tratamiento con 9-KOT.

El estudio de Gene Ontology de los genes modificados, reveló un enriquecimiento en términos asociados con fotosíntesis, entre los genes que vieron incrementada su expresión en los tejidos pre-tratados con 9-KOT (42 genes), mientras que los términos asociados con las respuestas a estreses bióticos y abióticos, así como a las respuestas a ABA, JA y auxinas, estaban enriquecidos dentro del grupo de genes (538 genes) cuya expresión disminuía como consecuencia del tratamiento con 9-KOT (Tabla S4, incluida como Material Suplementario en el CD adjunto).

El examen adicional de estos genes, en comparación con los datos depositados en los bancos de datos, reveló que, dentro del grupo de genes reprimidos en los tejidos pre-tratados con 9-KOT, aparecía un alto nivel de correspondencia con los perfiles transcriptómicos característicos de la respuestas a *Pst* DC3000 *avrRpm1* (86%) y *Pst* DC3000 (80%), así como con las respuestas a estrés oxidativo (57%) y a estrés osmótico (45%) (Figura 10A). Igualmente, dentro del grupo de genes cuya expresión disminuía como consecuencia del pre-tratamiento con 9-KOT, se detectó una correlación significativa con las respuestas a ABA (con un 35% de genes inducidos y un 7% reprimidos por ABA), JA (con un 25% de genes inducidos y un 7% reprimidos por JA) y SA (con una representación similar de genes inducidos y

reprimidos, de un 13% y 12%, respectivamente), mientras que la correlación con las respuestas a hormonas tales como etileno y auxinas era menor (19% y 16%, respectivamente) (Figura 10B). Al igual que se menciona en el apartado anterior, la validez de las correlaciones descritas se puso de manifiesto mediante al análisis de 5000 genes control, seleccionados al azar, y para los que la correlación con las respuestas a los tratamientos examinados no superaba el 15% en ninguno de los casos.

Los resultados de este estudio indicaban que, de los genes inducidos en respuesta a la infección con la bacteria *Pst* DC3000, el pre-tratamiento con 9-KOT provocaba la disminución de la expresión de aquellos relacionados con el estrés oxidativo asociado a la infección, así como de genes regulados por la acción de las hormonas ABA, JA y SA.

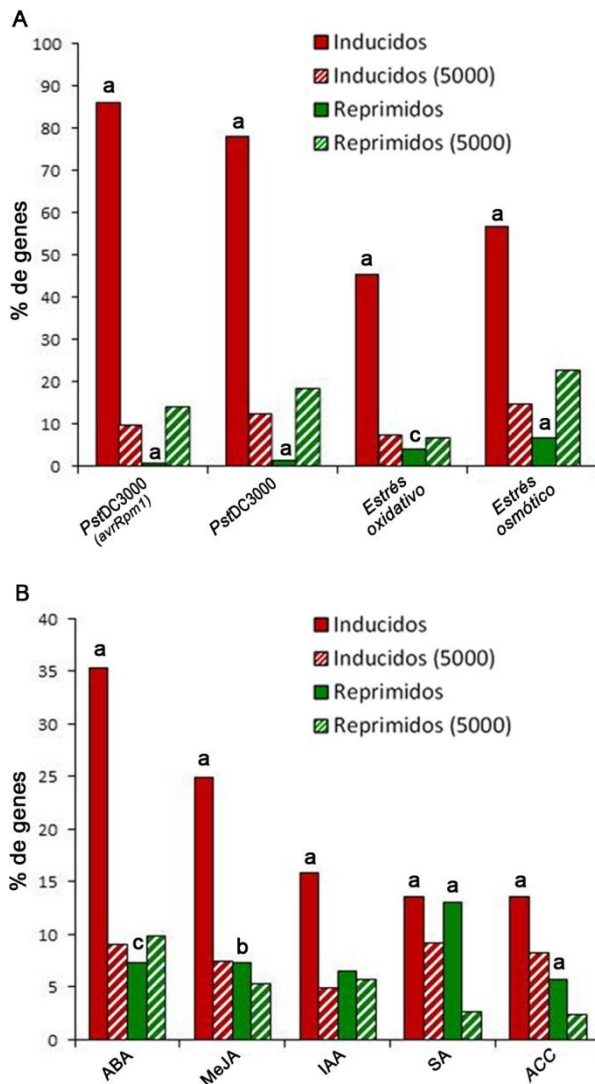


Figura 10. Análisis de los genes reprimidos en hojas pre-tratadas con 9-KOT tras la infección de *Pst* DC3000.

(A) Comparación de los genes reprimidos en hojas pre-tratadas con 9-KOT tras la infección de *Pst* DC3000 con la respuesta a estreses bióticos y abióticos disponibles en las bases de datos.

(B) Análisis de la correspondencia entre los genes reprimidos en hojas pre-tratadas con 9-KOT tras la infección de *Pst* DC3000 y los genes de respuesta a hormonas.

Se muestran los estímulos que presentan un mayor nivel de correspondencia. Las barras rojas y verdes indican la correspondencia con genes inducidos o reprimidos, respectivamente, para cada estímulo específico. Se usó un grupo de 5000 genes seleccionados al azar (barras rayadas) para validar la significación de estos análisis. Las letras encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los genes que responden a 9-KOT y un grupo de 5000 genes seleccionados al azar, con los análisis transcripcionales disponibles en las bases de datos, usando un test binomial ($P < 0.001$ [a], $0.001 < P < 0.01$ [b], $0.01 < P < 0.05$ [c]).

4.2.2.3. El pre-tratamiento con 9-KOT altera la homeostasis hormonal durante una infección de *Pst DC3000*

La producción de SA, ABA y JA forma parte de la respuesta de la planta frente a la infección por patógenos, en donde pueden ejercer distintas acciones frente a distintos tipos de patógenos. Así, mientras que el SA juega un papel esencial en la activación de una respuesta de defensa frente a la infección de patógenos biotrofos, la producción de ABA y JA ejerce una acción antagonista que favorece la infección (Cui y col., 2005, Mohr y Cahill, 2007; Flors y col., 2008; Koornneef y Pieterse, 2008; de Torres-Zabala y col., 2007 y 2009). De esta manera, el nivel de producción de estas hormonas, así como la interacción de las rutas de señalización que regulan, juegan un papel determinante en el establecimiento de la interacción planta-patógeno. Por ello, los resultados que mostraban que los cambios transcripcionales asociados a la acción protectora del 9-KOT afectaban a la expresión de genes regulados por estas hormonas, sugerían que la aplicación de este compuesto podría modificar su producción durante la infección bacteriana y, que dicha modificación, podría determinar, al menos en parte, la acción defensiva de este compuesto. Con objeto de examinar esta posibilidad procedimos a evaluar los niveles de hormonas durante la respuesta a *Pst DC3000* de tejidos pre-tratados con 9-KOT, en comparación a los niveles hormonales observados en tejidos pre-tratados con agua, utilizados como control. De acuerdo con los trabajos que demuestran la producción de SA, ABA y JA, durante la respuesta de la planta a la infección bacteriana, el análisis de los tejidos control (pre-tratados con agua), permitieron observar que la infección de *Pst DC3000* provoca un aumento progresivo en los niveles de las tres hormonas evaluadas (Figura 11). La producción de SA se inicia a las 8 h de infección, alcanzando niveles máximos de acumulación a las 24 h, mientras que la producción de ABA y JA se retrasaba en el tiempo, alcanzando el máximo nivel de acumulación a las 48 y 72 h, respectivamente. Además, el análisis de los tejidos pre-tratados con 9-KOT permitió identificar cambios significativos en la acumulación de las tres hormonas examinadas. Así, el pre-tratamiento con 9-KOT produce un aumento de los niveles de SA a las 48 y 72 h de la infección, mientras que, por el contrario, los niveles de ABA y JA disminuyen, de forma significativa, en las muestras correspondientes a las 48 y 72 h en el caso del ABA, y de 72 h en el caso del JA.

Los resultados de estos análisis revelaban, que la acción protectora del 9-KOT estaba acompañada de una modificación en los niveles de las hormonas testadas. Además, de acuerdo a la acción de estas hormonas en la respuesta de defensa frente a patógenos biotrofos, el aumento de los niveles de SA, y la disminución de ABA y JA, podría ejercer un efecto positivo en la activación de la respuesta de defensa.

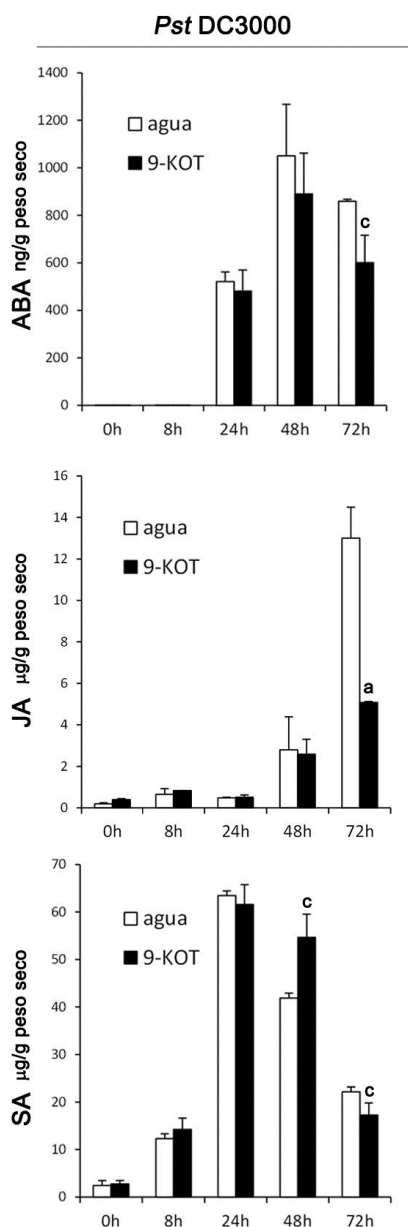


Figura 11. Determinación de los niveles de ABA, JA y SA durante la infección de *Pst* DC3000 en hojas de plantas silvestres pre-tratadas con agua y 9-KOT.

Hojas de plantas silvestres se trataron con agua o 9-KOT, 48 h antes de la infección bacteriana. Los tejidos se recogieron a los tiempos indicados y se midieron los niveles de ABA, JA y SA según se describe en Materiales y Métodos. Los datos mostrados corresponden a las medias y errores estándar de tres experimentos independientes. Las letras encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los tejidos tratados con 9-KOT. ($P < 0.001$ [a], $0.01 < P < 0.05$ [c]).

4.2.2.4. La acción del 9-KOT contrarresta la estrategia de virulencia empleada por *Pst* DC3000

El aumento de los niveles de ABA y JA durante las etapas tardías de la infección forma parte de la estrategia infectiva de la bacteria *Pst* DC3000, en la que la liberación de efectores bacterianos al interior de la célula vegetal, le permite manipular la homeostasis hormonal e interferir con la activación de la respuesta de defensa (de Torres y col., 2007 y 2009). De acuerdo con estos datos pudimos comprobar que, dentro del grupo de genes de respuesta a ABA y JA, cuya expresión se reduce como consecuencia del tratamiento con 9-KOT, el 60% de los genes de respuesta a ABA y el 41% de los que responde a JA, se encuentran dentro del grupo de genes cuya

expresión se induce en la planta, en respuesta a la liberación de efectores bacterianos al interior de la célula vegetal (Truman y col., 2006). De esta manera, la reducción de los niveles de ABA y JA en los tejidos tratados con 9-KOT contribuiría a contrarrestar los mecanismos de virulencia bacterianos y favorecería así la defensa de la planta. De acuerdo con esta idea, era posible predecir que el pre-tratamiento con 9-KOT no afectaría al crecimiento de la cepa mutante *Pst* DC3000 *hrpA*, que carece del sistema de secreción tipo III (T3SS) que permite la liberación de los efectores de virulencia desde la bacteria a la célula hospedadora (Truman y col., 2006).

Con objeto de examinar esta hipótesis, procedimos a evaluar el crecimiento del mutante *Pst* DC3000 *hrpA* en hojas de plantas silvestres, pre-tratadas con 9-KOT, en comparación con el crecimiento, de la misma cepa mutante, en hojas de plantas silvestres pre-tratadas con agua. De acuerdo con su incapacidad para liberar factores de virulencia al interior de la célula vegetal, el crecimiento alcanzado por la cepa mutante *Pst* DC3000 *hrpA* en las plantas silvestres pre-tratadas con agua, era claramente inferior al alcanzado por la bacteria *Pst* DC3000. Además, de acuerdo a lo esperado, mientras que la aplicación de 9-KOT provocaba una importante reducción en la tasa de crecimiento alcanzada por la bacteria *Pst* DC3000, este tratamiento no modificaba el crecimiento de la cepa mutante *Pst* DC3000 *hrpA*, que alcanzaba el mismo nivel que el caracterizado, para la misma cepa, en las hojas de las plantas silvestres pre-tratadas con agua (Figura 12).

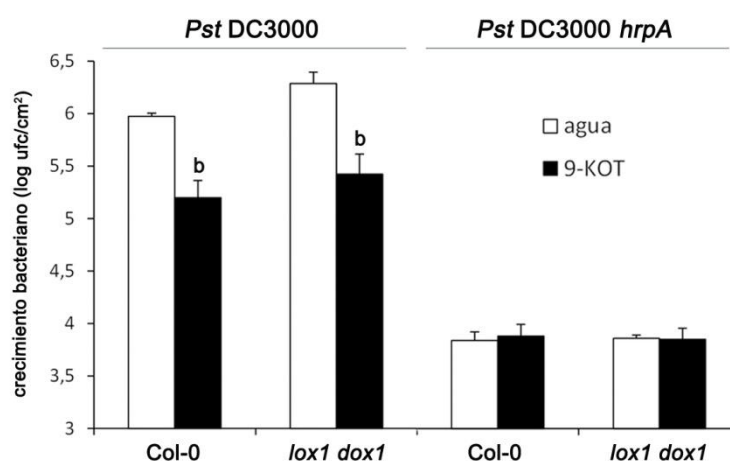


Figura 12. Efecto del 9-KOT en el crecimiento de distintas cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*.

Se muestra el crecimiento de las cepas *Pst* DC3000 and *Pst* DC3000 *hrpA* en hojas de plantas silvestres y mutantes *lox1 dox1*. Las hojas examinadas se trataron con agua y 9-KOT, 48 h antes de la infección, y se evaluó el crecimiento bacteriano a los 3 días de la inoculación. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes. Las letras encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los tejidos tratados con 9-KOT. ($0.001 < P < 0.01$ [b]).

El efecto de la aplicación de 9-KOT sobre las dos cepas bacterianas descritas, *Pst* DC3000 y *Pst* DC3000 *hrpA*, se examinó igualmente en el mutante *lox1 dox1*. De esta manera, nos proponíamos examinar si la aplicación de 9-KOT podría complementar el defecto del mutante *lox1 dox1* para controlar el crecimiento bacteriano, y si dicho tratamiento podría modificar el crecimiento de la cepa mutante *Pst* DC3000 *hrpA*. Los resultados de estos estudios revelaron que, la aplicación de 9-KOT sobre el mutante *lox1 dox1*, provoca una complementación parcial del fenotipo mutante, reduciendo el crecimiento de la bacteria *Pst* DC3000 de forma significativa, en comparación al nivel de crecimiento alcanzado en las hojas de plantas pre-tratadas con agua. Además, al igual que ocurría en las plantas silvestres, el crecimiento de la cepa mutante *Pst* DC3000 no mostraba variaciones significativas, independientemente del pre-tratamiento al que era sometido el tejido infectado (Figura 12).

Los resultados de estos estudios apoyan la participación del 9-KOT contrarrestando los mecanismos de virulencia bacterianos relacionados con la liberación de efectores en la célula vegetal.

4.3. LA PÉRDIDA DE LAS FUNCIONES LOX1 Y α -DOX1 PROVOCA LA ALTERACIÓN DEL BALANCE HORMONAL DURANTE LA INFECCIÓN BACTERIANA.

Teniendo en cuenta que la aplicación de 9-KOT, antes de la inoculación de *Pst* DC3000, provocaba una reducción en los niveles de ABA y JA, era esperable que ocurrieran cambios hormonales de sentido opuesto durante la respuesta del mutante *lox1 dox1*, con niveles reducidos de 9-KOT, a la infección de *Pst* DC3000. Para evaluar esta posibilidad, procedimos a determinar los niveles de SA, ABA y JA, en hojas de plantas silvestres y mutantes *lox1 dox1*, tras la inoculación de la cepa bacteriana *Pst* DC3000. En estos ensayos, y dado el defecto del doble mutante *lox1 dox1* para establecer una SAR efectiva, los niveles de las hormonas de interés se determinaron tanto en tejidos infectados, no pre-tratados, como en tejidos sistémicos de plantas sometidas a una primera inoculación con la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1*. Como se muestra en la Figura 13, los resultados de estos estudios no permitieron observar diferencias significativas en los niveles de SA que se producen en los tejidos de las plantas mutantes *lox1 dox1*, en comparación con los correspondientes a las plantas silvestres. A diferencia de estos resultados, los niveles de JA aumentan de forma significativa en las muestras obtenidas a las 72 h de la infección, tanto en tejidos locales como sistémicos, mientras que las variaciones en los niveles de ABA se detectan principalmente en los tejidos sistémicos a las 48 y 72 h de la infección. Los

resultados de estos análisis indican que la ausencia de las actividades LOX1 y α -DOX1 están asociadas con una alteración en la acumulación de ABA y JA.

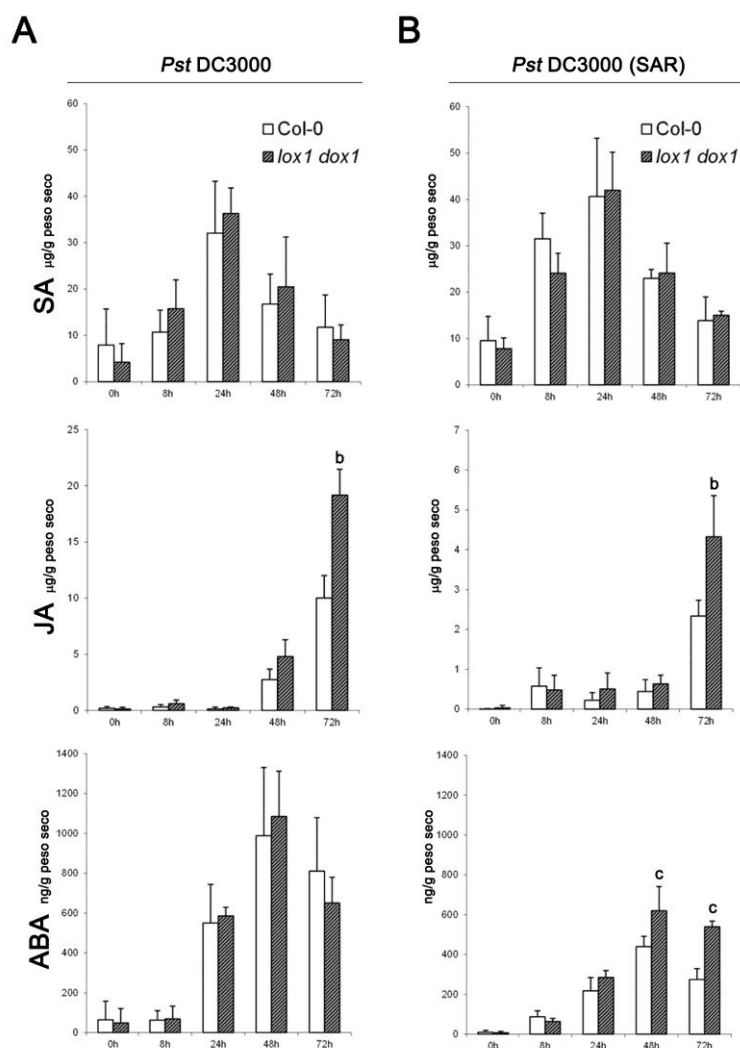


Figura 13. Determinación de los niveles de ABA, JA y SA en hojas de plantas silvestres y *lox1 dox1* durante una infección bacteriana.

(A) Se recogió, en los tiempos indicados, tejido de plantas silvestres y mutantes *lox1 dox1* en respuesta a la inoculación local *Pst* DC3000 (10^6 cfu/mL) y se procedió a la determinación de los niveles de hormonas.

(B) Hojas distales de plantas, previamente inoculadas con *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^7 cfu/mL), fueron sometidas a un segundo tratamiento con *Pst* DC3000 (10^6 cfu/mL). El tejido se sometió a la determinación de los niveles hormonales en los tiempos indicados. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes. Las letras encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre las plantas silvestres y las mutantes *lox1 dox1* ($0.001 < P < 0.01$ [b], $0.01 < P < 0.05$ [c]).

4.3.1. Los enzimas α -DOX1 y LOX1 participan en la respuesta de la planta a la producción y/o señalización de ABA

Los datos descritos anteriormente mostraban, que los niveles de ABA y JA que se acumulan durante la infección de la bacteria *Pst* DC3000 eran mayores en el mutante *lox1 dox1* que en las plantas silvestres. Estos resultados permitían suponer, que la respuesta de los mutantes *lox1 dox1* al tratamiento con dichas hormonas podría variar con respecto a la de las plantas silvestres. Para evaluar esta posibilidad, procedimos a examinar las alteraciones fenotípicas, inducidas en las plántulas de *Arabidopsis*, en respuesta a la presencia de hormonas en el medio de crecimiento. El estudio de los fenotipos de interés se realizó empleando plántulas crecidas *in vitro* en

medio MS conteniendo ABA, JA o SA, a distintas concentraciones. El efecto de estas hormonas se examinó tanto en el doble mutante *lox1 dox1*, como en los mutantes individuales *lox1* y *dox1*. Además, y como control de estos experimentos, en estos estudios se incluyeron las plantas mutantes *abi1-2*, *coi1-1* y *npr1*, alteradas en los procesos de señalización regulados por ABA, JA y SA, respectivamente. Como se observa en las Figuras 14 y 15, las hormonas examinadas provocan la inhibición del crecimiento de la raíz de las plantas silvestres, que aparece más corta que la de las mismas plantas crecidas en medio MS. El análisis de los mutantes individuales *lox1* y *dox1*, así como del doble mutante *lox1 dox1*, no permite apreciar diferencias relevantes en la respuesta a la presencia de SA y JA, con respecto a la observada en las plantas silvestres (Figura 14). Por el contrario, el acortamiento producido en

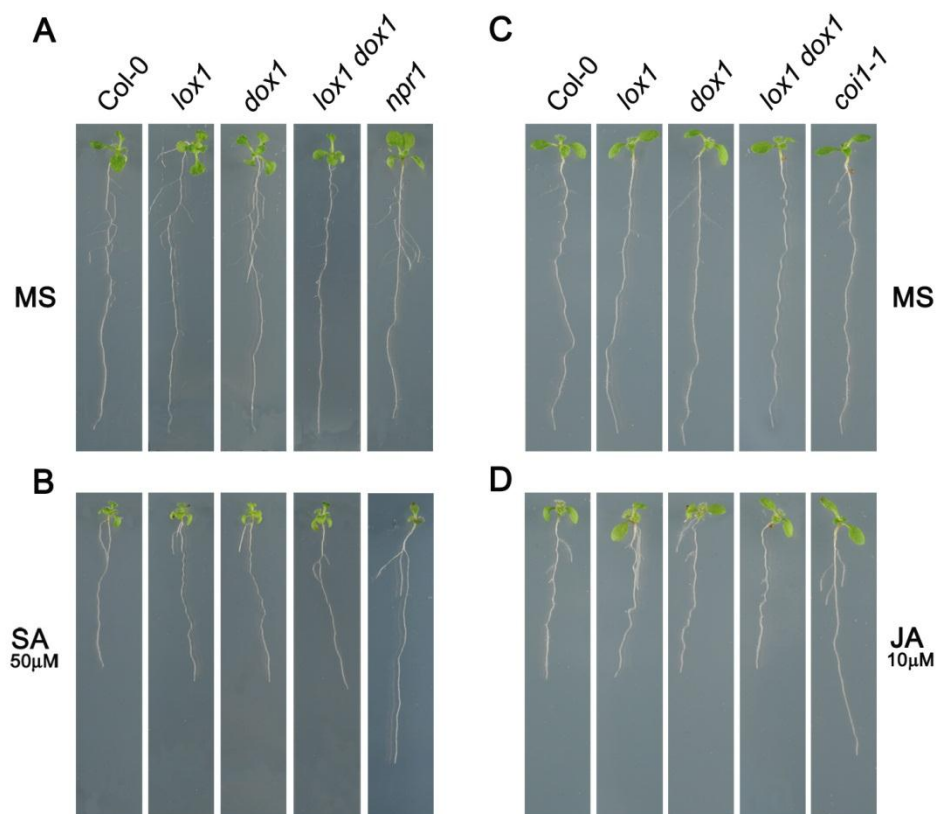


Figura 14. Alteraciones fenotípicas en plántulas silvestres y mutantes de oxilipinas crecidas *in vitro* en presencia de SA y JA.

(A) Fenotipo de plántulas crecidas 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS fresco.

(B) Fenotipo de plántulas crecidas durante 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS conteniendo SA (50 μ M).

(C) Idéntico a lo descrito en el apartado (A).

(D) Fenotipo de plántulas crecidas durante 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS conteniendo JA (10 μ M).

Se muestran los fenotipos de plantas silvestres y mutantes *lox1*, *dox1*, *lox1 dox1*, *npr1* (insensible a SA) y *coi1-1* (insensible a JA).

respuesta a la presencia de ABA en el medio de crecimiento, era claramente mayor en el mutante *lox1 dox1* que en las plantas silvestres, de manera que la reducción de la longitud de la raíz del mutante *lox1 dox1* era similar a la observada en el mutante *abi1-2* hipersensible a ABA (Sáez y col., 2006). A diferencia del doble mutante *lox1 dox1*, la respuesta de los mutantes individuales *lox1* y *dox1* a la presencia de ABA no mostraba diferencias significativas con respecto a la observada en las plantas silvestres (Figura 15).

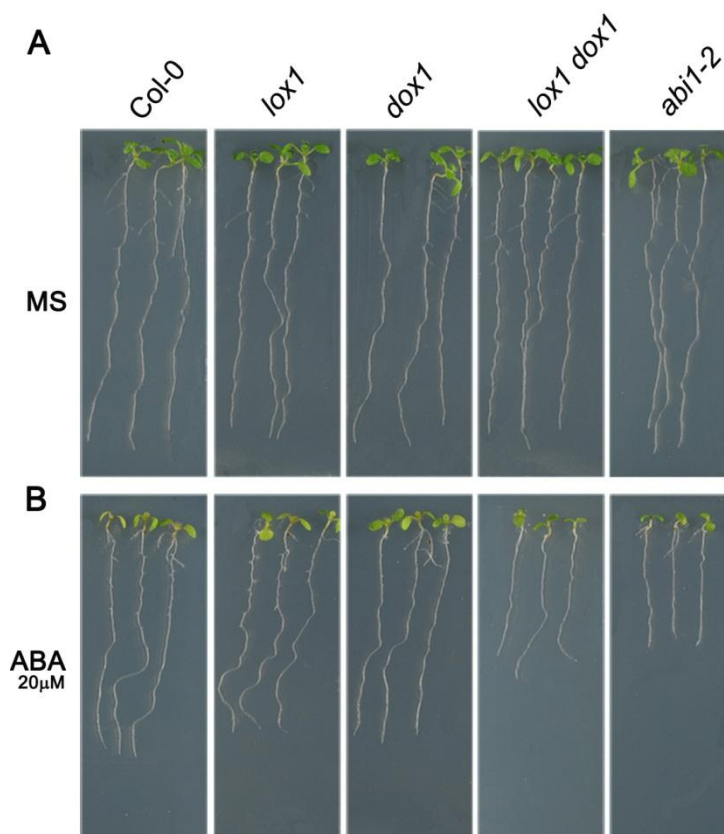


Figura 15. Alteraciones fenotípicas en plantas silvestres, *lox1 dox1*, *lox1*, *dox1* y *abi1-2* crecidas en un medio con ABA.

(A) Aspecto de plántulas crecidas 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS fresco.

(B) Fenotipo de plántulas crecidas durante 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS conteniendo ABA (20 μM).

Se muestran los fenotipos de plantas silvestres y mutantes *lox1*, *dox1*, *lox1 dox1*, *abi1-2* (hipersensible a ABA).

Los resultados de estos análisis indicaban que las actividades enzimáticas LOX1 y α-DOX1 participan en la regulación de la producción de ABA, así como en la respuesta de la planta a esta hormona.

4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE *noxy1*

4.4.1. El mutante *noxy1* es insensible a la aplicación de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT y del herbicida isoxaben.

De forma paralela a la caracterización de los mutantes deficientes en la síntesis de oxilipinas, y con objeto de examinar el papel de estos compuestos en la defensa vegetal, los resultados de este trabajo incluyen la caracterización del mutante *noxy1*, aislado en base a su insensibilidad a la aplicación de 9-hidroxi-octadecatrienoico (9-HOT), un producto sintetizado a través de la acción de los enzimas 9-LOXs, cuya presencia en el medio de crecimiento provoca la alteración del desarrollo radicular, que adquiere un aspecto ondulado, y presenta una reducción del número de raíces laterales, en comparación con el fenotipo que se observa en la raíz de plántulas silvestres crecidas en ausencia de este producto. Además, y acompañando a las alteraciones fenotípicas descritas, los estudios dirigidos a examinar la respuesta de las plantas a la aplicación de 9-HOT, revelaban que el tratamiento con este compuesto daba lugar a la formación de depósitos de calosa y a la producción de una respuesta de estrés oxidativo, en la que se producían altos niveles de ión superóxido (Velloso y col., 2007). El análisis de estas respuestas en el mutante *noxy1* permitió comprobar la insensibilidad de estas plantas a la aplicación de 9-HOT. Así, como se observa en la Figura 16, la mutación *noxy1* conlleva la insensibilidad de la planta a 9-HOT en las tres respuestas examinadas, activación de la ondulación radicular o *waving*, formación de depósitos de calosa y generación de ión superóxido, que era en todos los casos inferior a la observada en las plantas silvestres.

Al igual que ocurre en respuesta a la aplicación de 9-HOT, la presencia de 9-KOT en el medio de crecimiento provoca la alteración del crecimiento radicular, que crece mostrando la ondulación o *waving* de la raíz. Estos resultados, junto con el hecho de que el 9-HOT puede actuar como precursor en la síntesis de 9-KOT, sugieren que las respuestas a ambos compuestos compartirían una ruta común de señalización. De acuerdo a esta idea, la falta de *waving* radicular del mutante *noxy1* en respuesta a la presencia de 9-KOT (Figura 17), puso de manifiesto la insensibilidad de las plantas *noxy1* a la presencia de dicha oxilipina y, por tanto, que la respuesta de la planta a ambos compuestos se establece a través de procesos comunes de señalización. Finalmente, y con objeto de examinar la respuesta del mutante *noxy1* en relación a la caracterizada en otros mutantes *noxy* aislados en el laboratorio, procedimos a examinar la respuesta del mutante *noxy1* a la presencia de isoxaben, un herbicida que provoca la parada del crecimiento de la planta como consecuencia de la inhibición de

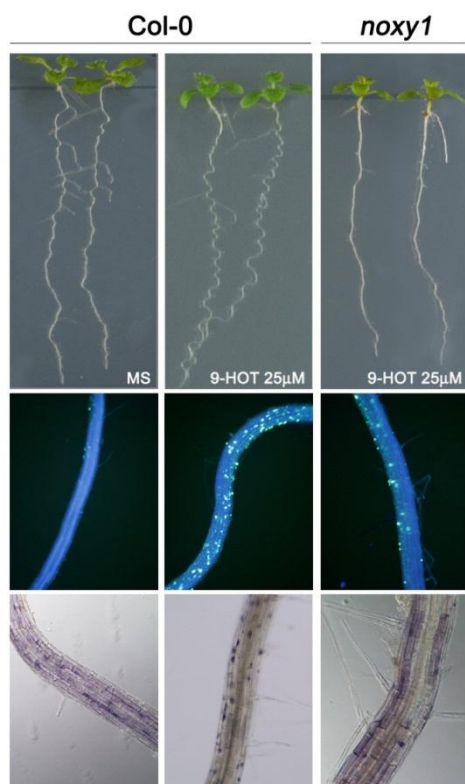


Figura 16. Caracterización fenotípica del mutante *noxy1*.

Fenotipo de plántulas silvestres y mutantes *noxy1* crecidas 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS fresco o a medio MS conteniendo 9-HOT (25µM). Se muestran imágenes de raíces teñidas con azul de anilina, en las que se aprecian los depósitos de calosa formados en las plantas silvestres en respuesta al tratamiento con 9-HOT, así como los depósitos de azul tretazolio revelados mediante la tinción con NBT.

la síntesis de celulosa. De acuerdo a lo observado en otros mutantes *noxy*, el crecimiento del mutante *noxy1* muestra una sensibilidad reducida a la presencia de este compuesto, en comparación con la respuesta observada en las plantas control, en las que se produce el engrosamiento de la raíz y el acortamiento de su longitud, efectos cuya intensidad son claramente menores en el mutante *noxy1*.

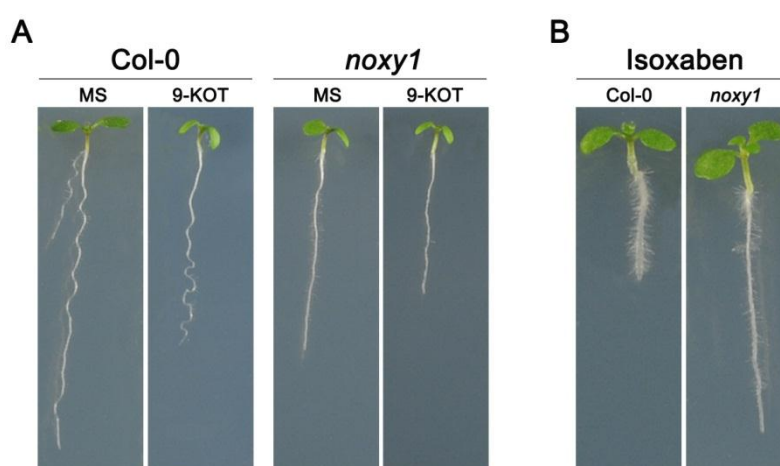


Figura 17. Respuesta del mutante *noxy1* a la aplicación de 9-KOT e Isoxaben.

(A) Fenotipo de plántulas silvestres y mutantes *noxy1* crecidas 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS fresco conteniendo 9-KOT (25µM).

(B) Se muestran imágenes de plántulas silvestres y mutantes *noxy1* que han germinado y crecido durante 6 días en medio MS conteniendo Isoxaben (20 nM).

4.4.2. Respuesta del mutante *noxy1* frente a la infección de patógenos

Dado nuestro interés en el estudio de la función de los enzimas 9-LOX en la defensa vegetal, procedimos a examinar la respuesta del mutante *noxy1* a la infección de patógenos. La insensibilidad del mutante *noxy1* a la aplicación de 9-HOT y 9-KOT y, por tanto, en la ruta de señalización que se activa en respuesta a estos compuestos de defensa, permitía pensar que la mutación *noxy1* provocaría la reducción de la capacidad defensiva del mutante *noxy1* frente a la infección de bacterias biotrofas. Por otro lado, la formación de lesiones espontáneas durante el desarrollo vegetal está con frecuencia asociada a la activación de la expresión de genes de defensa, que potencian la capacidad defensiva de la planta frente a distintos tipos de patógenos, biotrofos o necrotrofos, dependiendo de la mutación (Dietrich y col., 1994; Lorrain y col., 2003; Yang y col., 2004; Mühlenbock y col., 2008). Por ello, y con objeto de examinar el efecto de la mutación *noxy1* en la capacidad defensiva de la planta, procedimos a caracterizar la respuesta a la infección con las bacterias biotrofas del género *Pseudomonas* utilizadas en los apartados anteriores, y con hongos necrotrofos pertenecientes a los géneros *Botrytis* y *Alternaria*.

4.4.2.1. La mutación *noxy1* aumenta la resistencia a la infección local de bacterias biotrofas

La respuesta del mutante *noxy1* frente a la infección de bacterias biotrofas se llevó a cabo mediante la cuantificación del crecimiento de las cepas *Pst* DC3000 *avrRpm1* (avirulenta) y *Pst* DC3000 (virulenta), y la observación de los síntomas provocados durante la infección, en comparación con la respuesta a la infección en las plantas silvestres. Los resultados de estos análisis mostraron una importante reducción del crecimiento bacteriano en el mutante *noxy1*, que disminuye un 65% en el caso de la bacteria virulenta y más de un 80% en el de la cepa avirulenta, con respecto al crecimiento alcanzado en las plantas silvestres (Figura 18A). El análisis de la expresión de los genes *PR1*, *PR2*, y *PR4*, marcadores de la defensa vegetal, permitió comprobar que la reducción del crecimiento bacteriano en las plantas mutantes estaba acompañada de un aumento en los niveles de expresión de los genes *PR1* y *PR2*, mientras la expresión de gen *PR4*, marcador de la ruta de defensa regulada por la acción del etileno y del ácido jasmónico, era menor en el mutante *noxy1* que en las plantas control (Figura 18B).

Acompañando al aumento de la resistencia del mutante *noxy1*, la presencia de lesiones producidas en los tejidos infectados permitía observar una importante reducción del área afectada (Figura 18C). Así, mientras que en las plantas silvestres

los síntomas producidos por las bacterias examinadas abarcaban todo el área inoculada, en el mutante *noxy1* se forman lesiones de menor tamaño, que en ningún caso llegaban a ocupar todo el área infectada. La tinción de las lesiones con azul de tripano y diaminobencidina, marcadores de muerte celular y de estrés oxidativo, respectivamente, mostraron que la intensidad de ambos parámetros disminuía en el mutante *noxy1*. Así, mientras que la tinción con azul de tripano permitía visualizar el

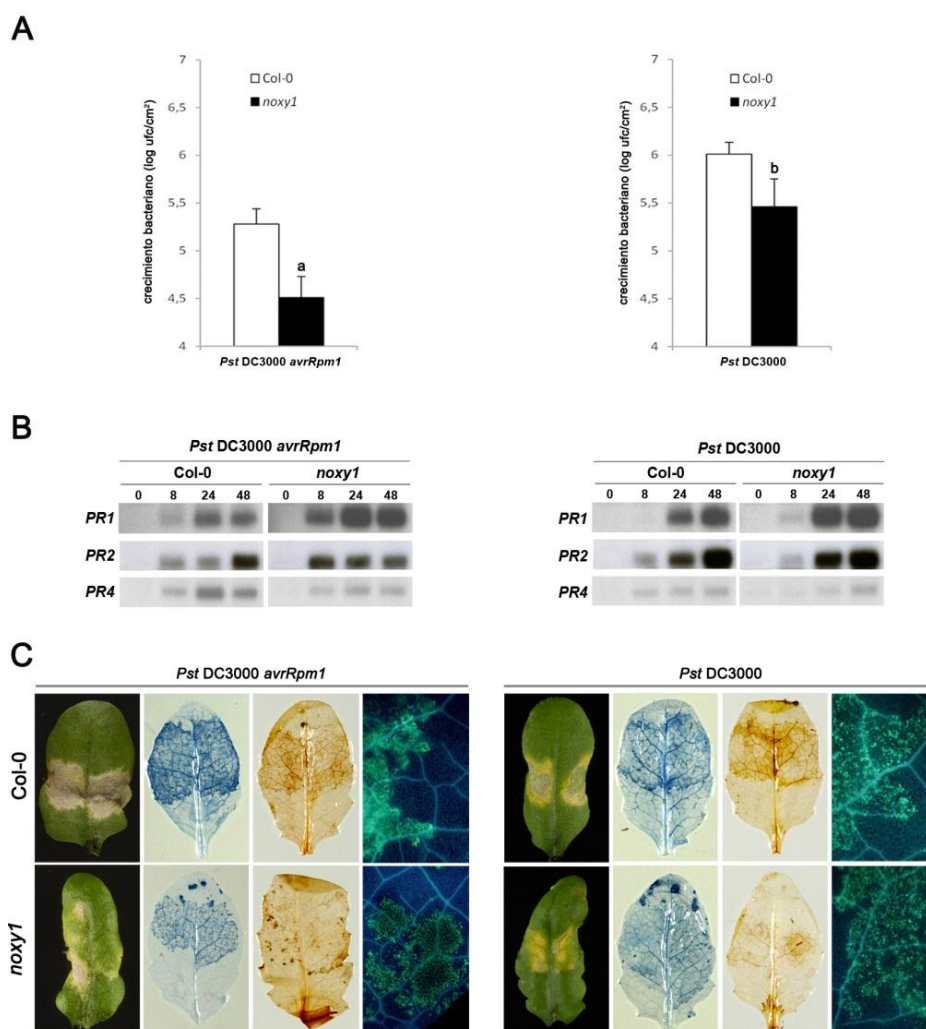


Figura 18. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy1* a infecciones bacterianas.

(A) Nivel de crecimiento alcanzado por las cepas *Pst DC3000 avrRpm1* (10^5 ufc/mL) y *Pst DC3000* (10^5 ufc/mL) en plantas silvestres y mutantes *noxy1*, a los 4 días de infección. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes. Las letras encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de crecimiento bacteriano de plantas silvestres y mutantes. ($P < 0.001$ [a], $0.001 < P < 0.01$ [b]).

(B) Expresión de genes de defensa en plantas silvestres y mutantes *noxy1* inoculadas con las cepas *Pst DC3000 avrRpm1* (10^6 ufc/mL) y *Pst DC3000* (10^6 ufc/mL). Los filtros conteniendo los ARNs obtenidos a distintos tiempos de infección se hibridaron con sondas preparadas a partir de los genes *PR1*, *PR2* y *PR4*.

(C) Ejemplos representativos de las lesiones desarrolladas en plantas silvestres y mutantes *noxy1* tras la inoculación de las dos cepas bacterianas examinadas. Las tinciones con azul de tripano, diaminobencidina y azul de anilina se realizaron a las 48 h tras la inoculación bacteriana.

área inoculada en ambos tipos de plantas, la intensidad de la coloración azul era siempre más débil en el mutante *noxy1* que en las plantas control. De la misma manera, la acumulación de agua oxigenada, revelada mediante la aplicación de diaminobencidina, era claramente inferior en el mutante *noxy1* que en las plantas control. Finalmente, procedimos a examinar la acumulación de calosa mediante la tinción de las hojas infectadas con azul de anilina. Los resultados de estos análisis permiten observar, que la acumulación de calosa en el mutante *noxy1* disminuye en las hojas infectadas con respecto a la observada en las plantas silvestres. La disminución de los niveles de calosa en las plantas mutantes era patente en las dos interacciones examinadas, aunque las diferencias observadas eran claramente mayores en la interacción incompatible, en donde la calosa aparece preferentemente confinada al área que rodea las lesiones (Figura 18C).

Los datos de estos estudios ponían de manifiesto la participación de la proteína NOXY1 en la respuesta de defensa de la planta frente a la infección de bacterias patógenas, y que la mutación *noxy1* provocaba el aumento de la resistencia de la planta frente a la infección de las dos bacterias examinadas, para las que la reducción del crecimiento bacteriano estaba acompañada con una clara reducción en el tamaño de las lesiones, la intensidad de la muerte celular, la producción de agua oxigenada y la acumulación de calosa.

4.4.2.2. La mutación *noxy1* provoca una disminución en el nivel de daño celular asociado a la activación de una reacción hipersensible.

El daño celular asociado a la formación de lesiones está acompañado de la liberación de iones al espacio extracelular, cuya cuantificación se utiliza como medida del daño celular producido. Por ello, y con objeto de comprobar si, como se concluye de los resultados descritos en el apartado anterior, la mutación *noxy1* provoca una reducción en el daño celular asociado a la activación de una reacción hipersensible, procedimos a evaluar la liberación de iones a partir de discos de hojas inoculadas con la cepa avirulenta. Los discos se recogen a distintos tiempos tras la infección y se sumergen en una solución acuosa, en la que se determina en nivel de conductividad. Los resultados de estos análisis revelan el aumento de la conductividad durante la formación de las lesiones en las plantas silvestres (Figura 19). El nivel de conductividad de los mutantes *noxy1* era similar al detectado en las plantas silvestres a las 24 h de infección, sin embargo, mientras que dicho valor aumenta significativamente a tiempos posteriores en las plantas silvestres, el nivel de conductividad en el mutante *noxy1* disminuye a las 48 h de infección por debajo de los valores detectados a las 24 h.

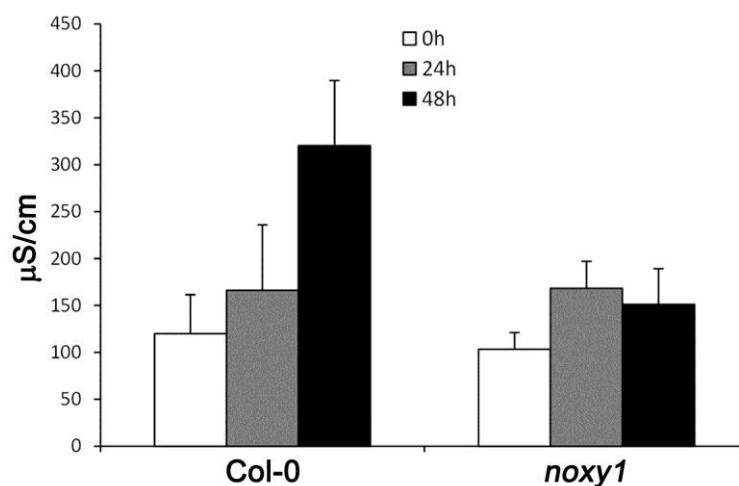


Figura 19. Medida de la conductividad en hojas de plantas silvestres y mutantes *noxy1* inoculadas con la bacteria *Pst DC3000 avrRpm1*.

Cuantificación de los niveles de conductividad en plantas silvestres y mutantes *noxy1* a distintos tiempos tras la inoculación de la cepa avirulenta *Pst DC3000 avrRpm1* (10^6 ufc/mL). Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes.

Los resultados de estos análisis permiten confirmar la participación de la proteína NOXY1 en la defensa de la planta frente a la infección de bacterias patógenas, en donde contribuye a regular el nivel de daño celular asociado a la infección.

4.4.2.3. La mutación *noxy1* aumenta la resistencia de los tejidos sistémicos a la infección de bacterias biotrofas

Además de la respuesta local, y teniendo en cuenta los datos que indicaban la participación de las proteínas α -DOX1 y LOX1, y de sus derivados, en el establecimiento de la defensa sistémica (SAR), procedimos a analizar el efecto de la mutación *noxy1* en esta respuesta. Para ello procedimos a inocular la hojas basales de la planta con la cepa avirulenta *Pst DC3000 avrRpm1* inductora de la SAR y a examinar, 48 h después, la respuesta de las hojas sistémicas a una infección secundaria con la bacteria virulenta *Pst DC3000* (Figura 20). Los resultados de estos análisis permitieron comprobar que la activación de la defensa sistémica, en las plantas control, provocaba una reducción del 50% en el crecimiento de la bacteria virulenta en comparación con el alcanzado en plantas control pre-tratadas con $MgCl_2$. Igualmente, la activación de la respuesta sistémica en el mutante *noxy1* provocaba la reducción del crecimiento de la bacteria virulenta en los tejidos sistémicos. Esta reducción era ligeramente superior a la observada en las plantas control, y provocaba una disminución de un 60% en el crecimiento de la bacteria *Pst DC3000* con respecto

al evaluado en las hojas de plantas mutantes *noxy1* pre-tratadas con MgCl_2 . Además, la observación de las lesiones producidas en los tejidos sistémicos permitía comprobar una reducción importante del daño celular en relación al observado en una infección local (ver Figura 18C). Dicha reducción era aparente en los dos tipos de plantas examinadas, plantas control silvestres y plantas mutantes *noxy1*.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la capacidad de los mutantes *noxy1* para activar una respuesta de defensa sistémica similar a la observada en las plantas silvestres y, por tanto, que el efecto de la mutación *noxy1* se manifiesta principalmente durante la activación de la defensa local.

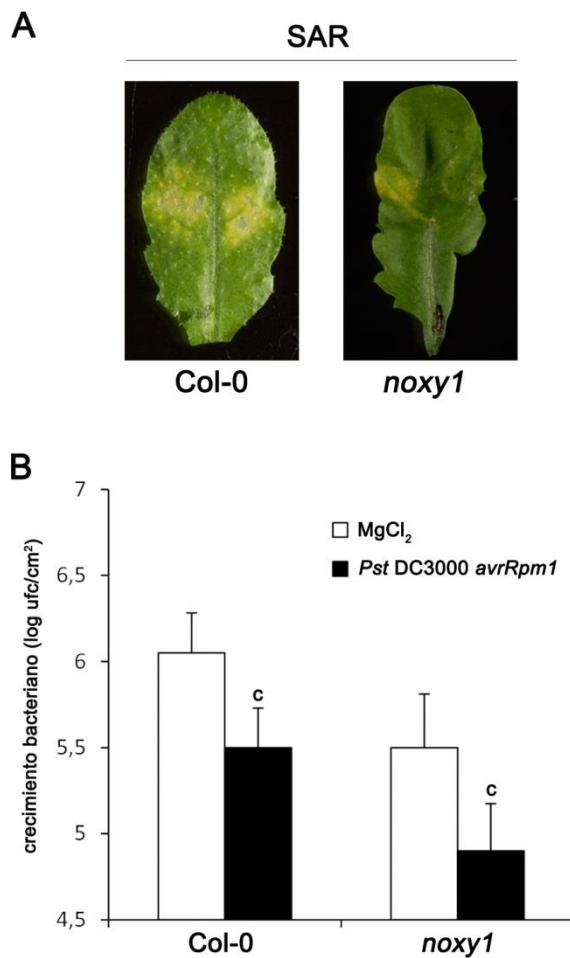


Figura 20. Activación de la defensa sistémica en plantas silvestres y mutantes *noxy1*.

(A) Aspecto de las lesiones desarrolladas tras la inoculación con la cepa *Pst* DC3000 (10^6 ufc/mL) en hojas distales de plantas silvestres y mutantes *noxy1* pre-tratadas 48 h antes con la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^7 ufc/mL).

(B) Nivel de crecimiento de la cepa *Pst* DC3000 (10^5 ufc/mL) a los 4 días de infección en hojas distales de plantas silvestres y mutantes *noxy1*, sometidas 48 h antes a la inoculación de la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^7 ufc/mL) (barras negras) o MgCl_2 (barras blancas), en las hojas basales de la planta. Los datos corresponden a la media y errores estándar de 3 experimentos independientes. Las letras encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de crecimiento bacteriano de las muestras control, pre-tratadas con MgCl_2 , y los tejidos pre-tratados con la bacteria. ($0.01 < P < 0.05$ [c]).

4.4.2.4. La mutación *noxy1* provoca un aumento en la susceptibilidad a la infección de hongos necrotrofos.

La activación de una respuesta de defensa frente a la infección de patógenos biotrofos ejerce, con frecuencia, una acción antagonista sobre la activación de los mecanismos de defensa frente a patógenos necrotrofos. Por ello, y una vez descrita la resistencia mostrada por el mutante *noxy1* frente a la infección de patógenos biotrofos,

nos propusimos analizar la respuesta de los mutantes *noxy1* a patógenos necrotrofos, utilizando para ello los hongos *Alternaria Brassicicola* y *Botrytis cinerea*. La infección de ambos patógenos provoca la maceración del tejido infectado de las plantas susceptibles y la formación de esporas que cubren el área dañada en las últimas etapas de la infección. La evaluación de la infección se realizó mediante la observación de los síntomas producidos, que se agruparon, en ambos casos, en tres niveles, designados I, II y III, de acuerdo a su severidad. El análisis de los síntomas producidos por los dos hongos examinados reveló el aumento de la susceptibilidad del mutante *noxy1* frente a ambos tipos de patógenos, siendo las diferencias observadas entre el *noxy1* y las plantas silvestres mayores en la interacción con el hongo *Botrytis cinerea*. Así, como se muestra en la Figura 21, la infección de este último produce un

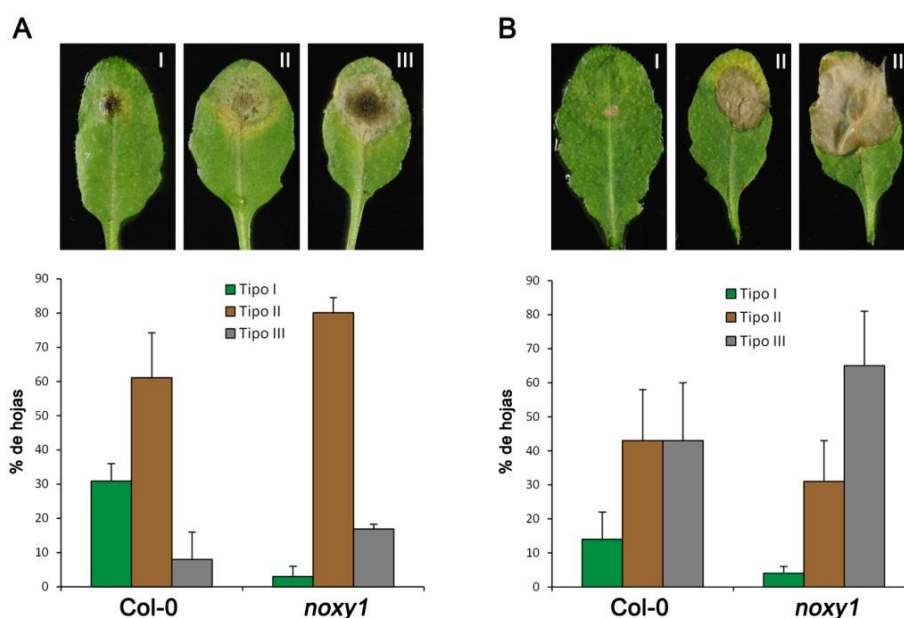


Figura 21. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy1* a infecciones por hongos necrotrofos.

(A) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación del hongo *Alternaria brassicicola* (7×10^5 esporas/mL) en plantas silvestres y mutantes *noxy1*. La cuantificación de los síntomas se realizó utilizando una escala de tres puntos, designados I, II y III, de acuerdo a su intensidad. Se muestran ejemplos representativos de cada punto de la escala y los porcentajes de hojas que muestran los síntomas descritos.

(B) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación del hongo *Botrytis cinerea* (7×10^5 esporas/mL) en plantas silvestres y mutantes *noxy1*. La cuantificación de los síntomas se realizó utilizando una escala de tres puntos, designados I, II y III, de acuerdo a su intensidad. Se muestran ejemplos representativos de cada punto de la escala y los porcentajes de hojas que muestran los síntomas descritos.

aumento en el número de hojas que muestran síntomas tipo III desde el 45%, correspondiente a las plantas control, hasta cerca de un 70% observado en el mutante

noxy1. Estas diferencias son menos acusadas durante la infección de *Alternaria brassicicola*, en donde son las hojas que muestran síntomas tipo II las que muestran un incremento mayor, desde un 65% en las plantas control, a un 85% en las plantas mutantes.

Independientemente del nivel de susceptibilidad de cada uno de los hongos examinados, los resultados de estos análisis revelan el aumento de la susceptibilidad del mutante *noxy1* frente a la infección de hongos necrotrofos.

4.5. CLONAJE POSICIONAL DEL GEN *NOXY1*

Para definir la relación de dominancia o recesividad del fenotipo *noxy1* con respecto al genotipo silvestre, se procedió a realizar su cruzamiento con la línea silvestre. El análisis de la población F2 resultante reveló el carácter recesivo de la mutación. La segregación de los fenotipos silvestre:mutante se ajustaba a una proporción 3:1 e indicaba, por tanto, que correspondía a una única mutación nuclear. La población F1 procedente del primer cruzamiento, se retrocruzó con el genotipo silvestre con objeto de eliminar posibles mutaciones, adicionales a la mutación *noxy1*, que pudieran interferir en su caracterización. A este fin, se realizaron tres retrocruzamientos consecutivos.

Igualmente, con el fin de determinar si alguna de las mutaciones *noxy* identificadas en el laboratorio eran alélicas de la mutación *noxy1*, se realizaron tests de alelismo en los que el mutante *noxy1* se cruzó con varios de los mutantes *noxy* seleccionados en el laboratorio. Los resultados de los análisis revelaron que ninguna de las mutaciones analizadas correspondían a alelos de la mutación *noxy1*.

Con objeto de localizar la mutación *noxy1* en el genoma de *Arabidopsis* se procedió a cruzar dicho mutante con plantas silvestres del ecotipo Landsberg (Ler) y a generar las poblaciones recombinantes necesarias para realizar el cartografiado del mutante *noxy1*. La población F2 obtenida de este cruce se sembró en placas en presencia de 9-HOT, en donde se procedió a seleccionar las plantas que mostraban el fenotipo mutante y que, por tanto, no manifestaban la curvatura radicular inducida por esta oxilipina. La insensibilidad del mutante *noxy1* a la presencia de isoxaben se utilizó también en esta selección. El ADN de las líneas recombinantes se analizó mediante PCR, utilizando marcadores genéticos de los tipos SSLP y CAP, que mostraban polimorfismo entre los ecotipos parentales utilizados. De esa manera se acotó una región de 20 genes en el BAC F9C16 del cromosoma I, en la que se procedió a secuenciar los genes candidatos en los que pudiera estar contenida la mutación *noxy1*. Estos análisis revelaron la presencia de una mutación puntual en el locus

At1g43980, que conllevaba el cambio en una base nucleotídica, de G a A, y la modificación de la secuencia aminoacídica en el aminoácido 366 de la proteína correspondiente, que cambiaba de glicina a ácido glutámico (Figura 22A).

El análisis de la secuencia genómica del locus At1g43980, en comparación con la información disponible acerca de la secuencia del ADNc correspondiente, nos permitió definir que la región codificadora del gen *NOXY1* está contenida en un único exón de 1902 pb y que el transcrito derivado de esta secuencias contiene, además,

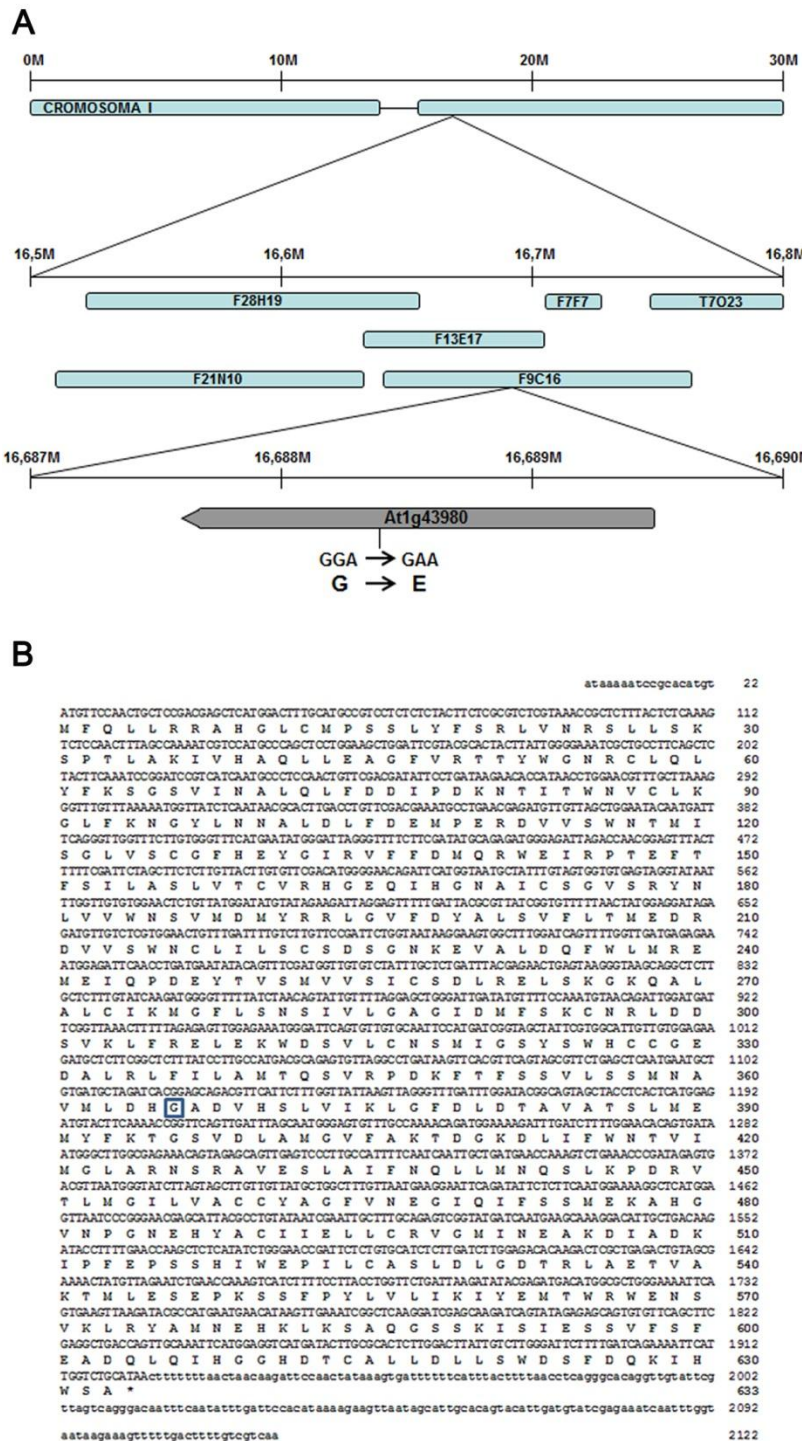


Figura 22. Cartografiado y análisis de la secuencia del gen *NOXY1*.

(A) Representación de la región del cromosoma 1 de *Arabidopsis* en la que se localiza el gen *NOXY1*.

(B) La secuencia codificadora del gen *NOXY1* (At1g43980) está contenida en un único exón representado en gris. Se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región codificadora (en mayúsculas), los extremos 5' y 3' no codificantes del transcrito *NOXY1* (en minúsculas), y la secuencia proteica codificada. La mutación *noxy1* provoca un cambio aminoacídico G₃₆₆E, enmarcada con un cuadrado azul en la secuencia proteica.

regiones no codificantes 5' y 3' de 18 y 198 pb, respectivamente. La secuencia del gen *NOXY1* contiene por tanto un marco de lectura abierto, no interrumpido por la presencia de intrones, que se traduciría en una proteína de 633 aminoácidos (Figura 22B). Cabe destacar que las regiones 5' y 3' del ADNc correspondientes al gen *NOXY1* han sido identificadas en este trabajo utilizando el kit "5' y 3' Rapid Amplification cDNA ends" y que este estudio ha puesto de manifiesto que la posición del triplete de iniciación de la traducción difiere del descrito en los bancos de datos, que se situaba 12 aminoácidos aguas abajo del identificado en este trabajo.

4.6. COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN *noxy1*

Con objeto de confirmar la identidad de la mutación *noxy1* procedimos a expresar una copia silvestre del locus At1g43980 en el mutante *noxy1* y a examinar la reversión de las alteraciones fenotípicas asociadas a dicha mutación. Para ello procedimos a generar la construcción designada *NOXY1:NOXY1*, en la que la expresión del gen *NOXY1* estaba dirigida por su promotor, y a introducir dicha construcción, mediante transformación, en plantas mutantes *noxy1* (Figura 23). A partir

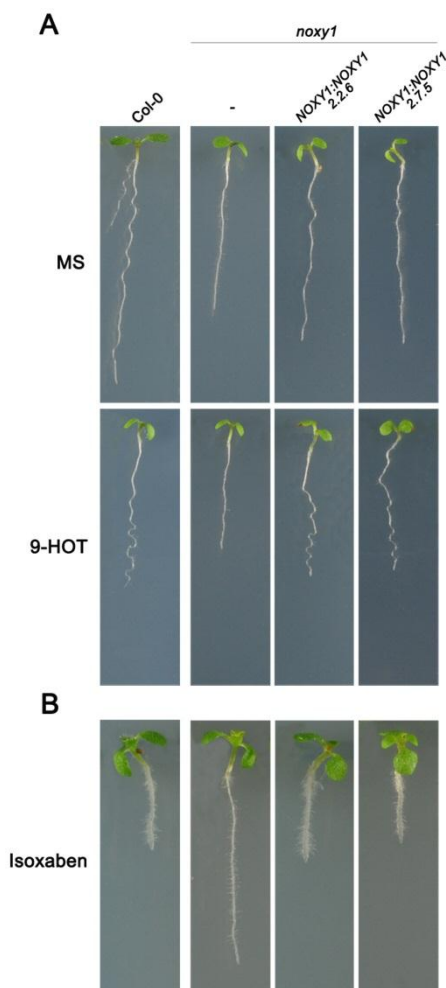


Figura 23. Análisis de la complementación del fenotipo *noxy1*.

Fenotipo de plántulas silvestres, mutantes *noxy1* y mutantes *noxy1* transformadas con la construcción *NOXY1:NOXY1*.

(A) Aspecto de plántulas crecidas 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS fresco y a medio MS conteniendo 9-HOT (25 μ M).

(B) Aspecto de las plántulas germinadas y crecidas durante 6 días en medio MS conteniendo isoxaben (20 nM).

de las plantas transgénicas obtenidas, se procedió a seleccionar líneas homocigotas en las que se examinó la complementación del fenotipo mutante en placas con medio MS suplementadas con 9-HOT (25 μ M) o isoxaben (20 nM). Los resultados de estos análisis permitieron comprobar que la expresión de la construcción *NOXY1:NOXY1* en las plantas mutantes revierte las dos alteraciones fenotípicas asociadas a esta mutación, tales como la respuesta a 9-HOT, produciendo el *waving* radicular y el engrosamiento radicular que se produce en respuesta a isoxaben. La recuperación de ambos fenotipos permite confirmar que la mutación del locus At1g43980 causa las alteraciones fenotípicas caracterizadas en el mutante *noxy1* y, por tanto, que dicho locus corresponde al gen *NOXY1*.

4.7. CARACTERIZACIÓN DEL LOCUS AT1G43980

El análisis de la secuencia proteica codificada por el gen *NOXY1* revelaba la presencia de 11 dominios de tipo pentatricopéptido, de 35 aminoácidos cada uno de ellos, situados en tándem a lo largo de su secuencia. Los dominios descritos cuya secuencia y alineamiento se muestran en la Figura 24A, permiten incluir a la proteína *NOXY1* dentro de una gran familia de proteínas designadas como PPR, del inglés PENTATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING PROTEIN. La composición y disposición de los 11 motivos identificados, permite predecir que la estructura de la proteína *NOXY1* formaría una doble hélice constituida por una sucesión de hélices α , entre las que se intercalarían láminas β . Según se concluye a partir de la secuencia del genoma de *Arabidopsis*, la familia de proteínas PPR incluye más de 450 proteínas distintas, cuya función es desconocida en la mayoría de los casos. No obstante, la caracterización funcional de algunos de los miembros de esta familia proteica han revelado su capacidad para interactuar con el ADN y ARN, contribuyendo a la regulación post-transcripcional de la expresión génica (Andrés y col., 2007; Delannoy y col., 2007; Hölzle y col., 2011). A su vez, se ha descrito que la expresión de los genes PPR podría estar regulada a nivel post-transcripcional a través de la participación de ARNs de pequeño tamaño que contribuirían a regular el nivel de acumulación de sus transcritos (Howell y col., 2007).

Por otro lado, los estudios dirigidos a determinar la localización celular de las proteínas PPR caracterizadas han permitido revelar su presencia en orgánulos tales como los cloroplastos, las mitocondrias, y el núcleo (Lurin y col., 2004; Cushing y col., 2005; Kotera y col., 2005; Liu y col., 2010). En este sentido, el análisis de la secuencia proteica correspondiente a la proteína *NOXY1* permite distinguir una secuencia en el extremo N-terminal que podría estar implicada en su transporte a las mitocondrias,

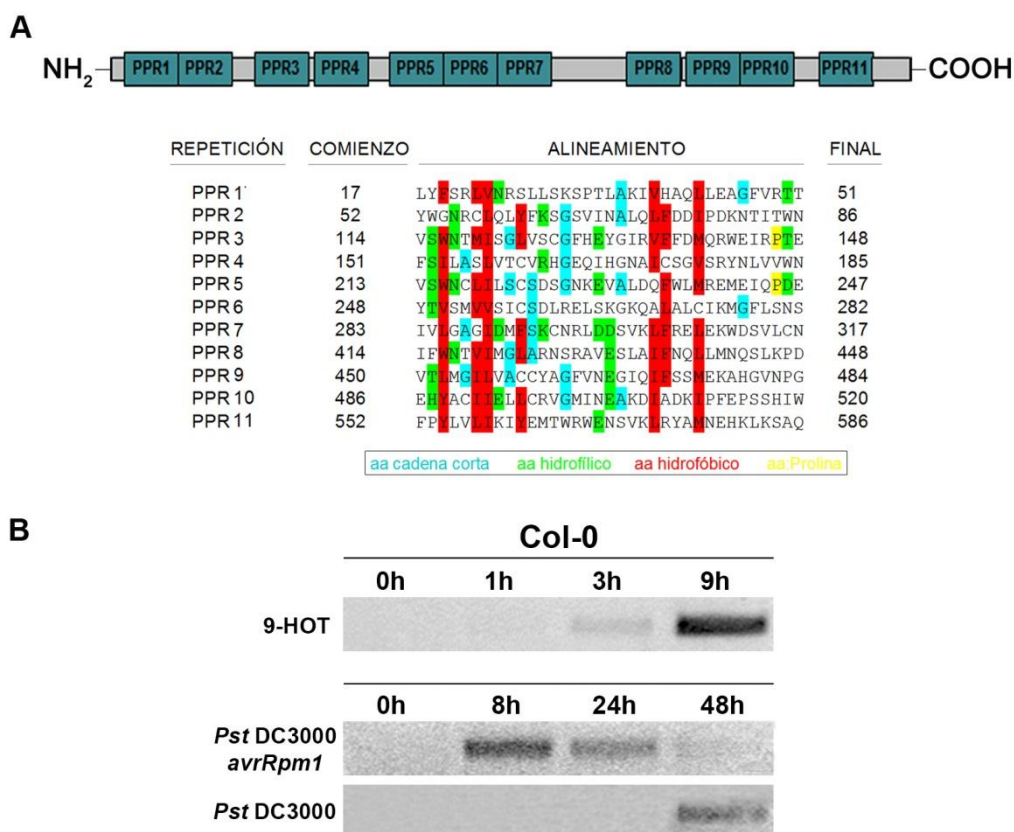


Figura 24. Representación de los dominios identificados en la proteína NOXY1 y expresión del gen NOXY1.

(A) Se muestra una representación esquemática en la que se observa la posición de los 11 dominios pentatricopéptido (PPR) repetidos a lo largo de la secuencia proteica. Se muestra un alineamiento de los dominios PPR identificados y las secuencias de cada uno de ellos.

(B) RT-PCR semicuantitativa sobre muestras de ARN obtenidas a partir de raíces de plántulas tratadas con 9-HOT (25 μ M) y de hojas inoculadas con las bacterias *Pst* DC3000 (10^6 ufc/mL) y *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^6 ufc/mL).

aunque por el momento no disponemos de datos experimentales que apoyen o contradigan dicha localización celular.

Los análisis dirigidos a examinar la expresión del gen *NOXY1* mediante PCR semicuantitativa nos ha permitido determinar la ausencia de transcritos *NOXY1* en tejidos de hojas y de raíz de plantas sanas, y que los tratamientos con bacterias patógenas y 9-HOT en hojas y raíces, respectivamente, provocan un aumento de la expresión génica. Así, como se muestra en la Figura 24B la expresión del gen *NOXY1* se induce a las 8 h en respuesta a la infección con la bacteria avirulenta disminuyendo a las 24 h de la infección, mientras que la activación de la expresión en respuesta a la bacteria virulenta se retrasa en el tiempo y se hace visible en las muestras de ARN extraídas a las 48 h de la inoculación bacteriana. Por otro lado, el tratamiento con 9-HOT en la raíz provoca la inducción de la expresión del gen *NOXY1* a las 9 h de tratamiento.

4.8. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DEL MUTANTE *noxy1* EN RESPUESTA A LUZ BAJA

4.8.1. La mutación *noxy1* produce lesiones necróticas espontáneas durante el desarrollo foliar

El desarrollo de las plantas *noxy1* crecidas en condiciones de luz estándar, bajo un fotoperiodo de 14 h de luz y una intensidad de 6000 luxes, no permiten observar alteraciones fenotípicas con respecto al fenotipo observado en las plantas silvestres. Por el contrario, el mutante *noxy1* desarrolla microlesiones en la superficie foliar cuando la intensidad de la luz disminuye hasta los 3500 luxes. Las lesiones descritas aparecen en plantas de dos semanas de desarrollo, y su caracterización mediante tinciones con azul de tripano y azul de anilina reveló la muerte de las células afectadas, así como la formación de depósitos de calosa en el tejido que rodea las zonas necrosadas (Figura 25).

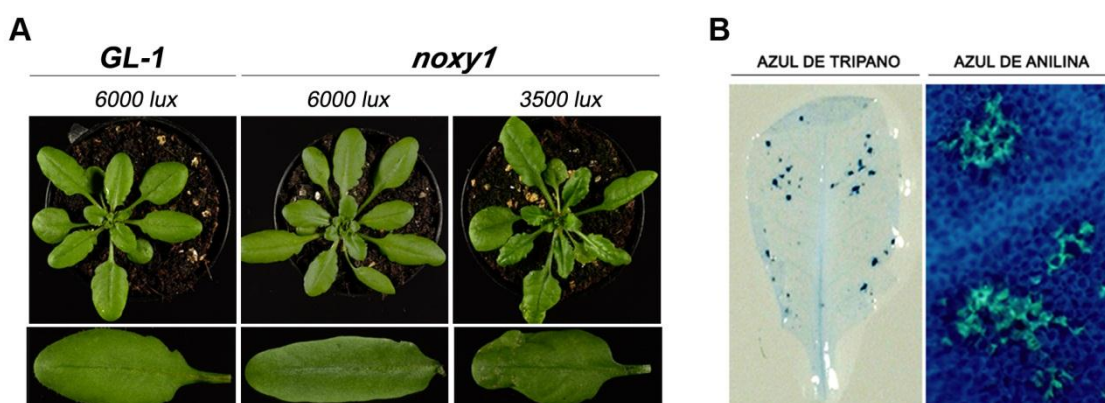


Figura 25. Fenotipo de plantas mutantes *noxy1*.

(A) Se muestra el fenotipo de plantas silvestres y mutantes *noxy1*, crecidas en condiciones estándar bajo un fotoperiodo de 14 h de luz y 6000 luxes de intensidad y el fenotipo de mutantes *noxy1* crecidas bajo un fotoperiodo de 14 h de luz y 3500 luxes de intensidad.

(B) Análisis histológico de las lesiones aparecidas en el mutante *noxy1* mediante tinción con azul de tripano y azul de anilina.

Con objeto de examinar esta respuesta en más detalle, el fenotipo del mutante *noxy1* se examinó en plantas crecidas bajo distintos fotoperiodos, en los que se variaba tanto el número de horas como la intensidad de la luz. En primer lugar, procedimos a modificar el número de horas de luz manteniendo una intensidad lumínica constante de 6000 luxes. Los resultados de estos análisis no permitieron observar cambios visibles, con respecto al fenotipo de las plantas silvestres, en plantas crecidas bajo un fotoperiodo de 14 h de luz o bajo un periodo de día corto, en

el que las plantas se sometieron a 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Por el contrario, a esta intensidad de luz (6000 luxes), el crecimiento del mutante *noxy1* bajo un fotoperiodo de 8 h de luz, provoca la formación de lesiones de gran tamaño, que aparecen en las etapas tardías del desarrollo de la planta (Figura 26B). El efecto provocado por la reducción del número de horas de luz, se hizo igualmente patente en plantas crecidas en condiciones de baja intensidad de luz. Así, la reducción de la intensidad de la luz hasta 500 luxes daba lugar a la formación de lesiones de gran tamaño, que aparecían de forma progresiva a los tres días de la reducción lumínica, llegando a ocupar una gran parte de la superficie foliar (Figura 26A). El efecto provocado por la reducción de la intensidad de la luz era patente en plantas crecidas bajo un fotoperiodo de 14 h y 12 h de luz.

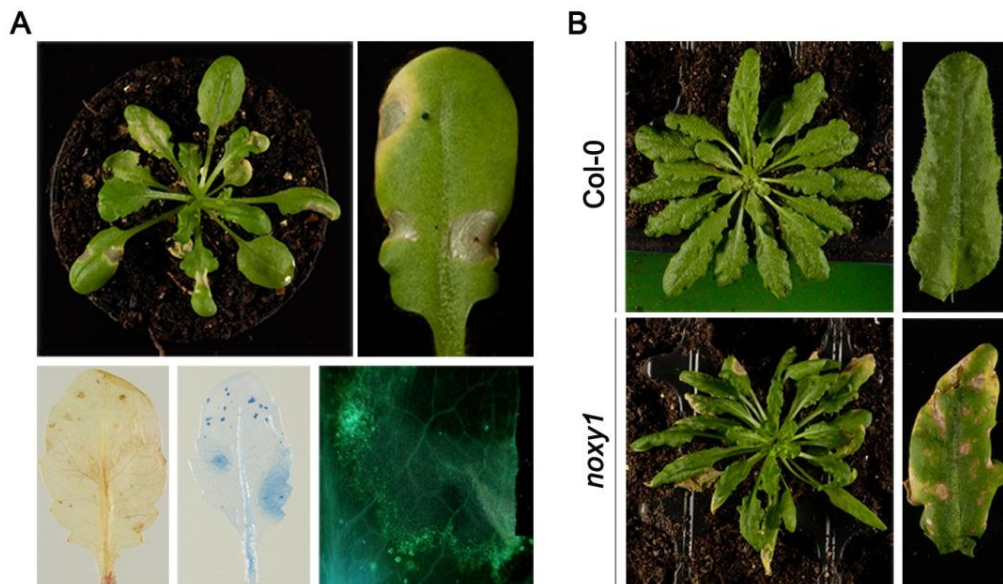


Figura 26. Análisis fenotípico de plantas silvestres y mutantes *noxy1* crecidas en condiciones de baja intensidad lumínica.

(A) Se muestra el fenotipo de plantas *noxy1* que, habiendo crecido en condiciones estándar (14 h de luz y 6000 luxes de intensidad lumínica), se someten, durante 3 días, a una intensidad de luz de 500 luxes. Se muestran ejemplos representativos de las lesiones desarrolladas en el mutante *noxy1* y las tinciones con diaminobencidina, azul de tripano y azul de anilina.

(B) Se muestra el fenotipo de plantas silvestres y mutantes *noxy1* crecidas bajo un fotoperiodo de día corto y alta intensidad lumínica (6000 luxes). Se muestran hojas de cada uno de los genotipos examinados, en las que se observa la formación de lesiones de gran tamaño en aquellas que proceden del mutante *noxy1*.

Los resultados de estos estudios indicaban que la formación de lesiones en el mutante *noxy1* ocurría como consecuencia de la reducción del número de horas y de la intensidad de la luz, aunque el tiempo necesario para su formación era mucho menor en el último caso.

4.8.2. Análisis de los cambios transcriptómicos asociados a la formación de lesiones en el mutante *noxy1*

Con objeto de analizar la naturaleza y el impacto de las lesiones producidas en el mutante *noxy1* como consecuencia de la reducción de la intensidad de la luz, se procedió a examinar los cambios transcriptómicos en hojas de plantas silvestres y mutantes (con lesiones) crecidas durante tres y cinco días en condiciones de luz de baja intensidad (500 luxes). A estos tiempos las lesiones empiezan a hacerse visibles, lo que nos permitió seleccionar las hojas en las que la reducción de la intensidad de luz que da lugar a la formación de lesiones ha sido activada.

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto importantes variaciones en el perfil transcripcional del mutante *noxy1* respecto al correspondiente a las plantas silvestres. La lista completa de los genes cuya expresión varía en los dos tipos de plantas examinadas se recoge en la Tabla S5 (incluida como Material Suplementario en el CD adjunto). En estos ensayos es posible determinar que los cambios producidos a los tres y cinco días de tratamiento eran muy similares entre sí y que de hecho el patrón observado a los cinco días constituía una versión más débil del observado a los 3 días, y que fue examinado en mayor profundidad. La reducción de la intensidad de la luz en las plantas *noxy1* provoca el cambio en la expresión de 1644 genes de los que 1145 genes aumentan su expresión, mientras que el nivel de expresión de los 499 genes restantes disminuye en comparación con las plantas control.

La función biológica de los genes inducidos más de dos veces durante la formación de las lesiones se examinó mediante el programa Gene Ontology. Estos análisis revelaron el enriquecimiento de estos genes en términos tales como la respuesta de defensa, la muerte celular programada, la senescencia, la autofagia, así como diversos estreses de tipo abióticos, tales como el estrés oxidativo, la desecación y la temperatura. Igualmente, también se encontró un alto nivel de correspondencia con términos relacionados con procesos de reforzamiento de la pared celular, la estructura de los cloroplastos y las mitocondrias, el procesamiento de ARN y la respuesta a las hormonas SA, JA, ET y ABA (Tabla S6, incluida como Material Suplementario en el CD adjunto). Por otro lado, los términos enriquecidos en los genes que vieron reducida su expresión durante la formación de lesiones correspondían principalmente al metabolismo basal de la célula, así como, también, a la respuesta frente a patógenos y hormonas.

El análisis de estos resultados se completó mediante su comparación con los resultados procedentes de otros análisis transcriptómicos, depositados en los bancos de datos. En este estudio pudimos comprobar que dentro del grupo de genes inducidos durante la formación de lesiones, aparece un alto nivel de correspondencia con genes de respuesta a estreses bióticos y abióticos. Así, es posible observar un alto nivel de correspondencia con genes de respuesta a bacterias biotrofas, tales como *Pst* DC3000, *Pst* DC3000 *hrcC* y *Pst* DC3000 *avrRpm1* (58%, 42% y 62%, respectivamente), y de respuesta a hongos necrotrofos tales como *Phytophthora parasitica* y *Botrytis cinerea* (57% y 55%, respectivamente) (Figura 27A). Igualmente, dentro de las respuestas a estreses abióticos cabe mencionar la correspondencia con genes de respuesta a frío, al aumento de temperatura, a estrés osmótico, a estrés salino, a sequía, a estrés oxidativo, a luz ultravioleta y a herida (26%, 25%, 65%, 29%, 25%, 42% y 38%,

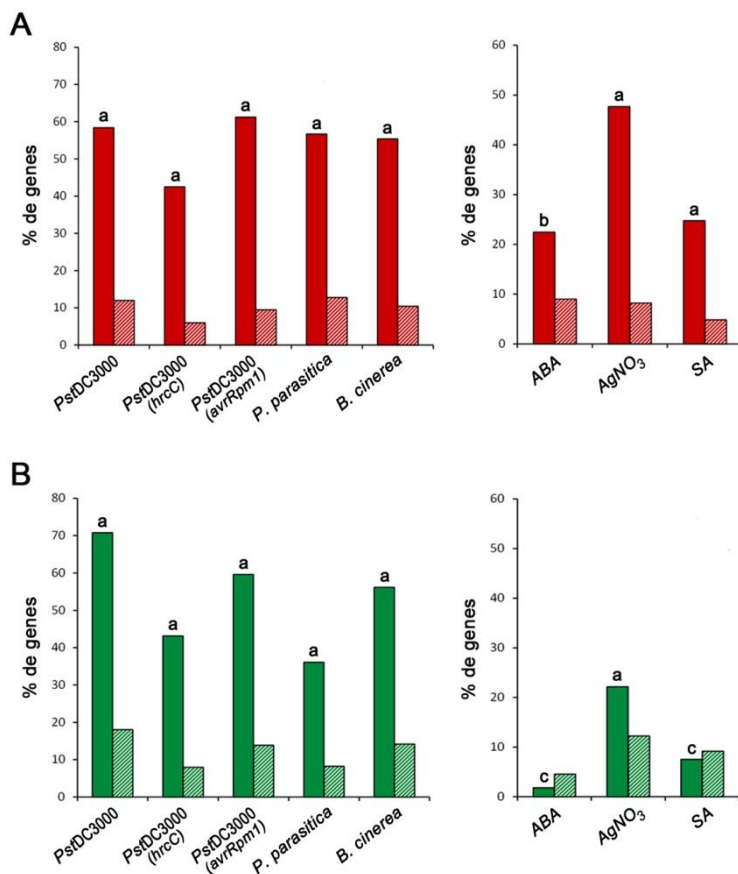


Figura 27. Análisis de los cambios transcriptómicos que acompañan a la formación de lesiones necróticas en el mutante *noxy1* crecido en condiciones de baja intensidad lumínica.

(A) Comparación de los perfiles transcriptómicos obtenidos en plantas *noxy1* crecidas en condiciones de baja intensidad de luz con los resultados disponibles en las bases de datos. Se muestra el nivel de correspondencia entre los cambios observados en el mutante *noxy1* y los correspondientes a la respuesta frente a distintos tipos de estrés biótico y la señalización regulada por hormonas. Las barras indican la correspondencia de los genes inducidos con cada estímulo particular. Como control de estos análisis se utilizó un grupo de 5000 genes seleccionados al azar (barras rayadas), con los que se analizó la correspondencia con aquellos estímulos con los que los genes inducidos durante la formación de lesiones en el mutante *noxy1* presentaban altos niveles de correspondencia.

(B) Análisis de los genes reprimidos durante la formación de lesiones en el mutante *noxy1* respecto al control según se describe en el apartado A. Las letras situadas encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los genes que responden a 9-KOT y el grupo de 5000 genes utilizados para validar estos análisis, usando un test binomial ($P < 0.001$ [a], $0.001 < P < 0.01$ [b], $0.01 < P < 0.05$ [c]).

respectivamente) (Figura 28A). Además de las respuestas descritas, cabe mencionar que el 22% de los genes correspondían a genes de respuesta a ABA, el 25% a SA y el 48% al inhibidor de ET, AgNO₃ (Figura 27A).

Por otro lado, y dentro de los genes reprimidos durante la formación de lesiones encontramos también un alto nivel de correspondencia con la respuesta a distintos tipos de estrés biótico y abiótico. Así, es posible resaltar un alto nivel de coincidencia con genes cuya expresión se inhibe en respuesta a *Pst* DC3000, *Pst* DC3000 *hrcC* y *Pst* DC3000 *avrRpm1* (70%, 42% y 60%, respectivamente), y a los hongos *Phytophthora parasitica* y *Botrytis cinerea* (35% y 57% respectivamente) (Figura 27B). Igualmente, dentro de las respuestas de estreses abióticos, podemos mencionar

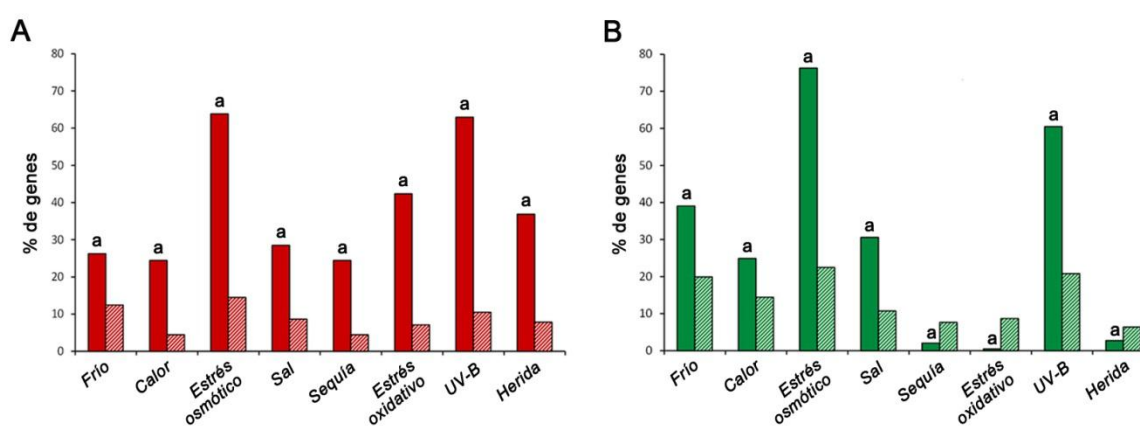


Figura 28. Análisis de los cambios transcriptómicos que acompañan a la formación de lesiones necróticas en el mutante *noxy1* crecido en condiciones de baja intensidad lumínica.

(A) Comparación de los perfiles transcriptómicos obtenidos en plantas *noxy1* crecidas en condiciones de baja intensidad de luz con los resultados disponibles en las bases de datos. Se muestra el nivel de correspondencia entre los cambios observados en el mutante *noxy1* y los correspondientes a la respuesta frente a distintos tipos de estrés abiótico. Las barras indican la correspondencia de los genes inducidos con cada estímulo particular. Como control de estos análisis se utilizó un grupo de 5000 genes seleccionados al azar (barras rayadas), con los que se analizó la correspondencia con aquellos estímulos con los que los genes inducidos durante la formación de lesiones, en el mutante *noxy1*, presentaba altos niveles de correspondencia.

(B) Análisis de los genes reprimidos durante la formación de lesiones en el mutante *noxy1* respecto al control según se describe en el apartado A.

Las letras situadas encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los genes que responden a 9-KOT y el grupo de 5000 genes utilizados para validar estos análisis, usando un test binomial ($P < 0.001$ [a]).

la correspondencia con genes que se inhiben en respuestas a frío, al aumento de temperatura, a estrés osmótico y a la luz ultravioleta (39%, 25%, 76%, 30% y 60%, respectivamente) (Figura 28B).

Del mismo modo que en los estudios transcriptómicos descritos en apartados anteriores, la validez de las correlaciones descritas se puso de manifiesto mediante el análisis de 5000 genes control, seleccionados al azar, y para los que no se encontró correlación por encima del 22% con ninguna de las respuestas a los tratamientos examinados.

4.9. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA DEL MUTANTE *noxy1* A ESTRÉS OSMÓTICO Y ESTRÉS OXIDATIVO

Basándonos en los resultados previos que indicaban que la formación de lesiones en el mutante *noxy1* estaba acompañada de la alteración de la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo y estrés abiótico, procedimos a examinar si la respuesta del mutante a algunos de estos tipos de estrés estaba alterada con respecto a la de las plantas control. Para ello, procedimos a examinar el desarrollo de las plantas mutantes crecidas en medio MS en presencia de compuestos generadores de especies reactivas de oxígeno, tales como el Rosa Bengala, generador de singlete de oxígeno, el Paraquat, generador de ión superóxido, y de H₂O₂. Igualmente para examinar la respuesta del mutante *noxy1* a estrés abiótico se observó el fenotipo de plantas crecidas en presencia de sorbitol, glicerol y NaCl. Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 29, en la que es posible observar que la exposición de las plántulas silvestres a los tratamientos de estrés oxidativo producía una reducción de su crecimiento y la formación de áreas cloróticas en la superficie foliar. Este efecto era ligeramente más intenso en el caso del mutante *noxy1*, en el que se apreciaba un leve aumento en el nivel de clorosis (Figura 29A). Al igual que durante la respuesta de estrés oxidativo, la exposición al glicerol y al sorbitol provocaba la reducción del crecimiento y la aparición de clorosis en las hojas. Ambos efectos eran más evidentes en las plantas mutantes *noxy1* que en los controles silvestres, siendo más patente las diferencias entre las plántulas que se desarrollan en presencia de glicerol, ante el cual el mutante muestra un efecto más severo. Finalmente, el análisis de la respuesta a la presencia de NaCl muestra importantes diferencias entre las plantas mutantes y los controles silvestres. Dichas diferencias empiezan a hacerse patentes a la concentración de 100 mM, a la que se observa una clara reducción en el desarrollo y la germinación del mutante *noxy1*, con respecto al de las plantas control. El aumento de la concentración de NaCl a 150 mM causa la inhibición de la germinación del mutante *noxy1* y provoca, por tanto, diferencias muy acusadas entre ambos tipos de plantas (Figura 29B).

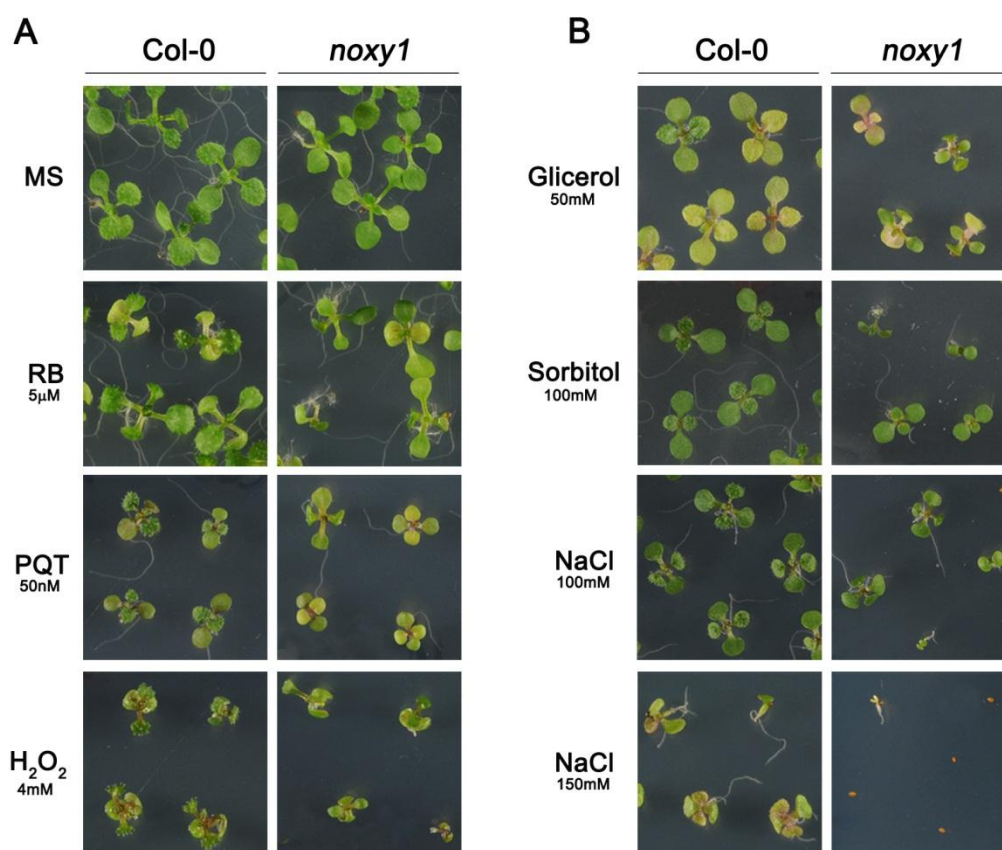


Figura 29. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes *noxy1* a tratamiento de estrés oxidativo y estrés abiótico.

(A) Fenotipo de plántulas crecidas durante 10 días en medio MS y en medio MS conteniendo Rosa Bengala (RB), Paraquat (PQT) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

(B) Fenotipo de plántulas crecidas durante 10 días en medio MS conteniendo Glicerol, Sorbitol y Cloruro Sódico (NaCl).

4.10. LA PÉRDIDA DEL GEN *NOXY1* PROVOCA ALTERACIONES EN LA RESPUESTA HORMONAL

Los resultados descritos anteriormente mostraban la alteración del mutante *noxy1* en la respuesta frente a la infección de patógenos en donde, como se ha mencionado anteriormente, la homeostasis hormonal juega un papel relevante en el establecimiento de la interacción planta-patógeno. Además, la mutación *noxy1* provoca diferencias importantes en la respuesta de la planta frente a distintos tratamientos abióticos, en especial en el caso del NaCl, cuya respuesta provoca un aumento en los niveles de ABA (Jia y col., 2002; Xiong y col., 2002; Barrero y col., 2006). Estos resultados sugerían que las variaciones observadas en el mutante *noxy1* podrían estar asociadas a la alteración de las rutas de señalización reguladas por la acción de hormonas tales como el SA, el JA y el ABA. Estos resultados permitían

suponer que la respuesta del mutante *noxy1* al tratamiento con dichas hormonas podría variar con respecto a la de las plantas silvestres. Para evaluar esta posibilidad, procedimos a examinar las alteraciones fenotípicas inducidas en las plántulas de *Arabidopsis*, en respuesta a la presencia de hormonas en el medio de crecimiento. Los resultados de estos análisis aparecen recogidos en la Figura 30, en la que se observa que las tres hormonas examinadas provocan la inhibición del crecimiento de la raíz tanto en las plantas silvestres como en el mutante *noxy1*. Sin embargo, mientras que el acortamiento provocado por las hormonas SA y JA era similar en ambos tipos de plantas, la acción del ABA era mucho más acusada en el caso de las plantas *noxy1*, cuya raíz detiene su crecimiento en respuesta a la presencia de dicha hormona. Estos resultados revelan la hipersensibilidad del mutante *noxy1* a ABA, y sugieren que la proteína NOXY1 participa en la regulación de la producción de ABA, así como en la respuesta de la planta a esta hormona.

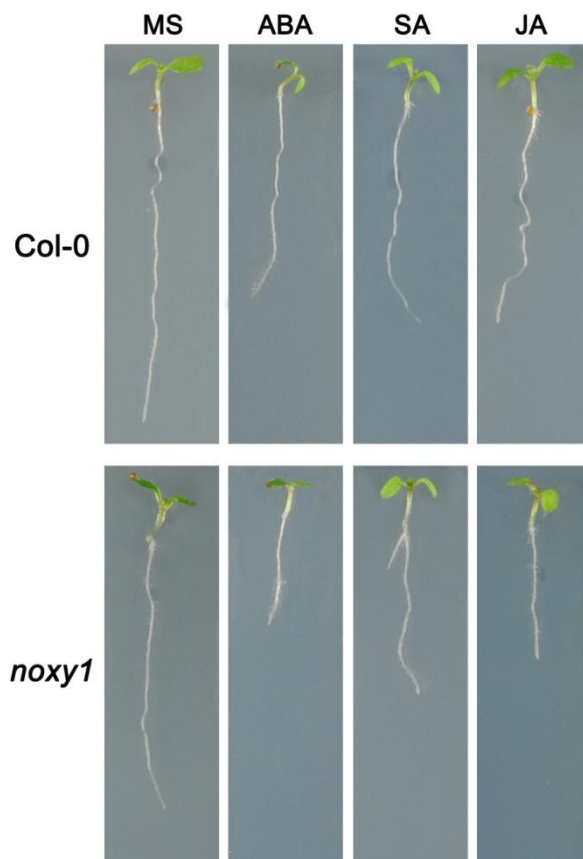


Figura 30. Análisis de las alteraciones fenotípicas producidas en plantas silvestres y mutantes *noxy1* crecidas en presencia de las hormonas ABA, SA y JA.

Aspecto de plántulas silvestres y mutantes *noxy1* crecidas 4 días en medio MS y transferidas, para continuar su crecimiento durante 6 días, a medio MS fresco y a medio MS conteniendo ABA (20 μ M), SA (50 μ M) y JA (10 μ M).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las oxilipinas constituyen una amplia familia de derivados lipídicos que se generan a partir de la oxidación de ácidos grasos y participan en el control de importantes procesos fisiológicos y patogénicos de la planta (Savchenko y col., 2010; López y col., 2008 y 2011). La producción de oxilipinas comienza, principalmente, por la acción de los enzimas α -dioxigenasas (α -DOX) y lipoxigenasas (9-LOX y 13-LOX), que catalizan la incorporación de oxígeno en el carbono, 2, 9 y 13, respectivamente, de los ácidos grasos sobre los que actúan (Hamberg y col., 1999; Feussner y Wasternack, 2002; Hamberg y col., 2003). Estas tres actividades enzimáticas inician tres rutas de síntesis independientes, de las que la iniciada por acción de los enzimas 13-LOXs es la que más atención ha suscitado, dada su participación en la síntesis de JA y la demostración de que esta oxilipina constituye una importante hormona vegetal implicada en la regulación de numerosos procesos de desarrollo y defensa en las plantas (Fonseca y col., 2009; Koo y Howe, 2009; Wu y Baldwin, 2010; Browse, 2009). A diferencia de las 13-LOXs, las rutas de síntesis de oxilipinas iniciadas por la acción de los enzimas α -DOXs y 9-LOXs ha sido objeto de un estudio menos extenso, aunque datos recientes señalan, igualmente, su participación en procesos de inmunidad vegetal y en procesos de desarrollo de la planta (Sanz y col., 1998; Ponce de León y col., 2002; Hamberg y col., 2003; Prost y col., 2005; Andersson y col., 2006; Vellosillo y col., 2007; Bannenberg y col., 2009b; Hwang y Hwang 2010; López y col., 2011).

En relación a su participación en la defensa vegetal, los estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado la activación de los enzimas α -DOX y 9-LOX durante la respuesta de las plantas frente a la infección de patógenos biotrofos, en particular de bacterias del género *Pseudomonas*, en donde dichas actividades contribuyen de forma positiva a la inducción de una respuesta de defensa eficaz con capacidad para controlar la infección (Ponce de León y col., 2002; López y col., 2011). La caracterización de esta respuesta puso de manifiesto la acción del enzima α -DOX1 y de las dos actividades 9-LOX, codificadas por los genes *LOX1* y *LOX5*, en el control del estrés oxidativo que acompaña a la activación de la respuesta hipersensible de defensa de la planta (Ponce de León y col., 2002; López y col., 2011).

Además de la participación individual de las rutas iniciadas por la acción de los enzimas α -DOX1 y 9-LOX, la caracterización bioquímica de los productos generados tras su activación en plantas de tabaco y *Arabidopsis*, puso de manifiesto que ambas actividades enzimáticas participan en la síntesis de productos doblemente oxigenados, derivados de la acción coordinada de ambos enzimas (Hamberg y col., 2003; Vellosillo

y col., 2007). Estos resultados demostraban la interacción metabólica de ambas rutas y sugerían su actuación coordinada en la respuesta de defensa vegetal.

En base a estos resultados, y con objeto de examinar la acción de ambos enzimas, en este trabajo nos propusimos examinar la respuesta de defensa vegetal de plantas mutantes deficientes, de forma simultánea, en las dos actividades enzimáticas de interés, α -DOX y 9-LOX, en comparación con la de mutantes individuales, carentes de cada una de dichas actividades, y de plantas silvestres. Igualmente, en nuestro estudio procedimos a examinar la respuesta a la infección de microorganismos patógenos del mutante *noxy1* (del inglés *non-responding to oxylipins*), insensible a la aplicación de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT producidas por la acción de los enzimas 9-LOX (Figura 16).

El análisis de la expresión de los genes *LOX1*, *LOX5* y *α -DOX1* nos permitió confirmar su inducción en respuesta a la infección de las bacterias modelo *Pseudomonas syringae pv tomato (Pst) DC3000 avrRpm1* (avirulenta) y *Pseudomonas syringae pv tomato (Pst) DC3000* (virulenta). En ambas interacciones, el nivel de expresión del gen *LOX5*, era significativamente inferior al de los genes *α -DOX1* y *LOX1*, que fueron, por ello, seleccionados para este estudio (Figura 1). A este objeto procedimos a utilizar las plantas mutantes, *lox1-1* y *α -dox1-1* (designadas en este trabajo como *lox1* y *dox1*), previamente caracterizadas (Vellosillo y col., 2007; López y col., 2011; Bannenberg y col., 2009b), en las que la inserción de ADN-T provoca la ausencia de los correspondientes transcritos y, por tanto, la falta de las proteínas α -DOX1 y LOX1, respectivamente, en cada uno de ellos (Figura 2). Igualmente, procedimos a generar un doble mutante *lox1 dox1* obtenido mediante el cruce de los mutantes individuales, seguido de la identificación mediante PCR de líneas homocigotas para ambas inserciones de ADN-T, y que carece, por tanto, de las dos actividades enzimáticas de interés.

Los resultados derivados de la caracterización de los mutantes descritos puso de manifiesto el aumento de su susceptibilidad frente a la infección de la bacteria virulenta *Pst DC3000* y, además, que el defecto de dichos mutantes para contener el crecimiento bacteriano era claramente mayor en el doble mutante *lox1 dox1* que en los mutantes individuales *lox1* y *dox1*. Por otro lado, la disminución de la capacidad defensiva de estos mutantes no aparecía acompañada de un cambio significativo en el desarrollo de los síntomas producidos como consecuencia de la infección, aunque era posible apreciar una ligera tendencia hacia una mayor intensidad de los síntomas formados en los mutantes con respecto a la observada en las plantas silvestres (Figura 3).

Además de en la respuesta de defensa local, el análisis de los mutantes caracterizados puso de manifiesto la acción de ambas actividades enzimáticas durante la activación de esta respuesta de defensa sistémica (SAR). En este caso, la falta de las actividades α -DOX1 y LOX1 provocaba una importante reducción en la capacidad de la planta para activar la defensa sistémica, que afectaba tanto a la tasa de crecimiento bacteriano, como a la producción de síntomas. Además, los resultados de estos análisis permitieron comprobar que, al igual que en la defensa local, la intensidad de los defectos asociados a las mutaciones *lox1* y *dox1* era mayor en el doble mutante que en los mutantes individuales y apoyaban, por tanto, la acción coordinada de ambas proteínas en la activación de la defensa sistémica en tejidos alejados del punto de infección.

La participación de los enzimas α -DOX1 y LOX1 en la activación de la respuesta de defensa sistémica se suma a las evidencias experimentales que sostienen la acción, directa o indirecta, de distintos derivados lipídicos, en la activación de esta respuesta, en donde se ha propuesto que dichos compuestos podrían actuar como señal sistémica, movilizándose desde los tejidos infectados al resto de la planta (Maldonado y col., 2002; Jung y col., 2009; Truman y col., 2007; Xia y col., 2009; Chanda y col., 2011).

La contribución de los genes *LOX1* y *α -DOX1* a la defensa vegetal se vio apoyada por los resultados que mostraron que la aplicación de oxilipinas en los tejidos vegetales, 48 h antes de la infección de la cepa virulenta *Pst* DC3000, ejerce un efecto protector que conlleva la reducción del crecimiento bacteriano y de la intensidad de las lesiones producidas durante la infección. Dentro del grupo de oxilipinas que ejercen un nivel mayor de protección se pueden distinguir productos sintetizados a través de las dos rutas biosintéticas, α -DOX y 9-LOX, caracterizadas, siendo los derivados 17:3 (un aldehído producido por la descarboxilación del ácido 2-hidroperoxioctadecatrienoico), 3-nonenal (un aldehído producido a partir del ácido 9-hidroperóxido del ácido linolénico mediante una hidroperóxido liasa), 9,12,13-THOE (un trihidroxi ácido producido por las acciones secuenciales de las 9-LOX, epoxi alcohol sintasa y epoxi hidrolasa), 9,10-DHOD (un derivado de peroxigenasas/epoxigenasas) y 9-KOT (producido por la deshidratación del 9-hidroperóxido del ácido linolénico) los compuestos que ejercen una acción protectora más intensa (Figura 6).

La participación de oxilipinas en la protección de los tejidos vegetales frente al daño celular que acompaña a una infección, ha sido descrito previamente en plantas de tabaco (Hamberg y col., 2003), aunque los resultados obtenidos indican que la acción de dichos compuestos puede variar en los distintos huéspedes examinados. Así, mientras que la aplicación de 2-HOT y 9-HOT, derivados de las rutas iniciadas por

la acción de α -DOX y 9-LOX, respectivamente, reduce los síntomas producidos por *Pseudomonas syringae* pv *syringae* y *Ps* pv *tabaci* en hojas de tabaco (Hamburg y col., 2003), el efecto de estas oxilipinas en *Arabidopsis* es menor.

Al igual que en la respuesta local, la aplicación de oxilipinas produce también un efector protector en los tejidos sistémicos no tratados, aunque su acción defensiva es en todos los casos inferior a la que ocurre en la respuesta local. En este caso cabe resaltar que nuestros resultados contrastan con los publicados por Jung y col. (2009). Así, mientras que estos autores proponen la actuación del ácido azelaico como señal sistémica, en nuestro trabajo, la aplicación de azelaico o de su derivado hidroxilado provoca un efecto protector menor, tanto en los tejidos locales como en los tejidos sistémicos, que no se corresponde con su posible papel como señal activadora de la defensa vegetal.

Independientemente de la acción específica de cada una de las oxilipinas examinadas, los resultados de estos análisis indican que las dos rutas biosintéticas caracterizadas están involucradas en la generación de oxilipinas con capacidad protectora. Además, y aunque el efecto de los compuestos examinados en los tejidos sistémicos es claramente menor que el observado en los tejidos locales, el hecho de que la falta de las actividades LOX1 y α -DOX1 provoque un defecto importante en la activación de la defensa sistémica, podría apoyar la participación de estas oxilipinas en el establecimiento de la respuesta sistémica de defensa. En este caso, y dado que la activación de los genes *LOX1* y *α -DOX1* tras la infección bacteriana se limita casi exclusivamente a los tejidos locales (Figura 1), los derivados LOX1 y α -DOX1 serían producidos en el tejido local y trasladados a las hojas sistémicas para ejercer su acción activadora.

Dentro de las oxilipinas con actividad protectora identificadas en este estudio, el ácido 9-ceto-octadecatrienoico (9-KOT), sintetizado a través de las 9-LOXs, provoca el efecto más intenso, causando la reducción del crecimiento bacteriano tanto a nivel local como sistémico, por lo que fue seleccionado en este trabajo para examinar su actividad en más detalle. La cuantificación del 9-KOT en hojas inoculadas con *Pst* DC3000 mostró un incremento en su acumulación durante el desarrollo de la infección en plantas silvestres y, por tanto, su posible participación en esta respuesta (Figura 7). De acuerdo con la falta de actividad LOX1 en los mutantes *lox1* y *lox1 dox1*, el nivel de 9-KOT en estas plantas experimenta una importante reducción con respecto a los niveles determinados en las plantas silvestres. Por el contrario, el nivel de 9-KOT alcanzado en el mutante *dox1*, llega a duplicar el nivel detectado en las plantas silvestres, lo que posiblemente sea consecuencia de la interacción de las rutas 9-LOX

y α -DOX, en la que la reducción en una de las actividades enzimáticas, en este caso la 9-LOX, conlleva un aumento en la activación de la ruta con la que interacciona.

El estudio de los cambios transcriptómicos en plantas silvestres en respuesta al tratamiento con 9-KOT (Figura 9) apoya su implicación en la defensa de la planta. Así, un alto porcentaje de los genes de respuesta a 9-KOT corresponde a genes inducibles en respuesta a infecciones patogénicas ($\approx 50\%$) y a respuestas asociadas a las mismas, como son el estrés oxidativo ($\approx 50\%$) y las hormonas SA y ABA (ambas $\approx 50\%$), implicadas en procesos de inmunidad vegetal (Figura 9B).

En principio, estos resultados podrían contrastar con las variaciones transcripcionales detectadas durante la infección de la cepa virulenta *Pst* DC3000 en plantas silvestres pre-tratadas con 9-KOT. Así, en este estudio observamos que el pre-tratamiento con 9-KOT reduce la activación de genes implicados en la respuesta a *Pst* DC3000 y a estrés oxidativo (78% y 45% en cada caso). Cabe destacar, no obstante, que la comparación de los genes cuya expresión se modifica en los dos análisis transcriptómicos realizados revela diferencias importantes entre ellos. Así, y de acuerdo a su efecto protector, los genes inducidos en respuesta a 9-KOT contribuirían de forma activa a la defensa de la planta, mientras que, a diferencia de estos, los genes que se reprimen durante la infección en tejidos pre-tratados con 9-KOT, corresponderían a genes utilizados por el patógeno para favorecer la infección.

En apoyo de esta idea, cabe resaltar que dentro de los genes reprimidos durante la infección de tejidos pre-tratados con 9-KOT existe un alto porcentaje de genes de respuesta a las hormonas ABA y JA, cuya producción en la infección de patógenos biotrofos antagoniza con la inducción de la respuesta de defensa (Cui y col., 2005; Mohr y Cahill, 2007; Flors y col., 2008; Koornneef y Pieterse, 2008; de Torres y col., 2007, 2009). Además, un alto porcentaje de estos genes (el 60% de los genes que responden a ABA y el 41% de los genes de respuesta a JA) se encuentran presentes dentro del grupo de genes que se inducen en la planta como consecuencia de la liberación de efectores bacterianos en la célula vegetal durante la infección (Truman y col., 2006). Estos datos sugieren que el efecto del 9-KOT en la represión de ABA y JA, estaría dirigido a contrarrestar la activación de los genes que favorecen la colonización bacteriana. En apoyo de esta idea, encontramos que la aplicación del 9-KOT, tanto en plantas silvestres como en los mutantes *lox1 dox1*, no ejerce ningún efecto en el crecimiento de la cepa mutante *Pst* DC3000 *hrpA*, deficiente en el sistema de secreción tipo III (T3SS) bacteriano y, por tanto, incapaz de liberar efectores de virulencia en el interior de la célula vegetal (Figura 12).

Como conclusión adicional de estos estudios, podemos resaltar que la aplicación de 9-KOT en el mutante *lox1 dox1* provoca la complementación de su fenotipo (Figura 12), lo que apoya la participación del 9-KOT en la defensa vegetal.

De acuerdo con la idea que sugiere que la producción de 9-KOT podría modificar, de forma directa o indirecta, el balance hormonal que controla el establecimiento de una interacción planta-patógeno, la cuantificación de los niveles de SA, JA y ABA, durante la infección de *Pst* DC3000 en tejidos pre-tratados con 9-KOT, reveló un aumento en los niveles de SA y un descenso en los niveles de ABA y JA, en comparación a los evaluados en tejidos control, pre-tratados con agua. Los cambios hormonales detectados apoyan la participación del 9-KOT en la defensa de la planta frente a patógenos biotrofos en la que el SA participa como activador de la defensa (Nawrath y Metraux, 1999; Vlot y col., 2009), mientras que las hormonas ABA y JA interfieren con dicha respuesta (Cui y col., 2005; Mohr y Cahill, 2007; Flors y col., 2008; Koornneef y Pieterse, 2008; de Torres y col., 2007, 2009).

Los datos que indican que el 9-KOT puede afectar el balance hormonal se sustentan, además, por los resultados obtenidos mediante la cuantificación de las hormonas SA, ABA y JA, en plantas mutantes *lox1 dox1* durante la infección de *Pst* DC3000. En estos tejidos se detectó una mayor acumulación de JA en las hojas infectadas, y un aumento de los niveles de JA y ABA en tejidos sistémicos activados mediante la inoculación de la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1* en las hojas basales de la planta. Estos ensayos pusieron de manifiesto, además, que los niveles de acumulación de SA no experimentaban diferencias significativas con respecto a los detectados en plantas silvestres, lo que permitía concluir que el defecto en la respuesta defensiva de las plantas *lox1 dox1* no estaba producido por la alteración de esta hormona, sino que dicho defecto podría estar asociado al aumento de los niveles de las hormonas JA y ABA en los tejidos infectados y, por tanto, que la producción de las oxilipinas derivadas de la acción de los enzimas 9-LOX y α -DOX podría modificar el nivel de estas hormonas o los procesos de señalización regulados por ellas.

La alteración de la producción y/o señalización de ABA en el mutante *lox1 dox1* se confirmó mediante ensayos *in vitro* en los que se observó el fenotipo de plántulas crecidas en presencia de hormonas. Estos ensayos revelaron la hipersensibilidad de los mutantes *lox1 dox1* a ABA, mientras que la respuesta de las plantas examinadas a la presencia de JA no manifestaba diferencias aparentes con respecto a las observadas en las plantas silvestres (Figura 14 y 15). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de los enzimas 9-LOX y α -DOX en la regulación de la respuesta de la planta a la presencia de ABA y, por tanto, de la ruta de transducción regulada por la acción de esta hormona.

El hecho de que la respuesta de las plantas mutantes a la aplicación de JA sea similar a la observada en las plantas silvestres, sugiere que la mutación *lox1 dox1* no ejerce un efecto directo sobre la ruta de señalización regulada por esta hormona, por lo que las modificaciones observadas en la expresión de genes de respuesta a JA en el mutante *lox1 dox1*, durante la infección de la bacteria *Pst* DC3000, estarían afectando principalmente a la producción de JA y no a su señalización. En línea con esta idea, y de acuerdo con los estudios que revelan la interacción entre las distintas rutas y actividades enzimáticas que participan en las síntesis de oxilipinas (Hamberg y col., 2003; Halitschke y col., 2004), el incremento de JA en los mutantes *lox1 dox1* tras la infección bacteriana, podría ser consecuencia de una interacción metabólica entre las actividades enzimáticas LOX1, α -DOX1 y 13-LOX, esta última implicada en la síntesis de JA, cuya actividad podría verse favorecida como consecuencia de la reducción de las actividades LOX1 y α -DOX1 en el mutante *lox1 dox1*.

Además de los resultados descritos, el análisis de la respuesta de los mutantes *lox1* y *dox1* puso de manifiesto que, a diferencia de la hipersensibilidad a ABA mostrada por el doble mutante, la respuesta de los mutantes individuales era similar a la de las plantas silvestres. Estos resultados sugieren la participación coordinada de ambas enzimas, 9-LOX y α -DOX, en el control de los procesos de señalización regulados por la acción del ABA, en los que la actividad de uno de dichos enzimas sería suficiente para regular la acción de esta hormona. Por otro lado, este efecto podría verse reforzado como consecuencia de la interacción enzimática que se establece entre ambas proteínas, en la que la pérdida de una de dichas actividades está acompañada de un aumento en la actividad del enzima con la que interacciona.

La alteración en la regulación de la señalización de ABA del mutante *lox1 dox1* estaría directamente relacionada con el defecto de estas plantas para activar una respuesta de defensa eficaz, ya que, como indicamos anteriormente, la producción de ABA antagoniza con la activación de la respuesta de defensa de las plantas frente a la infección de bacterias biotrofas (Mohr y Cahill, 2007; Flors y col., 2008; Ton y col., 2009; de Torres y col., 2007, 2009), Por otro lado, y dado que el ABA juega un papel esencial en la adaptación de las plantas a estrés abiótico (Jia y col., 2002; Xiong y col., 2002; Barrero y col., 2006; Cutler y col., 2010), es posible pensar que la respuesta de los mutantes *lox1 dox1* a este tipo de estrés pudiera estar también alterada en comparación con la de las plantas silvestres. En este sentido, cabe mencionar que una alta proporción de los cambios transcripcionales producidos en respuesta a la aplicación de 9-KOT (55%) corresponden a genes de respuesta a estrés osmótico. Futuros estudios serán necesarios para examinar esta posibilidad.

Los resultados que demuestran el aumento de la susceptibilidad de los mutantes *lox1 dox1* a la infección por la bacteria *Pst* DC3000, así como el papel protector de las oxilipinas sintetizadas tras la inducción de estas actividades enzimáticas, permitían suponer que la respuesta del mutante *noxy1*, seleccionado en base a su insensibilidad a la aplicación de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT, mostraría, igualmente, un aumento de la susceptibilidad frente a este tipo de patógenos. Sin embargo, y en contra de los resultados esperados, la caracterización fenotípica del mutante *noxy1* reveló que la mutación *noxy1* provocaba un importante aumento de su capacidad defensiva frente a la infección de bacterias biotrofas. El efecto observado afectaba a las dos cepas examinadas, virulenta y avirulenta, cuyo crecimiento en el mutante *noxy1* era claramente inferior al alcanzado en las plantas silvestres (Figura 18A).

La protección asociada a la mutación *noxy1* se manifestaba, igualmente, mediante una importante reducción en el nivel del daño celular producido en respuesta a la infección, que se apreciaba claramente en el aspecto de las lesiones formadas como consecuencia de la infección, en las que el área afectada disminuye en comparación con el área que ocupan las lesiones formadas en las plantas silvestres (Figura 18C). La tinción de las lesiones con azul de tripano y la cuantificación del daño celular en ensayos de conductividad permiten concluir que las diferencias entre las lesiones formadas en el mutante *noxy1* afectan no solo al área dañada sino también a la intensidad del daño celular producido, que es menor en el mutante *noxy1* que en las plantas control. Igualmente, la tinción de las lesiones formadas con diaminobencidina y azul de anilina ponen de manifiesto, respectivamente, una clara reducción en los niveles de peróxido de hidrogeno y de calosa en el mutante *noxy1*.

La resistencia vegetal frente a la infección de bacterias biotrofas conlleva con frecuencia la activación de un proceso de muerte celular o HR en el que la generación de especies reactivas de oxígeno y la acumulación de calosa están asociadas a la activación de esta respuesta (Apel y Hirt, 2004; Gechev y col., 2006; Triantaphylidés y Havaux, 2009; Nanda y col., 2010; Jacobs y col., 2003; Nishimura y col., 2003; Boller y Felix, 2009). Esta situación contrasta de forma clara con los resultados obtenidos en el mutante *noxy1*, en donde la intensidad de los parámetros descritos, muerte celular, peróxido de hidrogeno y calosa, disminuye con respecto a la de las plantas control.

Por el momento desconocemos los mecanismos que provocan el aumento de la resistencia del mutante *noxy1* a la infección de bacterias biotrofas. No obstante, es posible especular que el hecho de que el mutante *noxy1* sea deficiente en los procesos de señalización activados por 9-HOT y 9-KOT podría provocar un aumento en el nivel de dichos compuestos que, a su vez, activarían otras respuestas en la

planta que contribuirían a dificultar el desarrollo de los patógenos. En este sentido, la reducción de los niveles de peróxido de hidrógeno en el mutante *noxy1* es, probablemente, el reflejo de una alteración en la respuesta de estrés oxidativo que acompaña a la activación de la defensa. En esta respuesta, el oxígeno se convierte en distintas especies reactivas a través de distintas reacciones (Apel y Hirt, 2004; Vellosillo y col., 2010; Nanda y col., 2010). Así, la disminución de peróxido de hidrogeno podría ser consecuencia de un aumento en la generación de otro tipo de especies reactivas cuya producción estaría favorecida por el aumento de los niveles de 9-HOT y 9-KOT.

De acuerdo con esta posibilidad, la mutación *noxy1* conlleva la formación de lesiones necróticas que aparecen de forma espontánea sobre la superficie foliar en condiciones de baja intensidad de luz, y cuya intensidad está en relación inversa a la disminución de la intensidad lumínica y a la reducción del número de horas de luz en las que se desarrolla la planta. Así, mientras que en condiciones de crecimiento estándar el fenotipo del mutante *noxy1* es indistinguible del de las plantas silvestres, la reducción de la intensidad lumínica desde 6000 a 3500 luxes provoca la formación de pequeñas lesiones necróticas, cuya intensidad aumenta dramáticamente cuando se disminuye la luz hasta los 500 luxes.

El estudio de los cambios transcriptómicos asociados a la formación de lesiones en el mutante *noxy1*, reveló importantes variaciones en la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa y la muerte celular que acompaña a esta respuesta. Además, y de acuerdo con la alteración de la producción de especies reactivas de oxígeno, la formación de lesiones conlleva la activación de genes relacionados con las respuestas a estrés oxidativo y estrés osmótico. De esta manera la reprogramación transcripcional asociada a la formación de lesiones estaría relacionada con el aumento de la resistencia del mutante *noxy1* a la infección de patógenos biotrofos. Por el momento, desconocemos si el crecimiento del mutante *noxy1* en condiciones estándar de luz conlleva cambios transcripcionales que pudieran provocar el aumento de la resistencia asociada a esta mutación. Independientemente de la existencia de estos cambios, es posible predecir variaciones significativas en la intensidad y en el tiempo de inducción de la respuesta de defensa del mutante *noxy1* en comparación al de las plantas silvestres, aún en condiciones estándar de crecimiento.

Al igual que en el mutante *noxy1*, existen numerosos estudios que describen la existencia de mutantes, denominados en inglés *lesion mimics*, en los que aparecen lesiones espontáneas que varían de acuerdo a las condiciones de crecimiento de la planta y, en especial, de las condiciones de luz (Mateo y col., 2004; Mühlenbock y col.,

2008). La caracterización de estos mutantes ha puesto de manifiesto que la aparición de lesiones está acompañada de importantes cambios transcripcionales que afectan a la capacidad defensiva de las plantas caracterizadas (Dietrich y col., 1994; Lorrain y col., 2003; Yang y col., 2004; Mühlenbock y col., 2008). Por otro lado, y de acuerdo al tipo de lesiones desarrolladas, las mutaciones caracterizadas afectan a dos tipos de genes, aquellos implicados en la iniciación del proceso de muerte celular, en cuyo caso el tamaño de las lesiones se mantiene de forma estable, y los implicados en la supresión de este proceso, en cuyo caso las lesiones aumentan progresivamente llegando a ocupar una parte importante de la superficie foliar. En el mutante *noxy1*, las lesiones formadas mantienen su tamaño desde su aparición, lo que estaría de acuerdo con la participación de la proteína NOXY1 en la iniciación del proceso de muerte celular y no en su supresión.

La caracterización de los genes que se inducen durante la formación de lesiones en el mutante *noxy1* revela un importante incremento ($\approx 50\%$) en genes inducibles en respuesta a la aplicación de AgNO_3 , caracterizado por su capacidad para interferir en la activación de la ruta de transducción dependiente del ET (Suttle, 1998; Jun y col., 2004). En este sentido cabe resaltar que estudios transcripcionales realizados en el laboratorio con objeto de identificar genes de la planta que varían su expresión en respuesta a la generación de singlete de oxígeno revelan, igualmente, que un alto porcentaje de los genes que responden a la generación de este tipo de especie reactiva de oxígeno corresponden a genes inducibles en respuesta a la aplicación de AgNO_3 (López y col., 2011). Estos resultados sugieren que la formación de lesiones en el mutante *noxy1* podría ser consecuencia, al menos en parte, de un aumento en la producción de singlete de oxígeno, una especie reactiva de oxígeno con un alto efecto tóxico, cuya acumulación conduce a la formación de lesiones necróticas (Lee y col., 2007; Przybyla y col., 2008; Baruah y col., 2009). Por otro lado, y en base a los resultados que describen la interacción entre la producción de peróxido de hidrógeno y singlete de oxígeno (op den Camp y col., 2003; Gadjev y col., 2006; Laloi y col., 2007; López y col., 2011), la producción de este último podría estar asociada con una reducción en la producción de peróxido de hidrógeno, tal y como se observa en el mutante *noxy1* durante la infección de la bacteria *Pst* DC3000.

En línea con esta discusión, los cambios transcripcionales caracterizados en el mutante *noxy1* afectan a la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo y a estreses abióticos, en donde la producción de especies reactivas de oxígeno juega igualmente, un papel crítico como parte de los mecanismos de adaptación de las plantas a este tipo de estrés (Gill y Tuteja, 2010). De acuerdo con esta posibilidad, los análisis dirigidos a examinar la respuesta del mutante *noxy1* a distintas condiciones de

estrés oxidativo y estrés abiótico revelan la hipersensibilidad de estas plantas a la presencia de ión superóxido, peróxido de hidrógeno, glicerol y NaCl.

El clonaje posicional del mutante *noxy1* permitió identificar la mutación responsable de las alteraciones fenotípicas asociada a la mutación *noxy1* en el locus At1g43980. Además, el hecho de que la expresión de la versión silvestre de este locus en el mutante *noxy1* complemente el fenotipo mutante con respecto a la insensibilidad de la raíz a la aplicación de 9-HOT, 9-KOT e isoxaben, permitió confirmar la identidad de la mutación.

El análisis de la secuencia codificada por el gen *NOXY1* reveló su homología con la superfamilia de proteínas PENTATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING PROTEINS o PPRs, caracterizadas por contener dominios de 35 aminoácidos que se repiten a lo largo de la secuencia proteica. La proteína codificada por el gen *NOXY1* contiene 11 dominios PPR, cuyo alineamiento pone de manifiesto que, al igual que ocurre en el resto de los miembros de esta familia proteica, los dominios PPR comparten un número reducido de aminoácidos cuya posición está conservada en todos ellos (Figura 25A). Los análisis de predicción estructural indican que los motivos PPRs estarían formando α -hélices antiparalelas, cuya organización en tándem originaría una superhélice que contendría un surco en su cara interior, que constituiría el lugar de unión de un hipotético ligando (Jinek y col., 2004). Los aminoácidos localizados en la parte central del surco de unión al ligando son de naturaleza hidrofílica, mientras que los situados en el fondo de este dominio poseen carga positiva, lo que implica la naturaleza hidrofílica y acídica del ligando. Estas características, junto con los resultados experimentales derivados del estudio de determinadas proteínas PPRs, han puesto de manifiesto la interacción de las proteínas PPRs con moléculas de ARN o ADN, y proponen su participación en procesos de regulación post-transcripcional de la expresión génica (Hölzle y col., 2001; Andrés y col., 2007; Delannoy y col., 2007). En la actualidad estamos generando plantas transgénicas portadoras de la construcción *NOXY1*-HA, con las que procederemos a examinar e identificar el ligando de unión a la proteína *NOXY1* mediante ensayos de RNA-Seq.

Los análisis realizados con objeto de determinar la localización celular de las proteínas PPR permiten predecir su presencia en diversos compartimentos celulares tales como las mitocondrias, los cloroplastos, el núcleo y el citoplasma. Dichas predicciones han sido corroboradas en determinados casos con evidencias experimentales que demuestran la interacción de las proteínas caracterizadas con moléculas de ARN y ADN y, por lo tanto, su participación en procesos de regulación de la expresión génica (Lurin y col., 2004; Cushing y col., 2005; Kotera y col., 2005; Liu

y col., 2010). El estudio de la secuencia de la proteína NOXY1 así como la generación de plantas transgénicas transformadas con la construcción NOXY1-GFP, no nos ha permitido, hasta el momento, determinar su localización celular. Así, y aunque la proteína de fusión NOXY1-GFP complementa el fenotipo del mutante *noxy1*, el examen microscópico de dichas plantas no revela la fluorescencia asociada a dicha proteína de fusión.

A este respecto, se ha descrito que la expresión de los genes que codifican las proteínas PPRs podría estar regulada mediante la participación de ARNs de pequeño tamaño que contribuirían a regular el nivel de acumulación de sus transcritos (Katiyar-Agarwal y col., 2006; Katiyar-Agarwal y Jin, 2007). De esta manera, la expresión del gen *NOXY1*, así como la de otros genes PPRs, podría estar sometida a uno de los distintos procesos de silenciamiento transcripcional o post-transcripcional que participan en la regulación de la expresión génica en plantas (Padmanabhan y col., 2009; Katiyar-Agarwal y Jin, 2010, Brodersen y Voinnet, 2006; Matzke y col., 2009), y en particular la actividad transcripcional durante la respuesta de defensa de la planta frente a la infección de microorganismos patógenos (Katiyar-Agarwal y col., 2006; Katiyar-Agarwal y Jin, 2007). El gen *NOXY1*, se encuentra dentro de un grupo de proteínas PPRs cuya expresión podría estar regulada por la acción de sARNs de 24 nucleótidos, cuya presencia está asociada a un proceso de silenciamiento transcripcional en el que la acción de la ARN polimerasa RDR2 y la ARNasa DCL3 conduce, en último término, a la metilación del ADN y, por tanto, a la ausencia de los transcritos correspondientes (Howell y col., 2007). En línea con esta posibilidad y teniendo en cuenta los datos que revelan la acumulación de los transcritos derivados del gen *NOXY1* en respuesta al tratamiento con 9-HOT a la infección de las bacterias *Pst* DC3000 *avrRpm1* y *Pst* DC3000 (Figura 24), es posible proponer que el gen *NOXY1* estaría sometido a un proceso de silenciamiento que determinaría su falta de expresión durante el desarrollo de la planta, mientras que la supresión de dicho silenciamiento, durante la respuesta de la planta a distintas condiciones de estrés, activaría su expresión, permitiendo que la proteína NOXY1 realice su acción controlando dicha respuesta.

La regulación post-transcripcional de la expresión génica es un proceso frecuente en la respuesta de la planta a estrés biótico y abiótico, aunque el efecto de este proceso parece jugar un papel muy relevante en la respuesta de la planta a estrés abiótico y en particular a la señalización mediada a través del ABA (Kuhn y Schroeder, 2003; Nambara y Marion-Poll, 2005; Covarrubias y Reyes, 2010). De acuerdo a esta circunstancia, los resultados que muestran la hipersensibilidad del mutante *noxy1* a la aplicación de ABA indican la alteración en esta planta de los mecanismos de

regulación dependientes de esta hormona. En relación a este hecho cabe resaltar que, a pesar de las diferencias detectadas entre los mutantes *lox1 dox1* y *noxy1* durante la respuesta a la infección de bacterias biotrofas, ambos mutantes muestran una respuesta de hipersensibilidad a ABA que indica la participación de los genes *LOX1*, *α-DOX1* y *NOXY1* en procesos relacionados con la respuesta de las plantas a estrés y, en particular, en la regulación de los procesos de estrés oxidativo que acompañan a estas respuestas. Estudios posteriores a los descritos en esta memoria nos permitirán examinar con más detalle la acción del ABA sobre estos mutantes y determinar las alteraciones asociadas a las mutaciones caracterizadas.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La expresión de los genes *LOX1* y α -*DOX1* se induce de forma local durante la respuesta de plantas de *Arabidopsis* a la infección de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 y *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 *avrRpm1*.

2. La pérdida de las funciones *LOX1* y α -*DOX1*, provoca un aumento en la susceptibilidad de la planta frente a la infección de la bacteria virulenta *Pst* DC3000, y reduce su capacidad para inducir una respuesta de defensa en los tejidos sistémicos, alejados de las zonas infectadas.

3. La intensidad de los defectos descritos es claramente mayor en el doble mutante *lox1 dox1* que en los mutantes individuales *lox1* y *dox1*, lo que revela la participación coordinada de ambas actividades enzimáticas en la activación de las respuestas de defensa local y sistémica de las plantas.

4. La aplicación exógena de oxilipinas protege a las plantas frente a la infección de la bacteria *Pst* DC3000. El efecto protector ejercido por estos compuestos se manifiesta en la reducción tanto de la tasa de crecimiento bacteriano como de los síntomas producidos durante la infección.

5. Entre los compuestos examinados, el ácido 9-cetooctadecatrienoico (9-KOT) ejerce un efecto protector más intenso y su producción aumenta en plantas silvestres en respuesta a la infección. Los niveles de 9-KOT disminuyen en los mutantes *lox1* y *lox1 dox1*, y aumenta, por encima de los correspondientes a las plantas silvestres, en el mutante *dox1*, como consecuencia de la interacción metabólica que se establece entre las dos actividades enzimáticas caracterizadas.

6. La aplicación de 9-KOT en plantas silvestres altera la expresión de genes de respuesta a bacterias biotrofas, a estrés oxidativo y a estrés osmótico, así como la de genes de respuesta a las hormonas ABA, JA y SA. Además, el efecto protector ejercido por el 9-KOT provoca la alteración de la homeostasis hormonal, reduciendo los niveles de ABA y JA durante la infección de *Pst* DC3000.

7. El pre-tratamiento con 9-KOT interfiere con mecanismos de virulencia de la bacteria *Pst* DC3000, en los que la liberación de efectores bacterianos al interior de la célula

vegetal provoca la modificación del metabolismo de la planta con objeto de favorecer la infección e inhibir la respuesta de defensa.

8. Las funciones LOX1 y α -DOX1 regulan la homeostasis de las hormonas ABA y JA durante la respuesta de defensa vegetal, y su pérdida afecta a los procesos de producción y señalización de ABA.

9. El mutante *noxy1*, insensible a las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT, genera lesiones necróticas espontáneas en respuesta a la reducción de la intensidad lumínica. La generación de lesiones conlleva la inducción de la expresión de genes relacionados con procesos de inmunidad vegetal, de respuesta a estrés abiótico y a las hormonas ABA y ET.

10. La mutación *noxy1* aumenta la resistencia de la planta frente a la infección de bacterias biotrofas y la susceptibilidad frente a hongos necrotrofos.

11. El gen *NOXY1* codifica una proteína de la familia de las PPRs, del inglés PENTATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING PROTEIN, de función desconocida que podría participar en procesos de regulación post-transcripcional de la expresión génica.

12. El mutante *noxy1* muestra un fenotipo de hipersensibilidad a ABA que revela una alteración en la producción y/o señalización de esta hormona y que podría, a su vez, provocar un defecto en la regulación del estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., and Dopazo, J.** (2004). FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* **20**, 578-580.
- Álvarez, M.E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* **44**, 429-442.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunstrom, A., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Gobel, C., Feussner, I., and Ellerstrom, M.** (2006). Oxylinin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *J Biol Chem* **281**, 31528-31537.
- Andrés C., Lurin C., Small I.D.** (2007). The multifarious role of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiologia Plantarum* **129**, 14-22.
- Apel, K., and Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399.
- Ausubel, F.M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**, 973-979.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M., and Castresana, C.** (2009a). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* **44**, 85-95.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Rodríguez, M.J., López, M.A., Ponce de León, I., Hamberg, M., and Castresana, C.** (2009b). Functional analysis of alpha-DOX2, an active alpha-dioxygenase critical for normal development in tomato plants. *Plant Physiol* **151**, 1421-1432.
- Barrero, J.M., Rodríguez, P.L., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2006). Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant Cell Environ* **29**, 2000-2008.
- Baruah, A., Simkova, K., Apel, K., and Laloi, C.** (2009). *Arabidopsis* mutants reveal multiple singlet oxygen signaling pathways involved in stress response and development. *Plant Mol Biol* **70**, 547-563.
- Bechtold, N., and Pelletier, G.** (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**, 259-266.

- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B.** (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 351-368.
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I.** (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**, 279-284.
- Blee, E.** (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**, 33-72.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R.** (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 396-403.
- Boller, T., and Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 379-406.
- Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., and Herzyk, P.** (2004). Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* **573**, 83-92.
- Brodersen, P., and Voinnet, O.** (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* **22**, 268-280.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F., and Cammue, B.P.** (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 393-416.
- Brooks, D.M., Bender, C.L., and Kunkel, B.N.** (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* **6**, 629-639.
- Browse, J.** (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 183-205.
- Buhot, N., Gomes, E., Milat, M.L., Ponchet, M., Marion, D., Lequeu, J., Delrot, S., Coutos-Thevenot, P., and Blein, J.P.** (2004). Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Biol Cell* **15**, 5047-5052.
- Buttner, D., and Bonas, U.** (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 107-133.
- Carol, R.J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M.C., Kakesova, H., Derbyshire, P., Drea, S., Zarsky, V., and Dolan, L.** (2005). A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* **438**, 1013-1016.
- Carr, J.P., Lewsey, M.G., and Palukaitis, P.** (2010). Signaling in induced resistance. *Adv Virus Res* **76**, 57-121.
- Cianciotto N.P.** (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* **12**, 581-588.

- Clarke, J.D., Aarts, N., Feys, B.J., Dong, X., and Parker, J.E.** (2001). Constitutive disease resistance requires EDS1 in the Arabidopsis mutants *cpr1* and *cpr6* and is partially EDS1-dependent in *cpr5*. *Plant J* **26**, 409-420.
- Covarrubias, A.A., and Reyes, J.L.** (2010). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ* **33**, 481-489.
- Cristescu, S.M., De Martinis, D., Te Lintel Hekkert, S., Parker, D.H., and Harren, F.J.** (2002). Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5342-5350.
- Croft, K., Juttner, F., and Slusarenko, A.J.** (1993). Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* **101**, 13-24.
- Cui, J., Bahrami, A.K., Pringle, E.G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C.L., Pierce, N.E., and Ausubel, F.M.** (2005). *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1791-1796.
- Cushing, D.A., Forsthoefel, N.R., Gestaut, D.R., and Vernon, D.M.** (2005). Arabidopsis *emb175* and other ppr knockout mutants reveal essential roles for pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in plant embryogenesis. *Planta* **221**, 424-436.
- Cutler, S.R., Rodríguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 651-679.
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M.K., Yu, K., Sekine, K.T., Gao, Q.M., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat Genet* **43**, 421-427.
- Chaturvedi, R., Krothapalli, K., Makandar, R., Nandi, A., Sparks, A.A., Roth, M.R., Welti, R., and Shah, J.** (2008). Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid. *Plant J* **54**, 106-117.
- Dangl, M., Brosch, G., Haas, H., Loidl, P., and Lusser, A.** (2001). Comparative analysis of HD2 type histone deacetylases in higher plants. *Planta* **213**, 280-285.
- De León, I.P., Sanz, A., Hamberg, M., and Castresana, C.** (2002). Involvement of the Arabidopsis alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J* **29**, 61-62.

- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodríguez Egea, P., Bogre, L., and Grant, M.** (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J* **26**, 1434-1443.
- de Torres Zabala, M., Bennett, M.H., Truman, W.H., and Grant, M.R.** (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *Plant J* **59**, 375-386.
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M., and Dangl, J.L.** (1991). Identification and molecular mapping of a single Arabidopsis thaliana locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J* **1**, 289-302.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**, 4777-4788.
- Delannoy, E., Stanley, W.A., Bond, C.S., and Small, I.D.** (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem Soc Trans* **35**, 1643-1647.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19-21.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., and Dangl, J.L.** (1994). Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577.
- Dong, X.** (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 547-552.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 185-209.
- Farmer, E.E., Almeras, E., and Krishnamurthy, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 372-378.
- Feussner, I., and Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 275-297.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E.** (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J* **20**, 5400-5411.
- Flors, V., Ton, J., van Doorn, R., Jakab, G., García-Agustín, P., and Mauch-Mani, B.** (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and

- induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **54**, 81-92.
- Fonseca, S., Chico, J.M., and Solano, R.** (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 539-547.
- Fujiwara S., Tanaka N., Kaneda T., Takayama S., Isogai A., and Che F.S.** (2004). Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 986-998.
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T.S., Laloi, C., Minkov, I.N., Shulaev, V., Apel, K., Inze, D., Mittler, R., and Van Breusegem, F.** (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**, 436-445.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C.** (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* **28**, 1091-1101.
- Gill, S.S., and Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**, 909-930.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
- Gobel, C., Feussner, I., Hamberg, M., and Rosahl, S.** (2002). Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim Biophys Acta* **1584**, 55-64.
- Gobel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sánchez-Serrano, J., Hamberg, M., and Rosahl, S.** (2001). Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* **276**, 6267-6273.
- Granado, J., Felix, G., and Boller, T.** (1995). Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiol* **107**, 485-490.
- Graner, G., Hamberg, M., and Meijer, J.** (2003). Screening of oxylipins for control of oilseed rape (*Brassica napus*) fungal pathogens. *Phytochemistry* **63**, 89-95.
- Grant, M., and Lamb, C.** (2006). Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 414-420.
- Greenberg, J.T.** (1996). Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12094-12097.
- Guo, H., and Ecker, J.R.** (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667-677.

- Halitschke, R., Ziegler, J., Keinanen, M., and Baldwin, I.T.** (2004). Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in *Nicotiana attenuata*. *Plant J* **40**, 35-46.
- Hamberg, M., Sanz, A., and Castresana, C.** (1999). alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**, 24503-24513.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodríguez, M.J., Calvo, A.P., and Castresana, C.** (2003). Activation of the fatty acid alpha-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylipins protecting against cell death. *J Biol Chem* **278**, 51796-51805.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.** (1997). Plant Disease Resistance Genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 575-607.
- Hammond-Kosack, K.E., and Parker, J.E.** (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 177-193.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hauser, A.R.** (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **7**, 654-665.
- Holzle, A., Jonietz, C., Torjek, O., Altmann, T., Binder, S., and Forner, J.** (2011). A RESTORER OF FERTILITY-like PPR gene is required for 5'-end processing of the nad4 mRNA in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **65**, 737-744.
- Howe, G.A., and Jander, G.** (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 41-66.
- Howell, M.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Cumbie, J.S., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C.** (2007). Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in *Arabidopsis* reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* **19**, 926-942.
- Hwang, I.S., and Hwang, B.K.** (2010). The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol* **152**, 948-967.
- Iba, K.** (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 225-245.

- Innes, R.W., Bisgrove, S.R., Smith, N.M., Bent, A.F., Staskawicz, B.J., and Liu, Y.C.** (1993). Identification of a disease resistance locus in Arabidopsis that is functionally homologous to the RPG1 locus of soybean. *Plant J* **4**, 813-820.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G.B.** (2003). An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* **15**, 2503-2513.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A., and Alfano, J.R.** (2004). Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J* **37**, 554-565.
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L., and Greenberg, J.T.** (2007). A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr Biol* **17**, 499-508.
- Jia, W., Wang, Y., Zhang, S., and Zhang, J.** (2002). Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot* **53**, 2201-2206.
- Jinek, M., Rehwinkel, J., Lazarus, B.D., Izaurralde, E., Hanover, J.A., and Conti, E.** (2004). The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1001-1007.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Juhas M, Crook D.W., and Hood D.W.** (2008). Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* **12**, 2377-2386.
- Jun, S.H., Han, M.J., Lee, S., Seo, Y.S., Kim, W.T., and An, G.** (2004). OsEIN2 is a positive component in ethylene signaling in rice. *Plant Cell Physiol* **45**, 281-289.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**, 89-91.
- Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2009). Fatty Acid-derived signals in plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 153-176.
- Katiyar-Agarwal, S., and Jin, H.** (2007). Discovery of pathogen-regulated small RNAs in plants. *Methods Enzymol* **427**, 215-227.
- Katiyar-Agarwal, S., and Jin, H.** (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 225-246.

- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J., and Jin, H.** (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18002-18007.
- Kazan, K., and Manners, J.M.** (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol* **146**, 1459-1468.
- Kendrick, M.D., and Chang, C.** (2008). Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 479-485.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E.** (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**, 301-307.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., and Takabayashi, J.** (2008). Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **69**, 2127-2132.
- Kombrink, E. y Somssich, I.E.** (1995). *En Plant Relationship* (Carroll, G. Y Tudzynsk, eds.). *The Mycota*, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin in Press.
- Konieczny, A., and Ausubel, F.M.** (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**, 403-410.
- Koo, A.J., and Howe, G.A.** (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**, 1571-1580.
- Koornneef, A., and Pieterse, C.M.** (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* **146**, 839-844.
- Kotera, E., Tasaka, M., and Shikanai, T.** (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**, 326-330.
- Kuhn, J.M., and Schroeder, J.I.** (2003). Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 463-469.
- Kwon, S.J., Jin, H.C., Lee, S., Nam, M.H., Chung, J.H., Kwon, S.I., Ryu, C.M., and Park, O.K.** (2009). GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* **58**, 235-245.
- Laloi, C., Apel, K., and Danon, A.** (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 323-328.
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., and Apel, K.** (2007). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 672-677.
- Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275.

- Lee, K.P., Kim, C., Landgraf, F., and Apel, K.** (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10270-10275.
- Lehti-Shiu, M.D., Zou, C., Hanada, K., and Shiu, S.H.** (2009). Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiol* **150**, 12-26.
- Lewis, J.D., Guttman, D.S., and Desveaux, D.** (2009). The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 1055-1063.
- Liu, X., Yu, F., and Rodermeil, S.** (2010). An *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat protein, SUPPRESSOR OF VARIATION7, is required for FtsH-mediated chloroplast biogenesis. *Plant Physiol* **154**, 1588-1601.
- Loake, G., and Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 466-472.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**, 16-20.
- López, M.A., Bannenberg, G., and Castresana, C.** (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 420-427.
- López, M.A., Vicente, J., Kulasekaran, S., Velloso, T., Martinez, M., Irigoyen, M.L., Cascon, T., Bannenberg, G., Hamberg, M., and Castresana, C.** (2011). Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *Plant J* **67**, 447-458.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balague, C., and Roby, D.** (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* **8**, 263-271.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L., and Small, I.** (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089-2103.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., and Cameron, R.K.** (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 399-403.

- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M., and Karpinski, S.** (2004). LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol* **136**, 2818-2830.
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., and Matzke, A.J.** (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 367-376.
- McCann, H.C., and Guttman, D.S.** (2008). Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol* **177**, 33-47.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- Mene-Saffrane, L., Dubugnon, L., Chetelat, A., Stolz, S., Gouhier-Darimont, C., and Farmer, E.E.** (2009). Nonenzymatic oxidation of trienoic fatty acids contributes to reactive oxygen species management in Arabidopsis. *J Biol Chem* **284**, 1702-1708.
- Mishina, T.E., and Zeier, J.** (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J* **50**, 500-513.
- Mohr, P.G., and Cahill, D.M.** (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Funct Integr Genomics* **7**, 181-191.
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F., and Triantaphylides, C.** (2005). Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol* **138**, 1516-1526.
- Mosblech, A., Feussner, I., and Heilmann, I.** (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**, 511-517.
- Mueller, M.J., and Berger, S.** (2009). Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* **70**, 1511-1521.
- Muhlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpinska, B., and Karpinski, S.** (2008). Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 2339-2356.
- Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y.** (2008). Amino acid sequence of bacterial microbe-associated

- molecular pattern flg22 is required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1165-1174.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 165-185.
- Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., and Dunand, C.** (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol* **52**, 195-204.
- Nandi, A., Welti, R., and Shah, J.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **16**, 465-477.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**, 650-655.
- Nawrath, C., and Metraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.
- Nguyen, H.P., Chakravarthy, S., Velasquez, A.C., McLane, H.L., Zeng, L., Nakayashiki, H., Park, D.H., Collmer, A., and Martin, G.B.** (2010). Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 991-999.
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H., Vogel, J.P., Edwards, H., and Somerville, S.C.** (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**, 969-972.
- Nomura, K., Melotto, M., and He, S.Y.** (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 361-368.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**, 249-266.
- Onkokesung, N., Galis, I., von Dahl, C.C., Matsuoka, K., Saluz, H.P., and Baldwin, I.T.** (2010). Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding

- and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant Physiol* **153**, 785-798.
- op den Camp, R.G., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I., Nater, M., and Apel, K.** (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2320-2332.
- Padmanabhan, C., Zhang, X., and Jin, H.** (2009). Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 465-472.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Mettraux, J.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Pieterse, C.M., León-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**, 308-316.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodríguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerré-Tugayé, M.T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M., and Fournier, J.** (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol* **139**, 1902-1913.
- Przybyla, D., Gobel, C., Imboden, A., Hamberg, M., Feussner, I., and Apel, K.** (2008). Enzymatic, but not non-enzymatic, $1O_2$ -mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the EXECUTER1-dependent stress response program in the flu mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **54**, 236-248.
- Rance, I., Fournier, J., and Esquerre-Tugaye, M.T.** (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6554-6559.
- Reiner, A., Yekutieli, D., and Benjamini, Y.** (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* **19**, 368-375.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., and Jones, J.D.** (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 372-379.
- Ron, M., and Avni, A.** (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**, 1604-1615.

- Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., and Martin, G.B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* **448**, 370-374.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., and Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**, 374-378.
- Sáez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R., and Rodríguez, P.L. (2006). Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* **141**, 1389-1399.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanz, A., Moreno, J.I., and Castresana, C. (1998). PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell* **10**, 1523-1537.
- Savchenko, T., Walley, J.W., Chehab, E.W., Xiao, Y., Kaspi, R., Pye, M.F., Mohamed, M.E., Lazarus, C.M., Bostock, R.M., and Dehesh, K. (2010). Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *Plant Cell* **22**, 3193-3205.
- Shabala, S., Cuin, T.A., Pang, J., Percey, W., Chen, Z., Conn, S., Eing, C., and Wegner, L.H. (2010). Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley. *Plant J* **61**, 839-853.
- Shah, J. (2005). Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 229-260.
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 459-464.
- Shang, Y., Li, X., Cui, H., He, P., Thilmony, R., Chintamanani, S., Zwiesler-Vollick, J., Gopalan, S., Tang, X., and Zhou, J.M. (2006). RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19200-19205.
- Spoel, S.H., and Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* **3**, 348-351.
- Spoel, S.H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N.W., Genschik, P., and Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**, 860-872.
- Staswick, P.E. (2008). JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* **13**, 66-71.

- Steppuhn, A., Gaquerel, E., and Baldwin, I.T.** (2010). The two alpha-dox genes of *Nicotiana attenuata*: overlapping but distinct functions in development and stress responses. *BMC Plant Biol* **10**, 171.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12837-12842.
- Suttle, J.C.** (1998). Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol* **118**, 843-848.
- Suzuki, H., Xia, Y., Cameron, R., Shadle, G., Blount, J., Lamb, C., and Dixon, R.A.** (2004). Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J Exp Bot* **55**, 169-179.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., and Cammue, B.P.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* **13**, 63-68.
- Ton, J., Flors, V., and Mauch-Mani, B.** (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci* **14**, 310-317.
- Triantaphylides, C., and Havaux, M.** (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* **14**, 219-228.
- Truman, W., de Zabala, M.T., and Grant, M.** (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J* **46**, 14-33.
- Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., and Grant, M.** (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1075-1080.
- Tsuda, K., and Katagiri, F.** (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 459-465.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet* **5**, e1000772.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B.N., Anand, A., Mysore, K.S., and Bender, C.L.** (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 955-965.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135-162.
- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M., and Castresana, C.** (2010). Emerging complexity in reactive oxygen species production and

- signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol* **154**, 444-448.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M.A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M., and Castresana, C.** (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**, 831-846.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F., and Park, S.W.** (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol* **11**, 436-442.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 177-206.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chetelat, A., and Farmer, E.E.** (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **24**, 467-476.
- Wang, K.L., Yoshida, H., Lurin, C., and Ecker, J.R.** (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* **428**, 945-950.
- Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D., and Farmer, E.E.** (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**, 485-494.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C., and Feussner, I.** (1999). Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves--preferential induction of the reductase pathway by salicylate(1). *FEBS Lett* **464**, 133-137.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F., and Staskawicz, B.J.** (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* **3**, 49-59.
- Wu, J., and Baldwin, I.T.** (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Genet* **44**, 1-24.
- Xia, S., Zhu, Z., Hao, L., Chen, J.G., Xiao, L., Zhang, Y., and Li, X.** (2009). Negative regulation of systemic acquired resistance by replication factor C subunit3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**, 2009-2017.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K.** (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14 Suppl**, S165-183.
- Yang, Y., Qi, M., and Mei, C.** (2004). Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J* **40**, 909-919.
- Yoo, S.D., Cho, Y., and Sheen, J.** (2009). Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci* **14**, 270-279.

- Zipfel, C.** (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**, 10-16.
- Zipfel, C.** (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 414-420.

ANEXO

Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens^{1[W]}

Isabelle Prost², Sandrine Dhondt², Grit Rothe, Jorge Vicente, Maria José Rodriguez, Neil Kift, Francis Carbonne, Gareth Griffiths, Marie-Thérèse Esquerré-Tugayé, Sabine Rosahl, Carmen Castresana, Mats Hamberg, and Joëlle Fournier*

Unité Mixte de Recherche 5546 Centre National de la Recherche Scientifique-Université Paul Sabatier, Pôle de Biotechnologie Végétale, 31326 Castanet-Tolosan, France (I.P., S.D., F.C., M.-T.E.-T., J.F.); Department of Stress and Developmental Biology, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, D-06120 Halle/Saale, Germany (G.R., S.R.); Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain (J.V., M.J.R., C.C.); National Farmers Union of England and Wales, London WC2H 8HL, United Kingdom (N.K.); Chemical Engineering and Applied Chemistry, University of Aston, Aston Triangle, Birmingham B4 7ET, United Kingdom (G.G.); and Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden (M.H.)

Plant oxylipins are a large family of metabolites derived from polyunsaturated fatty acids. The characterization of mutants or transgenic plants affected in the biosynthesis or perception of oxylipins has recently emphasized the role of the so-called oxylipin pathway in plant defense against pests and pathogens. In this context, presumed functions of oxylipins include direct antimicrobial effect, stimulation of plant defense gene expression, and regulation of plant cell death. However, the precise contribution of individual oxylipins to plant defense remains essentially unknown. To get a better insight into the biological activities of oxylipins, *in vitro* growth inhibition assays were used to investigate the direct antimicrobial activities of 43 natural oxylipins against a set of 13 plant pathogenic microorganisms including bacteria, oomycetes, and fungi. This study showed unequivocally that most oxylipins are able to impair growth of some plant microbial pathogens, with only two out of 43 oxylipins being completely inactive against all the tested organisms, and 26 oxylipins showing inhibitory activity toward at least three different microbes. Six oxylipins strongly inhibited mycelial growth and spore germination of eukaryotic microbes, including compounds that had not previously been ascribed an antimicrobial activity, such as 13-keto-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatrienoic acid and 12-oxo-10,15(Z)-phytyldienoic acid. Interestingly, this first large-scale comparative assessment of the antimicrobial effects of oxylipins reveals that regulators of plant defense responses are also the most active oxylipins against eukaryotic microorganisms, suggesting that such oxylipins might contribute to plant defense through their effects both on the plant and on pathogens, possibly through related mechanisms.

Plant oxylipins represent a vast and diverse family of secondary metabolites, believed to occur in all higher plants. They originate from oxidation and further conversions of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), predominantly linoleic acid (18:2) and linolenic acid (18:3). The enzymatic biosynthesis of plant

oxylipins from these PUFAs is mainly initiated by α -dioxygenase (α -DOX) and lipoxygenases (LOXs; Blée, 2002; Feussner and Wasternack, 2002; Howe and Schillmiller, 2002; Supplemental Fig. 1). α -DOX converts 18:2 and 18:3 into highly reactive 2-hydroperoxyoctadecadi(tri)enoic acids, which can be converted into the corresponding 2-hydroxyoctadecadi(tri)enoic acid [2-HO(D/T)] or undergo nonenzymatic decarboxylation into one-carbon-shortened fatty aldehydes and fatty acids (Hamberg et al., 2003). Hydroperoxides formed through the action of 9- and 13-LOXs [9-HPO(D/T) or 13-HPO(D/T)] can be further metabolized by six main enzymatic routes, giving rise to (1) 9- or 13-hydroxyoctadecadi(tri)enoic acid [9- or 13-HO(D/T)] through reduction by a peroxygenase (Blée, 2002) or other peroxidase activity (Weichert et al., 1999; Dietz et al., 2002); (2) trihydroxylated fatty acids through conversion into epoxy alcohols, catalyzed either by an epoxy-alcohol synthase (Hamberg, 1999) or a peroxygenase (Blée, 1998), followed by an epoxide hydrolase (Blée, 1998); (3) fatty acid ketodienes (KOD)

¹ This work was supported by the European Union project Natural Oxylipins and Defence in Ornamentals (QLK5-CT-2001-02445) and by the Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences, and Spatial Planning (project no. 2001-2553).

² These authors contributed equally to the paper.

* Corresponding author; e-mail fournier@scsv.ups-tlse.fr; fax 33-562-193-502.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Joëlle Fournier (fournier@scsv.ups-tlse.fr).

^[W] The online version of this article contains Web-only data.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.066274.

or ketotrienes (KOT) through dehydration by LOXs (Vollenweider et al., 2000) or by dehydrogenation of fatty acid hydroxides by a recently characterized enzyme (Chechetkin et al., 2004); (4) unstable hemiacetals, which almost immediately dissociate into short-chain aldoacids (C9 or C12) and aldehydes (C9 or C6), via the activity of 9- or 13-hydroperoxides lyases (HPL; Grechkin, 2002; Grechkin and Hamberg, 2004); (5) divinyl ether fatty acids through the action of divinyl ether synthases (Grechkin, 2002); and (6) unstable allene oxides generated by allene oxide synthases (Tijet and Brash, 2002). These latter compounds can undergo nonenzymatic hydrolysis forming α - or γ -ketols, or can be channeled into the generation of cyclic, prostaglandin-like cyclopentenones through enzymatic cyclization by allene oxide cyclases. C18 cyclopentenones, e.g. 12-Oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid (12-Oxo-PDA), are further reduced to cyclopentanones and β -oxidized to shorter-chain molecules, such as jasmonic acid (JA; Vick and Zimmerman, 1983). Other oxylipins, such as epoxy and dihydroxy fatty acids, can be formed from C18 PUFAs by the peroxygenase/epoxide hydrolase pathway (Blée, 1998). Overall, more than 100 different oxylipins have been detected so far in a wide range of plant tissues.

A few genes encoding oxylipin biosynthetic enzymes are specifically induced upon inoculation with plant pests or pathogens, and the production of related oxylipins is concomitantly increased as revealed in oxylipin profiling studies (Weber et al., 1999; Göbel et al., 2001, 2002; Ponce de Leon et al., 2002; Hamberg et al., 2003), suggesting a role for these compounds in plant defense. The importance of oxylipins in defense was demonstrated in specific cases. For example, decreasing gene expression of a pathogen-inducible 9-LOX in tobacco (*Nicotiana tabacum*) resulted in increased susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (hereafter designated as *P. parasitica*), an oomycete pathogen of tobacco (Rancé et al., 1998), while suppression of 13-HPL in potato (*Solanum tuberosum*) resulted in increased aphid fecundity on the transgenic plants (Vancanneyt et al., 2001). Conversely, overexpression of 9-LOX in tobacco or jasmonate methyl transferase in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) resulted in increased resistance to *P. parasitica* (Mène-Saffrané et al., 2003) and to *Botrytis cinerea*, a fungal plant pathogen (Seo et al., 2001), respectively.

Indeed, some oxylipins produced in response to pathogen attack were shown to be antimicrobial compounds. Thus, 13-HPOT and 13-HOT (Graner et al., 2003), colneleic acid and colnelenic acid (CL and CLn; Weber et al., 1999), as well as several epoxy- or polyhydroxylated fatty acids (Blée, 1998) were described as antifungal or antioomycete compounds, while cis-3-hexenol and trans-2-hexenal (2-hexenal) were able to strongly reduce growth of *Pseudomonas* in vitro (Croft et al., 1993). Contribution of the oxylipin pathway to plant defense can also proceed from production of signal molecules inducing defense gene

expression or regulating localized cell death, a powerful plant defense mechanism against pathogens known as the hypersensitive response (La Camera et al., 2004). Signaling activities were proposed notably for LOX-generated 9- and 13-HPOD/T (Rustérucci et al., 1999; Knight et al., 2001), α -DOX-generated oxylipins (Ponce de Leon et al., 2002; Hamberg et al., 2003), and many 13-LOX-derived compounds, including the hormone-like JA, methyl jasmonate, 12-Oxo-PDA (Farmer et al., 2003), 13-HPL-derived C6 aldehydes (Bate and Rothstein, 1998; Farmer et al., 2003), 13-HPOT, 13-HOT (Weichert et al., 1999; Vollenweider et al., 2000), and the electrophilic fatty acid KODs and KOTs (Almeras et al., 2003). It is not known whether the signaling and antimicrobial activities define two nonoverlapping groups of oxylipins, possibly correlating with different branches of the pathway. Since antimicrobial activity was reported for a few compounds only, and against a limited number of microorganisms, we set up a large-scale approach in which the effect of 43 naturally occurring oxylipins, comprising previously characterized compounds as well as less studied ones, was individually assessed on the in vitro growth of six prokaryotic and seven eukaryotic, agronomically important, microbial plant pathogens. This large-scale screening approach provides a new insight into the antimicrobial activity of oxylipins, and suggests that certain oxylipins might fulfill multiple functions during plant-pathogen interactions.

RESULTS

Screening Oxylipins for Inhibitory Activities against Plant Microbial Pathogens

Forty-three oxylipins as well as anacardic acid (AA-15:1; Table I; Fig. 1) were prepared and purified in multi-milligram quantities by up scaling previously described procedures (see "Materials and Methods"). They were chosen to represent as much as possible the diversity of structures of this family of metabolites (Fig. 1; Supplemental Fig. 1). Screening of this collection of oxylipins for their effect on microbial plant pathogens was achieved by evaluating the growth of target organisms in liquid media, 24 h after exposure to each oxylipin at 100 μ M, in a microspectrophotometric assay. This concentration was selected on the basis of published data on antimicrobial oxylipins, e.g. CLn or 2-hexenal (Croft et al., 1993; Weber et al., 1999), and of preliminary experiments (data not shown). Target organisms were chosen in the major classes of microbial pathogens of crop plants, i.e. bacteria, fungi, and oomycetes (Table II). In vitro growth effects were measured as compared to controls grown in the presence of the ethanol carrier (1%) alone. Results were organized and visualized using a hierarchical clustering software (Seo and Shneiderman, 2002).

The 44 synthesized compounds as well as 18:2 and 18:3 were assayed at 100 μ M on plant bacterial

Table 1. Oxylipins used in this study

Short names and references to the relevant biosynthetic enzyme or chemical synthesis method are indicated. The references indicated by the numbers in the Reference column are as follows: 1, Hamberg et al., 1999; 2, Gardner, 1996; 3, Lie and Pasha, 1998; 4, Gunstone et al., 1994; 5, Baertschi et al., 1988; 6, Hamberg and Fahlstadius, 1990; 7, Hamberg, 1987; 8, Galliard and Phillips, 1972; 9, Hamberg, 1998; and 10, Hamberg, 1991.

Oxylipin	Short Name	Reference
2(<i>R,S</i>)-Hydroxy-9(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	2-HOE	1
2(<i>R</i>)-Hydroxy-9(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoic acid	2-HOT	1
8(<i>Z</i>),11(<i>Z</i>),14(<i>Z</i>)-Heptadecatrienal	17:3-al	1
9(<i>S</i>)-Hydroperoxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoic acid	9-HPOT	2, 3
9(<i>S</i>)-Hydroperoxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	9-HPOD	2, 3
11(<i>S</i>)-Hydroperoxy-7(<i>Z</i>),9(<i>E</i>),13(<i>Z</i>)-hexadecatrienoic acid	11-HPHT	2, 3
13(<i>S</i>)-Hydroperoxy-6(<i>Z</i>),9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecatrienoic acid	13-HPOT ω 6	2, 3
13(<i>S</i>)-Hydroperoxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoic acid	13-HPOT	2, 3
13(<i>S</i>)-Hydroperoxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecadienoic acid	13-HPOD	2, 3
9(<i>S</i>)-Hydroxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoic acid	9-HOT	2, 3
9(<i>S</i>)-Hydroxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	9-HOD	2, 3
11(<i>S</i>)-Hydroxy-7(<i>Z</i>),9(<i>E</i>),13(<i>Z</i>)-hexadecatrienoic acid	11-HHT	2, 3
13(<i>S</i>)-Hydroxy-6(<i>Z</i>),9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecatrienoic acid	13-HOT ω 6	2, 3
13(<i>S</i>)-Hydroxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoic acid	13-HOT	2, 3
13(<i>S</i>)-Hydroxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecadienoic acid	13-HOD	2, 3
9-Keto-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoic acid	9-KOT	2, 3
9-Keto-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	9-KOD	2, 3
13-Keto-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-octadecatrienoic acid	13-KOT	2, 3
13-Keto-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecadienoic acid	13-KOD	2, 3
(\pm)-cis-9,10-Epoxyoctadecanoic acid	9,10-EO	4
9(<i>R</i>),10(<i>S</i>)-Epoxy-12(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	9,10-EOE	4
12(<i>R</i>),13(<i>S</i>)-Epoxy-9(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	12,13-EOE	4
(\pm)-threo-9,10-Dihydroxy-12(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	9,10-DHOE	4
(\pm)-threo-12,13-Dihydroxy-9(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	12,13-DHOE	4
9,10,16-Trihydroxyhexadecanoic acid (aleuritic acid)	9,10,16-THH	4
12-Oxo-10,15(<i>Z</i>)-phytyldienoic acid	12-Oxo-PDA	5, 6
13-Hydroxy-12-keto-9(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	12,13-KHOD	7
2(<i>E</i>)-Hexenal	2-Hexenal	–
3(<i>Z</i>)-Hexenal	3-Hexenal	4
2(<i>E</i>)-Nonenal	2-Nonenal	4
3(<i>Z</i>)-Nonenal	3-Nonenal	4
9-Oxononanoic acid	9-Oxo-C ₉	4
12-Oxo-9(<i>Z</i>)-dodecenoic acid	12-Oxo-12:1(<i>Z</i>)	4
12-Oxo-10(<i>E</i>)-dodecenoic acid	12-Oxo-12:1(<i>E</i>)	4
1-Penten-3-ol	5:1-ol	–
Colnelenic acid	CLn	8
Colneleic acid	CL	8
ω 5(<i>Z</i>)-Etherolenic acid	ω 5(<i>Z</i>)-ELn	9
10(<i>S</i>),11(<i>S</i>)-Epoxy-9(<i>S</i>)-hydroxy-12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoate ^a	9,10,11-EHOD	10
11(<i>S</i>),12(<i>S</i>)-Epoxy-13(<i>S</i>)-hydroxy-9(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoate ^a	11,12,13-EHOD	10
9(<i>S</i>),12(<i>S</i>),13(<i>S</i>)-Trihydroxy-10(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	9,12,13-THOD	10
9(<i>S</i>),12(<i>S</i>),13(<i>S</i>)-Trihydroxy-10(<i>E</i>)-octadecenoic acid	9,12,13-THOE	10
9(<i>S</i>),10(<i>S</i>),11(<i>R</i>)-Trihydroxy-12(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	9,10,11-THOE	10
11(<i>R</i>),12(<i>S</i>),13(<i>S</i>)-Trihydroxy-9(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	11,12,13-THOE	10
6-[8(<i>Z</i>)-Pentadecenyl]salicylic acid (anacardic acid)	AA-15:1	4

^aMethyl ester.

pathogens *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, and *Erwinia carotovora* (Fig. 2; Supplemental Table I). Lower concentrations were also tested for the most active compounds. The highly antibacterial oxylipin, 2-hexenal, that prevented the growth of all the bacteria at low concentration (10 μ M) was used as a control in these experiments. About half of the tested oxylipins reduced the growth of at least one bacterial strain

above 25%. Sensitivity toward oxylipins was contrasted among and within species. *P. syringae* strains were the most sensitive bacteria, whereas *Erwinia* and *Xanthomonas* strains exhibited low sensitivity toward oxylipins. The most active compounds (CL, CLn, ω 5(*Z*)-etherolenic acid [ω 5(*Z*) ELn], 17:3-al, and AA-15:1) were specific to one species. Interestingly, to our knowledge, inhibition of bacterial growth has not been

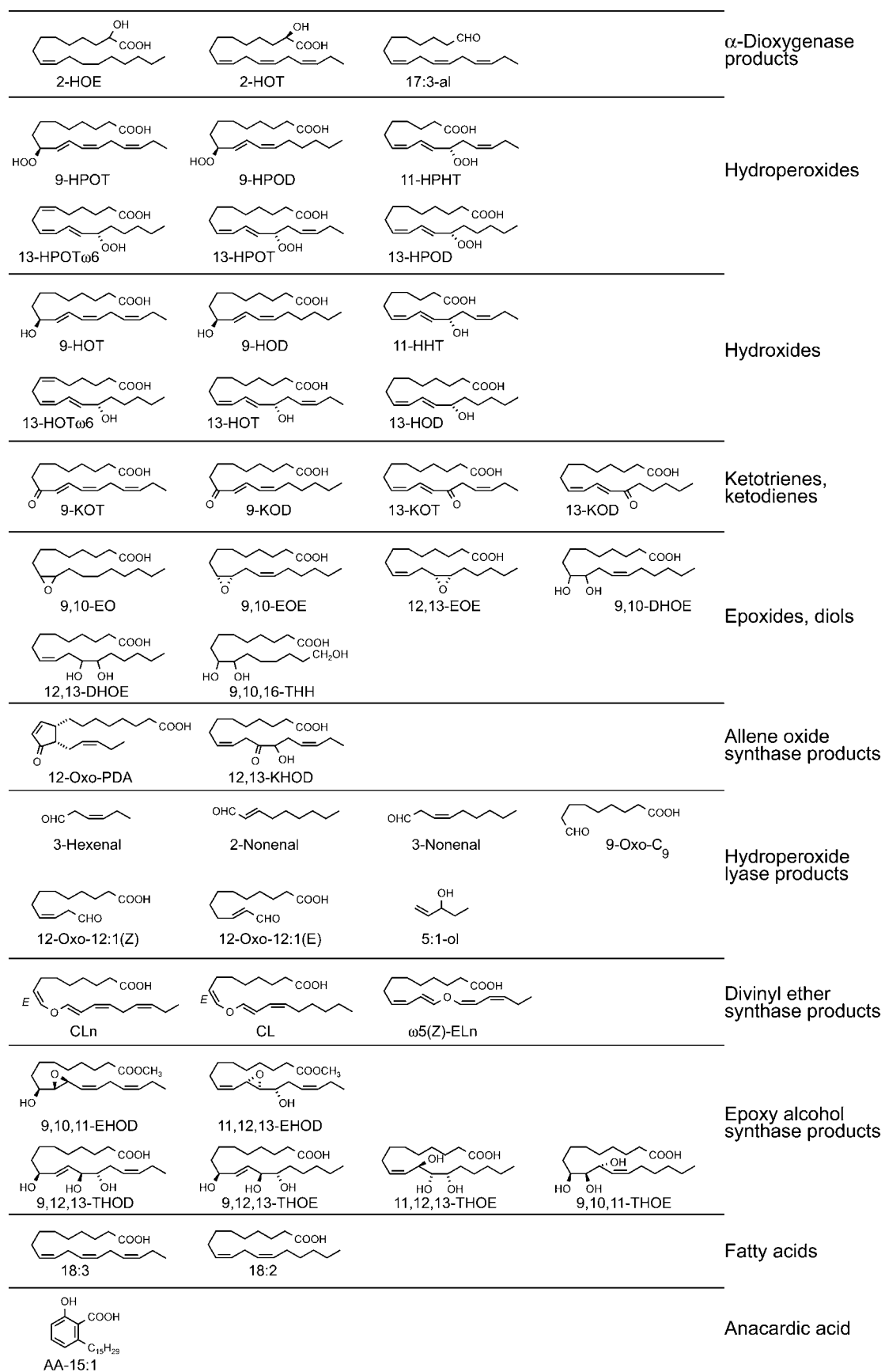


Figure 1. Structures of oxylipins and other compounds used in this work. Abbreviated names for oxylipins are as in Table I.

Table II. Microbial plant pathogens used in this study

Species	Disease
Bacteria	
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Bacterial canker of fruit trees, bacterial blight of legumes
<i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i>	Bacterial speck of tomato and Arabidopsis
<i>P. syringae</i> pv <i>maculicola</i>	Bacterial leaf spot of crucifers
<i>P. syringae</i> pv <i>tabaci</i>	Bacterial wildfire of tobacco and soybean
<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i>	Black rot of crucifers
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Bacterial soft rot of many vegetables, blackleg of potato
Fungi	
<i>A. brassicicola</i>	Black spot of crucifers
<i>F. oxysporum</i> f. <i>radicis-lycopersici</i>	Root and crown rot of tomato
<i>B. cinerea</i>	Gray mold rot on many crops
<i>C. herbarum</i>	Leaf mold, pod, and seed spot on many hosts
<i>Rhizopus</i> spp.	Postharvest decay
Oomycetes	
<i>P. infestans</i>	Late blight of potato and tomato
<i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	Black shank of tobacco

reported before for divinyl ethers. One third of the oxylipins tested did not affect the growth of any bacterial strains.

The same set of compounds was assayed on five fungi, *Alternaria brassicicola*, *B. cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, and *Rhizopus* sp., and on two oomycetes, *Phytophthora infestans* and *P. parasitica*. Spores of some of the target organisms, namely, *P. infestans*, *P. parasitica*, *B. cinerea*, and *C. herbarum*, which showed a prolonged lag phase in liquid medium (data not shown), were pregerminated for 16 h prior to oxylipin treatment to actually test the activity of oxylipins on mycelial growth. The results obtained after 24 h of treatment with each oxylipin at 100 μM are gathered in Figure 3 and Supplemental Table II. Eukaryotic microbes appeared to be more sensitive to oxylipins than bacteria. About two-thirds of the molecules tested reduced the growth of at least one eukaryotic plant pathogen above 25% and about half of the compounds were strongly active (around 50% growth inhibition). As observed with bacteria, the eukaryotic microorganisms displayed contrasting levels of overall sensitivity to oxylipins, ranging from high (*P. parasitica* and *C. herbarum*) to intermediate (*B. cinerea*, *P. infestans*, and *F. oxysporum*) or rather low (*A. brassicicola* and *Rhizopus* sp.). One of the most active compounds was 12-Oxo-PDA. This compound is a well established plant signal molecule in wound and stress responses (Stintzi et al., 2001), but its antifungal and antioomycete activity was not previously reported. Four PUFA hydroperoxides (13-HPOT, 9-HPOT, 9-HPOD, and 13-HPOD) as well as their reduced forms (13-HOT, 9-HOT, 13-HOD, and 9-HOD) and dehydration products (notably the ketotrienes, 13-KOT and 9-KOT) were also among the most active oxylipins. In this category, 18:3-derived products seemed slightly more efficient on the strains of the intermediate class of sensitivity to oxylipins than the corresponding 18:2-derived products. Comparison of

the effects of 9-LOX-derived compounds to their 13-LOX-derived counterparts, in contrast, did not reveal any obvious relationship between positional specificity and activity.

Apart from only two oxylipins, 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxy-10(E),15(Z)-octadecadienoic acid and 11(R),12(S),13(S)-Trihydroxy-9(Z)-octadecenoic acid, it is clear that most oxylipins exhibited antimicrobial activities. Inhibitory activity was very often restricted to a small number of microbes, but 26 oxylipins out of 43 significantly reduced the in vitro growth of at least three different microbes in this study, and nine oxylipins, 9-HOT, 13-HOD, 9-KOT, 13-KOT, 12(R), 13(S)-Epoxy-9(Z)-octadecenoic acid, 12-Oxo-PDA, 13-Hydroxy-12-keto-9(Z),15(Z)-octadecadienoic acid, CLn, and ω 5(Z)-ELn, inhibited the growth of six or more different microbes. We next focused on a small number of oxylipins showing inhibitory activities against eukaryotic microbes.

Concentration Required for 50% Growth Inhibition by Selected Oxylipins

The concentration required to inhibit the in vitro mycelial growth of *B. cinerea*, *C. herbarum*, *P. infestans*, and *P. parasitica* by 50% (IC₅₀) was determined for 12-Oxo-PDA, 13-KOT, 13-HPOT, 13-HOT, 9-HPOT, and 9-HOT. A widely used antifungal molecule (benomyl) and an antioomycete compound (metalaxyl) were assayed in the same conditions against the two fungi and the two oomycetes, respectively. For oxylipins, IC₅₀ values ranged from 25 to 70 μM with *C. herbarum* and *P. parasitica* as target organisms, from 50 to 130 μM with *B. cinerea*, and were estimated to be higher than 150 μM for *P. infestans*. The IC₅₀ for metalaxyl or benomyl were about 1 to 30 μM for the same target organisms, except for metalaxyl and *P. infestans* (100 μM). This suggested that natural oxylipins were slightly less efficient than synthetic molecules at

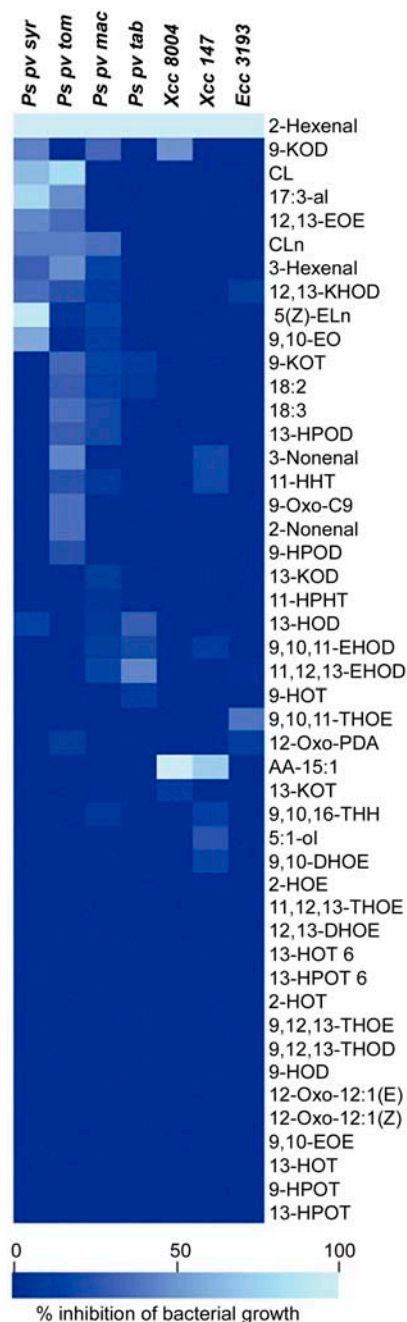


Figure 2. Antibacterial activities of oxylipins. Each test bacterial strain was exposed to each compound ($100 \mu\text{M}$) in the appropriate liquid medium, for 24 h. For all compounds reproducibly producing a significant reduction in growth of a given organism compared to the ethanol control ($P < 0.05$), inhibition of growth over 24 h was expressed as a percentage relative to the ethanol control: $100 \times (1 - [\text{growth in the presence of oxylipin}/\text{growth in control}])$. Other compounds were scored as causing 0% growth inhibition for this organism. In the diagram, color intensity is inversely proportional to inhibitory activity of the oxylipin toward the organism. Bacteria names are abbreviated as follows: *Ps pv syr*, *P. syringae pv syringae*; *Ps pv tom*, *P. syringae pv tomato*; *Ps pv mac*, *P. syringae pv maculicola*; *Ps pv tab*, *P. syringae pv tabaci*; *Xcc*, *X. campestris pv campestris*; and *Ecc*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Values represent means of at least three independent experiments, with at least three replicates in each experiment.

inhibiting fungal (or oomycete) growth. We also observed that the growth inhibition effect of these oxylipins was generally transient, with most target organisms overcoming inhibition and resuming growth after 48 to 72 h (data not shown). These observations prompted us to address the stability of the oxylipins in the assay.

Stability of Selected Oxylipins

Many oxylipins are chemically unstable and/or prone to degradation in the presence of biomolecules. Hydroperoxides, for example, are very easily decomposed by metal ions or converted into hydroxides by thiol groups or other reducing agents. Many of the keto-containing oxylipins possess an electrophilic α,β -unsaturated carbonyl partial structure that is prone to Michael addition of glutathione and other thiol-containing compounds (Vollenweider et al., 2000). Additionally, oxylipins may be metabolized by several enzymes (Schaller, 2001; Chechetkin et al., 2004) or enter the mitochondrial or peroxisomal β -oxidation helix, resulting in successive shortening of the carbon chain. To get some insight into their chemical and metabolic stability, the proportion of oxylipins remaining in the assay together with their corresponding metabolites was identified after a 24-h incubation period. Experiments carried out with *B. cinerea*, *C. herbarum*, or *P. parasitica* indicated that the oxylipins introduced were generally hardly detectable in the assay mixture after 24 h (Table III). The structures of the recovered metabolites showed that the hydroperoxides were reduced by the three microorganisms, and 9-HOT, 13-HOT, and 12-Oxo-PDA were degraded through conversion into 15,16-dihydroxylated derivatives or β -oxidation processes, in *B. cinerea* and *C. herbarum*. In contrast, the two hydroxides were recovered nearly unmodified after incubation with *P. parasitica*. CLn and 13-KOT showed low chemical stability in the absence of the fungi, and metabolites could not be detected. CLn may have suffered hydrolysis and chain cleavage into shorter-chain compounds (Galliard et al., 1974), which would have escaped detection by the method used, whereas 13-KOT may have formed Michael adducts with cellular constituents to form water-soluble derivatives (Vollenweider et al., 2000; Almeras et al., 2003). In the case of *P. infestans*, stability of 9,12,13-THOE, $\omega 5(Z)$ -ELn, and CL as well as above-mentioned compounds was assayed. Most oxylipins, including 9-HOT and 13-HOT, showed a very low chemical stability in the noninoculated growth medium of *P. infestans* (data not shown), which might partly explain their low inhibitory activity toward this oomycete as compared to *P. parasitica*. Only 12-Oxo-PDA and 9,12,13-THOE, a chemically quite stable oxylipin (Hamberg, 1991), were less degraded (44% and 83% remaining after 24 h versus 67% and 90% in medium alone, respectively). Altogether, the data suggested that the half-life of oxylipins in the presence of the target organism

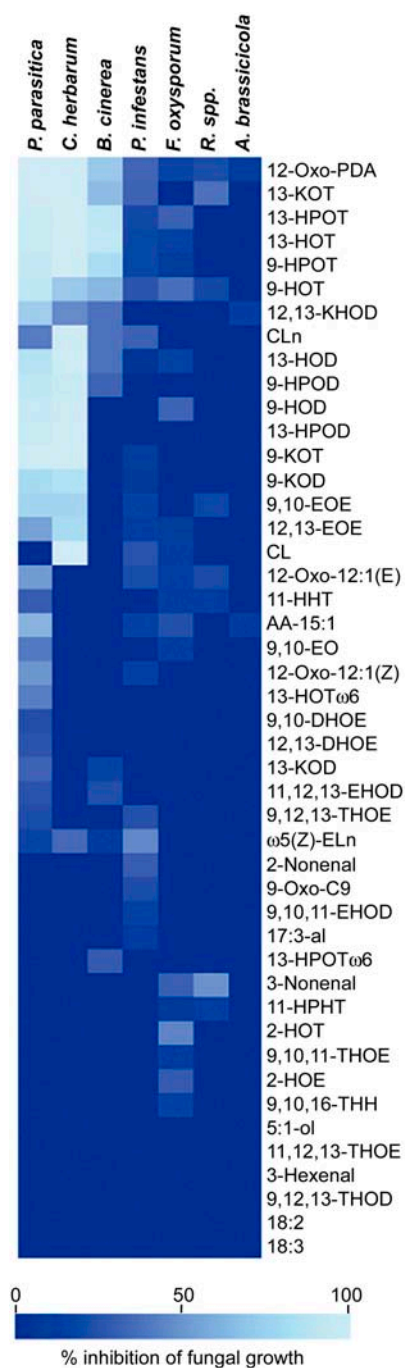


Figure 3. Antifungal and antioomycete activities of oxylipins. Each test fungal or oomycete strain was exposed to each compound (100 μ M) in the appropriate liquid medium for 24 h, starting from the time of spore addition to the wells (*F. oxysporum*, *Rhizopus* sp., and *A. brassicicola*) or 16 h later (*P. parasitica*, *C. herbarum*, *B. cinerea*, and *P. infestans*). For all compounds reproducibly producing a significant reduction in growth of a given organism compared to the ethanol control ($P < 0.05$), inhibition of growth over 24 h was expressed as a percentage relative to the ethanol control: $100 \times (1 - [\text{growth in the presence of oxylipin} / \text{growth in control}])$. Other compounds were scored as causing 0% growth inhibition for this organism. In the diagram, color intensity is inversely proportional to inhibitory activity of the oxylipin toward the organism. The names of tested organisms are abbreviated as follows: *P. parasitica*, *Phytophthora parasitica nicotiana*; *C. herbarum*, *Clado-*

might be quite short. Early degradation might therefore explain why many oxylipins were found to reproducibly but only partially affect the growth of the target microorganisms. In spite of this, the selected oxylipins still displayed significant growth-inhibiting activity toward actively growing mycelium of several target organisms.

Effects on Spore Germination

A microscopic visualization approach was used to investigate the effects of oxylipins on spore germination, an important developmental stage in the life cycle of fungi and oomycetes. Interestingly, this method allowed evaluation of oxylipin activity after shorter time exposure. Oxylipins were added (100 μ M final concentration) to freshly prepared spores of *P. parasitica*, *P. infestans*, or *B. cinerea*. The percentage of germinated spores was calculated at optimized time points following treatment, for each organism, and compared to the percentage of germination in controls mock treated with the ethanol carrier (1%) alone or untreated (Fig. 4). Except for CL, the compounds tested highly impaired spore germination of oomycetes such as *P. parasitica* and *P. infestans*, with a maximum of 5% residual spore germination. *B. cinerea* spore germination was also efficiently inhibited by five oxylipins. 12-Oxo-PDA was again the most active oxylipin. It is also noteworthy that some oxylipins that produced the highest levels of inhibition at these early time points, durably inhibited spore germination with no further germination being observed during the next 3 to 4 d (data not shown).

DISCUSSION

Based on the previous, limited knowledge of the biological activities of oxylipins, a large-scale study of direct effects of these compounds on plant pathogens was designed to examine the distribution of antimicrobial activities within the biosynthetic pathway and the spectrum of potential target organisms. Our results reveal that growth-inhibiting activity is unexpectedly widespread among oxylipins. The sensitivity of different pathogens to a given compound may vary greatly, even among closely related strains. The fact that antimicrobial oxylipins were found in all branches of the oxylipin pathway indicated that the production of antimicrobial compounds is not separated from the production of plant signals. Indeed, some of the most active oxylipins against eukaryotic microorganisms in this study, 13-HOT, 13-KOT, 12-Oxo-PDA, as well as

sporium herbarum; *B. cinerea*, *Botrytis cinerea*; *P. infestans*, *Phytophthora infestans*; *F. oxysporum*, *Fusarium oxysporum*; *R. spp.*, *Rhizopus* species; and *A. brassicicola*, *Alternaria brassicicola*. Values represent means of at least three independent experiments, with at least three replicates in each experiment.

Table III. Stability of oxylipins in the presence of eukaryotic microbes and structures of main metabolites

Oxylipins (100 μM) were incubated with suspensions of spores of *B. cinerea*, *C. herbarum*, or *P. parasitica*, or with growth medium alone, at 25°C. Samples were removed at 0 h and 24 h, were added to ethanol, and 14(S)-Hydroxy-10(Z),12(E),16(Z)-nonadecatrienoic acid (3 μg) was added as an internal standard. Levels of oxylipins and structures of metabolites were determined by GC-MS as described in the text. N.D., Not detectable.

Oxylipin	Fungus	Stability ^a	Major Metabolite
		%	
13-HPOT	<i>B. cinerea</i>	N.D.	13,15,16-Trihydroxy-9,11-octadecadienoic acid
	<i>C. herbarum</i>	N.D.	13-HOT
	<i>P. parasitica</i>	N.D.	13-HOT
	Medium	N.D.	
9-HPOT	<i>B. cinerea</i>	N.D.	9,15,16-Trihydroxy-10,12-octadecadienoic acid
	<i>C. herbarum</i>	N.D.	9-HOT
	<i>P. parasitica</i>	N.D.	9-HOT
	Medium	N.D.	
13-HOT	<i>B. cinerea</i>	0	13,15,16-Trihydroxy-9,11-octadecadienoic acid
	<i>C. herbarum</i>	5	3,13-Dihydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid
	<i>P. parasitica</i>	80	–
	Medium	100	
9-HOT	<i>B. cinerea</i>	0	9,15,16-Trihydroxy-10,12-octadecadienoic acid
	<i>C. herbarum</i>	3	9,15,16-Trihydroxy-10,12-octadecadienoic acid
	<i>P. parasitica</i>	65	–
	Medium	78	
12-Oxo-PDA	<i>B. cinerea</i>	1	2,3,4,5-Tetranor-10,11-dihydro-12-oxo-PDA
	<i>C. herbarum</i>	32	3-Hydroxy-12-Oxo-PDA
	<i>P. parasitica</i>	36	–
	Medium	60	
CLn	<i>B. cinerea</i>	1	–
	<i>C. herbarum</i>	10	–
	<i>P. parasitica</i>	4	–
	Medium	23	
13-KOT	<i>B. cinerea</i>	1	–
	<i>C. herbarum</i>	1	–
	<i>P. parasitica</i>	13	–
	Medium	38	

^aLevel of oxylipin extracted after 24 h relative to oxylipin extracted in 0 h samples.

fatty acid hydroperoxides, were previously identified as signaling molecules and/or cell death inducers in plants. Thus, according to our results, signaling and antimicrobial activities do not define distinct categories of oxylipins.

The mechanisms underlying the antimicrobial activity of oxylipins in vitro, as well as their precise contribution to plant defense in planta, remain to be elucidated. The growth-inhibiting activity of oxylipins, as measured on bacterial or fungal cell populations in liquid medium, was apparently transient, suggesting that these compounds did not affect cell viability and only delayed growth. However, a more drastic, lethal effect is not ruled out since such effect would not necessarily have been detected in the microspectrophotometric assay that was used. After 24 h of treatment, the level of remaining oxylipin is generally low as shown in this work, and a low amount of surviving cells would be sufficient to resume growth after 72 h (data not shown). Moreover, in spore germination assays, long-lasting inhibition of germination was observed, suggesting that oxylipin treatment might result in spore death in some cases.

The effects of selected oxylipins on cell viability and growth rates will have to be investigated by dedicated methods.

Regarding the mechanism of action of oxylipins, the rather high IC_{50} measured for selected active oxylipins suggests that growth inhibition might be due to chemical or physical properties of these metabolites rather than to interaction with specific cellular targets. In this respect, the high chemical reactivity of some oxylipins, notably hydroperoxides, is reminiscent of what is observed with hydrogen peroxide, which acts as a plant signal at low concentrations and, at higher doses, is toxic to plants and other cells (Apel and Hirt, 2004) due to its chemical reactivity. However, not all oxylipins bearing a hydroperoxide function caused growth inhibition in our assay. Likewise, it was recently proposed that several bioactive oxylipins, including 12-Oxo-PDA and 13-KOT, might induce plant cell damage and defense gene expression through a mechanism based on their electrophilic nature (Farmer et al., 2003). The effect of these oxylipins on fungi and oomycetes might be based on such reactivity. Consistent with this, 12-Oxo-PDA scored among the most

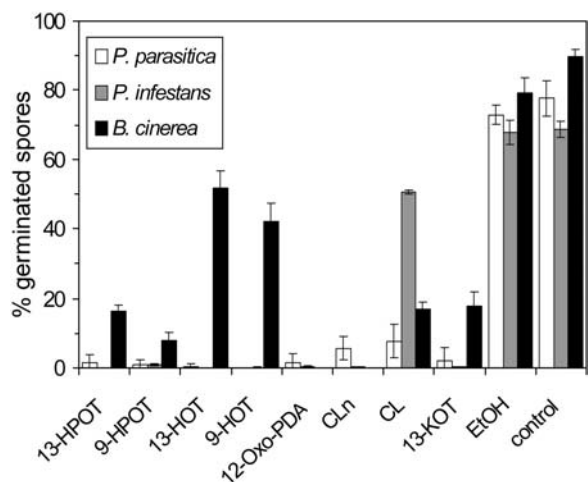


Figure 4. Effect of selected oxylipins on spore germination of oomycetes and fungi. Freshly prepared spores of *P. parasitica*, *P. infestans*, or *B. cinerea* ($5 \cdot 10^4$ spores/mL) were exposed to each selected oxylipin (100 μ M) and assessed for germination status after 5 h (*P. infestans*), 6 h (*P. parasitica*), or 8 h (*B. cinerea*). Each oxylipin was tested in at least three replicates, in each experiment. Each bar represents mean of three independent experiments \pm sd.

active compounds against eukaryotic filamentous microbes, while JA, which derives from 12-Oxo-PDA and shares several structural features except the α,β -unsaturated carbonyl group, did not affect the mycelial growth of *P. parasitica*, *C. herbarum*, and *B. cinerea* in the same conditions (data not shown). Again, not all electrophilic oxylipins were able to cause growth inhibition to a given organism. Overall, our data did not reveal strong relationships between oxylipin chemical structure and pattern of activity.

Besides their chemical reactivity, fatty acid derivatives are likely to interact with biological membranes. It was recently proposed that *cis*-9-heptadecenoic acid, an antifungal fatty acid, might insert into the hydrophobic layer of fungal membranes, thereby disrupting membrane properties and possibly causing cell collapse (Avis and Bélanger, 2001). Although the hydrophobicity of some oxylipins should be reduced as compared to fatty acids (by the presence of polar oxygenated substituents), hence decreasing their ability to insert into membranes, they might still cause detergent-like disruption of fungal membranes. The effects of selected oxylipins on membrane permeability should be investigated in the future.

The damaging effect of some plant oxylipins on fungi and oomycetes might also result from more specific molecular interactions. Indeed, evidence is accumulating that, as other eukaryotes, fungi and oomycetes produce eicosanoids and/or oxylipins that are involved in the regulation of growth, development, and life cycle (Kock et al., 2003; Noverr et al., 2003; Tsitsigiannis et al., 2004). Whether plant oxylipins interfere with microbial metabolism or signaling by competing with structurally related endogenous

lipids should be investigated. Understanding the mechanism of action of oxylipins requires additional studies on specificity and structure-activity relationships, focused on selected compounds such as 12-Oxo-PDA.

Obviously, the mechanism of action might differ depending on the considered microorganism, as suggested by this work that shows rather unexpectedly that plant pathogens display greatly varying levels of sensitivity, ranging from highly sensitive to a large number of oxylipins to mostly unaffected by these compounds. This might result from varying abilities to metabolize oxylipins as pointed out by the stability assays performed on selected oxylipins. Alternatively, these pathogens might also differ greatly in either the uptake of oxylipins from the aqueous culture broth, features of potential targets such as their membrane composition, or their eicosanoid/oxylipin metabolism.

Beyond addressing the direct effect of oxylipins on pathogens *in vitro*, a crucial point will be to investigate whether growth inhibition is likely to take place in planta during pathogen attack. Open questions concern the local concentration of oxylipins at infection sites and the likelihood that pathogens become in contact with these compounds. The amount of oxylipins in pathogen-challenged plant tissues was investigated in recent years at the organ level through oxylipin profiling/signature methods. In potato, the amount of individual oxylipins reached up to 200 nmol per gram of inoculated leaf tissue during the first 24 h (Göbel et al., 2002) and in tobacco leaves, levels up to 500 nmol per gram were observed (Hamberg et al., 2003). One might expect even higher concentrations at or near infection sites since oxylipins are probably not evenly distributed in inoculated leaves. Additive inhibitory effects might be expected in planta where pathogens have to face the various oxylipins that are produced simultaneously. Regarding cellular location, the production of oxylipins is considered to be compartmentalized, with biosynthetic enzymes occurring in plastids, peroxisomes, cytosol, and possibly other compartments (Feussner and Wasternack, 2002). It will be particularly important to localize the accumulation of oxylipins at the subcellular level, during pathogen attack. For instance, are they released into apoplastic spaces during attack by biotrophic pathogens?

In conclusion, as a heterogeneous group, oxylipins have widespread antimicrobial activities, with often a marked and limited range of specificities. Our data show that several oxylipins previously identified as plant signaling molecules or cell death inducers also efficiently affect the growth of eukaryotic microbes, indicating that these biological activities might be somehow related. Although little is known about oxylipin production and their physiological role in filamentous plant pathogens, a complex interplay of bioactive oxylipins produced both by the host and the microbe could take place at the plant-eukaryotic microbe interface.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material and Growth Conditions

The plant pathogens used in this work are listed in Table II. The bacterial strains were *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (NCPB2686), *P. syringae* pv *tabaci* (NCPB1427), *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Whalen et al., 1991), *P. syringae* pv *maculicola* (NCPB 1820), *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 8004, *X. campestris* pv *campestris* 147 (Lummerzheim et al., 1993), and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC3193 (Vidal et al., 1997). The fungal strains were *Cladosporium herbarum* (Pers.:Fr.) Link, *Botrytis cinerea* (strain MUCL30158), *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Rhizopus* strain unspecified, and *Alternaria brassicicola* (strain MUCL20297; Thomma et al., 1999), kindly provided by B. Mauch-Mani, University of Neuchâtel, Switzerland. The oomycete strains were *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker race1 (Apple's isolate 1452; Hendrix and Apple, 1967) and *Phytophthora infestans* strain CRA 208 transformed with a green fluorescent protein gene under the control of the Ham promoter (Si-Ammour et al., 2003), kindly provided by Dr Felix Mauch, University of Fribourg, Switzerland. Cultures of *A. brassicicola*, *F. oxysporum*, *Rhizopus* sp., and *B. cinerea* were maintained on potato (*Solanum tuberosum*) dextrose agar (39 g/L, Oxoid) and subcultured on a weekly basis. *P. parasitica* and *C. herbarum* were grown at 24°C on V8 agar medium (50 mL of V8 juice and 20 g agar per liter, pH 5.0) and subcultured every 14 d. *P. infestans* was maintained on oat bean agar and subcultured every 11 d. *A. brassicicola*, *F. oxysporum*, and *Rhizopus* sp. spores were harvested in potato dextrose broth (4.8 g/L, DIFCO) and diluted to a concentration of $1 \text{ to } 2 \times 10^5$ spores/mL and used immediately. For *C. herbarum* conidia production, actively growing mycelium was suspended in sterile distilled water and spread onto a fresh V8 agar plate. After 5 d at 24°C in the dark, a spore suspension was collected by gently scrapping the spores into sterile distilled water. Spore suspension was filtered through a 60 µm scrynell membrane and concentration was adjusted to 4×10^4 spores/mL with water. *B. cinerea* spore suspension was obtained in a similar way, after growing mycelium for 3 to 4 weeks on potato dextrose agar medium (24 g/L, Sigma) with a photoperiod of 12 h to induce sporulation. Concentration was adjusted to 10^5 spores/mL. *P. parasitica* zoospore production was initiated by starvation of 7-d-old mycelium on 1.5% agar plates and zoospores were released in sterile water by cold shock, at 4°C for 30 min, according to Gooding and Lucas (Gooding and Lucas, 1959). The zoospore suspension was collected and density adjusted to 4×10^4 or 10^5 zoospores/mL with sterile distilled water. Similarly, *P. infestans* zoospores were collected in sterile distilled water, after 3 h at 4°C, and spore density was adjusted to 5×10^5 zoospores/mL.

Antimicrobial Tests

In vitro antimicrobial activities of oxylipins were evaluated in a microspectrophotometric assay, according to Broekaert et al. (1990). Microorganisms were grown in sterile, flat-bottom, 96-well microplates, sealed with Parafilm, in a final volume of 100 µL. Bacteria were grown at 28°C starting with approximately 2,000 bacteria per well. *Pseudomonas* strains were grown in King's medium (2% proteose peptone, 2% glycerol, 6.5 mM K_2HPO_4 , and 6 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), *Erwinia* in LPG medium (0.3% yeast [*Saccharomyces cerevisiae*] extract, 0.5% Bacto-peptone, and 0.5% Glc), and *Xanthomonas* in Kado medium (1% yeast extract, 0.8% casamino acids, 1% saccharose, 6.5 mM K_2HPO_4 , and 6 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Fungi and oomycetes were grown in the dark at 25°C, except for *P. infestans*, which was grown at 18°C. *A. brassicicola*, *F. oxysporum*, and *Rhizopus* sp. were grown in potato dextrose broth (4.8 g/L, DIFCO) in an orbital shaker. *B. cinerea*, *C. herbarum*, and *P. parasitica* were grown in clarified V8 juice broth (5% V8 juice in water, pH 5.0, centrifuged three times at 3,000 rpm, for 20 min) without shaking. *P. infestans* was grown in water, onto solid oat bean medium (100 µL each by well), without shaking. Cultures were started with 2,000 spores (*C. herbarum* and *P. parasitica*) or 5,000 spores (*B. cinerea*, *A. brassicicola*, *F. oxysporum*, *Rhizopus* sp., and *P. infestans*). Fatty acids, oxylipins, AA-15:1, metalaxyl (methyl *N*-methoxyacetyl-*N*-2,6-xylyl-DL-alaninate, Riedel-deHaën) and benomyl [methyl 1-(butylcarbamoyl)benzimidazol-2-ylcarbamate, Riedel-deHaën] were dissolved in ethanol. Each treatment was performed in three to eight replicates in the same plate, and experiments were repeated three or four times independently. Ethanol concentration was kept to a maximum of 1% final concentration in each well; controls were treated with 1% ethanol.

Except for *P. infestans*, growth was monitored by measuring the absorbance of the microcultures at 595 nm with a microplate reader (Bio-Rad or DYNEX Technologies), at 0 h and after 24 to 72 h of incubation in the presence or

absence of compounds to be tested. Growth of *P. infestans* transformed with green fluorescent protein was determined by measuring fluorescence emission at 530 nm after excitation at 485 nm, with a CytoFluor II fluorescence reader (BioSearch, Millipore). For *C. herbarum*, *B. cinerea*, *P. parasitica*, and *P. infestans*, oxylipins were added after 16 h of growth and A_{595} (or fluorescence) measured at 16 h and after a further 24 to 72 h period. At least three wells were used in each experiment and the experiments repeated at least three times independently. Analysis of variance of antimicrobial test results was performed on final absorbance (or fluorescence) values within experiments. The test compounds were tested against different organisms in groups of up to 12 compounds, with all compounds being tested on each of a number of replicate plates alongside control treatments. As a result, individual plates were treated as replicates and the effect of different compounds on the growth of individual organisms was analyzed for small groups of compounds and compared to the values gained for control treatments in that group of plates only. Therefore, the different analyses of variance do not provide comparisons of the effectiveness of one compound against another, but do provide a measure of the impact of individual compounds against the control treatment (1% ethanol) in that experiment.

Growth inhibition for each compound and each target organism was calculated using the following expression:

$$100 \times [1 - (\Delta\text{OD}_{595\text{nm}, 0-24\text{h}} \text{ in oxylipin} / \Delta\text{OD}_{595\text{nm}, 0-24\text{h}} \text{ in control})].$$

In the experiments involving *P. infestans*, fluorescence was used instead of absorbance. Results were organized and visualized using the Hierarchical Clustering Explorer software (version 2.0 beta; Human-Computer Interaction Lab, University of Maryland [http://www.cs.umd.edu/hcil/hce/]; Seo and Shneiderman, 2002).

Spore Germination Assay

Spore germination in the presence of oxylipins was assessed in 96-well microplates, in clarified V8 juice broth (*P. parasitica* and *B. cinerea*) or water (*P. infestans*). Oxylipins in ethanol were added in each well to a final concentration of 100 µM (1% ethanol final concentration) together with 5,000 spores or zoospores, in triplicate, in a total volume of 100 µL, and the plates incubated for a few hours. For each target organism, time points for spore status assessment were optimized for high number of germinated spores in the controls together with short germ tubes (average length of germ tubes not higher than 8- to 10-fold the spore diameter) for better visualization of each germling. The plates were observed in an inverted microscope (DMIRBB, Leitz or Leitz DM IL, Leica), and for each well two to four nonoverlapping pictures (magnification: 100×) were acquired with a charge-coupled device camera (Color Coolview, Photonic Sciences or Nikon D1x) and 100 to 200 spores or zoospores subsequently assessed for germination status. Spores with germ tubes as long or longer than the spore were counted as being germinated.

Oxylipins

The oxylipins used in this study are listed in Table I and Figure 1. Many of them were prepared from the hydroperoxides 9(S)-HPOD, 13(S)-HPOD, 9(S)-HPOT, or 13(S)-HPOT, which were in turn prepared by incubation of 18:2 or 18:3 (Nu-Chek-Prep) with LOX from tomato (*Lycopersicon esculentum*) or soybean (*Glycine max*; Gardner, 1996; Lie and Pasha, 1998). Secondary enzymes used for transformations of hydroperoxides into other oxylipins included allene oxide synthase (Hamberg, 1987; Baertschi et al., 1988), allene oxide cyclase (Hamberg and Fahlstadius, 1990), and divinyl ether synthase (Galliardi and Phillips, 1972; Hamberg, 1998; Supplemental Fig. 1). Peroxygenase (Blée and Schuber, 1990; Hamberg and Hamberg, 1990) and epoxide hydrolase (Hamberg and Hamberg, 1996) can be used for the preparation of various epoxy alcohols and trihydroxy oxylipins, however, chemical epoxidation and hydrolysis methods (Hamberg, 1991) are generally more convenient to use in these cases. α -DOX derivatives were produced as previously described (Hamberg et al., 1999). A number of oxylipins, e.g. monoepoxy fatty acids, were isolated as natural products from various seeds (Gunstone et al., 1994), and another group including short-chain aldehydes was prepared from commercially available starting materials using chemical methods. 2-Hexenal and 1-penten-3-ol were purchased from Sigma-Aldrich. 6-[8(Z)-Pentadecenyl] salicylic acid (AA-15:1), a nonoxylipin belonging to the anacardic acid family of antibacterial compounds (Kubo et al., 2003), was isolated from cashew nut shell liquid (Paramashivappa et al., 2001). Final purification of each

compound was in most cases carried out by straight-phase HPLC using 2-propanol/hexane-based solvent systems. The structures of the compounds obtained, as well as the stereochemical fidelity and purity in case of optically active compounds, were determined by chemical and physical methods as described either in the references given in Table I or in other studies cited by these references. The purity of each compound was in excess of 97% as determined by straight phase-HPLC and/or gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Most of the compounds used have recently become commercially available through Larodan Fine Chemicals and/or Cayman Chemical or Biomol.

Estimation of the Stability of Oxylipins

Oxylipins (13-HPOT, 9-HPOT, 13-HOT, 9-HOT, 12-Oxo-PDA, 13-KOT, and CLn, 100 μM each) were added to cultures of *P. parasitica*, *C. herbarum*, or *B. cinerea* in liquid growth medium, or to medium alone, and kept at 25°C. Aliquots were removed at 0 and 24 h and added to ethanol. 14(S)-Hydroxy-10(Z),12(E),16(Z)-nonadecatrienoic acid (3 μg) was added as an internal standard and the mixtures extracted with diethyl ether. The material obtained was derivatized by treatment with diazomethane followed by trimethylchlorosilane/hexamethyldisilazane/pyridine and analyzed by GC-MS using a Hewlett-Packard model 5970B mass-selective detector connected to a Hewlett-Packard model 5890 gas chromatograph. A capillary column of 5% phenylmethylsiloxane (12 m, 0.33 μm film thickness) was used with helium as the carrier gas. The column temperature was raised at 10°C/min from 120°C to 260°C. The derivatized samples were analyzed first in the scan mode to characterize metabolites or degradation products formed from the various oxylipins. A second analysis performed in the selected ion monitoring mode was used to determine the levels of oxylipins present in the 24 h samples relative to those in the 0 h samples. The following mass spectral ions were used in these analyses: mass-to-charge ratio (m/z) 325 (internal standard; M^+ , $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-C}_2\text{H}_5$), 311 (13-HOT; M^+ , $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-C}_2\text{H}_5$), 225 [9-HOT; $\text{Me}_3\text{SiO}^+=\text{CH}-(\text{CH}=\text{CH})_2\text{-C}_5\text{H}_{11}$], 238 (12-Oxo-PDA; M^+ , [$\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-C}_2\text{H}_5$ minus H]), 306 (CLn; M^+), and 237 (13-KOT; M^+ , $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-C}_2\text{H}_5$). The percentage level of oxylipin remaining at 24 h relative to the level at 0 h was calculated using the following expression:

$$\%_{24\text{ h}} = 100 \times (\text{intensity of ion/intensity of } m/z\ 325)_{24\text{ h}} / (\text{intensity of ion/intensity of } m/z\ 325)_{0\text{ h}}$$

In a second series, selected oxylipins were added to cultures of *P. infestans* grown in water on solid medium, or to water on solid medium alone, and samples obtained at 0 and 24 h were treated as described above. The oxylipins used in this case included the above-mentioned ones as well as 9,12,13-THOE (m/z 173), ω 5(Z)-ELn (m/z 306), and CL (m/z 308).

Estimation of the stability of the hydroperoxides 13-HPOT and 9-HPOT could not be performed using the method described due to their thermal instability, which precluded analysis by GC-MS; however, a number of stable metabolites formed from them could be identified.

Received May 27, 2005; revised September 26, 2005; accepted October 4, 2005; published November 18, 2005.

LITERATURE CITED

- Almeras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, Mène-Saffrané L, Farmer EE (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* **34**: 205–216
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399
- Avis TJ, Bélanger RR (2001) Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudomyces flocculosus*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 956–960
- Baertschi SW, Ingram CD, Harris TM, Brash AR (1988) Absolute configuration of *cis*-12-oxophytodienoic acid of flaxseed: implications for the mechanism of biosynthesis from the 13(S)-hydroperoxide of linolenic acid. *Biochemistry* **27**: 18–24
- Bate NJ, Rothstein SJ (1998) C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J* **16**: 561–569
- Blée E (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**: 33–72
- Blée E (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315–322
- Blée E, Schubert F (1990) Efficient epoxidation of unsaturated fatty acids by a hydroperoxide-dependent oxygenase. *J Biol Chem* **265**: 12887–12894
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol Lett* **69**: 55–59
- Chechetkin IR, Medvedeva NV, Grechkin AN (2004) The novel pathway for ketodiene oxylipin biosynthesis in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers. *Biochim Biophys Acta* **1686**: 7–14
- Croft K, Juttner F, Slusarenko AJ (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* **101**: 13–24
- Dietz KJ, Horling F, König J, Baier M (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxidase in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot* **53**: 1321–1329
- Farmer EE, Almeras E, Krishnamurthy V (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 372–378
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275–297
- Galliard T, Phillips DR (1972) The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona-1',3'-dienoxy)non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers. *Biochem J* **129**: 743–753
- Galliard T, Wardale DA, Matthew JA (1974) The enzymic and non-enzymic degradation of colneleic acid, an unsaturated fatty acid ether intermediate in the lipoxygenase pathway of linoleic acid oxidation in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Biochem J* **138**: 23–31
- Gardner HW (1996) Lipoxygenase as a versatile biocatalyst. *J Am Oil Chem Soc* **73**: 1347–1357
- Göbel C, Feussner I, Hamberg M, Rosahl S (2002) Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim Biophys Acta* **1584**: 55–64
- Göbel C, Feussner I, Schmidt A, Scheel D, Sanchez-Serrano J, Hamberg M, Rosahl S (2001) Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* **276**: 6267–6273
- Gooding GV, Lucas GB (1959) Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* **49**: 277–281
- Graner G, Hamberg M, Meijer J (2003) Screening of oxylipins for control of oilseed rape (*Brassica napus*) fungal pathogens. *Phytochemistry* **63**: 89–95
- Grechkin AN (2002) Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 457–470
- Grechkin AN, Hamberg M (2004) The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochim Biophys Acta* **1636**: 47–58
- Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB (1994) *The Lipid Handbook*, Ed 2. Chapman & Hall, London
- Hamberg M (1987) Mechanism of corn hydroperoxide isomerase: detection of 12,13(S)-oxido-9(Z),11-octadecadienoic acid. *Biochim Biophys Acta* **920**: 76–84
- Hamberg M (1991) Regio- and stereochemical analysis of trihydroxyoctadecenoic acids derived from linoleic acid 9- and 13-hydroperoxides. *Lipids* **26**: 407–415
- Hamberg M (1998) A pathway for biosynthesis of divinyl ether fatty acids in green leaves. *Lipids* **33**: 1061–1071
- Hamberg M (1999) An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. *Lipids* **34**: 1131–1142
- Hamberg M, Fahlstadius P (1990) Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Arch Biochem Biophys* **276**: 518–526
- Hamberg M, Hamberg G (1990) Hydroperoxide-dependent epoxidation of unsaturated fatty acids in the broad bean (*Vicia faba* L.). *Arch Biochem Biophys* **283**: 409–416
- Hamberg M, Hamberg G (1996) Peroxygenase-catalyzed fatty acid epoxidation in cereal seeds: sequential oxidation of linoleic acid into 9(S),12(S),13(S)-trihydroxy-10(E)-octadecenoic acid. *Plant Physiol* **110**: 807–815
- Hamberg M, Sanz A, Castresana C (1999) α -Oxidation of fatty acids in higher plants: identification of a pathogen-inducible oxygenase (PIOX)

- as an α -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**: 24503–24513
- Hamberg M, Sanz A, Rodriguez MJ, Calvo AP, Castresana C** (2003) Activation of the fatty acid α -dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves: formation of oxylipins protecting against cell death. *J Biol Chem* **278**: 51796–51805
- Hendrix JW, Apple JL** (1967) Stem resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in tobacco derived from *Nicotiana longiflora* and *Nicotiana plumbaginifolia*. *Tob Sci* **11**: 148–150
- Howe GA, Schillmiller AL** (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 230–236
- Knight VI, Wang H, Lincoln JE, Lulai EC, Gilchrist DG, Bostock RM** (2001) Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiol Mol Plant Pathol* **59**: 277–286
- Kock JLE, Strauss CJ, Pohl CH, Nigam S** (2003) The distribution of 3-hydroxy oxylipins in fungi. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **71**: 85–96
- Kubo I, Nihei KI, Tsujimoto K** (2003) Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Agric Food Chem* **51**: 7624–7628
- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T** (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* **198**: 267–284
- Lie MSFLK, Pasha K** (1998) Fatty acids, fatty acid analogues and their derivatives. *Nat Prod Rep* **15**: 607–629
- Lummerzheim M, de Oliveira D, Castresana C, Miguens FC, Louzada E, Roby D, van Montagu M, Timmerman B** (1993) Identification of compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and characterization of the hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 532–544
- Mène-Saffrané L, Esquerré-Tugayé MT, Fournier J** (2003) Constitutive expression of an inducible lipoxygenase in transgenic tobacco decreases susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Mol Breed* **12**: 271–282
- Noverr MC, Erb-Downward JR, Huffnagle GB** (2003) Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev* **16**: 517–533
- Paramashivappa R, Kumar PP, Vithayathil PJ, Rao AS** (2001) Novel method for isolation of major phenolic compounds from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. *J Agric Food Chem* **49**: 2548–2551
- Ponce de Leon I, Sanz A, Hamberg M, Castresana C** (2002) Involvement of the *Arabidopsis* α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J* **29**: 61–72
- Rancé I, Fournier J, Esquerré-Tugayé MT** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6554–6559
- Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, et al** (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**: 36446–36455
- Schaller F** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J Exp Bot* **52**: 11–23
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4788–4793
- Seo J, Shneiderman B** (2002) Interactively exploring hierarchical clustering results. *IEEE Computer* **35**: 80–86
- Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Mauch F** (2003) Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -Aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection. *Mol Plant Pathol* **4**: 237–248
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12837–12842
- Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **19**: 163–171
- Tijet N, Brash AR** (2002) Allene oxide synthases and allene oxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 423–431
- Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP** (2004) Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1398–1411
- Vancanneyt G, Sanz C, Farmaki T, Paneque M, Ortego F, Castanera P, Sanchez-Serrano JJ** (2001) Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8139–8144
- Vick BA, Zimmerman DC** (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **111**: 470–477
- Vidal S, Ponce de Leon I, Denecke J, Palva ET** (1997) Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. *Plant J* **11**: 115–123
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chetelat A, Farmer EE** (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **24**: 467–476
- Weber H, Chetelat A, Caldelari D, Farmer EE** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**: 485–494
- Weichert H, Stenzel I, Berndt E, Wasternack C, Feussner I** (1999) Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves—preferential induction of the reductase pathway by salicylate(1). *FEBS Lett* **464**: 133–137
- Whalen MC, Innes RW, Bent AE, Staskawicz BJ** (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* **3**: 49–59

Emerging Complexity in Reactive Oxygen Species Production and Signaling during the Response of Plants to Pathogens¹

Tamara Vellosillo, Jorge Vicente, Satish Kulasekaran, Mats Hamberg, and Carmen Castresana*

Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, E-28049 Madrid, Spain (T.V., J.V., S.K., C.C.); and Department of Medical Biophysics, Division of Physiological Chemistry II, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden (M.H.)

Plants have evolved a complex immune system to perceive microbial pathogens and respond by producing defense compounds preventing infection. Defense hormones such as salicylic acid (SA), jasmonates, and ethylene are key signals regulating the production of antimicrobial defenses. Moreover, other hormone pathways have critical actions by controlling responses to pathogen attack such as distribution of resources, cell death, water stress, or plant architecture. A fine-tuning regulation of these pathways through complex regulatory networks is necessary to achieve resistance against different pathogen classes (López et al., 2008; Grant and Jones, 2009).

Plants activate two forms of immunity by recognition of distinct pathogen molecules. A first and rapid response, known as basal resistance (microbe-associated molecular pattern-triggered immunity or MTI), is triggered after recognition of conserved microbial molecules (microbe-associated molecular patterns) by extracellular plant receptors (pattern recognition receptors; Boller and Felix, 2009). Second, effector-triggered immunity (ETI) is activated by resistance (*R*)-gene products (largely inside the cell) after recognition of specific effectors molecules (delivered into the plant cell by pathogens) and is commonly accompanied by a hypersensitive reaction (HR) involving localized host cell death at the point of infection (Jones and Dangl, 2006).

Oxidative burst involving production of reactive oxygen species (ROS) is a nearly ubiquitous response of plants to pathogen attack and has a key role in both MTI and ETI signaling (Torres et al., 2006). ROS activation is likely a primary consequence of the damage produced during the course of infection. However, whereas overaccumulation of ROS might enhance plant susceptibility (Govrin and Levine, 2000; Kariola et al., 2005) or cause an uncontrolled defense with spreading cell death lesions that can kill the plant (Lorrain et al., 2003; Moeder and Yoshioka, 2008), a tight regulation over ROS production and elimination through enzymatic and nonenzymatic antioxidants has allowed

plants to use these reactive compounds as a critical feature of MTI and ETI (Torres et al., 2006). Reported defense responses associated with the production of ROS include direct killing of pathogens, activation of host cell death (HR), and contribution to cell wall strengthening (Bolwell and Daudi, 2009). Moreover, emerging data highlight the role of ROS as signals in MTI and ETI (Torres et al., 2006; Van Breusegem et al., 2008) as well as their contribution to provide an appropriate redox environment needed to activate defense (Tada et al., 2008). The importance of ROS in plant defense will be discussed here with a focus on the production of distinct types of ROS and on the cellular compartments involved in their production.

ESTABLISHED ROLE FOR SUPEROXIDE IONS AND HYDROGEN PEROXIDE IN RESPONSE TO PATHOGEN ATTACK

Two distinct reactions can convert ground state oxygen into different types of ROS during an oxidative burst (Fig. 1). Thus, dioxygen can be stepwise reduced by electron transfer to superoxide ion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and the later can produce the hydroxyl radical (OH^\bullet). Alternatively, dioxygen can be converted by energy transfer to singlet oxygen (1O_2), a highly reactive short-lived product (half-life, approximately 200 ns) with a strong oxidizing potential (Apel and Hirt, 2004). Production of ROS occurs at different cellular locations in response to distinct environmental cues, and both the scavenging mechanisms and signaling events triggered by O_2^- , H_2O_2 , and 1O_2 have been investigated (op den Camp et al., 2003; Mittler et al., 2004; Gadjev et al., 2006). Results from transcriptomic analyses define common and specific responses toward different types of ROS as well as cross talk between distinct ROS signaling pathways, pointing to a complex scenario in which a fine regulation is critical for plant survival (op den Camp et al., 2003; Gadjev et al., 2006; Laloi et al., 2007).

Research examining the role of ROS in plant defense has been focused on the actions of O_2^- and H_2O_2 , whereas other ROS such as OH^\bullet and 1O_2 have been far less examined (Apel and Hirt, 2004). Different

¹ This work was supported by the Ministry of Science and Innovation (grant no. BIO2009-09670 to C.C.).

* Corresponding author; e-mail ccastresana@cnb.csic.es.
www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.161273

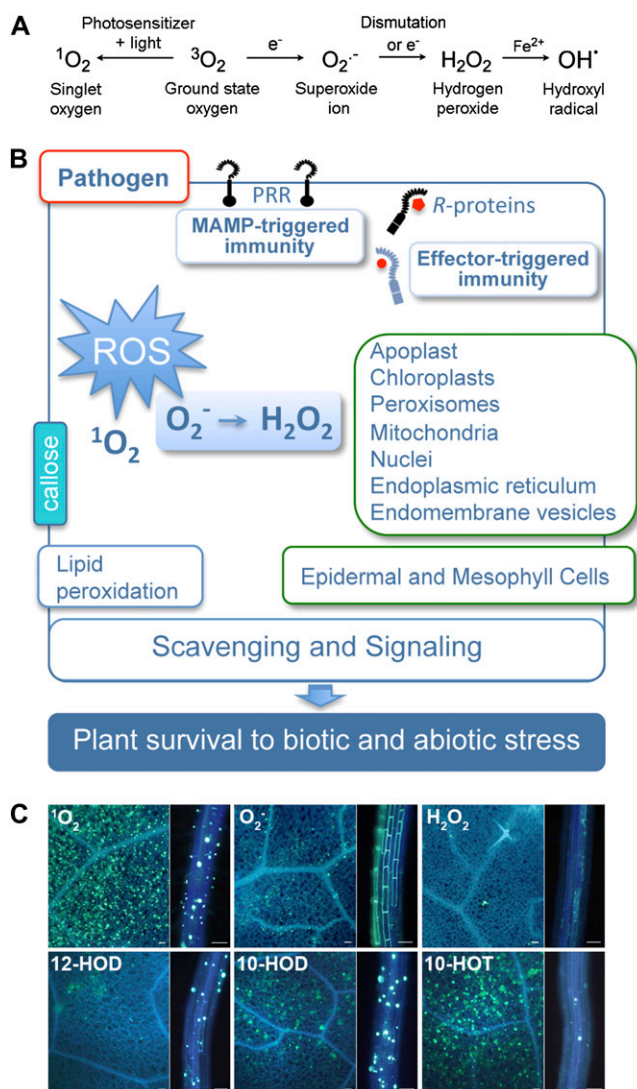


Figure 1. Production of ROS in plant defense. **A**, Generation of distinct ROS during oxidative burst. **B**, Tight regulation of ROS production at different cellular compartments and cell types is critical for plant survival. **C**, Callose accumulation after production of $^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 , and specific $^1\text{O}_2$ -derived hydroxy fatty acids. Aniline blue staining in *Arabidopsis* leaves of 4-week-old plants (square-shaped sections) and in roots of in vitro-grown seedlings (rectangular sections). Leaves were infiltrated with Rose Bengal ($1 \mu\text{M}$ as $^1\text{O}_2$ producer), xanthine-xanthine oxidase (2 mM - 0.1 units per mL as extracellular O_2^- generator), H_2O_2 (1 mM), 12-HOD ($25 \mu\text{M}$), 10-HOD ($25 \mu\text{M}$), and 10-HOT ($25 \mu\text{M}$). Roots are from 8-d-old seedlings grown in Murashige and Skoog medium and covered with a solution of the ROS inducers xanthine-xanthine oxidase and H_2O_2 , at the above concentrations, or germinated 4 d in Murashige and Skoog medium and then transferred to a fresh medium containing Rose Bengal (100 nM), or 12-HOD, 10-HOD, and 10-HOT ($10 \mu\text{M}$). Representative examples of 24 h treated tissues are shown in all cases. Scale bars = $50 \mu\text{m}$.

enzymes have been implicated in the generation of apoplastic ROS in plant defense, among which NADPH oxidases (also known as respiratory burst oxidases or Rboh), similar to those present in mammalian neutrophils, have received most attention.

Plant NADPH oxidases catalyze the formation of superoxide by the following reaction: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 = \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$. Secondary spontaneous or superoxide dismutase-catalyzed conversion of superoxide provides H_2O_2 , which in turn can afford OH^\bullet in the presence of transition metal ions such as Fe^{2+} or Cu^+ . Genetic analysis demonstrated that reduction or lack of RbohD and RbohF leads to elimination of extracellular H_2O_2 (Torres et al., 2002). However, reduced production of O_2^- and of its dismutation product H_2O_2 exerts different effects in plant pathogen growth and HR cell death, which suggests that apoplastic ROS might interact with distinct signaling pathways to serve different purposes. Thus, the spreading lesion phenotype of the *lsd1* mutants (for *lesion stimulating disease*) is enhanced in the triple mutant *lsd1-rbohD-rbohF*, which has led to propose the role of RbohD and RbohF in limiting SA-elicited cell death in cells surrounding an infection site (Torres et al., 2005).

In addition to the apoplast, evidence for a role of chloroplast, peroxisomes, or mitochondria in ROS production has been reported (Van Breusegem et al., 2008). Moreover, recent studies identified other cellular sites such as endoplasmic reticulum, endomembranes vesicles, and nuclei as producers of ROS during pathogen responses, although the actions of ROS from these cellular locations remain mostly unknown (Ashtamker et al., 2007). The participation of chloroplasts in pathogen responses is concluded by results showing that light is required to activate defense gene expression and HR (Karpinski et al., 2003) and that the light-growth conditions might affect the formation of infection-like lesions in a number of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) mutants (Lorrain et al., 2003; Moeder and Yoshioka, 2008). In many cases, these phenotypes correlate with a failure in the photosynthetic machinery or in the mechanisms protecting cells against oxidative damage, including the process of photorespiration that mitigates photooxidative damage and requires the participation of peroxisomes and mitochondria (Moreno et al., 2005; Queval et al., 2007).

The role of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) as a master regulatory protein that coordinates defense by processing chloroplastic ROS-derived signals has been shown (Straus et al., 2010). However, chloroplastic ROS production and plant defense can be uncoupled. A recent example is the demonstration that chloroplast-derived ROS are essential for the formation of HR cell death but not for the activation of other basal defense responses in tobacco (*Nicotiana tabacum*) transgenic plants (Zurbriggen et al., 2009). Also, mutation of the chloroplastic Resistance to Phytophthora1 protein in *Arabidopsis* led to reduced H_2O_2 and enhanced susceptibility to *Phytophthora brassicae*, but caused a rapid runaway cell death that originated at the point of infection (Belhaj et al., 2009).

Like chloroplasts, the mitochondria can also be an important source of ROS during physiological or pathological conditions that possess an efficient antioxidant machinery to control their toxic effects (Apel

and Hirt, 2004). Nevertheless, the role of these organelles in plant cell death and pathogen responses has received little attention. Several studies revealed that treatments with cell death inducers, such as bacterial elicitors or virulence effectors might disrupt the functionality of the mitochondria and increase basal levels of ROS (Balandin and Castresana, 2002; Yao et al., 2004; Block et al., 2010). These results suggest that mitochondrial disturbance is a broadly employed strategy by pathogens to suppress host immunity and that increased ROS may contribute to the protection of plants against pathogen damage.

Results described above indicate that plants have evolved sophisticated mechanisms to use the compartmentalized production of ROS in the modulation of the defense responses against pathogen attack.

EMERGING ROLES FOR $^1\text{O}_2$ AND LIPID PEROXIDATION IN PLANT DEFENSE

Information on the role of $^1\text{O}_2$ in plant defense is still very limited. However, direct and indirect evidence discussed below, is starting to disclose a signaling role of $^1\text{O}_2$ and its participation in the response to pathogens, an area that can be expected to receive much attention in the near future. $^1\text{O}_2$ is a highly reactive unstable molecule produced in plants under basal and light stress conditions (Triantaphylidès and Havaux, 2009). In the chloroplast, excited chlorophyll can act as a photosensitizer to produce $^1\text{O}_2$ from ground state oxygen. In addition, secondary metabolites such as phenaleno-like phytoalexins and phytoanticipins might act as photosensitizers to generate $^1\text{O}_2$ following absorption of light energy (Flors and Nonell, 2006). Increased levels of these metabolites after pathogen attack could thus contribute to generate $^1\text{O}_2$ as a product of the plant defense machinery.

$^1\text{O}_2$ has a crucial role during acclimation of plants to high light intensity and photooxidative stress (Triantaphylidès et al., 2008), a response that shows strong similarities to plant defense, including the functional integration of SA and of defense regulatory proteins such as LSD1, EDS1, and Phytoalexin Deficient4 (Mühlenbock et al., 2008). Of great interest, studies with the conditional *flu* mutant that generates $^1\text{O}_2$ upon light illumination (op den Camp et al., 2003) allow to distinguish two modes of $^1\text{O}_2$ activity. Thus, whereas high $^1\text{O}_2$ production leads to photooxidative damage, decreased levels mediate a signaling activity, two responses that could be executed by $^1\text{O}_2$ or by more stable $^1\text{O}_2$ -dependent products (Przybyla et al., 2008).

A universal response of plants to pathogen attack is the generation of a host of active lipid derivatives, collectively known as oxylipins (Andreou et al., 2009; Mosblech et al., 2009). Such compounds can be formed either by enzymatic or nonenzymatic peroxidation of fatty acids, however, certain of the hydroxy oxylipins, i.e. linoleic acid-derived 10-hydroxy-octadecadienoic acid (10-HOD) and 12-HOD and linolenic acid-derived 10-hydroxy-octadecatrienoic acid (10-HOT)

and 15-HOT, can only be formed by $^1\text{O}_2$ -dependent nonenzymatic oxygenation and can therefore be used as *in vivo* markers of $^1\text{O}_2$ generation (Przybyla et al., 2008). Whereas oxylipins formed by both specific enzymatic pathways (Hamberg et al., 2005; Kachroo and Kachroo, 2009) and by nonenzymatic free-radical reactions (Loeffler et al., 2005) play important roles in plant defense, no function has yet been assigned to the $^1\text{O}_2$ -derived hydroxy fatty acids. Of interest, these latter compounds accumulate in etiolated *flu* seedlings following illumination (Przybyla et al., 2008) and in leaves of *Arabidopsis* responding to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* inoculation (Grun et al., 2007), reflecting the generation of $^1\text{O}_2$ during stress responses, photooxidation, and pathogen attack.

Deposition of callose is a frequent response of cells to pathogen assault (Hématy et al., 2009). Importantly, production of $^1\text{O}_2$ (triggered by Rose Bengal) and application of $^1\text{O}_2$ -formed hydroxy acids, induce a strong accumulation of callose in leaves ($^1\text{O}_2$ and 12-HOT) and roots ($^1\text{O}_2$, 10-HOD, and 12-HOD) of *Arabidopsis* (Fig. 1). Callose deposition was also observed (preferentially in roots) after application of O_2^- (generated by xanthine-xanthine oxidase) and was only weakly detected in roots of seedlings responding to H_2O_2 (Fig. 1). These results suggest that ROS such as $^1\text{O}_2$ and O_2^- might contribute to the accumulation of callose during the response of plants to pathogen attack. Of interest, the differences in the pattern of callose deposition observed after generation of $^1\text{O}_2$ and O_2^- or application of distinct $^1\text{O}_2$ -derived hydroxy fatty acids point to tissue-specific variations in the mode of action to these compounds. Further support of the participation of $^1\text{O}_2$ in plant defense comes from results showing an overrepresentation of biotic stress-related genes during the transcriptomic reprogramming activated after generation of $^1\text{O}_2$ (M. Martínez and C. Castresana, unpublished data).

Although these new observations deserve further investigation, these results are indicative of an active response of plants toward specific $^1\text{O}_2$ -derived hydroxy fatty acids. Related to this, we note that the nonenzymatic oxidation of linolenic acid contributes to limit pathogen infection and spreading cell death and that the action of linolenic acid as a sink for ROS has been suggested (Mène-Saffrané et al., 2009). Also, in line with our discussion, we speculate that the $^1\text{O}_2$ -derived hydroxy fatty acids could play a role in oxidative stress signaling and actively contribute to protect plant tissues against pathogen attack.

CONCLUDING REMARKS

Results described above reveal that plants have evolved unique defense responses that depend on ROS production and redox signals generated by different mechanisms at specific cellular locations. Tight control over production and accumulation of ROS is likely to be crucial to plants grown in natural envi-

ronments where survival to pathogen attack and acclimation to prevailing abiotic stress factors (like high light) have to be integrated. However, key aspect of ROS production and signaling remain still poorly understood. Plants generate chemically distinct oxygen derivatives, which may be selectively produced at specific cellular locations in response to different environmental stresses. Studies to investigate the actions of ROS have revealed common and specific responses toward different types of ROS as well as cross talk between distinct ROS signaling pathways, thus showing a complex scenario hampering the investigation of selective actions by a given ROS. Major efforts in examining the actions of O_2^- and H_2O_2 might have oversimplified the analyses of ROS in plant defense. Compared to other ROS, 1O_2 has received little attention, and recent studies indicating its participation in plant defense are emerging. Polyunsaturated fatty acids are a preferred target of 1O_2 attack and several of its oxidation products could act as secondary messengers to trigger defense responses. Studies on the actions of ROS will benefit from newly developed tools helping to monitor in a noninvasive manner, the generation and signaling events of distinct types of ROS in the activation of resistance after pathogen attack.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Bannenberg and J. Paz-Ares for constructive comments.

Received June 16, 2010; accepted June 25, 2010; published October 6, 2010.

LITERATURE CITED

- Andreou A, Brodhun F, Feussner I (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* **48**: 148–170
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399
- Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O, Fluhr R (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* **143**: 1817–1826
- Balandin T, Castresana C (2002) AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol* **129**: 1852–1857
- Belhaj K, Lin B, Mauch F (2009) The chloroplast protein RPH1 plays a role in the immune response of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae*. *Plant J* **58**: 287–298
- Block A, Guo M, Li G, Elowsky C, Clemente TE, Alfano JR (2010) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. *Cell Microbiol* **12**: 318–330
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379–406
- Bolwell GP, Daudi A (2009) Reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In LA del Rio, A Puppo, eds, *Reactive Oxygen Species in Plant Signalling*. Springer, Berlin, pp 113–133
- Flors C, Nonell S (2006) Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. *Acc Chem Res* **39**: 293–300
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inze D, Mittler R, Van Breusegem F (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 436–445
- Govrin EM, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**: 751–757
- Grant MR, Jones JD (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**: 750–752
- Grun C, Berger S, Matthes D, Mueller MJ (2007) Early accumulation of non-enzymatically synthesised oxylipins in Arabidopsis thaliana after infection with *Pseudomonas syringae*. *Funct Plant Biol* **34**: 65–71
- Hamberg M, Ponce de León I, Rodríguez MJ, Castresana C (2005) Alpha-dioxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 169–174
- Hématy K, Cherk C, Somerville S (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 406–413
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Kachroo A, Kachroo P (2009) Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 153–176
- Kariola T, Brader G, Li J, Palva ET (2005) Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *Plant Cell* **17**: 282–294
- Karpinski S, Gabrys H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM (2003) Light perception in plant disease defence signalling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 390–396
- Laloi C, Stachowiak M, Pers-Kamczyc E, Warzych E, Murgia I, Apel K (2007) Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 672–677
- Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J, Mueller MJ (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* **137**: 328–340
- López MA, Bannenberg G, Castresana C (2008) Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 420–427
- Lorain S, Vailleau F, Balague C, Roby D (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* **8**: 263–271
- Mène-Saffrané L, Dubugnon L, Chetelat A, Stolz S, Gouhier-Darimont C, Farmer EE (2009) Nonenzymatic oxidation of trienoic fatty acids contributes to reactive oxygen species management in Arabidopsis. *J Biol Chem* **284**: 1702–1708
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490–498
- Moeder W, Yoshioka K (2008) Lesion mimic mutants: a classical, yet still fundamental approach to study programmed cell death. *Plant Signal Behav* **3**: 764–767
- Moreno JJ, Martín R, Castresana C (2005) Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J* **41**: 451–463
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**: 511–517
- Mühlenbock P, Szechynska-Hebda M, Plaszczyca M, Baudo M, Mateo A, Mullineaux PM, Parker JE, Karpinska B, Karpinski S (2008) Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2339–2356
- op den Camp RG, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Gobel C, Feussner I, et al (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 2320–2332
- Przybyla D, Gobel C, Imboden A, Hamberg M, Feussner I, Apel K (2008) Enzymatic, but not non-enzymatic, 1O_2 -mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the EXECUTER1-dependent stress response program in the flu mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **54**: 236–248
- Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoerberichts FA, Vandorpe M, Gakière B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G (2007) Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant cat2 demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H_2O_2 -induced cell death. *Plant J* **52**: 640–657
- Straus MR, Rietz S, van Themaat EV, Bartsch M, Parker JE (2010) Salicylic acid antagonism of EDS1-driven cell death is important for immune and oxidative stress responses in Arabidopsis. *Plant J* **62**: 628–640
- Tada Y, Spoel SH, Pajeroska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J,

- Dong X** (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952–956
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD** (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 517–522
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL** (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet* **37**: 1130–1134
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* **141**: 373–378
- Triantaphylidès C, Havaux M** (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* **14**: 219–228
- Triantaphylidès C, Kriskhke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ** (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol* **148**: 960–968
- Van Breusegem F, Bailey-Serres J, Mittler R** (2008) Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiol* **147**: 978–984
- Yao N, Eisfelder BJ, Marvin J, Greenberg JT** (2004) The mitochondrion—an organelle commonly involved in programmed cell death in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **40**: 596–610
- Zurbriggen MD, Carrillo N, Tognetti VB, Melzer M, Peisker M, Hause B, Hajirezaei MR** (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *Plant J* **60**: 962–973

Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence

Miguel A. López^{1,†}, Jorge Vicente^{1,†}, Satish Kulasekaran¹, Tamara Velloso¹, Marta Martínez¹, Maria L. Irigoyen¹, Tomas Cascón¹, Gerard Bannenberg¹, Mats Hamberg² and Carmen Castresana^{1,*}

¹Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain, and

²Division of Physiological Chemistry II, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, S-17177 Stockholm, Sweden

Received 10 March 2011; revised 6 April 2011; accepted 6 April 2011; published online 06 June 2011.

*For correspondence (fax +34 91 5854506; e-mail ccastresana@cnb.csic.es).

†These authors contributed equally to this work.

SUMMARY

9-lipoxygenases (9-LOXs) initiate fatty acid oxygenation in plant tissues, with formation of 9-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid (9-HOT) from linolenic acid. A *lox1 lox5* mutant, which is deficient in 9-LOX activity, and two mutants *noxy6* and *noxy22* (*non-responding to oxylipins*), which are insensitive to 9-HOT, have been used to investigate 9-HOT signalling. Map-based cloning indicated that the *noxy6* and *noxy22* mutations are located at the *CTR1* (CONSTITUTIVE ETHYLENE RESPONSE1) and *ETO1* (ETHYLENE-OVERPRODUCER1) loci, respectively. In agreement, the *noxy6* and *noxy22* mutants, renamed as *ctr1-15* and *eto1-14*, respectively, showed enhanced ethylene (ET) production. The correlation between increased ET production and reduced 9-HOT sensitivity indicated by these results was supported by experiments in which exogenously added ethylene precursor ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) impaired the responses to 9-HOT. Moreover, a reciprocal interaction between ET and 9-HOT signalling was indicated by results showing that the effect of ACC was reduced in the presence of 9-HOT. We found that the 9-LOX and ET pathways regulate the response to the lipid peroxidation-inducer singlet oxygen. Thus, the massive transcriptional changes seen in wild-type plants in response to singlet oxygen were greatly affected in the *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants. Furthermore, these mutants displayed enhanced susceptibility to both singlet oxygen and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, in the latter case leading to increased accumulation of the lipid peroxidation product malondialdehyde. These findings demonstrate an antagonistic relationship between products of the 9-LOX and ET pathways, and suggest a role for the 9-LOX pathway in modulating oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence.

Keywords: oxylipins, ethylene, oxidative stress, plant defence, Arabidopsis.

INTRODUCTION

Oxylipins are lipid-derived molecules that are ubiquitous in eukaryotes, and whose importance in controlling physiological and pathological processes in plants is being recognized (Savchenko *et al.*, 2010; López *et al.*, 2008). Enzymatic synthesis of oxylipins is initiated by incorporation of oxygen into a fatty acid molecule, catalysed by the activities of 9- and 13-lipoxygenases or α -dioxygenases (Andreou *et al.*, 2009; Hamberg *et al.*, 2005). The primary product is a fatty acid hydroperoxide, which is subsequently modified by an array of secondary enzymatic activities to generate an extensive family of metabolites (Mosblech *et al.*, 2009). Production of

oxylipins from polyunsaturated fatty acids can also take place non-enzymatically in the presence of singlet oxygen or by free radical-mediated oxygenation (Durand *et al.*, 2009; Hamberg, 2011).

Synthesis of oxylipins is triggered at specific developmental stages, as well as by various biotic and abiotic stresses. During these responses, oxylipins were found to regulate gene expression (Stintzi *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2008; Browse, 2009) and cell death (Vollenweider *et al.*, 2000; De León *et al.*, 2002; Hamberg *et al.*, 2003; Montillet *et al.*, 2005), and to exert direct anti-microbial activity (Prost

et al., 2005; Kishimoto *et al.*, 2008). Much attention has been paid to the biosynthetic pathway initiated by 13-lipoxygenases (13-LOX), and its main product, jasmonic acid (JA), which plays critical roles in fertility, resistance to necrotrophic pathogens, insect attack, wounding and establishing systemic resistance (Mandaokar and Browse, 2009; Caldelari *et al.*, 2011; Glazebrook, 2005; Onkokesung *et al.*, 2010; Koo and Howe, 2009; Truman *et al.*, 2007). A number of studies have also demonstrated the participation of oxylipins produced by the 9-LOX and α -DOX pathways in regulating plant development and defence responses (Rancé *et al.*, 1998; Vellosillo *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Hwang and Hwang, 2010; De León *et al.*, 2002; Obregón *et al.*, 2001; Bannenberg *et al.*, 2009b). Furthermore, increasing evidence indicates a role for non-enzymatically generated oxylipins in plant defence (Loeffler *et al.*, 2005; Mueller and Berger, 2009). Nevertheless, the signalling mechanisms by which these oxylipins exert their function remain poorly understood.

Using a collection of 47 oxylipins and an *in vitro* assay, we identified three types of oxylipin-activated phenotypic alterations on root growth, i.e. root waving, loss of root apical dominance, and decreased root elongation. Among the oxylipins tested, the 9-LOX product 9(S)-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid (9-HOT) was the most potent inducer of root waving, and was used to identify 9-HOT-insensitive *noxy* mutants (*non-responding to oxylipins*) within a mutagenized Arabidopsis population. Studies using the 9-HOT-insensitive mutant *noxy2* and the JA-insensitive *coi1-1* mutant demonstrated that the response of plants to 9-HOT was activated by a JA-independent signalling pathway, and that the *noxy* mutants constitute a valuable tool to investigate the signalling components of the 9-HOT response (Vellosillo *et al.*, 2007).

Examination of the molecular events triggered by 9-HOT revealed accumulation of callose, production of reactive oxygen species (ROS), and transcriptional changes for genes involved in plant defence. These actions are common to the response to pathogen infection (Dangl and Jones, 2001), and are indicative of a role of 9-HOT in plant defence. In agreement with this, the 9-HOT-insensitive *noxy2* mutant showed enhanced susceptibility to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Moreover, *noxy2* mutants showed reduced necrosis after infection compared with wild-type plants. These findings were in line with previous results showing accumulation of 9-HOT, and additional 9-LOX derivatives, during activation of a hypersensitive cell-death response protecting plants against biotrophic pathogens, as well as in the cell-death reaction caused by pathogen elicitors (Vollenweider *et al.*, 2000; Hamberg *et al.*, 2003; Göbel *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2006; Rustérucci *et al.*, 1999; Montillet *et al.*, 2005).

Here, we have characterized the signalling processes regulated by the 9-LOX derivative 9-HOT. We made use of a double mutant, *lox1 lox5*, that lack 9-LOX activity, and of

two 9-HOT-insensitive mutants, *noxy6* and *noxy22* (*non-responding to oxylipins*), and uncovered an antagonistic role of 9-LOX and ethylene (ET) in controlling responses involving oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence.

RESULTS

The *noxy6* and *noxy22* mutants, which are non-responsive to 9-HOT, are constitutive ethylene mutants

The 9-HOT-insensitive mutants *noxy6* and *noxy22* were isolated by a forward genetic screen based on the root waving activity of 9-HOT. We found that both mutants failed to respond to 9-HOT by inducing root waving but did respond to oxylipins such as JA and 9-oxononanoic acid (9-Oxo-C₉), which cause a reduction of root elongation (Figure S1). In addition, *noxy6* and *noxy22* plants did not activate responses to 9-HOT such as formation of focal deposits of callose (Figure S2). Moreover, production of superoxide anion and expression of three genes up-regulated by 9-HOT, i.e. *POX* (pyridine nucleotide oxidoreductase, At5g22140), *ABC* (ABC transporter, At1g15520) and *FOX* (FAD-binding oxidoreductase, At1g26380) (Vellosillo *et al.*, 2007), were reduced in these *noxy* mutants compared with wild-type plants (Figure S2).

Genetic analysis indicated that the *noxy6* and *noxy22* mutations were monogenic and recessive. Map-based cloning showed that the *noxy6* mutation is a C → T transition at nucleotide 3544 in the *CTR1* gene, which was renamed *ctr1-15* (Figure S3). The *ctr1-15* mutation converts Leu610 to Phe in the kinase domain of the CTR1 protein, which is a negative regulator of the ET pathway (Kieber *et al.*, 1993). The *noxy22* mutation is a C → T transition that converts Pro265 to Leu in the ETO1 protein, and was renamed *eto1-14* (Figure S3). The ETO1 protein is a negative regulator of ET synthesis (Wang *et al.*, 2004). As a consequence of the *ctr1-15* and *eto1-14* mutations, the ET pathway was constitutively activated, as confirmed by the characteristic triple response of dark-grown seedlings (Figure S4) (Guzmán and Ecker, 1990). These results indicate that ET may negatively interact with 9-HOT signalling.

Ethylene impairs the responses to 9-HOT via the canonical ethylene signalling pathway

Because constitutive ET production diminishes the response to 9-HOT, we examined the effect of the ethylene precursor ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) on the 9-HOT response. We found that ACC impaired root waving, and reduced the accumulation of callose and production of superoxide anion that otherwise accompanied 9-HOT treatment (Figure 1). We also tested the response of the ET-insensitive mutant *ein2-5* (Alonso *et al.*, 1999) to application of 9-HOT, either alone or in combination with ACC. We found that *ein2-5* reacted as wild-type plants do to 9-HOT by

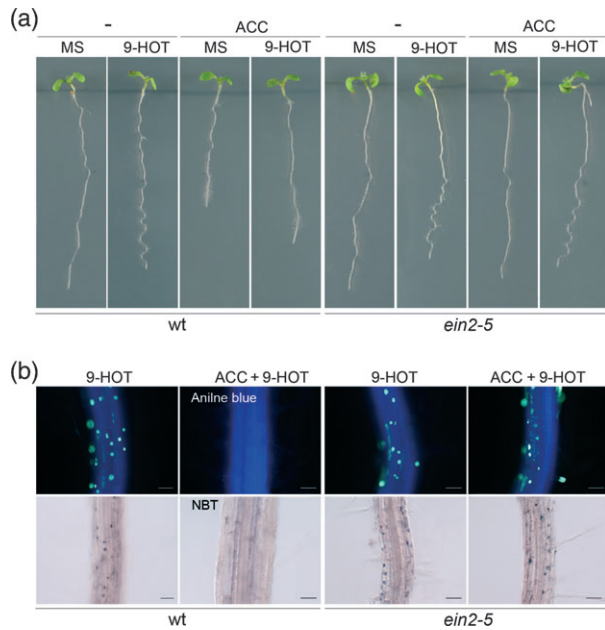


Figure 1. Characterization of wild-type and *ein2-5* plants in response to ACC and 9-HOT.

(a) Transmitted light visualization of seedlings grown for 3 days in MS medium and transferred to grow for an additional 3 days on MS medium containing 9-HOT (25 μM), ACC (2 μM) or 9-HOT in combination with ACC.

(b) Staining of roots treated as above. Fluorescence visualization of callose deposition in roots stained with aniline blue (upper panels), and transmitted light visualization of superoxide ions in roots stained with nitroblue tetrazolium (lower panels).

inducing root waving, callose deposition and ROS production. However, the effect of ACC on 9-HOT-activated root responses was impaired in the *ein2-5* mutant. These results indicated that activation of the 9-HOT responses examined does not require an active ET signalling pathway, but that the inhibitory effect of ACC on 9-HOT signalling is exerted through the canonical ET signalling pathway. Further, analysis of genes up-regulated by 9-HOT in *ein2-5* plants revealed enhanced accumulation of the three transcripts examined (*POX*, *ABC* and *FOX*) compared with wild-type plants (Figure S5). These results support a negative regulatory role of ET on the 9-HOT signalling pathway.

9-HOT interferes with activation of the ET signalling pathway

Because enhanced ET production inhibits 9-HOT signalling, it was of interest to examine whether, reciprocally, 9-HOT could antagonize ET signalling. In support of this idea, we noted that the inhibitory effect of ACC on root growth was diminished in the presence of 9-HOT (Figure 1a). To evaluate the effect of 9-HOT on the ET pathway, we made use of a well-characterized transgenic line *35S:EIN3-GFP* that shows constitutive expression of EIN3, a key transcription factor that is stabilized in response to ET to activate gene expres-

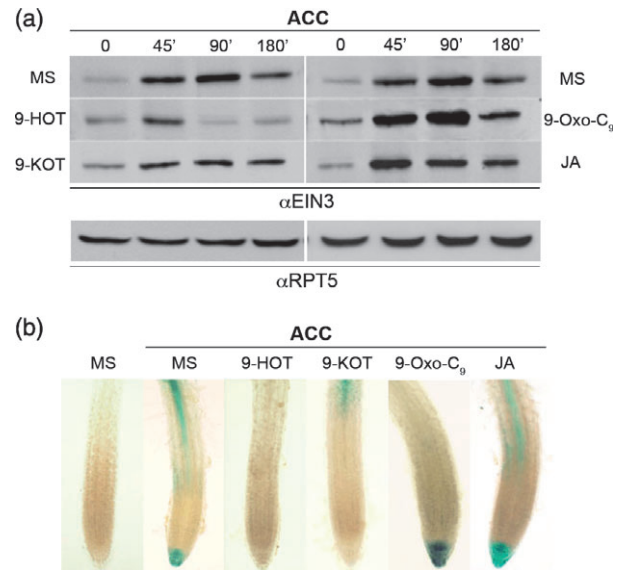


Figure 2. Analyses of ET signalling activation.

(a) Analyses of EIN3 protein accumulation in 6-day-old seedlings of *35S:EIN3-GFP* transgenic lines grown in MS medium and transferred to MS medium containing ACC (2 μM) alone or in combination with the oxylipins 9-HOT, 9-KOT, JA or 9-Oxo-C₉ (25 μM). Proteins were extracted and examined at the times indicated. Blots were hybridized to an antibody against EIN3. Anti-RPT5 was used as a loading control.

(b) Histological examination of GUS activity in transgenic lines containing the ethylene-responsive reporter *EBS:GUS*. GUS staining was performed 24 h after treatment with ACC alone or in combination with the oxylipins 9-HOT, 9-KOT, JA or 9-Oxo-C₉ (25 μM).

sion (Guo and Ecker, 2003). As shown in Figure 2(a), accumulation of EIN3-GFP increased strongly on application of ACC, and the increase was clearly reduced when 9-HOT was applied simultaneously with ACC. Further support for the effect of 9-HOT on the ET pathway was obtained using *EBS:β-glucuronidase* (GUS) transgenic plants, in which expression of the GUS gene is driven by a synthetic EIN3-responsive promoter (Stepanova *et al.*, 2007). As shown in Figure 2(b), no detectable expression of *EBS:GUS* was observed in roots of untreated plants, but ACC treatment resulted in a significant increase in GUS in root tips and in the elongation zone of the roots. The activation of *EBS:GUS* was reduced to a great extent when ACC was applied in combination with 9-HOT, proving that exogenous 9-HOT interferes with activation of the ET pathway.

In addition to 9-HOT, we explored the action of a second root waving oxylipin, i.e. 9-keto-10,12,15-octadecatrienoic acid (9-KOT), as well as of oxylipins that cause a reduction of root elongation, such as JA and 9-Oxo-C₉. We found that 9-KOT reduced the ACC-induced accumulation of EIN3, but to a smaller extent than 9-HOT, whereas JA and 9-Oxo-C₉ led to an increase in EIN3 compared with the level observed when ACC alone was applied (Figure 2a). Accordingly, activation of the *EBS:GUS* construct was significantly

reduced when ACC was applied in combination with 9-KOT, whereas no decrease of GUS activity was detected after treatment with JA or 9-Oxo-C₉ in combination with ACC (Figure 2b).

Lipid oxidation participates in the response of plants to 9-HOT

As 9-HOT increases ROS production and constitutive ET production (or application of ACC) prevents this response, we tested whether the cellular redox environment influences 9-HOT signalling. To this end, we compared the response of wild-type seedlings to 9-HOT when applied alone or in combination with various redox-active compounds, such as reduced glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG; the oxidized form of glutathione), ascorbate (a key redox buffer) and Trolox (which has lipophilic anti-oxidant activity, Fluka, <http://www.sigmaaldrich.com>). None of the redox-active compounds analysed caused any visible phenotypic alteration compared with seedlings grown on MS (Figure S6). Moreover, we found that the application of ascorbic acid, GSH or GSSG (100 μM) did not cause major differences in the responses to 9-HOT, such as root waving, callose deposition and ROS production (Figure 3). In contrast, the

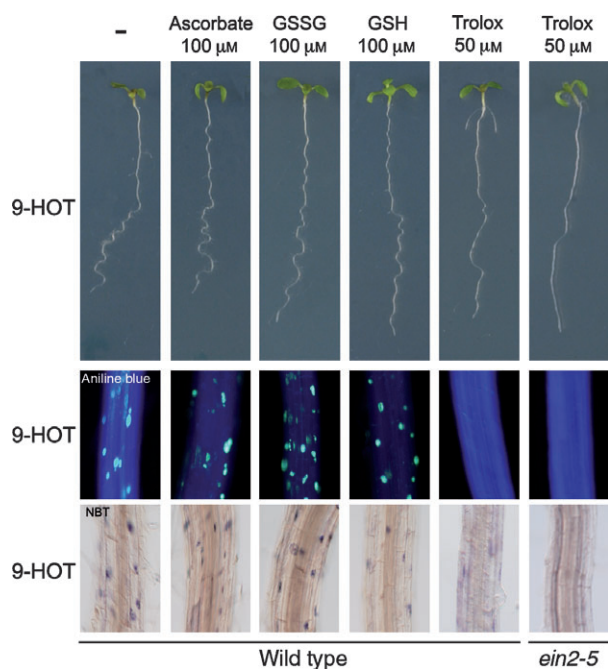


Figure 3. Effect of the redox environment on 9-HOT signalling. (a) Phenotype of wild-type seedlings grown for 3 days in MS medium and transferred for an additional 3 days to MS medium containing redox-active compounds such as ascorbate, glutathione disulfide (GSSG), reduced glutathione (GSH) and Trolox, in combination with 9-HOT (25 μM). Three-day-old seedlings of *ein2-5* grown in MS medium were transferred for an additional 3 days to MS medium containing Trolox (50 μM) in combination with 9-HOT (25 μM). (b) Fluorescence visualization of callose deposition in roots stained with aniline blue (upper panels), and transmitted light visualization of superoxide anion in roots stained with nitroblue tetrazolium (lower panels).

three 9-HOT responses examined were inhibited when 9-HOT was applied in combination with Trolox (50 μM) (Figure 3). As with wild-type plants, Trolox inhibited the response to 9-HOT in *ein2-5* mutants, showing that the anti-oxidant activity of Trolox is exerted in an ET signalling-independent manner (Figure 3). The fact that application of Trolox, a tocopherol analogue with lipophilic anti-oxidant activity, inhibited the responses to 9-HOT suggests that oxidative stress and lipid peroxidation may be involved in 9-HOT signalling. On the other hand, the fact that tocopherols exert their lipid-protecting action by efficiently quenching singlet oxygen and scavenging various radicals (Triantaphylidès and Havaux, 2009) suggests the participation of 9-HOT in signalling responses to these reactive molecules.

Transcriptional changes in response to singlet oxygen varied significantly in 9-LOX and ET mutants compared to wild-type plants

Because of the involvement of lipid oxidation in 9-HOT signalling, we predicted that the response to singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), a highly reactive oxygen species (ROS) that can initiate lipid peroxidation (Przybyla *et al.*, 2008; Triantaphylidès and Havaux, 2009), would differ between 9-HOT-deficient mutants and wild-type plants. Therefore, we examined the response of 9-LOX-deficient mutants and wild-type plants to Rose Bengal (RB), which is used to produce $^1\text{O}_2$. The *eto1-14* mutant (interfering with the 9-LOX pathway) was selected for these studies. In addition, a double mutant, *lox1-1 lox5-1* (hereafter referred to as *lox1 lox5*) containing a T-DNA insertion in each of the two 9-LOX genes of Arabidopsis, *LOX1* and *LOX5* (Bannenberg *et al.*, 2009a), was generated and included in these analyses (Figure S7). Quantification of 9-HOT to monitor 9-LOX activity revealed negligible amounts of 9-HOT in leaves and roots tissues of *lox1 lox5* seedlings. In addition, *eto1-14* seedlings showed levels of 9-HOT similar to those found in wild-type plants (Table 1).

The results from transcriptional profiles shown in Figure 4 (described in detail in Experimental Procedures) indicate that RB caused major transcriptional changes in gene expression, with 1262 genes being up-regulated and 570 genes down-regulated compared with mock-treated controls (twofold change or more false discovery rate 0.05) (Table S1). Comparison of transcriptional profiles with those obtained in previous studies using the conditional *flu*

Table 1 Levels of 9-HOT (nmol g⁻¹) in seedling homogenates incubated with linolenic acid

Genotype	Leaves	Roots
Wild-type	80.5 ± 11.5	133.2 ± 10.4
<i>lox1 lox5</i>	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.2
<i>eto1-14</i>	66.1 ± 1.4	102.8 ± 19.1

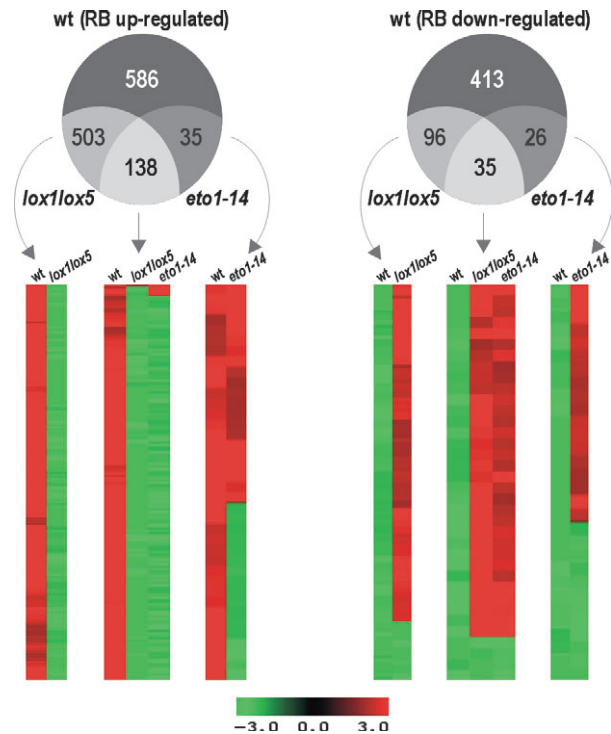


Figure 4. Microarray analyses of genes responsive to Rose Bengal (RB) in wild-type, *lox1 lox5* and *eto1-14* plants. RNA samples were prepared from 12-day-old seedlings 3 h after Rose Bengal treatment (10 μ M). Genes with twofold or greater differential expression that were either up-regulated or down-regulated in the plants examined were analysed. Venn diagrams and hierarchical clustering of genes that were up-regulated (left) and down-regulated (right) in wild-type plants after RB treatment, and of genes whose expression varied between RB-treated *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants and RB-treated wild-type plants. Three sub-clusters are shown, representing genes whose expression varied in wild-type and *lox1 lox5* (left), in wild-type and *eto1-14* (right), or in wild-type, *lox1 lox5* and *eto1-14* simultaneously (middle). Colours indicate fold change values of differentially expressed genes on a scale of -3.0 to 3.0 . A complete list of genes is given in Table S1.

mutant, which generates singlet oxygen (op den Camp *et al.*, 2003; Gadjev *et al.*, 2006), revealed that, despite important experimental differences (light-/dark-grown seedlings and non-localized production of singlet oxygen after RB treatment versus chloroplastic production of singlet oxygen in leaves of mature *flu* plants after a dark/light shift), almost 60% of the genes that showed increased expression in the *flu* mutant were also induced in wild-type plants after RB (Figure S8). Moreover, in our microarray, we found induction of genes that are known to be selectively up-regulated by singlet oxygen, but not by superoxide or hydrogen peroxide, indicating that the singlet oxygen generated by RB had specific signal activity rather than cytotoxic activity (op den Camp *et al.*, 2003; Gadjev *et al.*, 2006; Przybyla *et al.*, 2008).

Gene expression after RB treatment varied greatly in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants compared with wild-type seedlings. Of the RB up-regulated genes in wild-type plants, 51

and 12% showed at least twofold reduced expression in the *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants, respectively, and only 22 genes showed increased expression in *eto1-14* plants. Similar figures were found for the genes down-regulated after RB treatment in wild-type plants, as 20 and 9% of these genes showed higher expression (two-fold or more) in RB-responding *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants, respectively, while 3 and 2% of the genes showed reduced expression in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants in comparison to wild-type plants. We found that expression of 9% of the RB-responsive genes in wild-type plants (RB-induced and RB-repressed) was simultaneously modified in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants (Figure 4 and Table S2). Moreover, 74% of the genes that showed altered expression in the *eto1-14* mutant compared to wild-type plants were also altered in *lox1 lox5* mutants, indicating that ET preferentially affects a subset of the transcriptional response mediated by 9-LOX activity.

Further examination of our microarrays showed transcriptional changes in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants that were not detected in RB-responding wild-type plants (Table S3). Thus, the expression changes of 1439 genes in *lox1 lox5* and 140 genes in *eto1-14* were unique to these mutants. Furthermore, an additional group of 203 genes was found to show altered expression in both *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants, but not in RB-treated wild-type plants.

The possible biological function of the RB-responding genes was assessed by Gene Ontology (GO) term enrichment (Table S4). Among RB up-regulated genes, we found a significant overrepresentation of genes associated with various types of stress, regulation of gene expression, the metabolism of oxylipins and ET signalling. Terms associated with cell-wall organization and lipid metabolism were overrepresented in the pool of RB down-regulated genes in wild-type plants. Moreover, among genes whose expression varied in mutants but not in wild-type plants, we found an enrichment of terms associated with abiotic stress and photosynthesis among RB up-regulated *lox1 lox5* genes, and with amino acid, phenylpropanoid and flavonoid metabolic processes among *eto1-14* up-regulated genes.

Lack of 9-LOX activity and constitutive ET production enhance the susceptibility of plants to singlet oxygen

The altered gene expression in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants after RB production was indicative of an impaired response to singlet oxygen. The significance of this variation was evaluated by measuring ion leakage (as an indicator of cellular damage) in the leaves of adult plants subjected to RB treatment, as well as by examining the phenotype of seedlings when grown in the presence of RB. These analyses revealed an increase in ion leakage in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants compared to wild-type plants (Figure 5). Thus, the approximately 1.5-fold increase in ion leakage measured in wild-type plants 24 h after RB treatment increased

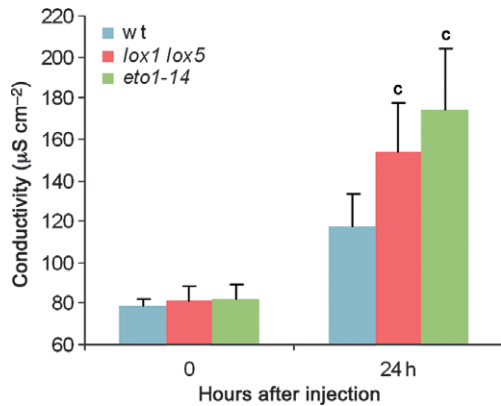


Figure 5. Measurement of ion leakage.

Conductivity measured in full-grown leaves of wild-type, *lox1 lox5* and *eto1-14* plants after injection with Rose Bengal (2 µM). Values are means and standard errors from three independent experiments are shown. Letters on top of the bars indicate statistically significant differences between the corresponding mutants and wild-type plants (Student's *t* test: 0.01 < *P* < 0.05).

approximately twofold above basal levels in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants. Furthermore, we observed significant phenotypic variations in 15-day-old seedlings grown on medium containing 5 µM RB (Figure 6a). Rating of the phenotypic symptoms on a three-point scale (I, II and III), according to their severity, revealed a high proportion of wild-type seedlings (approximately 85%) with type I phenotype (only green leaves), compared with approximately 60 and 20% of seedlings in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants, respectively (Figure 6b), whereas the remaining seedlings showed type II (with green and yellow leaves) and type III symptoms (only yellow leaves). These results reveal the enhanced susceptibility of these mutants to singlet oxygen. The fact that RB caused stronger damage in *eto1-14* than in *lox1 lox5* seedlings contrasted with the reduced number of transcriptional changes found in *eto1-14*, suggesting that the qualitative differences distinguishing the transcriptional response of *lox1 lox5* and *eto1-14* to RB are critical in modulating their adaptation to oxidative stress.

Lack of 9-LOX activity and constitutive ET production enhance bacterial susceptibility and malondialdehyde accumulation

Given the attenuated response of *lox1 lox5* and *eto1-14* to singlet oxygen, and that, as described above, the genes induced by singlet oxygen in wild-type plants were enriched in responses to pathogens, we tested whether the defence potential of these mutants was diminished and whether this correlated with altered ROS regulation. Analyses of the response to the biotrophic bacterial strains *Pst* DC3000 *avrRpm1* (avirulent) and *Pst* DC3000 (virulent) revealed higher bacterial growth rates in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants than

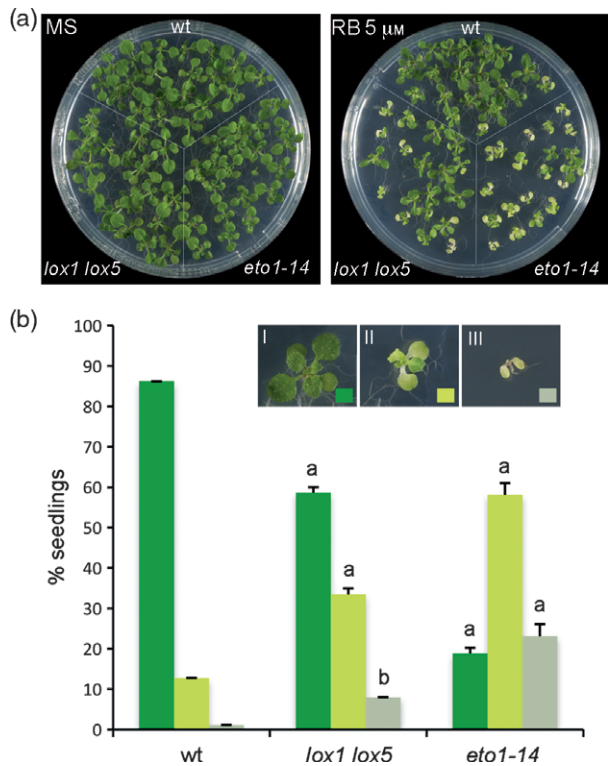


Figure 6. Analyses of phenotypic alterations in wild-type, *lox1 lox5* and *eto1-14* plants grown in RB-containing medium.

(a) Phenotype of seedlings grown for 15 days in MS medium (left) or in MS medium containing RB (5 µM) (right).

(b) Phenotypic alterations were scored on a three-point scale (I, II and III), according to the severity of the symptoms. The percentages of seedlings showing these phenotypes after 15 days of growth in RB-containing medium are shown. Values are means and standard errors from three independent experiments. Letters on top of the bars indicate statistically significant differences between the corresponding mutants and wild-type plants (Student's *t* test: ^a*P* < 0.001, ^b0.001 < *P* < 0.01).

in wild-type controls (Figure 7a). The growth of *Pst* DC3000 *avrRpm1* did not show a significant variation in *lox1 lox5*, but increased sevenfold in *eto1-14* relative to wild-type plants. Moreover, the growth of *Pst* DC3000 increased ten- and sevenfold in *lox1 lox5* and *eto1-14*, respectively, compared with controls. Further analyses of 9-HOT-responsive gene expression revealed that, compared with wild-type plants, enhanced bacterial growth was accompanied by delayed and reduced expression, which was more apparent in the case of the virulent bacteria (Figure 7b). Analysis of the symptoms caused by bacterial inoculation revealed a slightly decreased necrosis (visible by staining with trypan blue) and increased H₂O₂ accumulation (as concluded from the strong brown coloration observed by staining with 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride) during both interactions in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants (Figure 7c). Finally, we measured the accumulation of malondialdehyde (MDA), a product of uncontrolled lipid oxidation (Farmer and Davoine, 2007). As shown in Figure 8(a), there was a small but

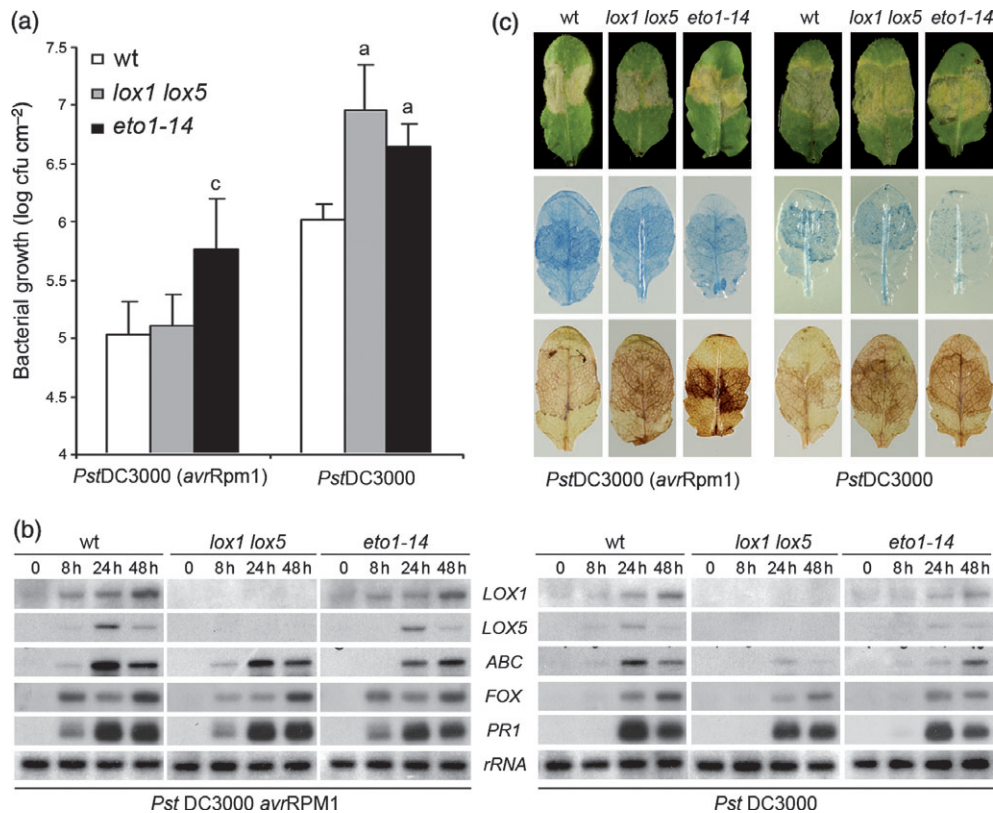


Figure 7. Response of *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants to bacterial inoculation.

(a) Growth of *Pst DC3000 avrRpm1* and *Pst DC3000* in plants 4 days after bacterial infiltration (10^5 cfu ml⁻¹). Values are means and standard errors obtained in three independent experiments. Letters on top of the bars indicate statistically significant differences between the corresponding mutants and wild-type plants (Student's *t* test: ^b $0.001 < P < 0.01$, ^c $0.01 < P < 0.05$).

(b) Analyses of gene expression after bacterial inoculation (10^6 cfu ml⁻¹). Blots were hybridized to riboprobes for *LOX1*, *LOX5*, *ABC*, *FOX* and *PR1* genes. Hybridization against an rRNA radioactive probe was used as a loading control.

(c) Representative examples of lesions that developed in the leaves after bacterial infiltration (upper panels). Staining with trypan blue (middle panels) and 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (lower panels) was performed 24 and 48 h, respectively, after *Pst DC3000 avrRpm1* and *Pst DC3000* inoculation.

significant increase in MDA in response to *Pst DC3000 avrRpm1* in *lox1 lox5* and *eto1-14* plants. A twofold increase above the levels in wild-type plants was measured in *lox1 lox5* mutants at 4 and 8 h post-inoculation, decreasing by 24 h to the levels found in wild-type plants. The MDA level in *eto1-14* mutants at 8 h post-inoculation was 1.5 times that in wild-type plants, and remained at similar levels 24 h after inoculation. Analyses of the response to *Pst DC3000* revealed 1.8- and 1.5-fold increases in the levels of MDA in *lox1 lox5* and *eto1-14* plants, respectively, compared with wild-type plants at 8 h after bacterial infiltration.

DISCUSSION

We have previously shown that the 9-LOX product 9-HOT regulates stress responses that commonly occur during the defence of plants to pathogen infection (Vellosillo *et al.*, 2007). To obtain further insight into the molecular mechanisms involved in 9-HOT signalling, as well the role of the 9-LOX oxylipin pathway, we used a genetic approach to generate a double *lox1 lox5* Arabidopsis mutant lacking

9-LOX activity, as well as 9-HOT signalling mutants (*non-responding to oxylipins*) with an impaired response to 9-HOT. The *noxy6* and *noxy22* mutants were selected based on their insensitivity to 9-HOT (Figures S1 and S2). Identification of the *noxy6* and *noxy22* mutations as new *ctr1* (*ctr1-15*) and *eto1* (*eto1-14*) alleles, respectively, strongly indicated that enhanced ET production negatively regulates 9-HOT signalling (Figures S3 and S4). In support of this finding, we observed that application of the ET precursor ACC, in combination with 9-HOT, provoked a clear reduction of the responses to 9-HOT in wild-type plants but not in the ethylene-insensitive mutant *ein2-5* (Figure 1). Moreover, gene induction by 9-HOT reached higher levels in the *ein2-5* mutant than in wild-type plants (Figure S5), confirming a negative action of ET on the 9-HOT signalling pathway.

In addition to the inhibitory effect of ET on 9-HOT signalling, a reciprocal interference was also found, indicating that the antagonistic action of ET and 9-HOT is bi-directional. Results showing that the presence of 9-HOT reduced the ACC-induced accumulation of EIN3-GFP in

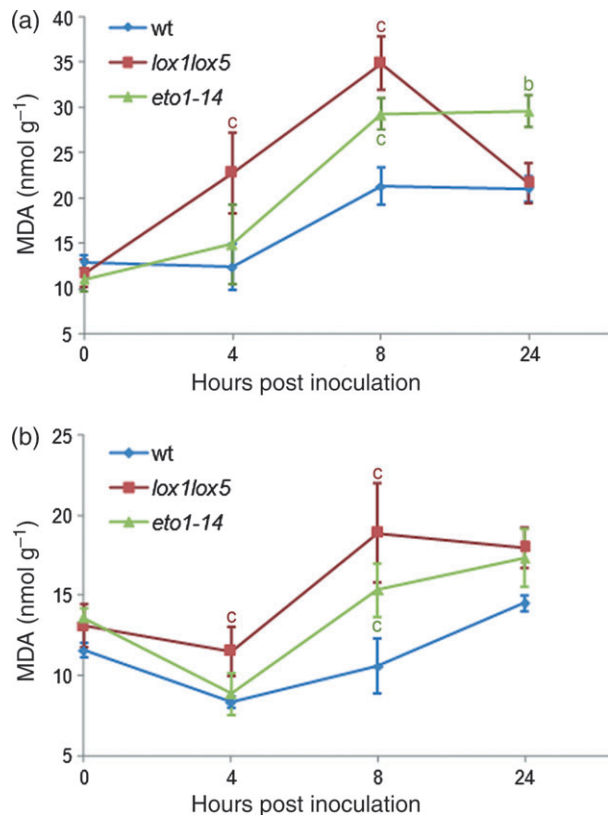


Figure 8. Analyses of MDA accumulation.

(a) Total (free and bound) MDA levels measured by GC-MS in the leaves of wild-type, *lox1lox5* and *eto1-14* at various intervals after *Pst* DC3000 *avrRpm1* infiltration (10^7 cfu ml⁻¹).

(b) Total (free and bound) MDA levels measured by GC-MS in the leaves of wild-type, *lox1lox5* and *eto1-14* at different intervals after *Pst* DC3000 infiltration (10^7 cfu ml⁻¹).

Values are means and standard errors from three independent experiments. Letters on top of the bars indicate statistically significant differences between the corresponding mutants and wild-type plants (Student's *t* test: ^b $0.001 < P < 0.01$, ^c $0.01 < P < 0.05$).

35S:*EIN3-GFP* transgenic plants, as well as of GUS activity in roots of *EBS:GUS* plants (Figure 2), demonstrated that 9-HOT interferes with activation of the ET pathway. Similar interference with the ET pathway was found with 9-KOT, which, like 9-HOT, induces root waving, whereas the opposite was observed with JA or 9-Oxo-C₉, which induce root growth arrest through a 9-HOT-independent signalling pathway (Figure 2 and Figure S1). The positive interaction of the JA and ET pathways was in accordance with previous results showing synergistic interaction of these hormones during the response of plants to necrotrophic pathogens (Glazebrook, 2005). On the other hand, the fact that the interaction between JA and ET differed from that of 9-HOT and ET, supported our previous data suggesting signalling diversification of these two oxylipins, JA and 9-HOT. Moreover, the fact that the action of 9-HOT and 9-KOT (9-LOX

derivatives) on ET signalling differed from that of 9-Oxo-C₉ (which is also produced by the 9-LOX oxylipin pathway), supported our early results suggesting functional specialization of oxylipins according to their molecular structure rather than the specific biochemical pathway (9-LOX, 13-LOX or α -DOX) mediating their production (Vellosillo *et al.*, 2007).

The fact that application of Trolox, a tocopherol analogue with lipophilic anti-oxidant activity (Girotti, 1998), impaired the effects of 9-HOT (Figure 3), suggested involvement of oxidative stress and lipid peroxidation in the 9-HOT response. Moreover, the fact that 9-HOT enhanced ROS production was indicative of a model in which 9-HOT potentiates activation of the 9-LOX pathway in a positive feedback loop. Additionally, these results suggest participation of the 9-LOX oxylipin pathway in controlling oxidative stress and lipid peroxidation. This is supported by the results of transcriptional analyses of wild-type plants, the *lox1lox5* mutant (lacking 9-LOX activity) and the *eto1-14* mutant (disrupting 9-HOT signalling) after application of RB, a generator of singlet oxygen with strong lipid peroxidation potential (Przybyla *et al.*, 2008; Triantaphylidès and Havaux, 2009). The fact that, of the 1832 genes responding to RB in wild-type plants, 51 and 12% showed altered expression in *lox1lox5* and *eto1-14*, respectively, demonstrated involvement of the 9-LOX and ET pathways in the response of plants to singlet oxygen (Figure 4). In addition, the higher levels of ion leakage (an indicator of cellular damage) and increased chlorosis in tissues of RB-treated *lox1lox5* and *eto1-14* mutants than in RB-treated wild-type plants (Figures 5 and 6) confirmed that both mutants are defective in signalling an appropriate response to singlet oxygen, and revealed their diminished ability to control this type of oxidative damage. As reported previously (Sattler *et al.*, 2004), tocopherols (vitamin E) quench singlet oxygen in a highly efficient manner, and their activity to limit lipid peroxidation is essential for germination and early plant growth. Therefore, the enhanced damage in RB-treated *lox1lox5* and *eto1-14* mutants relative to control plants may result, at least in part, from failure to control lipid peroxidation after application of singlet oxygen.

Further studies in adult plants revealed the participation of 9-LOX and ET in the defence of plants against virulent bacteria (Figure 7). Differing actions of the 9-LOX and ET pathways in this response were deduced from the enhanced susceptibility to *Pst* DC3000 in *lox1lox5* and *eto1-14* mutants compared with wild-type plants. The fact that the double *lox1lox5* mutant supported approximately tenfold increased bacterial growth compared with the approximately fivefold increase found in the *Arabidopsis lox1* mutant (Hwang and Hwang, 2010, and our unpublished data, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain) indicates the positive contribution of the two 9-LOX genes, *LOX1* and *LOX5*, to plant defence. In line with these results, the enhanced suscepti-

bility of the *eto1-14* plants could be, at least in part, a consequence of the antagonistic action of ET on 9-HOT signalling, and is in agreement with a study by Chen *et al.* (2009) showing that constitutive ET production decreased defence gene expression. In addition, recent reports revealed a positive role for ET as a regulator of pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity (Boutrot *et al.*, 2010; Mersmann *et al.*, 2010), indicating that ET may exert different actions in response to pathogens that are operative at various layers of defence.

The results showing increased H₂O₂ accumulation in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants after bacterial inoculation compared with wild-type plants (Figure 7c) are indicative of an alteration in the regulation of ROS. Moreover, the enhanced accumulation of MDA, a product of lipid peroxidation, in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants after bacterial infection (Figure 8) is probably a reflection of a failure in signalling responses to highly reactive oxygen species, such as hydroxyl radicals (OH[•]) and singlet oxygen (¹O₂). The fact that the *lox1 lox5* and *eto1-14* mutations may affect distinct types of ROS could be indicative of a broad regulatory role of the 9-LOX oxylipin and ET pathways on various ROS signalling pathways. Alternatively, the alterations observed could be a consequence of the interaction between distinct ROS signalling pathways as has been shown by Laloi *et al.* (2007). Independently of this, the data described suggest actions of the 9-LOX and ET pathways in the control of oxidative stress during the response to pathogen infection, in which the production of ROS must be tightly regulated to achieve full resistance and plant survival.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana wild-type, transgenic lines *35S:EIN3-GFP* and *EBS:GUS*, and *ein2-5* mutants were derived from ecotype Columbia (Col-0). The homozygous double insertion mutant *lox1 lox5* was generated by crossing individual mutants and identified by PCR as described in Vellosillo *et al.* (2007). For *in vitro* analyses, vernalized seeds were grown in Petri dishes containing Murashige & Skoog (MS) medium, pH 6.0, 1.5% w/v sucrose and 1.5 or 0.8% w/v agar (Bacto Agar; Becton-Dickinson, <http://www.bd.com>) for vertical or horizontal plates, respectively. Growth conditions were 16 h light/8 h dark at 22°C, with 250 μE m⁻² sec⁻¹ fluorescent illumination. Specific compounds were added to molten medium (50°C) at the indicated concentrations. Freshly prepared plates were always used to avoid product breakdown or instability. Phenotypes were observed 6 days after seed germination in approximately 15 independent seedlings (see Figure S9 as an example), and in at least three independent experiments. For *in planta* analyses, vernalized seeds were sown on soil, and grown in a growth chamber at 22°C and 70% relative humidity under a 14 h light/10 h dark photoperiod with 250 μE m⁻² sec⁻¹ fluorescent illumination.

Preparation of oxylipins

9(S)-hydroxy-10(E),12(Z),15(Z)-octadecatrienoic acid (9-HOT) was prepared by stirring linolenic acid (120 mg) at 23°C with *Solanum*

lycopersicum whole homogenate under an atmosphere of oxygen, essentially as described by Matthew *et al.* (1977). The product was subjected to open-column silicic acid chromatography to provide >95% pure 9(S)-hydroperoxyoctadecadienoic acid (HPOD) (70 mg). Treatment with sodium borohydride (100 mg) in methanol (10 ml) at 0°C for 30 min followed by preparative straight-phase HPLC using 2-propanol/hexane/acetic acid (2.2:97.8:0.005 v/v/v) as the mobile phase produced >99% pure 9-HOT as a colorless oil (44 mg; yield 35% from linolenic acid).

9-keto-10(E),12(Z),15(Z)-octadecatrienoic acid (9-KOT) was prepared by treating 9(S)-HPOD (125 mg) at 0°C for 5 min with a mixture of acetic anhydride (3 ml) and pyridine (2.4 ml). Water (1.5 ml) was added, and the mixture was stirred at 23°C for 60 min. Purification by straight-phase HPLC using 2-propanol/hexane/acetic acid (1.1:98.9:0.005 v/v/v) as the mobile phase afforded >97% pure 9-KOT as a white solid (91 mg; yield 77%).

9-oxononanoic acid (9-Oxo-C₉) was prepared by stirring 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid (2 g) in acetone (100 ml), water (25 ml) and acetic acid (5 ml) with sodium periodate (4 g) at 23°C under argon for 90 min. The product was subjected to silica gel chromatography, followed by crystallization from hexane at 4°C, producing >98% pure 9-Oxo-C₉ as a white solid (0.41 g; yield 38%).

Assay of 9-LOX activity

Roots (0.2 g) or liquid nitrogen-powderized leaves (0.5 g) were homogenized using an Ultra-Turrax disperser (IKA-Werke, <http://www.ika.net>) at 0°C in 3 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.7, containing 300 μM α-linolenic acid. The homogenates were stirred at 23°C for 20 min, and subsequently treated with 6 ml methanol containing 75 μg butylated hydroxytoluene anti-oxidant and 47.8 nmol of [17,17,18,18,18-²H₅]-9-HOT as an internal standard. After centrifugation at 700 g, oxylipins were isolated by extraction with diethyl ether. The products were derivatized by methyl esterification and trimethylsilylation and analysed by GC-MS as previously described (Hamberg *et al.*, 2003). The instrument was operated in scan mode for profiling of oxylipins and in selected ion monitoring mode for determination of levels of 9-HOT.

Histochemistry

Detection of callose and superoxide production was performed as described by Vellosillo *et al.* (2007). Production of H₂O₂ was visualized in detached leaves stained with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com/>) as described by Thordal-Christensen *et al.* (1997) and Moreno *et al.* (2005). For cell death analyses, leaves were stained as described by Hamberg *et al.* (2003). *In situ* localization of GUS activity was performed as described by Malamy and Benfey (1997).

Protein extraction and Western blot

Six-day-old seedlings of *35S:EIN3-GFP* transgenic plants were transferred to liquid MS medium and subjected after 24 h to ACC (2 μM) treatment alone or in combination with 25 μM of the oxylipins (9-HOT, 9-KOT, JA or 9-Oxo-C₉). Protein extracts were prepared by grinding seedlings to a fine powder in liquid nitrogen, and extracted using buffer containing 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF and 1× complete protease inhibitor cocktail (Roche, <http://www.roche.com>). Supernatants were obtained by centrifugation for 10 min at 3000 g, separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting. Immunoblot assays were performed as described by Sanz *et al.* (1998) using anti-*Arabidopsis* α-EIN3 antibody (Guo and Ecker,

2003) or anti-Arabidopsis α -RPT5 (19S regulator ATPase subunit Rpt5) antibody (Kwok *et al.*, 1999) as a loading control.

Plant treatments and gene expression analyses

For chemical treatment, RNA was prepared from 12-day-old seedlings grown on vertical MS-containing plates. Seedlings were covered with liquid MS medium (used as a control), or with liquid MS containing 9-HOT (25 μ M) or RB (10 μ M). Two square plates with 30–40 seedlings per plate were pooled for each time point examined. For studies of gene expression after bacterial inoculation, the abaxial side of rosette leaves of 4-week-old plants were injected with a bacterial suspension (10^6 cfu ml⁻¹). In all cases, tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Total RNA was isolated as described by Logemann *et al.* (1987). RNA gel blots were performed as described by Sambrook and Russell (2001), transferred to Hybond N membranes (GE Healthcare, <http://www.gehealthcare.com>), and hybridized to single-stranded riboprobes according to standard procedures. In all cases, gene expression was analysed in at least three independent experiments. Radioactive probes were prepared for *LOX1* (At1g55020), *LOX5* (At3g22400), *POX* (At5g22140), *ABC* (At1g15520), *FOX* (At1g26380) and *PR1* (At2g14160). The amount of loaded RNA was verified by addition of ethidium bromide to the samples and photography under UV light after electrophoresis, followed by hybridization to an rRNA as described by Vellosillo *et al.* (2007).

Microarray hybridization and analysis

For microarray analyses, RNA was extracted 3 h after treatment and purified using an RNeasy mini kit (Qiagen, <http://www.qiagen.com/>). RNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (Nanodrop Technology Inc., <http://www.nanodrop.com>), and its quality was assessed using an Agilent 2100 bioanalyser (Agilent Technologies, <http://www.agilent.com>). RNA from four independent biological replicates was prepared and independently hybridized in three independent experiments using slides of Agilent Arabidopsis oligo microarrays $4 \times 44\text{K}$ (reference 021169). Differential expression comparisons were performed as follows: (i) MS-treated wild-type Arabidopsis seedlings versus wild-type seedlings treated with RB-containing MS medium (10 μ M), (ii) RB-treated wild-type seedlings versus RB-treated *lox1 lox5* mutant seedlings, and (iii) RB-treated wild-type seedlings versus RB-treated *eto1-14* mutant seedlings. Details of hybridization and washing of microarrays are given in Appendix S1. Raw and normalized data were deposited in the Array Express data library (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under accession numbers E-MEXP-3009, E-MEXP-3010 and E-MEXP-3011. Significantly up-regulated and down-regulated transcripts obtained for each comparison (with a false discovery rate of 5%) are listed in Tables S1–S4. The fold change representing the differential expression is listed for each probe.

Analysis of gene ontology functional term enrichment

We used the FatiGO application (Al-Shahrour *et al.*, 2004) contained in the suite of web tools Babelomics version 3.2 (Al-Shahrour *et al.*, 2006). The server at the Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, Spain) was used to obtain an overview of the Gene Ontology (GO) functional term enrichment for RB-responsive genes. Hierarchical clustering of significant terms (adjusted *P* value <0.001) was performed using Multiexperiment Viewer (MeV) software version 4.3 (<http://www.tm4.org>) (Saeed *et al.*, 2003).

In vivo analyses of bacterial symptoms and *in vivo* growth curves

The pathogenic bacterial strains used in this study, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the avirulent strain *Pseudomonas* DC3000 *avrRpm1*, were grown overnight at 28°C in Petri plates containing King's medium B. Bacterial inoculation and quantification of bacterial growth were performed as described by De León *et al.* (2002). Data were statistically analysed using Student's *t* test using GRAPHPAD PRISM version 4 (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>). For symptoms tests, at least 20 plants were examined after bacterial infiltration (10^6 cfu ml⁻¹) in three independent experiments. Reported data are means and standard errors of the values obtained in three independent experiments.

Measurement of ion leakage

Cell damage was assayed by measuring ion leakage as described by De León *et al.* (2002). The abaxial side of leaves of 4-week-old plants were injected with 30 μ l Rose Bengal solution (2 μ M). Three leaves were treated per plant. Reported data are means and standard errors of the values obtained in three independent experiments. Data were statistically analysed by Student's *t* test as described above.

Analysis of malondialdehyde by GC-MS

Leaves were infiltrated with suspensions of *Pst* DC3000 *avrRpm1* (10^7 cfu ml⁻¹) or *Pst* DC3000 (10^7 cfu ml⁻¹). Leaf tissue was harvested at 4, 8 and 24 h post-inoculation, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The level of malondialdehyde (MDA) was measured essentially as described by Cighetti *et al.* (2002), using methyl malondialdehyde as an internal standard and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). Data were statistically analysed by Student's *t* test as described above. A detailed description of the extraction and quantification procedures is given in Appendix S2.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to J. Paz-Ares, R. Solano and C. Flors (School of Chemistry and Collaborative Optical Spectroscopy, University of Edinburgh, UK) for critical reading of the manuscript, J. Ecker (Genomic Analysis Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA) for *35S:EIN3-GFP* seeds and the anti-EIN3 antibodies, J. Alonso for *EBS:GUS* seeds, M. Berrocal for initial analyses of *noxy22*, R. Piqueras for help with *in vitro* plant growth, I. Poveda for expert photography, and G. Hamberg for preparation of oxylipins. Microarray analyses were performed at the genomic facilities of the Centro Nacional de Biotecnología (<http://www.cnb.uam.es/~genomica/>). This work was supported by grants BIO2009-09670, EUI2008-03698 and CSD2007-00057 from the Ministry of Science and Innovation).

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

- Figure S1.** Phenotypic response of *noxy6* and *noxy22* to oxylipins.
- Figure S2.** Response of *noxy6* and *noxy22* to 9-HOT.
- Figure S3.** Map-based cloning of *noxy6* and *noxy22*.
- Figure S4.** Phenotype of dark-grown wild-type, *ctr1-15* and *eto1-14* seedlings.
- Figure S5.** Expression 9-HOT-responsive genes in wild-type and *ein2-5* seedlings.

Figure S6. Phenotype of wild-type seedlings grown in the presence of redox-active compounds.

Figure S7. Scheme of genomic structures of LOX1 and LOX5 and position T-DNA insertions.

Figure S8. Comparison of transcriptional profiles from RB-treated wild-type seedlings and *flu* mutants.

Figure S9. Phenotypes of wild-type seedlings grown in vertically oriented plates.

Figure S10. Calibration curve for determination of MDA.

Table S1. Genes differentially expressed after RB treatment.

Table S2. Genes responding to RB treatment whose expression is affected by the *lox1 lox5* and *eto1-14* mutations.

Table S3. Genes whose expression changed after RB treatment in *lox1 lox5* and *eto1-14* mutants.

Table S4. GO term enrichment of RB-responsive genes.

Appendix S1. Details of microarray hybridization.

Appendix S2. Details of malonaldehyde determination.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

REFERENCES

- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, 2148–2152.
- Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R. and Dopazo, J. (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, **20**, 578–580.
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tárraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J.M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J. and Dopazo, J. (2006) BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* **34**, W472–W476.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström, A., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Göbel, C., Feussner, I. and Ellerstrom, M. (2006) Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *J. Biol. Chem.* **281**, 31528–31537.
- Andreou, A., Brodhun, F. and Feussner, I. (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* **48**, 148–170.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M. and Castresana, C. (2009a) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, **44**, 85–95.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Rodríguez, M.J., López, M.A., Ponce de León, I., Hamberg, M. and Castresana, C. (2009b) Functional analysis of α -DOX2, an active α -dioxygenase critical for normal development in tomato plants. *Plant Physiol.* **151**, 1421–1432.
- Boutrot, F., Segonzac, C., Chang, K.N., Qiao, H., Ecker, J.R., Zipfel, C. and Rathjen, J.P. (2010) Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 14502–14507.
- Browse, J. (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 183–205.
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E.E. and Dong, X. (2011) *Arabidopsis lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Mol. Biol.* **75**, 25–33.
- op den Camp, R.G., Przybyla, D., Ochsnein, C. et al. (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**, 2320–2332.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S. et al. (2009) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 2527–2540.
- Cighetti, G., Allevi, P., Anastasia, L., Bortone, L. and Paroni, R. (2002) Use of methyl malondialdehyde as an internal standard for malondialdehyde detection: validation by isotope-dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Clin. Chem.* **48**, 2266–2269.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826–833.
- De León, I.P., Sanz, A., Hamberg, M. and Castresana, C. (2002) Involvement of the *Arabidopsis* α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J.* **29**, 61–62.
- Durand, T., Bultel-Ponce, V., Guy, A., Berger, S., Mueller, M.J. and Galano, J.M. (2009) New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. *Lipids*, **44**, 875–888.
- Farmer, E.E. and Davoine, C. (2007) Reactive electrophile species. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 380–386.
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T.S., Laloi, C., Minkov, I.N., Shulaev, V., Apel, K., Inzé, D., Mittler, R. and Van Breusegem, F. (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**, 436–445.
- Gao, X., Starr, J., Göbel, C., Engelberth, J., Feussner, I., Tumlinson, J. and Kolomietz, M. (2008) Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **21**, 98–109.
- Girotti, A.W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39**, 1529–1542.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205–227.
- Göbel, C., Feussner, I. and Rosahl, S. (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *J. Biol. Chem.* **278**, 52834–52840.
- Guo, H. and Ecker, J.R. (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, **115**, 667–677.
- Guzmán, P. and Ecker, J.R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, **2**, 513–523.
- Hamberg, M. (2011) Stereochemistry of hydrogen removal during oxygenation of linoleic acid by singlet oxygen and synthesis of 11(S)-deuterium-labeled linoleic acid. *Lipids*, **46**, 201–206.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodríguez, M.J., Calvo, A.P. and Castresana, C. (2003) Activation of the fatty acid α -dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylipins protecting against cell death. *J. Biol. Chem.* **278**, 51796–51805.
- Hamberg, M., Ponce de León, I., Rodríguez, M.J. and Castresana, C. (2005) α -dioxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 169–174.
- Hwang, I.S. and Hwang, B.K. (2010) The pepper 9-lipoxygenase gene *CaLOX1* functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol.* **152**, 948–967.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. and Ecker, J.R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, **72**, 427–441.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. and Takabayashi, J. (2008) Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, **69**, 2127–2132.
- Koo, A.J. and Howe, G.A. (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, **70**, 1571–1580.
- Kwok, S.F., Staub, J.M. and Deng, X.W. (1999) Characterization of two subunits of *Arabidopsis* 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J. Mol. Biol.* **285**, 85–95.
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I. and Apel, K. (2007) Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 672–677.
- Loeffler, C., Berger, S., Guy, A., Durand, T., Bringmann, G., Dreyer, M., von Rad, U., Durner, J. and Mueller, M.J. (2005) B1-phytoprostanins trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol.* **137**, 328–340.
- Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16–20.
- López, M.A., Bannenberg, G. and Castresana, C. (2008) Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 420–427.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124**, 33–44.

- Mandaokar, A. and Browse, J. (2009) MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **149**, 851–862.
- Matthew, J.A., Chan, H.W. and Galliard, T. (1977) A simple method for the preparation of pure 9-D-hydroperoxide of linoleic acid and methyl linoleate based on the positional specificity of lipoxygenase in tomato fruit. *Lipids*, **12**, 324–326.
- Mersmann, S., Bourdais, G., Rietz, S. and Robatzek, S. (2010) Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol.* **154**, 391–400.
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rustérucchi, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inzé, D., Van Breusegem, F. and Triantaphylidès, C. (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **138**, 1516–1526.
- Moreno, J.I., Martín, R. and Castresana, C. (2005) Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J.* **41**, 451–463.
- Mosblech, A., Feussner, I. and Heilmann, I. (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 511–517.
- Mueller, M.J. and Berger, S. (2009) Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry*, **70**, 1511–1521.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J. and Berger, S. (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell*, **20**, 768–785.
- Obregón, P., Martín, R., Sanz, A. and Castresana, C. (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Mol. Biol.* **46**, 67–77.
- Onkokesung, N., Gális, I., von Dahl, C.C., Matsuoka, K., Saluz, H.P. and Baldwin, I.T. (2010) Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant Physiol.* **153**, 785–798.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G. et al. (2005) Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.* **139**, 1902–1913.
- Przybyla, D., Göbel, C., Imboden, A., Hamberg, M., Feussner, I. and Apel, K. (2008) Enzymatic, but not non-enzymatic, ¹O₂-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the EXECUTER1-dependent stress response program in the *flu* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **54**, 236–248.
- Rancé, I., Fournier, J. and Esquerré-Tugayé, M.T. (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 6554–6559.
- Rustérucchi, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P. et al. (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **274**, 36446–36455.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J. et al. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, **34**, 374–378.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanz, A., Moreno, J.I. and Castresana, C. (1998) PLOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell*, **10**, 1523–1537.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M. and DellaPenna, D. (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, **16**, 1419–1432.
- Savchenko, T., Walley, J.W., Chehab, E.W., Xiao, Y., Kaspi, R., Pye, M.F., Mohamed, M.E., Lazarus, C.M., Bostock, R.M. and Dehesh, K. (2010) Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *Plant Cell*, **22**, 3193–3205.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V. and Alonso, J.M. (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *Plant Cell*, **19**, 2169–2185.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browne, J. and Farmer, E.E. (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 12837–12842.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**, 1187–1194.
- Triantaphylidès, C. and Havaux, M. (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci.* **14**, 219–228.
- Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C. and Grant, M. (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 1075–1080.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M.A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M. and Castresana, C. (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, **19**, 831–846.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chételat, A. and Farmer, E.E. (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant J.* **24**, 467–476.
- Wang, K.L., Yoshida, H., Lurin, C. and Ecker, J.R. (2004) Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature*, **428**, 945–950.

