

Tesis Doctoral

Estudio de los mecanismos de respuesta a la infección causada por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* en la leguminosa modelo *Lotus japonicus*

Bordenave, César Daniel

2015-12-15

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bordenave, César Daniel. (2015-12-15). Estudio de los mecanismos de respuesta a la infección causada por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* en la leguminosa modelo *Lotus japonicus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bordenave, César Daniel. "Estudio de los mecanismos de respuesta a la infección causada por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* en la leguminosa modelo *Lotus japonicus*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-12-15.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Estudio de los mecanismos de respuesta a la infección causada por
la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* en la leguminosa
modelo *Lotus japonicus*.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. César Daniel Bordenave

Director de Tesis: Dra. Ana Bernardina Menéndez

Director Asistente de Tesis: Dr. Andrés Gárriz

Consejero de Estudios: Dra. Ana Bernardina Menéndez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología del Estrés Abiótico en Plantas, Unidad de Biotecnología I
"Dr. Rodolfo A. Ugalde", Instituto Tecnológico Chascomús, CONICET-UNSAM.

Buenos Aires, 2015.

Fecha de defensa: 15 de diciembre de 2015.

Estudio de los mecanismos de respuesta a la infección causada por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* en la leguminosa modelo *Lotus japonicus*.

1 Resumen

Lotus japonicus es una legumbre modelo ampliamente utilizada para el estudio de procesos importantes como la nodulación y la respuesta al estrés salino. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la respuesta defensiva de esta especie contra microorganismos patógenos. Comprender como se protege esta especie modelo contra patógenos podría ayudar a desarrollar cultivares más tolerantes en especies de *Lotus* de relevancia agronómica, así como también en otros géneros de legumbres.

Para poder dilucidar los mecanismos de defensa más importantes en esta leguminosa, en este trabajo se exploraron las principales respuestas de dos ecotipos fenotípicamente contrastantes, Miyakojima MG-20 y Gifu B-129, a la inoculación con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Las respuestas de defensa activadas en ambos ecotipos fueron considerablemente diferentes. Así, en Miyakojima MG-20 se observó una interacción compatible caracterizada por una rápida multiplicación de la bacteria, acompañada por un descenso en la eficiencia del fotosistema II, la aparición de clorosis, desecación y defoliación, así como un moderado pero sostenido aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (EROs). Estos fenómenos sólo fueron observados en los folíolos inoculados y no afectaron el desarrollo normal de la planta. Por su parte, en Gifu B-129 la interacción fue incompatible, los síntomas fueron en general imperceptibles, la bacteria fue incapaz de multiplicarse en los tejidos de la planta y existió un aumento notable de las EROs durante las primeras horas luego de la inoculación con la bacteria.

A partir de estudios transcripcionales utilizando microarreglos de ADN, pudieron identificarse alrededor de 3000 genes regulados diferencialmente frente a la inoculación con la bacteria en el ecotipo Miyakojima MG-20 y alrededor de 300 genes en el ecotipo Gifu B-129. Además, se comparó la expresión génica basal de estas líneas, observándose diferencias en genes relacionados con estrés biótico y abiótico, metabolismo hormonal, estado redox y procesos fotosintéticos. Por otro lado se realizó un estudio del metaboloma, en el cual también se observó un

comportamiento contrastante entre ambos ecotipos, detectándose un conjunto diferente de metabolitos que se modifican frente a la inoculación con la bacteria. Integrando los resultados del transcriptoma y del metaboloma se pudieron identificar numerosas vías metabólicas afectadas de manera diferencial en respuesta al ataque bacteriano, lo que permite explicar las diferencias de comportamiento observadas entre ambos ecotipos. Entre estas vías se destacan el sistema de antioxidantes (ascorbato y glutatión), el metabolismo del ácido γ -aminobutírico, la síntesis y degradación de componentes de la pared celular, la síntesis y degradación lípidos y el metabolismo hormonal.

Posteriormente, sobre la base del análisis transcriptómico se seleccionaron distintas líneas mutantes insercionales del ecotipo Gifu B-129 para un conjunto de genes que podrían jugar un rol importante en la defensa vegetal. La mayoría de tales líneas demostró una tolerancia equivalente a la observada en la línea salvaje, sugiriendo que los genes mutados no son esenciales en la respuesta de defensa en estos ecotipos. Sin embargo, una línea incapaz de expresar el gen de la enzima Poliamina Oxidasa I demostró una mayor tolerancia durante la patogénesis, lo que indicaría que la expresión de este gen afecta negativamente la respuesta defensiva de la planta.

Este trabajo permitió describir de manera global las principales vías metabólicas reguladas en dos ecotipos de *L. japonicus* durante la respuesta a la bacteria *P. syringae* pv. tomato DC3000. Las diferencias entre las respuestas inducidas en el ecotipo Gifu B-129 (interacción incompatible) con las observadas en el ecotipo Miyakojima MG-20 (interacción compatible) permitieron discernir cuales son los mecanismos de defensa más efectivos entre los presentados por los ecotipos evaluados. Estos resultados podrían ser extrapolados a otras especies de leguminosas de interés agronómico.

1.1 Palabras clave

Lotus japonicus, *Pseudomonas syringae*, Estrés Biótico, Transcriptómica, Metabolómica, *Lore1*, Poliaminas

Study of the responses to the infection caused by the phytopathogenic bacteria
Pseudomonas syringae in the model legume *Lotus japonicus*.

2 Abstract

Lotus japonicus is a model legume widely used for the study of important processes such as nodulation and response to salt stress. However, there are few works focusing on the defensive response of this species against pathogenic microorganisms. Understanding how this model species responds against plant pathogens could help to develop more tolerant cultivars in agronomically important *Lotus* species as well as in other legume genera.

In order to elucidate the most important defensive mechanisms in this legume, in this work it was explored the main responses of two phenotypically contrasting *L. japonicus* ecotypes, Miyakojima MG-20 and Gifu B-129, to the inoculation with the bacterial species *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. The defensive responses activated in both ecotypes were considerably different. Thus, in Miyakojima MG-20 was observed a compatible interaction, characterized by a rapid multiplication of the bacteria in infiltrated tissues, along with a decrease in the efficiency of the photosystem II, the appearance of chlorosis, desiccation and defoliation, as well as a moderate but steady increase in the levels of reactive oxygen species (ROS). All these symptoms were observed only in the inoculated leaflets, and never affected the normal development of the plant. In contrast, the interaction was incompatible in Gifu B-129, where symptoms were rather imperceptible, the bacterium was unable to multiply in leaf tissues, and a critical increase in ROS accumulation was observed during the first few hours after bacterial infiltration.

Based on DNA microarrays, were identified about 3,000 differentially regulated genes, upon infiltration with the bacteria in Miyakojima MG-20, and about 300 genes of this type in Gifu B-129. Moreover, it was possible to compare the basal gene expression between these lines, which showed differences in genes related to biotic and abiotic stresses, hormonal metabolism, redox state, and photosynthetic processes. A metabolomic study on these samples was also performed, revealing that a different set of metabolites in each ecotype was modified in response to the bacteria. By integrating the transcriptomic and metabolomic data, several metabolic pathways affected differentially in response to bacterial attack were identified, which helps to explain the observed differences in behavior between both ecotypes. Among

these pathways stand out those of the antioxidants system (ascorbate and glutathione), the γ -aminobutyric acid metabolism, the synthesis and degradation of cell wall components, the synthesis and degradation of lipids, and hormone metabolism.

Finally, several insertional mutants of the Gifu B-129 ecotype were selected for a set of genes that could play an important role in plant defense. Most of them showed a level of tolerance to the bacteria similar to that of the wild type, suggesting that these genes are not essential in the defense response in these ecotypes. However, one line defective in the Polyamine Oxidase I gene showed higher tolerance, indicating that the expression of this gene during the plant response to the bacterial attack negatively affects the defense of the plant.

This work globally describes the main metabolic pathways regulated in response to *P. syringae* pv. tomato DC3000 in two ecotypes of *L. japonicus*. The differences between the responses triggered in the ecotype Gifu B-129 (incompatible interaction) and Miyakojima MG-20 (compatible interaction) let us to unravel the most effective defense mechanisms among those presented by the evaluated ecotypes. These results could be extrapolated to other agronomical important legumes.

2.1 Keywords

Lotus japonicus, *Pseudomonas syringae*, Biotic Stress, Transcriptomics, Metabolomics, *Lore1*, Polyamines

3 Abreviaturas

AA: ascorbato

AAO: aldehído oxidasa

ABS: flujo energético absorbido

ABA: ácido abscísico

ACO: 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa

ACS: aminociclopropano-1-carboxilato sintasa

AJ: ácido jasmónico

AJ-Ile: AJ-isoleucina

AOC: aleno óxido cilasa

AOS: aleno óxido sintasa

APX: ascorbato peroxidasa

BHH: algoritmo de búsqueda bidireccional del mejor resultado (*Bi-directional Best Hit*)

CAD: cadaverina

CAT: catalasa

CNED: 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa

CS: sección excitada (*cross section*)

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DA-DCFH: diacetato de la 2,7-diclorodihidrofluoresceína

DAP: 1,3 diaminopropano

DCFH: 2,7-diclorodihidrofluoresceína

DEG: deshidrogenasa de alcohol de cadena corta

DFC: 2,7-diclorofluoresceína

DHA: dehidro ascorbato

DI: energía disipada

dpi: día(s) posterior(es) a la inoculación

EC number: *Enzyme Commission number*

EORO: especie reactiva del oxígeno

EST: etiqueta de secuencia expresada (*Expressed Sequence Tag*)

ET: etileno

ET: flujo de transporte electrónico (*electron transport*)

ETI: inmunidad disparada por efectores (*effector triggered immunity*)

EtOH: etanol

FC: veces de cambio (*fold change*)
fdr: tasa de descubrimiento falsa (*false discovery rate*)
Fm: fluorescencia máxima
Fv/Fm: rendimiento cuántico máximo
GABA: ácido γ -aminobutírico (*gamma aminobutyric acid*)
GC-MS: cromatografía gaseosa (*gas chromatography*) acoplada a espectrometría de masas
Gifu: *L. japonicus* ecotipo Gifu B-129
GMD: *Golm metabolome database*
GR: glutatión reductasa
GRX: glutarredoxina
GSH: glutatión
GSSG: glutatión di-sulfuro
GST: glutatión S-transferasa
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography*)
HR: reacción hipersensible (*hypersensitive reaction*)
hs, min, sec: horas, minutos y segundos
HTD: heptanodiamina
IAA: ácido 3-indolacético (*indole acetic acid*)
ICS: isocorismato sintasa
LOX: lipoxigenasa
LRR-LRK: receptor-quinasa (*kinase*) con repeticiones ricas en leucinas
MCP: muerte celular programada
MDHA: monodehidro ascorbato
MeJA: metil-jasmonato
MG-20: *L. japonicus* ecotipo Miyakogima MG-20
MS: espectrometría de masas (*mass spectrometry*)
MSTFA: N-metil-N-[trimetilsilil]trifluoroacetamida
NB-LLR: proteína con repeticiones ricas en leucina (*leucine rich*) y sitios de unión a nucleótidos (*nucleotide binding*)
OPR: *12-oxophytodienoate-10,11-reductase*
PA: poliamina
PAL: Fenilalanina (*phenylalanine*) amonio-liasa
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated*)

molecular patterns)

PAO: poliamina oxidasa

PCA: análisis de los componentes principales (*principal components analysis*)

PI: índice de desempeño (*performance index*)

P_Q: plastoquinona

PR: proteínas relacionadas a patógenos

PRDX: peroxirredoxina

PRR: receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*)

PSII: fotosistema II

PTI: inmunidad disparada por PAMP (*PAMP-triggered immunity*)

Pto: *P. syringae* pv. tomato DC3000

PUT: putrescina

Q_A: quinona A

Q_B: quinona B

R: proteína de resistencia

RC: centro de reacción (*reaction center*)

RILs: líneas recombinantes endocruzadas (*recombinant inbreed lines*)

rpm: revoluciones por min

RR: respuesta relativa (*response ratio*)

RT-PCR: transcripción reversa (*reverse transcription*) seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*polimerase chain reaction*)

SA: ácido salicílico

SAR: inmunidad sistémica adquirida (*systemic acquired immunity*)

SOD: la superóxido dismutasa

SPD: espermidina

SPM: espermina

SSTIII: sistema de secreción de tipo III

SUAR: *small auxin-up RNA*

TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos (*tricarboxylic acids cycle*).

TMS: grupo trimetilsililo, (CH₃)₃SiOR

TR: flujo energético atrapado (*trapped*)

TRX: tiorredoxina

UFC: unidad formadora de colonias

VIGS: silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

ZEP: zeaxantina epoxidasa

4 Índice de contenidos

1	Resumen.....	2
1.1	Palabras clave	3
2	Abstract.....	4
2.1	Keywords	5
3	Abreviaturas.....	6
4	Índice de contenidos	9
5	Introducción.....	13
5.1	La interacción planta-patógeno.....	13
5.2	La importancia de las leguminosas	19
5.3	La leguminosa modelo <i>L. japonicus</i>	21
5.4	Características de la bacteria fitopatógena <i>P. syringae</i>	23
5.5	Antecedentes en relación a la interacción <i>L. japonicus</i> - <i>P. syringae</i>	24
6	Hipótesis y objetivo general	25
7	Capítulo 1: Evaluación de la resistencia y caracterización fisiológica de la respuesta de los ecotipos MG-20 y Gifu a la inoculación con <i>Pto</i>	26
7.1	Introducción	26
7.1.1	Principios básicos de la fluorescencia directa de la clorofila	27
7.2	Objetivo particular	29
7.3	Materiales y métodos	29
7.3.1	Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	29
7.3.2	Preparación del inóculo bacteriano.....	30
7.3.3	Método de inoculación.....	30
7.3.4	Diseño experimental	30
7.3.5	Evaluación del área foliar afectada.....	31
7.3.6	Evaluación de la proliferación del patógeno	31
7.3.7	Detección de especies reactivas del oxígeno.....	31
7.3.8	Detección de compuestos fenólicos	32
7.3.9	Detección de calosa	32
7.3.10	Estudio de la fluorescencia directa de la clorofila	33
7.4	Resultados	34
7.4.1	Evaluación de los síntomas presentados por <i>L. japonicus</i> frente a <i>Pto</i>	34
7.4.2	Proliferación de <i>Pto</i> en tejidos de <i>L. japonicus</i>	36
7.4.3	Producción de especies reactivas del oxígeno en <i>L. japonicus</i> durante	

la interacción con <i>Pto</i>	37
7.4.4 Estudio de la fluorescencia directa de la clorofila en la interacción <i>L. japonicus</i> - <i>P. syringae</i>	38
7.5 Discusión	42
8 Capítulo 2: Estudio del transcriptoma y metaboloma de los ecotipos MG-20 y Gifu de <i>L. japonicus</i> durante la interacción con <i>Pto</i>	47
8.1 Introducción	47
8.2 Objetivo particular	50
8.3 Materiales y métodos	50
8.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	50
8.3.2 Preparación del inóculo bacteriano.....	50
8.3.3 Método de inoculación.....	50
8.3.4 Diseño experimental	50
8.3.5 Extracción del ARN.....	51
8.3.6 Análisis del transcriptoma	51
8.3.7 RT-PCR cuantitativa	52
8.3.8 Extracción de metabolitos.....	53
8.3.9 Derivatización	54
8.3.10 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	54
8.3.11 Identificación de metabolitos.....	54
8.3.12 Cuantificación de metabolitos	55
8.3.13 Análisis de correlaciones	55
8.4 Resultados	55
8.4.1 Análisis transcriptómico de los ecotipos MG-20 y Gifu frente a la inoculación con la bacteria fitopatógena <i>Pto</i>	55
8.4.1.1 Validación de los resultados del análisis de los microarreglos con la técnica de RT-PCR	58
8.4.1.2 Clasificación funcional de los genes regulados en <i>L. japonicus</i> frente a la inoculación con <i>Pto</i>	58
8.4.1.3 Genes relacionados a la percepción del patógeno y señalamiento de las vías de defensa.....	62
8.4.1.4 Genes de respuesta a estrés abiótico	66
8.4.1.5 Genes relacionados al estado redox celular	68
8.4.1.6 Regulación de la expresión génica	70

8.4.1.7	Dergradación de proteínas.....	74
8.4.1.8	Metabolismo Hormonal	75
8.4.1.8.1	Ácido salicílico	75
8.4.1.8.2	Ácido jasmónico.....	79
8.4.1.8.3	Etileno.....	81
8.4.1.8.4	Ácido Abscísico.....	82
8.4.1.8.5	Auxinas	84
8.4.1.9	Fotosíntesis.....	85
8.4.1.10	Comparación entre los transcriptomas basales de los ecotipos MG-20 y Gifu	89
8.4.2	Análisis metabolómico de los ecotipos MG-20 y Gifu frente a la inoculación con la bacteria fitopatógica <i>Pto</i>	92
8.4.2.1	Análisis de correlaciones	98
8.4.2.2	Aminoácidos.....	100
8.4.2.3	Glúcidos	102
8.4.2.4	Poliolos	110
8.4.2.5	Ácidos orgánicos.....	113
8.5	Discusión	116
9	Capítulo 3: Caracterización de líneas mutantes de <i>L. japonicus</i> ecotipo Gifu frente a la inoculación con <i>Pto</i>	121
9.1	Introducción	121
9.1.1	Genética reversa mediante la utilización de mutantes insercionales LORE1	121
9.2	Materiales y métodos.....	121
9.2.1	Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	121
9.2.2	Preparación del inóculo bacteriano.....	122
9.2.3	Método de inoculación.....	122
9.2.4	Diseño experimental	122
9.2.5	Extracción de ADN genómico	122
9.2.6	Selección de líneas homocigotas para las inserciones LORE1	123
9.2.7	Evaluación del área afectada.....	124
9.2.8	Evaluación de la proliferación del patógeno	126
9.2.9	Detección de especies reactivas del oxígeno	126
9.2.10	Estudio de la fluorescencia directa de la clorofila	126
9.2.11	Análisis bioinformático del gen chr3.CM0451.450.r2.....	126

9.2.12	Extracción de poliaminas (PAs) libres.....	130
9.2.13	Determinación de los niveles de poliaminas libres	131
9.3	Resultados y Discusión.....	131
9.3.1	Selección de genes de interés.....	131
9.3.2	Screening de la tolerancia a la inoculación con Pto en líneas Gifu mutantes insercionales LORE1	132
9.3.2.1	Porcentaje de área foliar afectada	134
9.3.2.2	Proliferación de Pto en tejidos foliares	134
9.3.3	Caracterización genética y fisiológica de la línea <i>pao1</i>	134
9.3.3.1	Análisis bioinformático del gen chr3.CM0451.450.r2 de <i>L. Japonicus</i>	136
9.3.3.2	Producción de especies reactivas del oxígeno en plantas del ecotipo Gifu mutantes para el gen <i>PAO1</i> durante la interacción con <i>Pto</i>	140
9.3.3.3	Fluorescencia directa de la clorofila	141
9.3.3.4	Determinación de los niveles de poliaminas <i>en L. japonicus</i> durante la interacción con la bacteria fitopatógena <i>Pto</i>	142
10	Conclusiones y consideraciones finales.....	148
11	Bibliografía	154

5 Introducción

5.1 La interacción planta-patógeno

Las enfermedades de las plantas presentan una seria limitación para la productividad agrícola. A lo largo de la historia de la humanidad, los agricultores y los mejoradores de plantas han tenido relativo éxito a la hora de superar la multitud de afecciones que merman la producción de los cultivos, lo que se ha logrado a través del desarrollo de prácticas agronómicas adecuadas, la utilización de pesticidas y el mejoramiento de las especies cultivadas. Sin embargo, muchas de estas soluciones han partido de trabajos empíricos, en los que no fue necesario comprender las interacciones planta-patógeno al nivel de los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares [1]. El conocimiento de los mecanismos básicos de patogénesis permite el desarrollo de líneas tolerantes con mayor aptitud agronómica en ambientes restringidos por la presencia de microorganismos fitopatógenos

Cada organismo es capaz de desarrollarse de un modo óptimo en un acotado rango de condiciones ambientales, mientras que más allá de ese rango se considera que el mismo se encuentra expuesto a estrés [2]. Las plantas, como todos los organismos vivos, se enfrentan a una gran variedad de estreses originados por una modificación persistente de distintas variables ambientales, algunas de origen abiótico, como la luz, la concentración de sales en el suelo, la disponibilidad de nutrientes, el pH, etc., y otras de origen biótico, como la herbivoría, la competencia con otras plantas, ataques por microorganismos patógenos, etc. A diferencia de los animales que pueden escapar a las condiciones adversas trasladándose a mejores ambientes, la naturaleza sésil de las plantas hace imposible que éstas puedan recurrir a esta estrategia, tornando más crítica la necesidad de poder responder adecuadamente al estrés de modo de superar las limitaciones impuestas por el ambiente en el que se desarrollan [3].

Si bien las plantas se encuentran co-existiendo con una gran variedad y cantidad de microorganismos, de los cuales muchos son potencialmente

patógenos [4], las mismas poseen distintos mecanismos de defensa que determinan que el establecimiento de una enfermedad sea una situación relativamente rara [3]. Cuando la enfermedad aparece, los síntomas son muy variados, incluyendo clorosis, desecación, podredumbre, aparición de tumores, alteración de la fuente/destino de metabolitos, entre otros [1]. Muchos de estos síntomas son originados por la acción directa del patógeno, mientras que otros se originan como consecuencia de la activación de los sistemas de defensa de la planta. La magnitud de los síntomas y el desenlace de la enfermedad dependerá de múltiples factores, como el trasfondo genético (tanto del patógeno como del hospedante), la edad y el estado fisiológico de la planta, las condiciones ambientales, la cantidad del inóculo, el método de inoculación, las condiciones de crecimiento del cultivo del microorganismo, el punto en la curva de crecimiento del mismo en la cual se encuentra al momento de inocular, el tejido inoculado, etc. [1].

Los estudios realizados hasta el momento permiten saber que las interacciones entre plantas y microorganismos potencialmente patógenos se encuentran sometidas a una presión de selección recíproca a través del tiempo, en una suerte de co-evolución representada metafóricamente como una “carrera armamentista” [5]. A grandes rasgos, las interacciones entre plantas y microorganismos se suelen clasificar en dos grupos: interacciones compatibles, en las cuales se produce la enfermedad en el hospedante, e interacciones incompatibles, donde el microorganismo es incapaz de superar las defensas de la planta [1]. Es importante destacar que la resistencia a un patógeno no necesariamente está acompañada de la ausencia de síntomas. Fenómenos como la muerte celular programada (MCP) o la reacción hipersensible (HR por su sigla en inglés) son ejemplos ampliamente descritos de síntomas que suelen observarse en interacciones incompatibles [6]. Por su parte, una interacción compatible puede no presentar síntomas detectables hasta etapas tardías en la infección [1]. Que la relación planta-patógeno resulte en una interacción compatible o incompatible depende de la combinación de las estrategias de patogénesis/defensa utilizadas por ambos organismos. Sin embargo, es común que combinaciones similares de ataque-defensa den resultados disímiles. Este contraste suele estar determinado tan solo por

diferencias en el “timing” con el cual se despliegan las respuestas defensivas del hospedante [7].

A veces, ninguna de las variantes genéticas de una especie de microorganismo es capaz de producir enfermedad en ninguna de las variedades o líneas de una determinada especie vegetal. Suele referirse a este tipo de interacción como “no-hospedante” [8]. Por otro lado, cuando al menos una de las variantes genéticas de una especie de microorganismo logra infectar al menos a una variante del hospedante, se considera a la interacción como del tipo “hospedante” [9]. Esta clasificación reconoce los aportes del trasfondo genético tanto del patógeno como del hospedante en el establecimiento de la enfermedad. Las interacciones del tipo no-hospedante en plantas suelen estar caracterizadas por una batería de barreras preformadas, integradas por distintas entidades morfológicas y bioquímicas que están presentes en la planta con anterioridad al ataque por parte del patógeno [10]. Paredes celulares resistentes, presencia de ceras en la cutícula de la hoja y moléculas con actividad anti-microbiana son ejemplos de este tipo de barreras no específicas [8].

En la planta existen mecanismos de respuesta que se activan al estar en contacto con el microorganismo. Esto se debe a la capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) a través de receptores de reconocimiento localizados en la superficie celular (pattern recognition receptors, PRRs) [11]. Así, el reconocimiento dispara distintas respuestas en la planta que, cuando son exitosas, impiden el desarrollo de la infección. La inmunidad disparada por PAMPs (PAMP-triggered immunity, PTI) es la primer línea activa de defensa en el organismo blanco a nivel celular [12], un ejemplo de esto es el reconocimiento de la flagelina de *P. syringae* por parte del receptor FLS2 de *Arabidopsis thaliana* [11, 13]. Las estrategias defensivas que resultan en una interacción no-hospedante, sean barreras preformadas o PTI, son poligénicas y en consecuencia suelen ser durables o estables a través del tiempo [1].

Para lograr superar la PTI, los patógenos suelen inyectar distintas proteínas o efectores en la célula blanco, de modo de inactivar o atenuar los mecanismos de defensa del hospedante [7]. Un ejemplo bien caracterizado es el del efector

AvrPtoB de *P. syringae*, el cual contiene un dominio ligasa E3, cuya función es la degradación del receptor FLS2 de *A. thaliana* [13, 14]. En relación a esto, se ha comprobado que cepas defectivas en AvrPtoB poseen una capacidad limitada de infectar plantas de tomate [15]. A su vez, para contrarrestar la acción de estos efectores, las plantas desarrollaron proteínas de resistencia (R) que actúan detectando al efector o contrarrestando su actividad [16]. Por ejemplo, la proteína Prf de tomate es capaz de censar la presencia de AvrPtoB y desencadenar una serie de respuestas defensivas [17]. Esta respuesta defensiva de la planta es llamada inmunidad disparada por efectores (effector triggered immunity, ETI). Las respuestas de este tipo suelen ser referidas como respuestas gen por gen, en las cuales un gen específico del microorganismo, el cual determina su patogenicidad, tiene su correspondiente gen en el hospedante, que determina resistencia. Este tipo de resistencia, en general monogénica, suele estar caracterizada por ser poco durable [1]. Esto se debe a que el patógeno evoluciona modificando sus efectores, avanzando de esta manera en la “carrera armamentista”.

Uno de los síntomas que suele observarse con mayor frecuencia en interacciones incompatibles es la respuesta hipersensible. Este mecanismo de respuesta está asociado a una temprana producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) [18] acompañada de una rápida MCP restringida al sitio de infección [19]. Otras respuestas activas asociadas a una interacción incompatible son la lignificación, la deposición de calosa y el aumento de glicoproteínas ricas en prolina o hidroxiprolina de la pared celular. Estas modificaciones hacen de dicha pared una barrera mecánica más resistente a la penetración y a la digestión enzimática, retrasando el avance de la infección o acotándola al área inicialmente colonizada por el microorganismo [1].

Las EROs, esencialmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y al anión superóxido (O^{2-}), no solo actúan como moléculas señal activando la HR, sino que también producen muchos y variados efectos tanto en el microorganismo como en la planta [20]. Por ejemplo, originan la oxidación de lípidos de membrana que puede traducirse en MCP [20, 21], activan o reprimen receptores de membrana [22], facilitan el entrecruzamiento de glicoproteínas de pared celular, participan de la degradación de

polisacáridos en el apoplasto, y favorecen el proceso de lignificación a través del entrecruzamiento de sus precursores [23 – 25]. Además, pueden dañar directamente al patógeno al oxidar sus moléculas, comprometiendo así funciones vitales de las células invasoras [26 – 28]. Finalmente, las EROs participan como segundos mensajeros en las vías de señalización disparadas por hormonas de la planta.

La concentración de EROs y el efecto que estas moléculas producirán en una célula depende en gran medida de la presencia de moléculas antioxidantes, tanto en la planta como en el patógeno [29]. Entre estos mecanismos antioxidantes podemos citar a distintas enzimas como la superóxido dismutasa que elimina directamente al superóxido (O_2^-), u otras como la glutatión y ascorbato peroxidasas, las cuales reciclan al glutatión y al ascorbato en el llamado ciclo del ascorbato-glutatión. Esta última vía metabólica puede modular los niveles de EROs para evitar el daño celular, ya sea limitando su ámbito de acción de modo de ser utilizadas solo como señal o bien como oxidantes exclusivamente en el medio extracelular. Por ende, ascorbato y glutatión tienen especial importancia como agentes antioxidantes [30].

El reconocimiento de un patógeno también induce la producción de señales hormonales, destacándose aquellas reguladas por el ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET) [31]. En particular, los niveles de AJ se incrementan significativamente pocas horas después de infectar *A. thaliana* con *P. syringae* [32] y la aplicación exógena de AS induce fluctuaciones en el estado redox de *A. thaliana* [33]. Las investigaciones realizadas en este tema, permiten proponer que existe un alto grado de regulación de estas hormonas, así como también una interdependencia entre ellas mediada por una regulación cruzada o *crosstalk* [34]. Por otro lado, se han caracterizado una serie de genes en la planta que se encuentran regulados positivamente por las señales hormonales disparadas durante la infección. Estos genes codifican para las proteínas relacionadas a patógenos (pathogen-related proteins, PRs) [35]. Por ejemplo, se ha observado que la fluctuación de EROs producida por la aplicación exógena de AS provoca que la proteína NPR1 (*non-expression of PR1*) [36] pase de oligómero a monómero, regulando posteriormente la expresión de genes PR [37]. Las PRs tienen un efecto directo en la defensa

contra microorganismos, aunque la función específica de algunas de estas proteínas aún no ha sido dilucidada. La regulación hormonal de la expresión de genes PR no se encuentra restringida al sitio de infección, sino que se induce en forma sistémica. Este proceso es llamado Inmunidad Sistémica Adquirida (SAR) [38]. Notablemente, la SAR es disparada por un patógeno específico, pero produce resistencia o tolerancia a un amplio espectro de microbios y virus, lo cual puede durar semanas y hasta meses [39].

No todas las estrategias defensivas son efectivas contra todos los patógenos, sino que esto depende en gran medida de la naturaleza del microorganismo. Esto se pone en evidencia al observar el contraste existente entre las respuestas desplegadas por las plantas frente a patógenos de tipo biotrófico y aquellas contra patógenos de tipo necrotrófico [40]. Los patógenos biotróficos suelen llevar a cabo la mayor parte de su ciclo dentro del hospedante sin producir muerte celular, ya que pueden sobrevivir inactivando o escapando a las respuestas defensivas de la planta, o bien evitando ser detectados. Este tipo de patógenos son especialmente efectivos modificando el metabolismo celular y las relaciones fuente/destino de los metabolitos primarios de forma de satisfacer sus necesidades energéticas [41]. Por su parte, los patógenos necrotróficos son más agresivos, generalmente desbordan las defensas celulares por su gran capacidad de multiplicación y producen una gran batería de productos fitotóxicos y enzimas degradativas que dañan los tejidos del hospedante más rápidamente de lo que el hospedante es capaz de responder con sus propios mecanismos antimicrobianos. Estos patógenos utilizan los tejidos degradados como fuente de nutrientes y suelen estar acompañados de otros patógenos oportunistas que agravan la situación de la planta [40]. La acumulación de EROs por parte de la célula vegetal y la consiguiente inducción de MCP puede ser un mecanismo efectivo contra patógenos biotróficos, pero puede contribuir al éxito de un patógeno necrotrófico [42]. El término hemibiotrófico hace referencia a los microorganismos que en las primeras etapas de infección se comportan como biotróficos, necesitan células vivas del hospedante para poder conseguir los recursos necesarios para desarrollarse, pero en las últimas etapas se comportan como necrotróficos, dañando las células con toxinas, degradando las paredes celulares y utilizando los

nutrientes liberados por el tejido necrótico [43]. En el caso de los hemibiotróficos, se pueden disparar diferentes combinaciones de señales, las cuales pueden ser parcialmente antagónicas, haciendo más compleja su interpretación [44]. Muchas veces un patógeno puede mostrar comportamientos característicos de un estilo de vida en un determinado hospedante pero no en otros, e incluso el mismo patógeno puede utilizar distintas estrategias con distinto grado de efectividad en diferentes tejidos del mismo hospedante [45].

5.2 La importancia de las leguminosas

Las legumbres han acompañado al ser humano desde los comienzos de la historia, probablemente debido a su gran valor nutricional. Esta familia de plantas, que actualmente se agrupan bajo el nombre Leguminosae, se caracteriza por su fácil domesticación y por su elevado aporte de proteínas a la dieta, lo cual se traduce no solo en un elevado valor como alimento humano, sino en su amplia aplicación como forraje de alta calidad para el ganado [46, 47]. También se destaca su utilización como fuente de maderas, aceites, fibras y medicinas y por sus importantes variedades hortícolas. Las leguminosas comprenden aproximadamente 700 géneros con más de 18.000 especies y ocupan nichos ecológicos en casi todos los ambientes de la Tierra [48]. Una de las claves de su éxito es su notable capacidad para establecer relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, conocidas como rizobios [49]. Esta particularidad de fijar nitrógeno le otorga a las leguminosas la facultad de habitar en suelos de fertilidad pobre, sin que esto afecte significativamente su producción y calidad de biomasa. Además, la introducción de especies de leguminosas en suelos pobres puede contribuir a mejorar la fertilidad de los mismos, aportando materia orgánica rica en compuestos nitrogenados [50]. También se encuentra ampliamente descripta su capacidad de asociarse con hongos micorrícicos, lo que favorece la absorción de fósforo [51].

El “diálogo” molecular que ocurre particularmente en las interacciones entre leguminosas y rizobacterias es realmente interesante, complejo y de enorme

interés tecnológico [52]. Se sabe además que existe un cierto paralelismo entre los genes inducidos durante la interacción con rizobacterias y aquéllos que participan en el reconocimiento entre raíces y hongos micorrícicos, aunque la comprensión de este último mecanismo se encuentra aún muy limitada [53]. Notablemente, el estudio detallado de las respuestas inducidas en la planta frente a organismos simbióticos ha demostrado que la relación entre planta y simbionte no es del todo “armoniosa”. De hecho, muchos genes de defensa generalmente inducidos frente al ataque de microorganismos fitopatógenos resultan también inducidos en los estadios más tempranos del desarrollo de la simbiosis [54]. No obstante, existen diferencias cruciales que señalan la capacidad de la planta de discriminar la naturaleza del microorganismo infeccioso. De esta manera, el conocimiento de las vías de señalización involucradas en la defensa de leguminosas frente a patógenos, puede llevar también a una comprensión más completa de los mecanismos que regulan el establecimiento de interacciones simbióticas. Sin embargo, existe aún un gran vacío en el conocimiento de las respuestas de defensa que operan frente a organismos patógenos en leguminosas [55].

La combinación de su alto valor nutritivo con la reducción de los costos debido a una menor necesidad de utilizar fertilizantes, le confieren a estos cultivos una ventaja económica que se ha puesto en evidencia en particular en nuestro país en las últimas décadas por el gran incremento en el área sembrada con cultivos de leguminosas, especialmente con soja (*Glycine max*). Esto fue favorecido, además, por la introducción de líneas mejoradas genéticamente y variedades con una mejor adaptabilidad a suelos marginales para la agricultura [56]. En el ámbito local, el cultivo de leguminosas contribuye notablemente a la productividad de la Pampa Deprimida del Salado, un área de aproximadamente 9 millones de hectáreas de la provincia de Buenos Aires y la más importante zona agrícola-ganadera de nuestro país. Sin embargo, la productividad de esta región se encuentra limitada ya que una gran proporción de estos suelos es afectada por ciclos de anegamiento-sequía, condiciones salino-alcálinas, baja permeabilidad y poca profundidad de la capa freática. Esto puede subsanarse parcialmente mediante el empleo de leguminosas alternativas tales como especies naturalizadas del género *Lotus*, las que presentan características

agronómicas de extremo interés.

5.3 La leguminosa modelo *L. japonicus*

Las especies del género *Lotus* pertenecen a la tribu Loteae DC., familia Leguminosae [57]. Las plantas pertenecientes a esta tribu producen flores caracterizadas por una garra o quilla con los márgenes endurecidos y plegados hacia dentro, estambres diadelfos y un estilo endurecido desde la base [58]. La mayoría de las especies de *Lotus* son nativas de Europa, Asia, África, Australia y algunas islas del océano Atlántico y Pacífico [59]. No obstante esto, las especies de *Lotus* presentan una distribución mundial, excepto en regiones muy frías y ciertas áreas tropicales del sudeste de Asia y América Central [59]. Esta amplia distribución geográfica, en parte, se debe a la introducción de estas especies por parte de las actividades humanas y a su adaptabilidad a diferentes estreses ambientales [60]. Esta adaptabilidad y tolerancia le otorgan una elevada potencialidad para ser utilizadas en diversos ambientes restrictivos para otros cultivos. Por otro lado, los efectos benéficos derivados de la incorporación de especies leguminosas como forraje en los sistemas de producción ganadera son reconocidos desde hace tiempo [47]. La principal importancia agronómica del género *Lotus* se basa en algunas especies utilizadas en sistemas pastoriles como forrajeras de alta producción, incluyendo aquellos que se encuentran sujetos a condiciones ambientales y edáficas extremas [61]. Estas especies son utilizadas con propósitos agronómicos principalmente en Sudamérica, Norteamérica y Europa, con 1,85; 1,39 y 1,38 millones de hectáreas sembradas respectivamente [61]. El 90% del área sembrada con *Lotus* se encuentra concentrada en solo 10 países, donde *L. corniculatus* ocupa el 90% de la misma [61]. El área total sembrada de *L. tenuis* supera las 160.000 hectáreas, y su uso e importancia para la producción de forraje en áreas templadas o subtempladas de Argentina, Chile, Uruguay, EEUU (principalmente en los estados del Oeste y del Este) y Australia ha ido en incremento en los últimos años [62].

L. japonicus es una leguminosa que, dadas sus características morfológicas y genéticas, tales como un genoma relativamente pequeño, tiempos de

generación cortos, el tamaño más bien pequeño de la planta, la cantidad abundante de flores, su carácter de autógena, la facilidad para su polinización manual y la existencia de distintas herramientas genéticas y moleculares, ha sido referenciada en los últimos años como un excelente modelo de estudio [63, 64]. Además, ha sido elegida como especie modelo de leguminosas con nodulación determinada, lo que ha posibilitado el desarrollo de una gran cantidad de herramientas. Actualmente se ha completado la secuenciación y mapeo del genoma del ecotipo Miyakojima MG-20 (a partir de ahora MG-20) de *L. japonicus* [65] cuya información se encuentra disponible en el sitio Legume Base (www.kazusa.or.jp/lotus). También se encuentran disponibles líneas recombinantes endocruzadas (RILs, del inglés *Recombinant Inbreed Lines*) completamente mapeadas entre los ecotipos MG-20 y Gifu B-129 (a partir de ahora Gifu) [63, 66] y entre las especies *L. burttii* y *L. filicaulis* [67, 68]. A partir de librerías de ESTs (del inglés *Expressed Sequence Tags*) [69] se diseñaron plataformas para el estudio transcriptómico por medio de microarreglos de ADN. También se han puesto a punto estrategias de “promotor tagging” [70], protocolos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* [71] y *A. rhizogenes* [72] y silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) [73]. A partir del año 2010, se encuentran disponibles más de 40,000 líneas mutantes de Gifu, las cuales fueron obtenidas mediante la inserción al azar del cromovirus LORE1 [74] (users-mb.au.dk/pmgrp/). Estas herramientas ya han comenzado a ser aplicadas para el estudio del comportamiento de esta especie bajo condiciones de estrés abiótico [75 – 77] y también en la evaluación los cambios transcripcionales que ocurren durante el reconocimiento de organismos simbiotes y el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno [78, 79].

Si bien los ecotipos Gifu y MG-20 son claramente accesiones de la misma especie, poseen características morfológicas muy diferentes [66, 80, 81]. Gifu es una planta de floración tardía, de crecimiento erecto que acumula antocianinas en tallo, mientras MG-20 posee floración temprana, tallos más bien rastreros y ausencia de antocianinas en los mismos. El ancho de la hoja y del tallo de MG-20 es mayor que el de Gifu. También, MG-20 posee hojas más anchas, tallos más gruesos y semillas más oscuras y de mayor tamaño en comparación a las de Gifu [82]. Las diferencias entre estos ecotipos no se

limitan a su morfología. Se han realizado varios estudios utilizando estos ecotipos como material contrastante observándose entre ellos diferencias fisiológicas y moleculares en el comportamiento frente a diferentes condiciones como alcalinidad [77], bajas temperaturas [83] y herbivoría [84]. Sin embargo, se desconoce la fisiología de estos ecotipos (y del género *Lotus* en general) frente al estrés de tipo biótico. Esto puede deberse a la relativa escasez de patógenos reportados que atacan a esta especie. Hacia el año 2005 solo habían sido reportados dos patógenos bacterianos, *P. viridiflava* y *Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus* [85], uno de origen fúngico, *Fusarium oxysporum* [86], y una interacción viral, ArMV-ba [87]. En general, estos reportes se enfocaron hacia un estudio más bien descriptivo de la enfermedad y no explican las bases moleculares de las interacciones entre patógenos y las especies de *Lotus* bajo estudio.

5.4 Características de la bacteria fitopatógena *P. syringae*

P. syringae, es una bacteria Gram negativa que infecta una amplia variedad de plantas. Suele desarrollarse en forma de *biofilm* sobre la superficie de las hojas, e ingresa de forma oportunista en el hospedante por heridas y ocasionalmente por los estomas [41]. Luego de penetrar, la bacteria se multiplica en el apoplasto y continúa su modo de vida extracelular [40], originando síntomas diversos que van desde clorosis hasta necrosis [10, 88]. *P. syringae*, ha sido descrita como un patógeno de plantas del tipo hemibiotrófico [89] y ha sido utilizada ampliamente como modelo para el estudio molecular de las interacciones planta-patógeno [90]. Hasta el momento se encuentran descritos alrededor de 50 patovares distintos de *P. syringae*, los cuales infectan una gran variedad de plantas mono y dicotiledóneas [1, 91]. Esta bacteria utiliza un sistema de secreción de tipo III para “inyectar” efectores en las células blanco de modo de modificar las relaciones fuente/destino de la célula y suprimir las defensas de la misma [92 – 94]. El primer genoma secuenciado de *P. syringae* fue el de *P. syringae* pv. tomato DC3000 (a partir de ahora *Pto*) [95], una cepa capaz de infectar al tomate originando la enfermedad de la mancha. Además, ha sido descrita la capacidad de *Pto* de infectar

Arabidopsis thaliana [96], lo que ha contribuido enormemente a su adopción como modelo para el estudio de las interacciones planta-patógeno [97].

5.5 Antecedentes en relación a la interacción *L. japonicus* - *P. syringae*

Los estudios realizados hasta el momento sobre la interacción de estos dos organismos son muy escasos. En 2008, Nagata y colaboradores publicaron un trabajo en el cual evaluaban la producción de óxido nítrico (NO•) y la expresión del gen LjHb1, que codifica para una Hemoglobina del tipo I, en plantas de *L. japonicus* sometidas a la interacción con rizobios compatibles o incompatibles [98]. La interacción con rizobios específicos de la planta incrementó la producción de óxido nítrico (NO•) y la expresión del gen LjHb1, en tanto durante la interacción con rizobios no específicos no se observaron tales efectos. En este trabajo, también se estudiaron las interacciones entre *L. japonicus* y bacterias descritas como fitopatógenas: *Ralstonia solanacearum*, *P. syringae* pv. pisi y *P. syringae* pv. glycinea. Las plantas inoculadas con *P. syringae* pv. pisi mostraron síntomas leves a los 28 días posteriores a la inoculación (dpi), que incluyeron amarronamiento de la zona meristemática en el extremo de la raíz, inhibición de la elongación de la raíz primaria y curvado del tallo. En las plantas inoculadas con *P. syringae* pv. glycinea se observaron síntomas similares en las raíces, pero no mostraron diferencias en el vástago en comparación con plantas control. *R. solanacearum* produjo síntomas más severos en raíz y en vástago. Por otra parte, se inocularon folíolos de *L. japonicus* con las mismas bacterias patógenas. Tanto *R. solanacearum* como *P. syringae* pv. pisi indujeron una respuesta similar a una HR, observándose una desecación restringida al folíolo infiltrado seguida por defoliación, en tanto *P. syringae* pv. glycinea no produjo síntomas [98].

6 Hipótesis y objetivo general

A partir de lo expuesto en la introducción, y en base a los antecedentes presentados, se planteó la siguiente **hipótesis**: "Los ecotipos de *Lotus japonicus* Gifu B-129 y Miyakojima MG-20 divergen en su respuesta a la infección con *Pseudomas syringae* pv. tomato". Para poner a prueba dicha hipótesis se propuso como **objetivo general de esta tesis**, caracterizar y comparar la respuesta a la inoculación con *Pto* por parte de los ecotipos de *L. japonicus*, desde el punto de vista fisiológico, metabólico y transcripcional.

7 Capítulo 1: Evaluación de la resistencia y caracterización fisiológica de la respuesta de los ecotipos MG-20 y Gifu a la inoculación con *Pto*

7.1 Introducción

En este capítulo se estableció un sistema de evaluación que permitiera cuantificar la severidad de la infección sobre plantas de *L. japonicus* infiltradas con una suspensión de *Pto*. Los parámetros empleados en dicha evaluación fueron: 1) el área de tejido vegetal afectada, 2) el grado de defoliación y 3) la velocidad de crecimiento *in planta* de la bacteria. Por otro lado, también hemos caracterizado la interacción de Gifu y MG-20 con *Pto* mediante la determinación de los niveles de EROs. La producción de estas especies moleculares es considerada una característica distintiva del reconocimiento exitoso del patógeno y de la activación de los mecanismos de defensa respectivos. El estudio del papel de las EROs en la interacción planta-patógeno ha sido abordado por diversos autores [99]. Las EROs median como señales en diversos mecanismos defensivos y pueden actuar como toxinas localizadas. Estas moléculas proceden de orígenes metabólicos diversos y/o de la regulación negativa de los sistemas de secuestro de las mismas, y pueden acumularse en diferentes compartimentos celulares donde cumplen funciones específicas. Existen factores que dificultan la detección de EROs en tejidos vegetales, tal como el tiempo de vida corto que presentan estas moléculas así como la existencia de una gran variedad de antioxidantes existentes en sistemas biológicos capaces de capturar estas especies reactivas. Las sondas fluorescentes son excelentes sensores de EROs debido a su alta sensibilidad, sencillez en la recopilación de los resultados y la alta resolución espacial en las técnicas de imagen microscópicas [100]. Por ejemplo, la forma diacetato de la 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DA-DCFH) se puede aplicar en estudios *in vivo* debido a su capacidad para difundir a través de la membrana celular. La oxidación de la 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) origina el compuesto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF), pensado inicialmente para ser útil como un indicador específico para peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [101]. Sin embargo, se ha demostrado que la DCFH es oxidada por otras EROs tales

como radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y radical peroxilo ($\bullet\text{OOR}$) [102]. De esta manera, esta sonda se utiliza en sistemas celulares como un marcador de estrés oxidativo celular [103].

Entre las mediciones que se efectuaron con el fin de caracterizar estas interacciones se encuentran además la detección de compuestos fenólicos, la deposición de calosa, y la determinación de la fluorescencia directa de la clorofila. Este último es un método simple y accesible, dado los avances en el desarrollo de fluorómetros comerciales y su *software* asociado. Estos fluorómetros permiten calcular un número de parámetros relacionados a su vez con cambios en la eficiencia del aparato fotosintético [104]. Entre estos parámetros, el rendimiento fotosintético máximo (F_v/F_m) es uno de los más empleados dado que su disminución es un indicador de estrés en la planta [105]. En 2005, Zou y colaboradores llevaron a cabo un estudio de la interacción entre cepas virulentas y avirulentas de *P. syringae* y soja, otra especie leguminosa de gran importancia [106]. Este trabajo se centró principalmente en la respuesta de la planta a nivel molecular, pero también se describió un efecto importante del patógeno sobre la maquinaria fotosintética. Las medidas de los parámetros fotosintéticos fueron consistentes con una reducción del F_v/F_m , lo cual podría deberse principalmente a la inducción de la HR asociada a la resistencia frente a la cepa avirulenta. Por su parte, la cepa virulenta produjo poco efecto sobre este parámetro. Similarmente, Bonfig y colaboradores, examinaron la respuesta de *A. thaliana* frente a cepas virulentas y avirulentas de *Pto*, encontrándose que la inoculación de los tejidos con ambas cepas llevó a un descenso del F_v/F_m [107].

7.1.1 Principios básicos de la fluorescencia directa de la clorofila

La fotosíntesis es el proceso por el cual las bacterias, plantas, algas y cianobacterias fotosintéticas convierten la energía radiante en una forma de energía químicamente estable. La transformación de esta energía durante la fotosíntesis es un proceso complejo que involucra varios mecanismos físicos y químicos, así como a diversos componentes celulares. El proceso se inicia cuando la luz es absorbida por las moléculas del complejo antena en la

membrana tilacoidal. La energía absorbida se transfiere como energía de excitación y es atrapada por un centro de reacción donde se utiliza para el transporte de electrones a través de la membrana, o bien disipada principalmente en forma de calor o como fluorescencia [108]. Las características de la fluorescencia emitida dependen en gran medida de la naturaleza de los pigmentos absorbentes, la transferencia de energía de excitación, y la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes [109]. Además, la fluorescencia también se ve afectada por el estado redox de los centros de reacción (RC) y de los donores y aceptores del fotosistema II (PSII), y por otra parte, es sensible a una amplia variedad de eventos [109]. Kautsky y Hirsh (1931) fueron los primeros en informar que, tras la iluminación de una muestra fotosintética preadaptada a la oscuridad, la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* no es constante, sino que presenta un aumento rápido hasta alcanzar un máximo seguido de un descenso para llegar, luego de unos minutos, a un nivel constante [110]. La figura 1 muestra un perfil de fluorescencia directa típico exhibido tras la iluminación con luz saturante de una muestra preadaptada a la oscuridad. Este tipo de gráfico, conocidos como OJIP, refleja la ocurrencia de distintos procesos fotosintéticos. El punto O es el valor mínimo de la fluorescencia (F_o). Aparece alrededor de los 50 μ s y en ese momento todos los centros de reacción están oxidados ("abiertos"). J, se desarrolla a los 2 ms y está relacionada con la reducción parcial de la quinona A (Q_A). I, se desarrolla a los 20 ms y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A y la quinona B (Q_B). P, es el valor máximo de la fluorescencia (F_m) y S (o estado estacionario) es el decaimiento de la fluorescencia [111].

El aumento de fluorescencia en la "fase rápida" O-P se ha explicado como una consecuencia de la reducción (ganancia de electrones) del total de aceptores de electrones en el PSII, particularmente la Q_A y la plastoquinona (P_Q). Una vez que el PSII absorbe luz y Q_A ha aceptado un electrón, no es capaz de aceptar otro hasta que el primero pasa al siguiente acarreador de electrones, la Q_B . Durante este período, el centro de reacción está "cerrado" porque está totalmente reducido. En cualquier punto en el tiempo, la presencia de una proporción de centros de reacción reducidos "cerrados", conduce a una

disminución en la eficiencia fotoquímica, con el correspondiente incremento en la fluorescencia emitida.

Figura 1: Ejemplo de un perfil de fluorescencia directa de la clorofila. Se grafica la fluorescencia directa (medida con el 100% de luz), representada en una escala logarítmica de tiempo mostrando la cinética característica y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones. La imagen pertenece a Moreno y colaboradores [111].

7.2 Objetivo particular

Establecer diferencias a nivel fisiológico en la respuesta de los ecotipos MG-20 y Gifu a la inoculación con *Pto*.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para todos los experimentos, las semillas de *L. japonicus* se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado durante 10 minutos, luego fueron enjuagadas y puestas a germinar en placas con agar-agua 0,8%. Se transfirieron plántulas de 7 días a macetas que contenían 200 cm³ de sustrato arena:perlita 1:3 y se las cultivó en cámara con un fotoperíodo 16h/8h (densidad de flujo de fotones

de 200 $\mu\text{mol m s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes blancas) a 24/21 \pm 2°C [día/noche] y 55/75% de humedad relativa. Se regaron las plantas periódicamente con solución Hoagland 0,5% [112] y se utilizaron a las 4 semanas de edad (momento en el cual presentaron 6 hojas verdaderas expandidas).

7.3.2 Preparación del inóculo bacteriano

Pto fue mantenida en 20% glicerol con medio Luria-Bertani (LB) a -80°C. Para preparar el inóculo que fue utilizado en todos los experimentos, las bacterias fueron cultivadas a partir de este stock en medio LB-agar con 50 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina a 30°C por 72 hs, resuspendidas en 10 mM MgCl_2 pH 7,0 y llevadas a una concentración de 10^7 UFC por mililitro.

7.3.3 Método de inoculación

En todos los experimentos, la suspensión de bacterias fue infiltrada en el folíolo central de las 4 hojas expandidas más jóvenes de cada planta usando una jeringa hipodérmica sin aguja, cuidando de que todo el tejido sea infiltrado por la solución. Las plantas control fueron infiltradas con 10 mM MgCl_2 , pH 7,0.

7.3.4 Diseño experimental

Para todas las mediciones, las plantas fueron infiltradas con la suspensión de bacterias o con la solución de MgCl_2 (control). Se evaluó daño foliar, proliferación del patógeno, producción de EROs, calosa y compuestos fenólicos, y se midió la fluorescencia directa de la clorofila. Para todos los ensayos se utilizaron al menos 6 réplicas independientes y cada medición se repitió al menos dos veces en experimentos independientes.

7.3.5 Evaluación del área foliar afectada

A los 2 días post-tratamiento, los folíolos centrales infiltrados fueron cortados de las plantas y escaneados a 600ppi. El área afectada por el tratamiento y al área total de los folíolos fueron medidas utilizando el *software* ImageJ (*National Institutes of Health, USA*). Se calculó el porcentaje del área afectada con respecto al área total de los cuatro folíolos infiltrados para cada planta. A cada réplica del tratamiento con *Pto* se le sustrajo la media del tratamiento control, que corresponde al daño mecánico producido por la jeringa.

7.3.6 Evaluación de la proliferación del patógeno

Se cosecharon plantas a 0, 1, 2 y 3 días posteriores a la inoculación (dpi). En este caso, cada réplica biológica fue representada por un pool de 4 folíolos centrales de una misma planta. Las muestras fueron pesadas, esterilizadas superficialmente con etanol al 70% por 30 segundos, lavadas con agua destilada estéril por 30 segundos y maceradas en una solución 10 mM de $MgCl_2$ a pH 7. Después de molido el tejido, las muestras fueron mezcladas con un vortex y diluidas en serie con solución 10 mM de $MgCl_2$ a pH 7. Finalmente, 20 μ l de cada dilución fueron plaqueados en medio LB-agar suplementado con 50 μ g ml^{-1} de rifampicina y las placas fueron incubadas a 30°C por 48 hs. Los recuentos fueron obtenidos contando las unidades formadoras de colonias en la dilución adecuada.

7.3.7 Detección de especies reactivas del oxígeno

Para revelar la presencia de peróxido de hidrógeno se cosecharon plantas a 6 y 24 hs de iniciado el tratamiento. Los folíolos infiltrados se incubaron en solución de 3,3'diaminobencidina (DAB, 1mg mL^{-1} en agua, pH 3,5 en oscuridad) por 3 hs. A continuación, se transfirieron a una solución de etanol 90% y fueron hervidas por 10 min. Finalmente, las mismas fueron fijadas en ácido láctico. La aparición de un precipitado marrón en los tejidos, observable a simple vista o con lupa reveló la presencia de peróxido de hidrógeno.

Para revelar la presencia de O_2^- se cosecharon plantas a 6 y 24 hs de iniciado el tratamiento. Los folíolos infiltrados se incubaron en una solución de nitroazul de tetrazolio (NBT) al 0.01% m/v en agua durante 3 hs a 25 °C. Luego de la incubación, se descartó la solución y las muestras se decoloraron con etanol 100% durante una noche. A continuación se reemplazó el etanol con una solución de glicerol al 50% v/v en agua y se incubó durante 30 min. La aparición de un precipitado azul en los tejidos, observable a simple vista o con lupa reveló la presencia de anión superóxido.

Para la detección de EROs se cosecharon plantas a 2, 6, 12, 24 y 48 hs de iniciado el tratamiento. Los hojas fueron cortadas de la planta y dejadas con sus pecíolos sumergidos en una solución de DA-DCFH (15 μ M) durante una hora, previa a la infiltración con *P. syringae*. Luego se observó la fluorescencia mediante la utilización de un microscopio de epifluorescencia (filtro de excitación, 460 nm; filtro de emisión, >515 nm).

7.3.8 Detección de compuestos fenólicos

Para la detección de compuestos fenólicos se cosecharon plantas a 6 y 24 hs de iniciado el tratamiento. Los folíolos infiltrados se incubaron en solución fijadora para autofluorescencia (10% formaldehído, 5% ácido acético, 45% etanol y H_2O) por 15 min. La solución fue removida y las muestras fueron incubadas en etanol 50% y 95%, por 20 min y toda la noche, respectivamente. Posteriormente, el etanol fue removido y las muestras fueron equilibradas en glicerol 70%. Los folíolos se montaron y se observaron en microscopio de epifluorescencia (filtro de excitación, 365 nm; espejo dicroico, 365 nm; y filtro barrera, 420 nm).

7.3.9 Detección de calosa

Para la detección de calosa se cosecharon plantas a 6 y 24 hs de iniciado el tratamiento. Las muestras fueron infiltradas con etanol/lactofenol (2:1 v/v) e incubadas a 60°C por 30 min. A continuación, se removió el lactofenol y se incubaron las muestras en azul de anilina (0.01% polvo de anilina azul en 150

mM K₂HPO₄, pH 9,5). Las muestras fueron equilibradas en glicerol 70%, luego montadas y observadas con microscopio de epifluorescencia (filtro de excitación, 365nm; espejo dicroico, 365nm; y filtro barrera, 420nm).

7.3.10 Estudio de la fluorescencia directa de la clorofila

Las mediciones de la fluorescencia directa de la clorofila se realizaron a 6 y 24 hs de iniciado el tratamiento, con un método no invasivo utilizando un fluorómetro portátil (Pocket PEA, Hansatech Instrument, UK). Para esto, se preadaptaron a oscuridad las hojas a medir durante 20 min, utilizando los clips adaptadores del equipo. Luego, se abrieron los adaptadores para permitir que las muestras sean expuestas a 3500 μmol fotón m⁻² s⁻¹ (637 nm de longitud de onda) durante 3 seg. El *software* pocket PEA (PEA plus v1.1, Hansatech Instrument Ltd., UK) fue usado para analizar las propiedades del PSII según Strasser y colaboradores [109]. A partir de los datos obtenidos se calcularon distintas expresiones según las siguientes ecuaciones:

$$F_v/F_m = \phi_{po} = TR_o/Abs = 1-F_o/F_m$$

$$PI = \gamma_{rc} / (1 - \gamma_{rc}) \cdot \phi_{po} / (1 - \phi_{po}) \cdot \Psi_{eo} / (1 - \Psi_{eo})$$

Flujos energéticos específicos (por centro de reacción, RC)

$$Abs/RC = Mo \cdot (1/V_j) \cdot (1/\phi_{po})$$

$$TR/RC = Mo \cdot (1/V_j)$$

$$Et/RC = Mo \cdot (1/V_j) \cdot \Psi_{eo}$$

$$DI/RC = (Abs/RC) - (TR_o/RC)$$

Flujos energéticos específicos (por sección excitada, CS)

$$Abs/CS = Chl/CS = F_o$$

$$TR/CS = \phi_{po} \cdot F_o$$

$$ET/CS = \phi_{po} \cdot \Psi_{eo} \cdot F_o$$

$$DI/CS = (Abs/CS) - (TR_o/CS)$$

$$RC/CS = \phi_{po} \cdot (V_j/Mo) \cdot F_o$$

7.4 Resultados

7.4.1 Evaluación de los síntomas presentados por *L. japonicus* frente a *Pto*

Para realizar una primera aproximación a la caracterización de las interacción entre *P. syringae* y *L. japonicus* se estudió macroscópicamente la aparición de síntomas en las líneas MG-20 y Gifu. Los primeros síntomas fueron observados en el ecotipo MG-20 a las 24 hs posteriores a la inoculación con la bacteria, los que consistieron en zonas de desecación parcial tanto alrededor del sitio de infiltración como en los márgenes del folíolo. Estos síntomas se fueron extendiendo con el correr de las horas hasta abarcar todo el tejido (figura 2). También se observaron zonas cloróticas y, ocasionalmente, sitios necróticos puntuales. Estos síntomas recuerdan a los que se observan en plantas de *Arabidopsis* [96] y soja [106] al ser infiltrados con esta bacteria. Alrededor de las 72 hs, la mayoría de los folíolos inoculados se desprendieron del tallo. Los síntomas descritos nunca se observaron en folíolos adyacentes a los inoculados y las plantas infectadas continuaron su ciclo reproductivo normalmente. Cabe destacar que si bien en este caso las plantas de MG-20 fueron inoculadas con una solución de bacterias que presentaba una OD_{600} de 0.1, estos experimentos fueron repetidos con dosis 10 y 100 veces menores observándose un aumento proporcional en el tiempo de desarrollo de los síntomas, pero culminando indefectiblemente en una defoliación de la mayoría de los folíolos infectados (resultados no mostrados).

Por su parte, pocos folíolos del ecotipo Gifu presentaron algún síntoma macroscópico y la magnitud de estos síntomas nunca alcanzó los niveles observados en MG-20 (figura 2). Raramente se observó defoliación en Gifu. Plantas infectadas, observadas meses después de la inoculación, no presentaron síntomas de enfermedad.

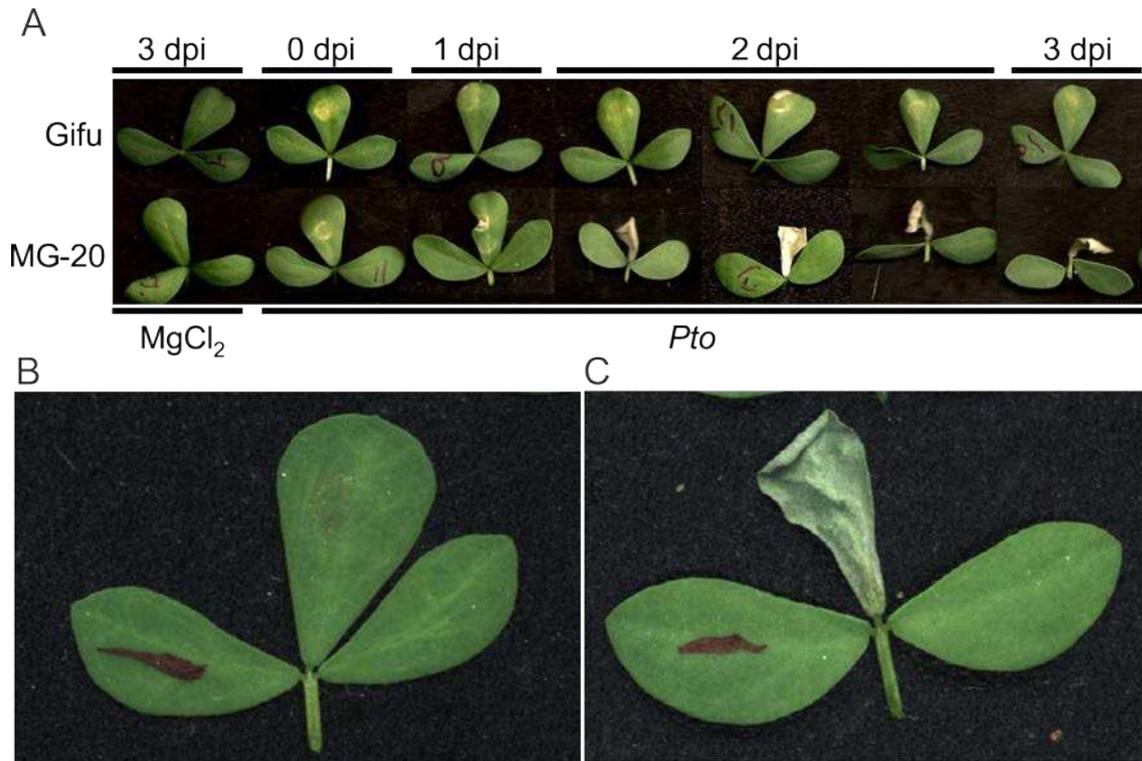


Figura 2: Síntomas macroscópicos mostrados por MG-20 y Gifu frente a la inoculación con *Pto*. A: la primer columna corresponde a folíolos infiltrados con la solución de MgCl₂, las siguientes columnas corresponden a los folíolos infiltrados con la suspensión de bacterias, solo los folíolos centrales fueron infiltrados utilizando una jeringa hipodérmica sin aguja como se describe en los materiales y métodos, eventualmente un folíolo lateral fue marcado para identificar el tratamiento; para cada ecotipo (primer fila corresponde a Gifu y segunda fila corresponde a MG-20) se observó la aparición de síntomas a 0, 1, 2 y 3 dpi. B y C muestran en detalle el folíolo central de Gifu y MG-20 respectivamente, inoculado con la suspensión de bacterias a los 3 dpi.

Con el objetivo de cuantificar las diferencias observadas en los síntomas presentados por los ecotipos Gifu y MG-20 frente a *Pto*, se analizó el porcentaje del área de los folíolos que presentaba síntomas a las 48 hs posteriores a la infiltración. En este caso, el % de área afectada en MG-20 alcanzó el 68.59%, mientras que en Gifu fue de solo del 17.25% (figura 3).

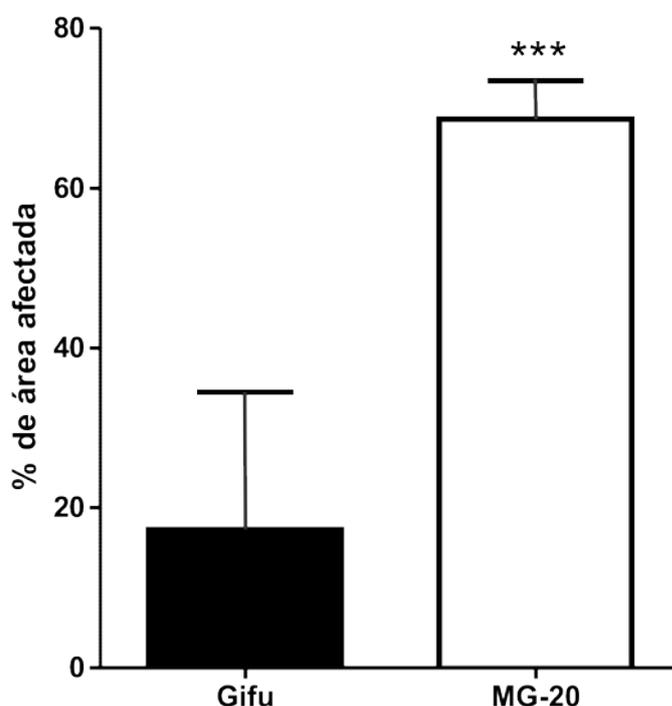


Figura 3: % de área afectada en los ecotipos MG-20 y Gifu infectados con *Pto* con respecto a su control. Las mediciones fueron realizadas a los 2 dpi, las barras corresponden al desvío estándar, los asteriscos corresponden a diferencias significativas entre Gifu y MG-20, según el *test* de Student (***) $p \leq 0,0005$.

7.4.2 Proliferación de *Pto* en tejidos de *L. japonicus*

La capacidad de *Pto* de proliferar en los tejidos de *L. japonicus* fue estudiada mediante el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFCs) en los tejidos infiltrados a diferentes tiempos posteriores a la infiltración. El ecotipo MG-20 mostró una presencia significativamente mayor de bacterias en sus tejidos que el ecotipo Gifu en todos los tiempos estudiados, con excepción del tiempo inicial (figura 4). Estas diferencias fueron de alrededor de 2 órdenes de magnitud. El ecotipo Gifu no mostró un aumento significativo en la cantidad de bacterias con respecto al tiempo inicial del tratamiento.

Los recuentos obtenidos al momento de infectar indican que los folíolos de ambos ecotipos recibieron una cantidad de bacterias similar con este método de inoculación.

No se recuperaron UFCs de los folíolos adyacentes al sitio de infiltración en ninguno de los ecotipos.

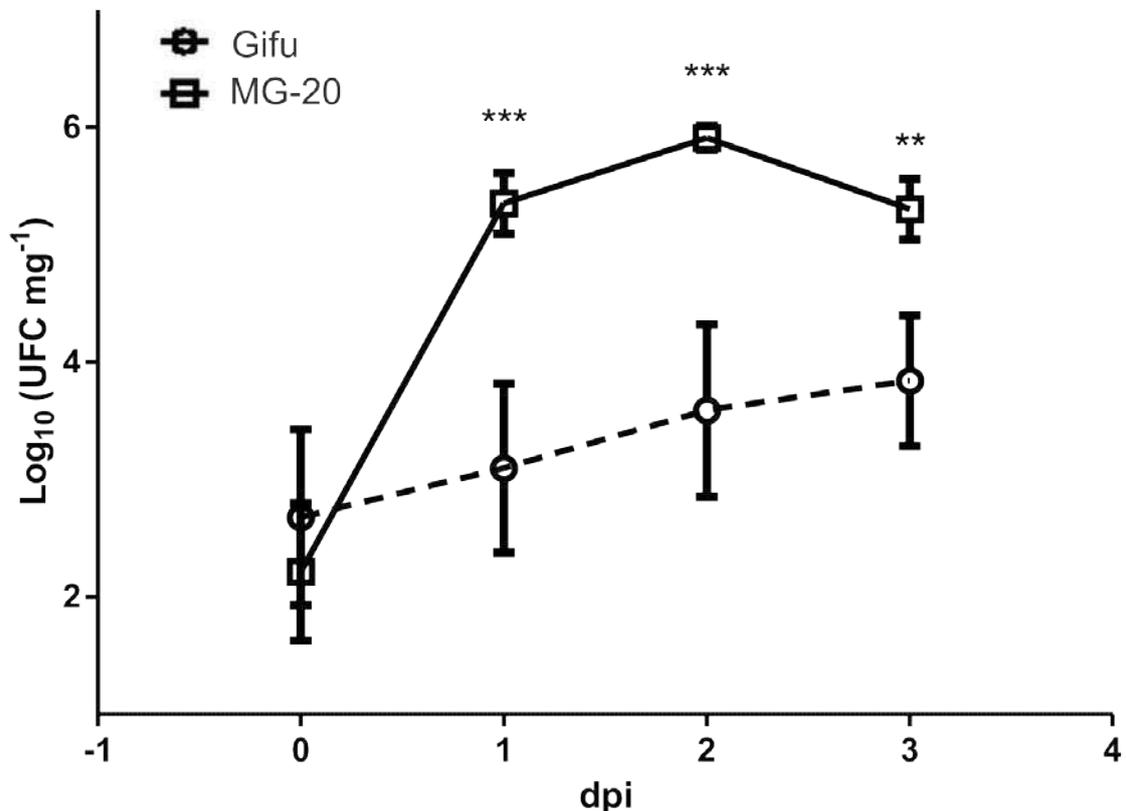


Figura 4: Perfil de recuentos de UFCs en función del tiempo. Se grafican las medias del Log₁₀ de las UFCs mg⁻¹ para 0,1, 2 y 3 dpi. Las barras corresponden al desvío estándar, los asteriscos corresponden a diferencias significativas entre ambos ecotipos para el mismo tiempo, según el *test* de Student (** p ≤ 0,005; *** p ≤ 0,0005).

7.4.3 Producción de especies reactivas del oxígeno en *L. japonicus* durante la interacción con *Pto*.

Para comprender cuál es la cinética de producción de EROs en la interacción *L. japonicus*-*P. syringae*, se estudió la acumulación de las mismas mediante diferentes métodos de detección. Dos de los métodos utilizados fueron las tinciones con los reactivos DAB y NBT, los cuales reaccionan con las especies reactivas peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y anión superóxido (O₂⁻), respectivamente. En este caso, no se observaron diferencias significativas en la tinción con estos compuestos en ninguno de los ecotipos infectados con respecto al control (datos no mostrados).

Por otro lado, se estudió la aparición de fluorescencia producto de la oxidación de la sonda DFCH. Como resultado, se observó un gran aumento en la

fluorescencia en las primeras horas posteriores a la inoculación en el ecotipo Gifu (figura 5A), la cual fue decayendo durante los días posteriores al ataque por parte de la bacteria. En cambio, en el ecotipo MG-20 se observó un leve incremento recién a las 24hs del tratamiento. Es importante notar que no solo se observaron diferencias en la cantidad de EROs detectadas, sino también en la ubicación subcelular de la señal fluorescente. Así, en el ecotipo Gifu la señal se concentró en el espacio apoplástico, mientras que en el ecotipo MG-20 la fluorescencia se observó de manera más difusa (figura 5B y C).

Por último, también se realizaron tinciones para detectar la presencia de compuestos fenólicos y deposición de calosa. En este caso, no se observó presencia de estos compuestos en ninguno de los tratamientos ensayados (datos no mostrados).

7.4.4 Estudio de la fluorescencia directa de la clorofila en la interacción *L. japonicus* - *P. syringae*

Luego de 6 hs de iniciado el tratamiento se observaron cambios mínimos en la fluorescencia directa de los dos ecotipos de *L. japonicus*. Sin embargo, pudo observarse una desviación más marcada de la curva OJIP después de 24 hs de realizada la inoculación con la bacteria (figura 6B). Este efecto fue mayor en MG-20, principalmente en la fase J y en menor medida en la I.

A partir de estos resultados se obtuvieron distintas expresiones que describen los procesos relacionados con la fluorescencia de la clorofila *a* del PSII. Entre ellos, los más utilizados son el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m), el cual corresponde a la eficiencia de las reacciones de la fase luminosa en una situación en la cual todos los centros de reacción del PSII están oxidados o "abiertos", y el índice de desempeño (PI), que corresponde a la conservación de la energía desde los fotones absorbidos por el PSII hasta la reducción de la Q_B [108].

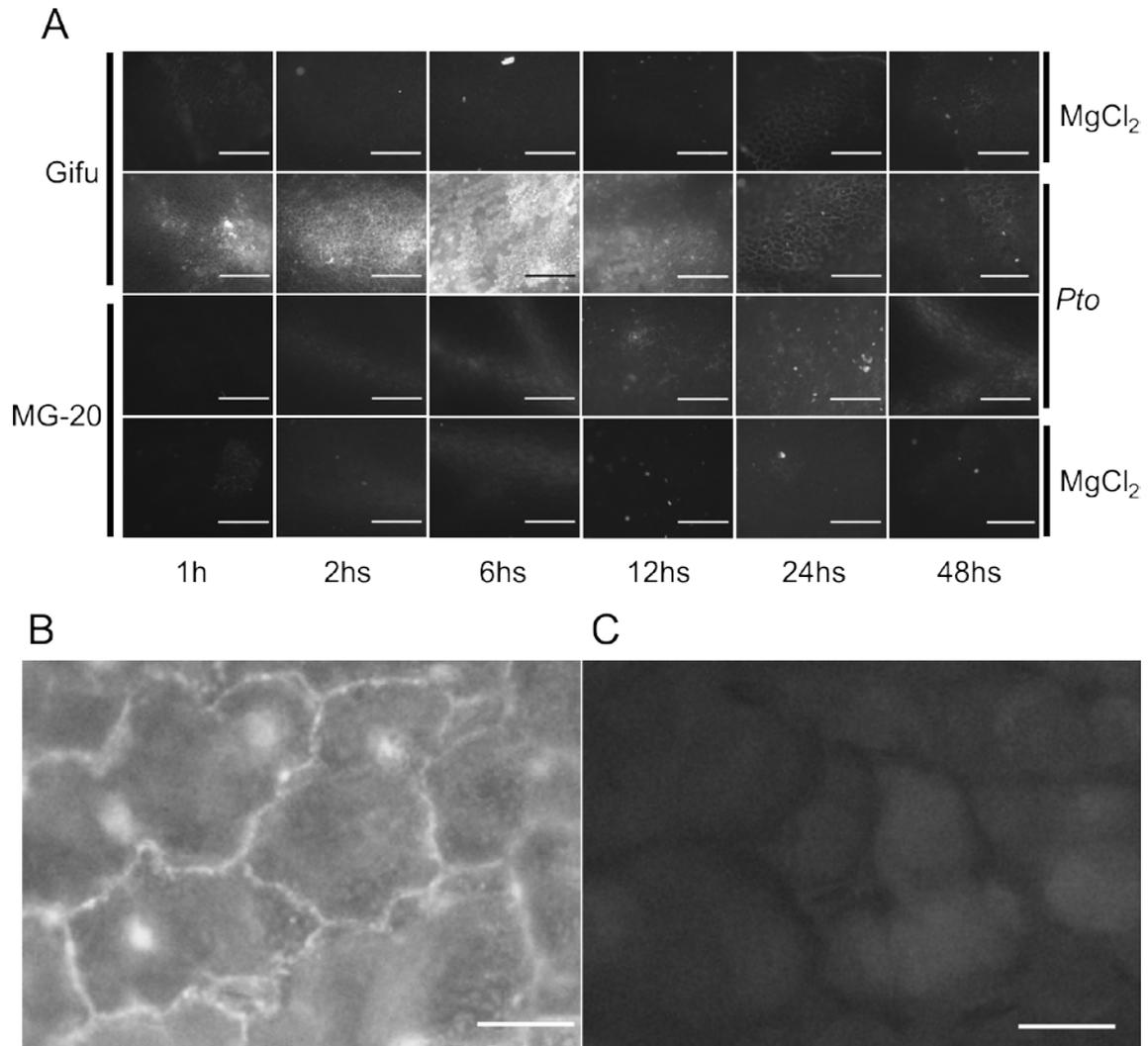


Figura 5: Fluorescencia producto de la oxidación de la DCF a diferentes tiempos posteriores a la infiltración con la solución de $MgCl_2$ o con la suspensión *Pto*. La fluorescencia fue observada con un microscopio de epifluorescencia (filtro de excitación, 460 nm; filtro de emisión, >515 nm). A: Las imágenes fueron obtenidas a distintos tiempos posteriores al tratamiento, como lo indica la figura. La barra horizontal en cada imagen corresponde a 500 μm . Las figuras muestran imágenes representativas de cada tratamiento. B y C: Detalle de imágenes obtenidas en el ecotipo Gifu (B) y MG-20 (C), la barra horizontal en cada imagen corresponde a 50 μm .

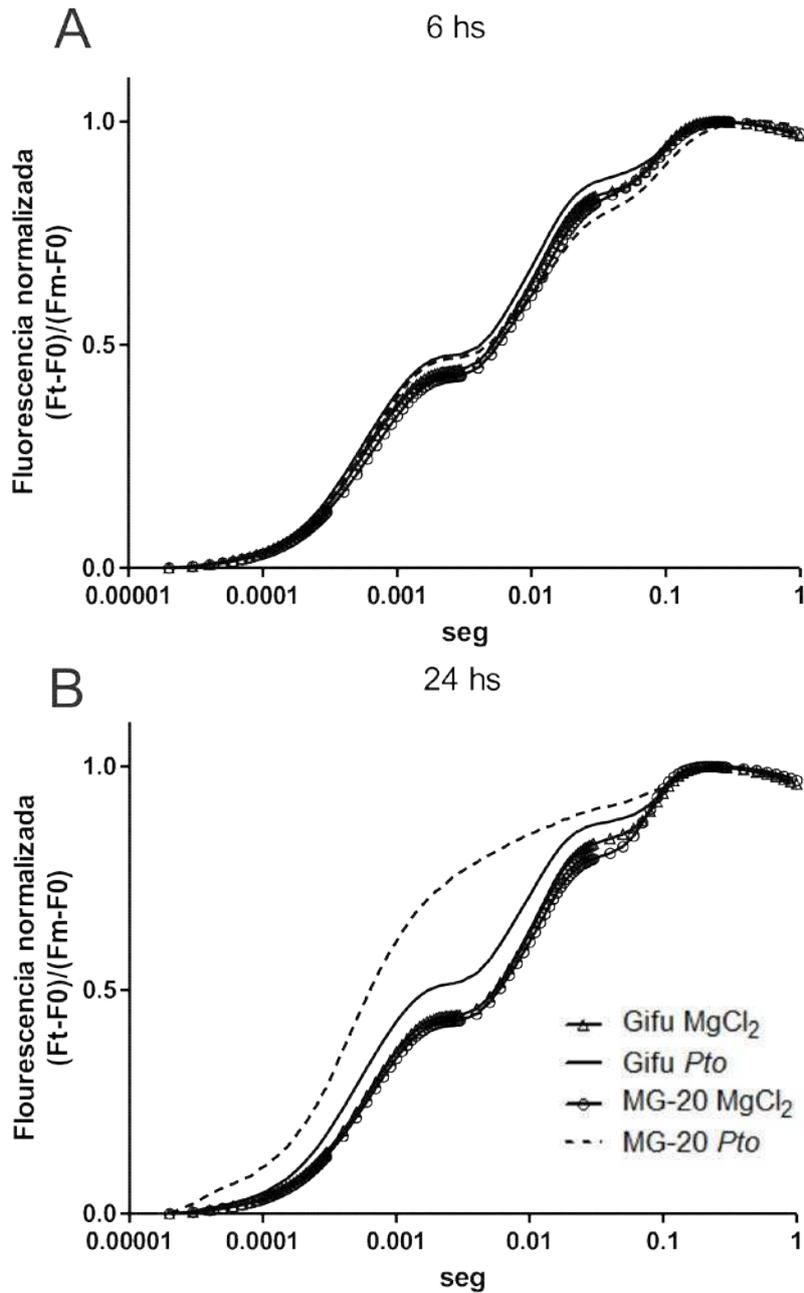


Figura 6: Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII en función del tiempo en escala logarítmica. El gráfico A corresponde a las mediciones realizadas 6 hs después de los tratamientos. El gráfico B corresponde a las mediciones realizadas 24 hs después de los tratamientos.

En la figura 7 se compararon el PI y el Fv/Fm obtenidos en las plantas infiltradas con la suspensión de bacterias con aquellas infiltradas con la solución de $MgCl_2$. Puede observarse que el tratamiento provoca pequeñas modificaciones de estos parámetros en ambos ecotipos pasadas las 6 hs, y que la reducción es mucho más marcada a las 24 hs, si bien el mayor efecto se observó en el ecotipo MG-20 (figura 7).

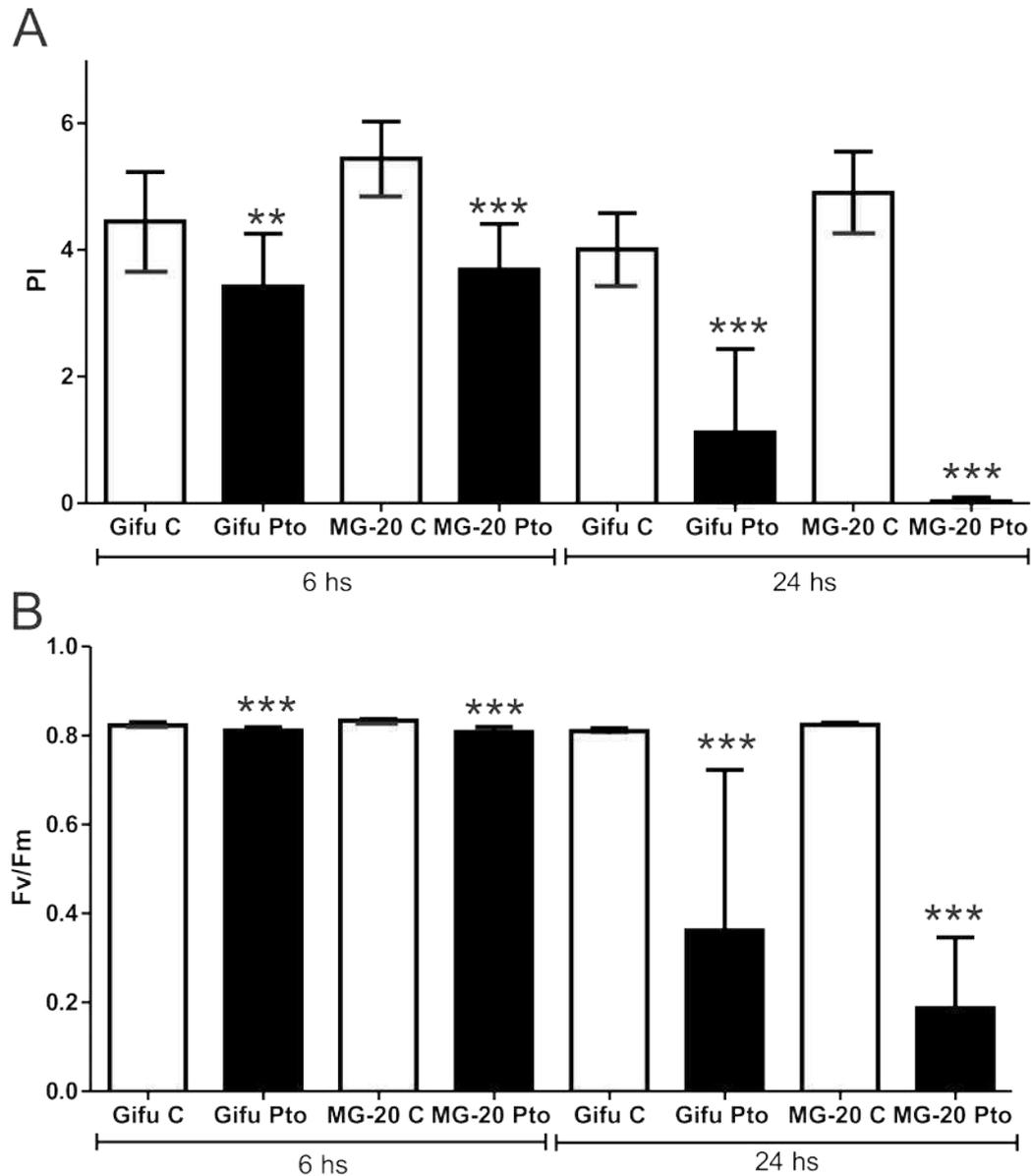


Figura 7: Análisis de la fluorescencia directa de la clorofila. A: índice de desempeño (PI). B: rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm). Gifu C y MG-20 C corresponden a los ecotipos Gifu y MG-20 en condición control, respectivamente, mientras Gifu *Pto* y MG-20 *Pto* corresponden a los ecotipos Gifu y MG-20 inoculados con la bacteria, respectivamente. Las barras corresponden al desvío estándar, los asteriscos corresponden a diferencias significativas entre plantas inoculadas con *Pto* y su control, según el *test* de Student (** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$).

Por otro lado, las curvas OJIP también permiten calcular la magnitud de otros parámetros fotosintéticos que reflejan los flujos de energía a través del aparato fotosintético. Estos parámetros pueden expresarse en función del área de la sección excitada (CS) o bien por centro de reacción activo (RC), lo que se conoce como modelo de hoja y modelo de membrana, respectivamente [113].

A su vez, con el fin de simplificar esta representación, los flujos de energía pueden dividirse en flujo absorbido (ABS), flujo atrapado (TR), flujo disipado (DI) y flujo de transporte electrónico (ET). Con estos modelos, se pueden observar las variaciones en los flujos de energía en distintas condiciones o a distintos tiempos de una forma dinámica, expresándolos según el ancho de la flecha que representa a cada uno. El modelo de hoja (figura 8A) muestra en ambos ecotipos una disminución gradual de los flujos de energía atrapada (TR/CS) y de transporte de electrones (ET/CS), con un correspondiente aumento en la energía disipada (DI/CS). También se observa una disminución en la cantidad de centros de reacción activos, que corresponde al parámetro RC/CS. La magnitud de todos los efectos mostrados por este modelo son marcadamente más importantes en el ecotipo MG-20. El modelo de membrana (figura 8B) muestra los flujos de energía específicos calculados para un centro de reacción. En este modelo puede observarse un aumento en el flujo absorbido por centro de reacción (ABS/RC) en ambos ecotipos, el cual corresponde al tamaño aparente del complejo antena para un centro de reacción. Esto es consistente con una mayor cantidad de centros de reacción inactivos, indicando que lo que los centros de reacción activos restantes tendrán asociados un complejo antena de mayor tamaño. Ambos ecotipos muestran también un aumento de la energía atrapada (TR/RC), pero solo el ecotipo MG-20 muestra un descenso sostenido en el flujo de transporte de electrones (ET/RC).

7.5 Discusión

El objetivo de este capítulo fue caracterizar la respuesta fisiológica de los ecotipos Gifu y MG-20 y establecer posibles diferencias entre ellos frente a la inoculación con *Pto*. Esta caracterización fue llevada a cabo analizando el nivel de daño presentado por los tejidos infectados, así como la capacidad de multiplicación de la bacteria en estos tejidos, los niveles de EROs y la fluorescencia directa de la clorofila. De forma consistente a lo largo de todos los experimentos, se obtuvieron importantes diferencias entre Gifu y MG-20.

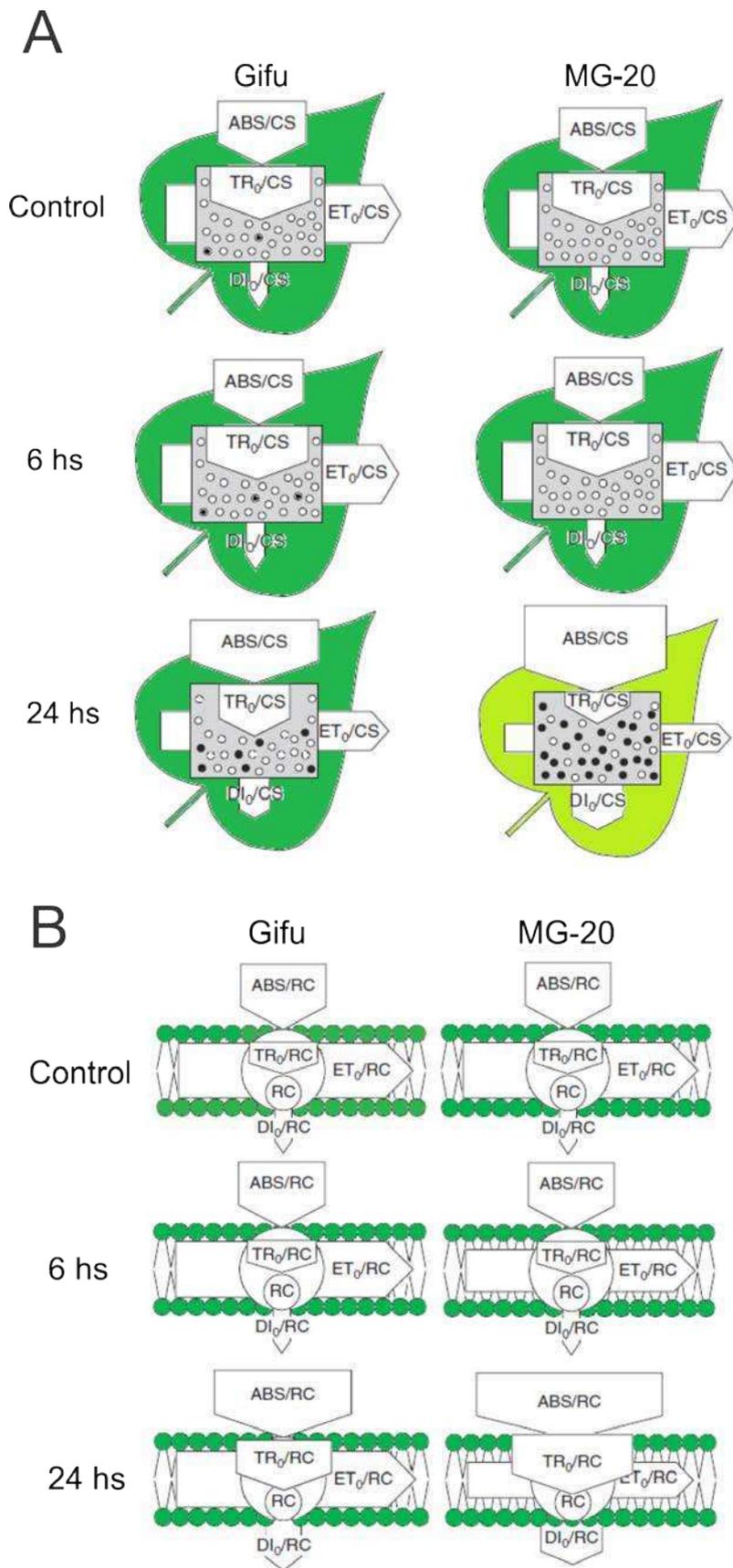


Figura 8: Modelos del aparato fotosintético que ilustran los efectos en los flujos de energía del PSII. Las flechas indican los flujos de absorción de luz (ABS), energía de excitación atrapada (TR), energía de disipación (DI), y transporte de electrones (ET) mas allá de la Q_A . El ancho de cada flecha representa la intensidad de flujo de energía respectivo. En A se grafica el modelo de hoja, donde cada parámetro está expresado en función del área excitada (CS). Los círculos blancos indican centros de reacción activos y los círculos negros representan centros de reacción inactivos, correspondiendo al parámetro RC/CS. En B se grafica el modelo de membrana, donde cada parámetro está expresado en función de un centro de reacción activo (RC).

La respuesta del ecotipo Gifu frente a la inoculación con la bacteria se caracteriza por la ausencia de síntomas, si bien ocasionalmente pueden aparecer pequeñas áreas afectadas del folíolo (figura 2A). Si bien la bacteria mantiene su viabilidad en estos tejidos, es incapaz de multiplicarse, de tal manera que el perfil de UFCs en los tejidos se muestra inalterado a lo largo del tiempo (figura 4). Otros parámetros medidos sí mostraron diferencias con respecto al tratamiento control. Entre estos parámetros se destaca la producción de EROs medida mediante la utilización de una sonda fluorescente (figura 5A). En este ecotipo pudo observarse la presencia de un *burst* oxidativo durante las primeras horas de tratamiento, señal que se presenta principalmente en el apoplasto celular (figura 5B). Esta producción localizada de EROs podría ser inducida para mantener bajos los niveles poblacionales de *Pto* ejerciendo un efecto tóxico sobre las células bacterianas, o bien funcionando como molécula señal mediando la activación de otras respuestas defensivas que impidan la proliferación del patógeno. Durante los siguientes capítulos se intentará arrojar un poco más de luz sobre la posible función del *burst* oxidativo observado en Gifu y de los mecanismos de resistencia que operan en este ecotipo.

Por su parte, la sintomatología del ecotipo MG-20 presentó un panorama totalmente distinto al de Gifu. Transcurridas 48 hs de efectuado el tratamiento, los tejidos foliares se mostraron cloróticos y con síntomas de desecación (figura 2A). Durante las siguientes 24 hs, la mayoría de los folíolos infectados se desprendieron de la planta (figura 2). Los niveles de síntomas presentados mostraron su correlato con la capacidad de multiplicación de la bacteria en los tejidos foliares. En este ecotipo se observó un aumento exponencial de las UFCs recuperadas de los folíolos inoculados, lo que alcanzó un máximo antes del desprendimiento del folíolo (figura 4).

El estudio de la fluorescencia directa de la clorofila mostró que la bacteria produjo un efecto negativo más acentuado en el ecotipo MG-20 que en Gifu (figura 7 y 8). Además, al analizar los flujos energéticos pudo observarse que los procesos que suceden en estos ecotipos frente a la inoculación con la bacteria son diferentes. En Gifu, la maquinaria fotosintética se mostró afectada a nivel de la cantidad de centros de reacción activos (figura 8A), los cuales

disminuyeron ligeramente respecto del control sin inocular, siendo menor su cantidad al aumentar el tiempo desde la inoculación. La baja influencia de la bacteria sobre el PSII también se pone en evidencia al observar las pocas diferencias mostradas entre los flujos energéticos por centro de reacción de plantas infectadas y de plantas control (figura 8B). En cambio, en MG-20 se observó un efecto negativo tanto a nivel de la cantidad de centros de reacción activos (figura 8A), así como de su funcionalidad, debiéndose a la caída del flujo energético por centro de reacción (figura 8B).

Los resultados presentados en este capítulo permiten caracterizar al ecotipo Gifu como un material resistente a la infección por *Pto*. Esto se basa en el hecho de que la bacteria es incapaz de mostrar una proliferación significativa en los tejidos de este ecotipo y de provocar daños importantes en los tejidos foliares. En el ecotipo MG-20 por el contrario, se observa la aparición de una extensa área de afección en los folíolos inoculados, un porcentaje alto de defoliación y un efecto negativo importante sobre la maquinaria fotosintética. Estos síntomas, sumados a la alta tasa de multiplicación de la bacteria en los tejidos foliares permiten caracterizar al ecotipo MG-20 como susceptible a la infección provocada por *Pto*. Zou y colaboradores analizaron la interacción entre soja y una cepa avirulenta de *P. syringae* pv. *glycinea* y observaron que la resistencia de la planta se debía a su capacidad de inducir una reacción hipersensible luego del reconocimiento del patógeno [106]. Es interesante hacer notar que los síntomas reportados por Zou y colaboradores en los tejidos de soja inoculados fueron muy similares a los que desarrolla MG-20 en la interacción con *Pto*. Así, reportaron la aparición temprana de zonas de desecación en tejidos foliares y un efecto negativo en la fluorescencia de la clorofila. De esta observación surge como interrogante si en MG-20 también se estaría desarrollando una respuesta del tipo hipersensible durante la interacción con *Pto*. Es sabido que *Pto* es capaz de desarrollarse tanto de forma biotrófica como necrotrófica, y que dependiendo de las condiciones es capaz de elicitar la respuesta hipersensible [114]. Esta bacteria también es capaz de desarrollarse de forma hemibiotrófica adquiriendo sus recursos, en las primeras etapas de la infección, de los tejidos vivos de la planta. Luego, al avanzar a la siguiente etapa de la infección es capaz de producir un daño en el

hospedante, mediado por una respuesta del tipo HR, de forma de nutrirse de los metabolitos producto de la degradación de los componentes celulares [115]. MG-20 no mostró frente a la bacteria tejido necrótico ni presentó síntomas que puedan caracterizarse como de MCP. Cuando *Pto* es inoculada en folíolos de MG-20, en las primeras etapas de la infección parece comportarse como una bacteria biotrófica, pero la forma en la que se desarrolla en los en las últimas etapas aún no es clara.

Durante los próximos capítulos se intentará echar luz sobre esto, analizando la respuesta a nivel transcripcional y metabólico de los ecotipos Gifu y MG-20 a la inoculación por *Pto*.

8 Capítulo 2: Estudio del transcriptoma y metaboloma de los ecotipos MG-20 y Gifu de *L. japonicus* durante la interacción con *Pto.*

8.1 Introducción

Los primeros estudios globales del transcriptoma de *L. japonicus* fueron iniciados en la primer década del siglo XXI y permitieron la identificación de 93.000 etiquetas de secuencias expresadas (ESTs) [117, 118]. Para el año 2005, esta base de datos abarcaba más de 111.000 secuencias y la misma se ha seguido incrementando. La base de datos de ESTs de *L. japonicus* es de acceso público y se encuentra disponible en la página del Kazusa DNA Research Institute (<http://est.kazusa.or.jp/en/plant/lotus/EST/>). A partir de estas secuencias, complementada con las secuencias predichas a partir del secuenciamiento del genoma de esta especie modelo, fue posible construir arreglos de oligonucleótidos con el objeto de realizar estudios de expresión génica a gran escala. Varios grupos de investigación diseñaron este tipo de arreglos [119], en los cuales los miles de oligonucleótidos son fijados individualmente sobre una membrana de nylon. Estos arreglos son luego utilizados para hibridizar ADN copias (ADNc) sintetizados a partir de RNA mensajero que luego será cuantificado por diferentes estrategias, arrojando una estimación de cuán representada está cada una de las secuencias en la muestra hibridizada. El escalamiento de esta técnica en forma de microarreglos, permitió pasar de unos pocos miles de sondas, al estudio simultáneo de la expresión de más de 10.000 ESTs por medio de hibridización con un set de oligonucleótidos cada uno [120].

Hasta la fecha se han diseñado dos microarreglos para *L. japonicus*: el A-AFFY-90 Affimetrix *custom array* y el AGEOD-14826 Agilent NimbleGen *custom gen expression array*. El primero, permite el estudio de 52.749 genes de *Lotus* y 8.710 genes de *Mesorrizobium loti* a partir de 10-20 oligonucleótidos para cada gen. Este microarreglo cubre el 77% de los posibles genes de *L. japonicus* [121]. Esta tecnología ha sido utilizada en una variedad de trabajos, incluyendo el estudio de los transcriptomas de varios órganos en etapas distintas del

desarrollo [122], diferentes condiciones de estrés como salinidad [76, 123], sequía [124, 125] y alcalinidad [77], el estudio de líneas modificadas genéticamente [79, 124, 126], e interacciones con microorganismos [78], [79]. El AGEOD-14826 Agilent NimbleGen custom gen expression array para *L. japonicus* permite el estudio simultáneo de 21.495 genes utilizando 60 oligonucleótidos para cada uno y ya ha sido utilizado para el estudio de líneas sobre-expresantes de factores de transcripción [127] y estudios de los mecanismos inherentes a la nodulación [128].

Si bien se han reportado estudios transcriptómicos de interacciones entre microorganismos y *L. japonicus*, estos trabajos se han enfocado en relaciones simbióticas [78, 79, 119, 128 – 130], y no existen hasta el momento trabajos de este tipo donde se caractericen las respuestas de esta leguminosa modelo durante el estrés biótico, tal como se ha hecho en otras especies modelo. Por ejemplo, el estudio comparativo de las respuestas que ocurren en plantas de *A. thaliana* infectadas con cepas virulentas y avirulentas de *Pto* describió diferencias importantes en el nivel de expresión de miles de genes [131], lo que ha permitido asociar distintos caminos metabólicos a la respuesta de defensa frente a esta bacteria. En cuanto a leguminosas, pocos patosistemas han sido evaluados respecto de sus perfiles de expresión génica, correspondiendo la mayoría de los estudios a *Medicago truncatula* [132, 133] y *Glycine max* [106]. Por otro lado, a la hora de asignar funciones potenciales a los genes identificados por medio de arreglos o microarreglos, también se consideran técnicas complementarias, como la metabolómica y la proteómica. La metabolómica abarca una serie de técnicas y tecnologías que permiten el estudio conjunto de las pequeñas moléculas que conforman el metaboloma de un organismo, incluyendo aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos, entre otros. El dogma central de la biología manifiesta que la información genética contenida en el genoma es transcripta en RNAs mensajeros individuales que conforman el transcriptoma, los cuales son traducidos a proteínas. Muchas de estas proteínas poseen actividad enzimática y pueden estar involucradas en la modulación del metabolismo que finalmente determinará el fenotipo del organismo. Perturbaciones en el genoma o el transcriptoma, por ejemplo a causa de un estrés, resultarán en cambios en los niveles enzimáticos y a su

vez en perturbaciones de los perfiles metabólicos. El metaboloma de las plantas reviste de especial importancia ya que posee una diversidad mayor de metabolitos que la de los animales y bacterias [134]. Se ha estimado que las hojas de *A. thaliana* contienen aproximadamente 5000 metabolitos distintos cuando se considera a aquéllos involucrados tanto en el metabolismo primario como secundario [135]. Es aceptado que muchos de estos metabolitos tienen un rol esencial en la respuesta a patógenos, en la herbivoría, así como durante el desarrollo durante condiciones abióticas estresantes.

La determinación de perfiles metabólicos utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) es una de las técnicas más difundidas para el estudio del metaboloma de plantas [136, 137] y es aceptada como una de las técnicas más robustas [138 – 140]. Esta metodología implica la extracción de los metabolitos a partir del material vegetal, su posterior derivatización de modo de transformarlos en moléculas volátiles aptas para ser separadas y cuantificadas por cromatografía gaseosa, la cuantificación al salir de la cromatografía y la posterior identificación de los metabolitos a partir de los principales datos arrojados por la MS: la masa molecular y el espectro de masa (o perfil de fragmentos luego de ser ionizado el metabolito). Una de las ventajas que ofrece esta tecnología es que ha sido utilizada a ritmo sostenido por mayor tiempo en comparación a otras técnicas similares, y por este motivo existen protocolos estables de extracción, derivatización, configuración y mantenimiento de los equipos, e interpretación de los cromatogramas [141, 142]. Además, por estas mismas razones y debido a la reproducibilidad de la técnica, las librerías de tiempos de retención y de espectros de masas pueden ser compartidas entre laboratorios, lo que ha generado que las bases de datos crezcan a un nivel sostenido. Las librerías más importantes hasta la fecha son la NIST [143], FiehnLib [144] y la GMD [145], las cuales representan una herramienta fundamental a la hora de explicar el gran crecimiento que ha mostrado la metabolómica de plantas en los últimos años. Esta tecnología ya ha sido utilizada en *L. japonicus* para el estudio de las respuestas a nivel metabólico durante la micorrización [146], la nodulación [129, 147] y el estrés abiótico [75, 148].

Para reconstruir las complejas redes y caminos que caracterizan los fenotipos

de una planta, es necesario integrar los perfiles metabólicos con los resultados obtenidos en estudios de otras *ómicas*. La combinación de datos transcriptómicos y metabolómicos, así como el estudio de su correlación es una estrategia prometedora para lograr descifrar la complejidad del metabolismo celular [149].

8.2 Objetivo particular

Caracterizar y comparar la respuesta a la inoculación con *P. syringae* por parte de los ecotipos de *L. japonicus* Gifu y MG-20, desde el punto de vista transcripcional y metabólico.

8.3 Materiales y métodos

8.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Ver Capítulo 1.

8.3.2 Preparación del inóculo bacteriano

Ver Capítulo 1.

8.3.3 Método de inoculación

Ver Capítulo 1.

8.3.4 Diseño experimental

Para todas las mediciones se utilizaron plantas de 4 semanas de edad (con 6 hojas verdaderas expandidas), las que fueron infiltradas en su folíolo central con la suspensión de bacterias o con la solución de $MgCl_2$ (control). Para el análisis de expresión génica, los folíolos se cosecharon a las 24 hs posteriores al tratamiento con la bacteria, mientras que para el análisis de metabolitos se realizaron dos cosechas, una a las 6 y otra a las 24 hs posteriores al

tratamiento. Cada tratamiento consistió de 24 plantas. Tanto para los estudios de expresión génica como de metabolómica, se agruparon los folíolos de las 24 plantas correspondientes a un mismo tratamiento, de forma de abarcar gran parte de la variabilidad entre individuos. Para todos los ensayos se realizaron 3 experimentos independientes, los cuales se consideraron como réplicas biológicas.

8.3.5 Extracción del ARN

Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C. El ARN total se extrajo a partir de 100 mg de tejidos congelados utilizando el *kit Spectrum Total RNA* (Sigma), según instrucciones de los fabricantes. La calidad del ARN fue evaluada en geles de agarosa.

8.3.6 Análisis del transcriptoma

El ARN (300 ng por muestra) se amplificó y marcó utilizando el *GeneChip® 3'IVT Express kit* (Affymetrix) según instrucciones del fabricante. Todas las réplicas biológicas se hibridizaron independientemente con un *Lotus japonicus Custom GeneChip®* (Affymetrix). Las matrices se digitalizaron en un Affymetrix *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix) y los datos fueron analizados con el *GeneChip Operating Software* de Affimetric.

Los datos (archivos .CEL) obtenidos fueron filtrados y analizados utilizando el *software* Robin [150]. Se consideraron significativos los genes con una tasa de descubrimiento falsa (*false discovery rate*, *fdr* correction) $\leq 0,01$. Los genes cuya expresión fue ≤ 2 o ≥ -2 veces de cambio (*fold change*, FC) no fueron tenidos en cuenta para el análisis posterior. Los archivos .CEL que se utilizaron en esta tesis han sido depositados en la base de datos ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/ArrayExpress/>) y son accesibles a través del número de acceso E-MTAB-2000.

Para evaluar la técnica y la calidad de las muestras se realizó un análisis de los componentes principales (PCA) con el *software* Robin [150] a partir de los datos crudos individuales de cada sonda, normalizados según estándares

internos del microarreglo (figura 9).

Para conocer la identidad del gen correspondiente a cada set de sondas (aproximadamente 20 sondas por gen), se alinearon las secuencias de todas las sondas que conforman un set contra la base de datos de las secuencias codificantes (CDSs) del genoma de *L. japonicus* utilizando el *software* Blast+ [157]. Es necesario mencionar que en este análisis se descartaron todos los sets de sondas que arrojaron resultados ambiguos (aquellos que alinearon con más de una CDS, que alinearon con el CDS asignado a otro set de sondas, que mostraron alineamientos parciales etc.).

Se alinearon las secuencias peptídicas de los CDSs predichos en el genoma de *L. japonicus* (ftp://ftp.kazusa.or.jp/pub/lotus/lotus_r2.5/Lj2.5_proteins.faa.gz) contra una base de datos de proteínas de función conocida altamente curada de dicotiledóneas utilizando el programa KEGG *Automatic Annotation Server* (KAAS) [152]. Este programa utiliza un algoritmo similar al BLAST, el GHOST, el cual es más eficiente en la búsqueda de homólogos remotos utilizando, además, un método bi-direccional (*Bi-directional Best Hit*, BBH) [152]. Los genes a los que no se les pudo asignar un ortólogo utilizando este método no fueron tenidos en cuenta en los siguientes análisis. Una vez asignados los ortólogos, los genes anotados fueron identificados según su código KEGG *orthology* (KO). Además, cuando el producto del gen correspondió a una enzima, también le fue asignado un número EC (*Enzyme Commission number*), el cual puede ser utilizado en una gran cantidad de bases de datos de caminos metabólicos como BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org/>) o MetaCyc (<http://metacyc.org/>). Una lista completa de todos los genes significativamente regulados se encuentra en la tabla anexa 1 disponible en (<https://drive.google.com/open?id=0B0cBITdsMbc5Q0NBeFQ1ZkpnZkE>).

La clasificación funcional de los genes se realizó utilizando el *software* MAPMAN [151] y a partir del KO.

8.3.7 RT-PCR cuantitativa

Los ensayos de hibridización con microarreglos se validaron por la técnica de transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa en

tiempo real (RT-PCR). El diseño de cebadores (tabla 4) se realizó con el programa Beacon Designer (Premier Biosoft Internacional), utilizando modelos génicos descargados de la base de datos del *L. japonicus Genome Sequencing Project* del Kazusa DNA Res. Inst. (www.kazusa.or.jp/lotus/release2/), utilizando los siguientes criterios:

Temperatura de *melting* = $55 \pm 5^\circ\text{C}$

Tamaño del amplicón = 75 - 200 bp.

La especificidad de los cebadores fue evaluada contra la misma base de datos.

El ADNc fue obtenido utilizando la siguiente mezcla de reacción:

2 μg de RNA total, 0,5 mM dNTPs, 1 μl de enzima retrotranscriptasa (*moloney murine leukemia virus*, 200 unidades ml^{-1} ; Promega), 5 μl de buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 50mM DTT, pH 8,3), 10 pmoles de cebador oligo dT (Productos Bio-lógicos) y H_2O hasta un volumen de 25 μl . 2,5 μl de una dilución 1/10 del ADNc fue diluido en 15 μl del mix de primer (300 nM de concentración final), 7,5 μl de FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) y la cantidad necesaria de H_2O miliQ. La reacción fue llevada a cabo en un sistema Mx3005P qPCR con la ayuda del *software* MxPro qPCR 4.0 (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A). Como gen *housekeeping* se utilizó el factor de elongation 1- α [153]. Para calcular la razón de expresiones relativas (tratados vs control) se utilizó el *software* REST [154].

8.3.8 Extracción de metabolitos

Los metabolitos se extrajeron mediante una versión modificada del método descrito por Jacobs y colaboradores [155]. Brevemente, se añadieron 1.460 μl de metanol 100% y 60 μl de 0,2 mg ml^{-1} de ribitol a la muestra de tejido congelado molido y se incubaron a 70°C durante 15 min. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12.000 revoluciones por min (rpm) y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. A continuación se añadieron 1.500 μl de agua y 750 μl de CHCl_3 . La muestra fue agitada con vórtex antes de ser centrifugada durante 10 min a 4.000 rpm. Posteriormente, se transfirieron 150 μl de la fase polar a un nuevo tubo para derivatización por agregado de grupos trimetilsililos (TMS). Todas las alícuotas para la derivatización se secaron al

vacío y el aire de los tubos fue desplazado con N₂ antes de almacenarlos en gel de sílice.

8.3.9 Derivatización

Las muestras fueron secadas en frío durante 30 min, de modo de eliminar cualquier resto de humedad. Cada muestra fue resuspendida en 70 µl de 20 mg ml⁻¹ de clorhidrato de metoxiamina en piridina. Posteriormente se incubó las muestras 90 min a 30°C con agitación suave y se les agregó 40 µl de MSTFA (N-metil-N-[trimetilsilil]trifluoroacetamida), incubándose otros 30 min a 37°C con agitación suave.

8.3.10 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis de GC-MS se realizó con un espectrómetro de masas 5973N (Agilent Technologies, EEUU), equipado con un inyector automático 7683 (Agilent Technologies, Stockport, Reino Unido), y acoplado a un detector de cromatografía de gases 6890N (Agilent Technologies, EEUU) con una columna HP-5MS UI (Agilent, 30 m x 0,25 mm, 0,25 micras de espesor de película). Se utilizó helio como gas portador. La temperatura del horno del GC fue de 70°C durante 5 min, incrementándose a 310°C de a 6°C cada un minuto, durante 4 min, el flujo dividido se ajustó a 1 ml min⁻¹, y la temperatura del inyector fue de 250°C. Los espectros de masas se registraron a 70 eV. El rango de masas obtenido fue de 30 a 650 de m/z.

8.3.11 Identificación de metabolitos

Los perfiles de fragmentos obtenidos por MS fueron comparados de forma automática contra bases de datos comerciales (Nist, Nist_msms, mainlib, replib y wiley7n) y caracterizados con el nombre del compuesto más probable. Posteriormente se realizó una confirmación manual de cada metabolito contra la base de datos de la *Golm metabolome database* (GMD; <http://gmd.mpimp->

golm.mpg.de/) y contra la biblioteca de espectros de MS generada por nuestro grupo a partir de ensayos realizados con *Lotus* en estrés abiótico [148].

8.3.12 Cuantificación de metabolitos

Los metabolitos se cuantificaron en base a una versión modificada de la metodología utilizada por Colebatch y colaboradores [129]. Las áreas de los picos correspondientes a cada metabolito se integraron usando ChemStation *Integrator Algorithm* (Agilent ChemStation Software). Las respuestas de los metabolitos se calcularon normalizando las áreas integradas por el peso fresco de la muestra y la respuesta del patrón interno (ribitol) para corregir errores de pipeteo y pequeñas diferencias en cantidad de muestra. La respuesta relativa de un metabolito se definió como la respuesta de un metabolito en una muestra determinada, normalizada por el promedio de las respuestas del mismo metabolito a lo largo de todo el experimento.

8.3.13 Análisis de correlaciones

Para los análisis de correlaciones metabolitos-metabolito y metabolitos-transcriptos se calcularon los coeficientes de correlación aplicando el algoritmo de Spearman para cada combinación posible de metabolitos o de metabolitos y transcriptos respectivamente. La visualización de las correlaciones se realizó por medio de un mapa de calor de los datos obtenidos cada combinación posible. Tanto para el cálculo de los coeficientes de correlación como para la confección de los mapas de calor se utilizó el software Past3 [156].

8.4 Resultados

8.4.1 Análisis transcriptómico de los ecotipos MG-20 y Gifu frente a la inoculación con la bacteria fitopatógena *Pto*

Como se describió durante el Capítulo 1, los síntomas presentados por el ecotipo MG-20 se desarrollan progresivamente, culminando con la defoliación

de casi la totalidad de los folíolos inoculados en alrededor de 72 hs. De esta manera, se decidió seleccionar a las 24 hs como el tiempo apropiado para realizar el estudio transcriptómico, ya que es en este punto comienzan a visualizarse los primeros síntomas de la infección.

Se obtuvieron un total de 3.744 genes regulados significativamente en respuesta a la inoculación con la bacteria en el ecotipo MG-20, y 293 en el ecotipo Gifu. La magnitud de estas respuestas transcripcionales se correlaciona con las diferencias sintomáticas observadas en estos ecotipos. Se observó que un 40% de los genes regulados en MG-20 aumentan su expresión en respuesta a la inoculación con la bacteria, mientras que en Gifu este porcentaje superó el 77%. Si bien esto parecería indicar que las respuestas de estos ecotipos no solo se diferencian en la cantidad de genes regulados sino también en el perfil general de regulación, al comparar ambos perfiles de expresión pudimos comprobar que solo 35 de los 293 genes regulados significativamente en Gifu fueron regulados exclusivamente en este ecotipo (figura 9), mientras que el resto (un 88%) también fue regulado en MG-20 en respuesta al tratamiento (figura 9). Además, otra observación que se realizó es que el sentido de la regulación en los genes que modificaron su expresión en ambos ecotipo frente a *Pto* es el mismo, dado que no se observaron genes que en un ecotipo fueran inducidos en respuesta a la infección por *Pto* y en el otro fueran reprimidos o viceversa (figura 9). En relación a estos transcritos, el gráfico de tendencias muestra una regulación relativamente más alta en MG-20 que en Gifu (figura 10). Estas diferencias se hacen mayores a medida que se observan los genes que más modificaron su expresión en respuesta a la inoculación con la bacteria, tanto los que poseen $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$ como los que poseen $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$.

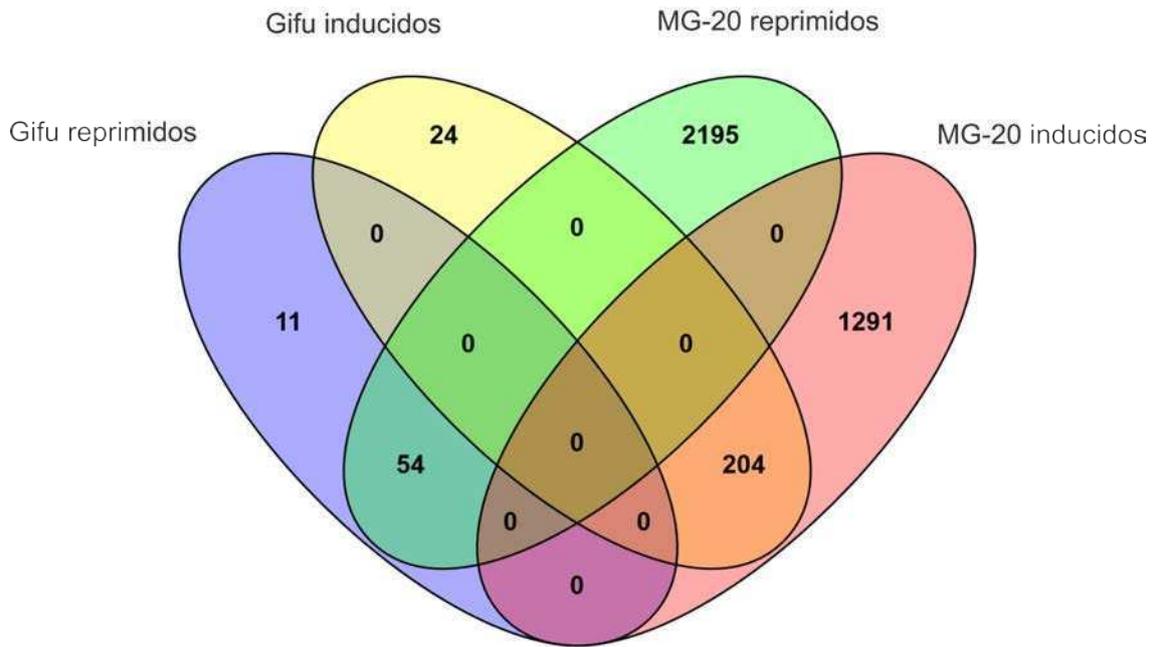


Figura 9: Diagrama de Venn de los genes regulados significativamente frente a la inoculación con *Pto* en los ecotipos Gifu y MG-20 de *L. japonicus*. Los genes regulados significativamente frente a la inoculación con la bacteria fueron agrupados según su perfil de expresión.

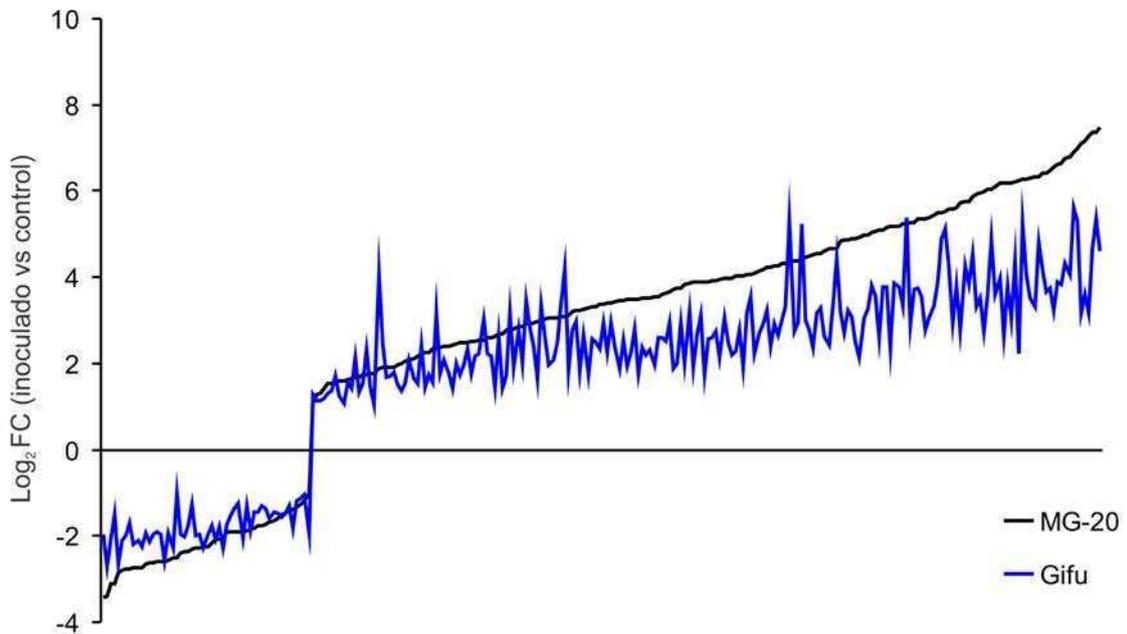


Figura 10: Gráfico de tendencias comparando la expresión de genes regulados significativamente en Gifu y MG-20. El orden de los genes a través del eje X fue determinado por el nivel de expresión en MG-20. El nivel de expresión de los genes en Gifu fue graficado respetando el mismo orden.

8.4.1.1 Validación de los resultados del análisis de los microarreglos con la técnica de RT-PCR

Para validar los resultados obtenidos por la técnica de hibridación en microarreglos de ADN, se utilizó ARN extraído del mismo set de muestras y se estudió la expresión de un conjunto de genes (tabla 1) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Con los resultados de este ensayo y los obtenidos a partir de los microarreglos, se realizó un análisis de regresión lineal en el cual la pendiente obtenida fue de 1,1036 con un $R^2=0,6744$ (figura 11), y un análisis de correlación de Pearson en el cual se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,82 con un P de la prueba de 0,000016. Estos resultados permiten validar la técnica utilizada para estudiar el transcriptoma de *L. japonicus* por medio de microarreglos.

8.4.1.2 Clasificación funcional de los genes regulados en *L. japonicus* frente a la inoculación con *Pto*

Si bien se contó con un mapa funcional de los transcritos de *L. japonicus* a través del *software* MAPMAN [151], esta versión data del año 2005 y no ha sido actualizada, aún cuando se han logrado grandes avances en las herramientas bioinformáticas que permiten comparar genomas.

Del total de las secuencias estudiadas, pudo asignarse un KO a cerca de un tercio del transcriptoma, un porcentaje similar al que se contaba utilizando la base de datos del *software* MAPMAN. Así, de los 3.744 genes regulados frente a la inoculación con la bacteria en el ecotipo MG-20, pudieron asignarse funciones a 1.079 y de los 293 regulados en Gifu pudieron asignarse función a 85.

ID del Gen	ID del set de sondas	Cebador directo	Cebador reverso
chr1.LjB18K24.110.r2.a	chr1.bm1732.2_at	ATGCCTCCTTCACTTAGG	CTTCACATATTCAGAGACTCACTT
chr3.CM0091.1150.r2.d	chr3.cm0216.2_at	GGAGGCAAGCGGAGATATAC	CGGTCCACATCAAATCCAAAC
chr3.CM0279.1210.r2.d	chr3.cm0279.2_at	TGGAGGTCATAGTAGTATCT	GAGGACTCACTTCTTCAT
chr5.CM0062.220.r2.d	chr5.cm0062.23_at	GCTATCTCGTGTTCAAGG	CTATCAGTGCTATCATAAGTTG
chr5.CM0344.440.r2.d	chr5.cm0344.11_at	GGCTTAACAACAATAGACTGAG	AACTTATAGGAGTGAATAATGCG
chr5.CM0200.390.r2.d	chr5.cm0953.1_at	TGAATGATGAAATGCCTAAGAG	CTTCTCCACCACTCCATT
chr5.LjT17N18.60.r2.d	chr5.tm1493.8_at	CTGGTGGTAATGAAGTCAAC	GAAGCTGCGCAACTCTCG
chr6.CM0139.1430.r2.d	chr6.cm0539.8_at	CTTCACAACATATGACAT	AACACAACATTATACTCCTT
chr4.CM0528.420.r2.d	cm0528.2_at	CTCGTCAAACAACCTTAC	CAATGGCACAAATCCTAAA
chr3.CM0279.180.r2.d	ljwgs_011581.2_at	AAGTTGTCATCCAAGTTG	GTAGTAGTTCATATTCACCATT
LjSGA_013445.2	ljwgs_013445.2_at	GGGTTTGGAGACCATTAGAA	GCACACACTGGGACAATA
chr4.CM1622.120.r2.d	ljwgs_020594.1_at	ATGCCATCCAGAGTGTTG	TATACCAAGTTAGCCTCATCTATT
chr1.LjT46A21.140.r2.a	ljwgs_023901.2_at	GCTACATTACCCTTCTTG	CCATTGCTCATTATCTCC
chr3.CM2163.270.r2.m	ljwgs_025651.1.1_at	CTCCTCTCACTCACTCTCACTCTC	TCTCTGTGCGTGGTTGTGTTC
LjSGA_025735.1	ljwgs_025735.1_at	CCAAGTGATGTTACAGTTAC	TGTCCTCTGCTTCTATTATC
LjSGA_045519.1	ljwgs_061086.1.1_at	GCATCAGATCCTAACGAC	CCCACAGAGAACTCAGAG
chr5.CM1077.690.r2.m	ljwgs_068360.1_at	CTCACACTTCTTCTCCAA	AAGGCATTGTTGATAGGT
chr1.CM0295.1210.r2.a	ljwgs_086126.1_at	GAGCACTTGAACATTGAA	TCCACTAACATCCTTGAG
EF1 α (<i>Housekeeping</i>)		TGACAAGCGTGTGATCGAGAGG	GATACCTCTTTCAGGCTCAGCCTT

Tabla 1: Cebadores utilizados en la validación de los resultados del análisis transcriptómico. La expresión de los genes listados en la tabla (columna 1) fue utilizada para validar los resultados obtenidos comparándola con la expresión de su set de sondas correspondiente en el microarreglo (columna 2). Se detalla la secuencia de los cebadores utilizados para la validación (columna 3 y 4) y el gen utilizado como *housekeeping* (EF1 α).

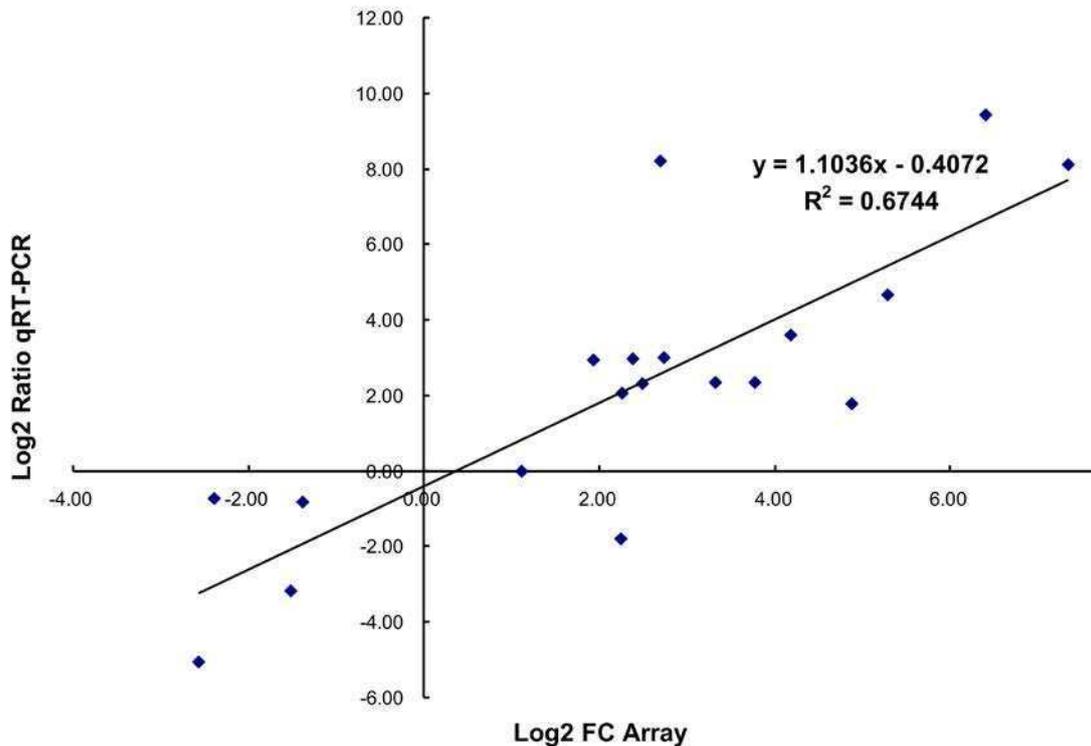


Figura 11: Análisis de regresión lineal para la validación de los resultados obtenidos por la hibridación con microarreglos. Gráfico de dispersión mostrando la expresión relativa obtenida del análisis de los microarreglos (eje X) y por la técnica de RT-PCR (eje Y), de los genes utilizados en la validación. Se muestra la recta generada por el modelo de regresión lineal, la ecuación de la recta obtenida y el R^2 .

En el ecotipo MG-20, las categorías funcionales más representadas entre los genes regulados en respuesta a la inoculación con la bacteria fueron "regulación de la transcripción", "regulación de la traducción" y "modificaciones post-raduccionales", las que en conjunto sumaron un 26% del total de los transcriptos regulados (figura 12B), indicando que la maquinaria de expresión génica en este ecotipo se ve ampliamente afectada durante el proceso. El metabolismo del carbono y la fotosíntesis también se encuentran entre las funciones con más porcentaje de transcriptos regulados, siendo esto consistente con el descenso de la eficiencia del PSII, detectado por medio del análisis de la fluorescencia directa de clorofila, y con el grado de clorosis que presentó este ecotipo al ser infectado con la bacteria. Además, un 6% de los transcriptos regulados se relaciona a procesos de degradación de proteínas indicando que la proteólisis puede estar jugando un papel importante en el desarrollo de los síntomas presentados por estas plantas.

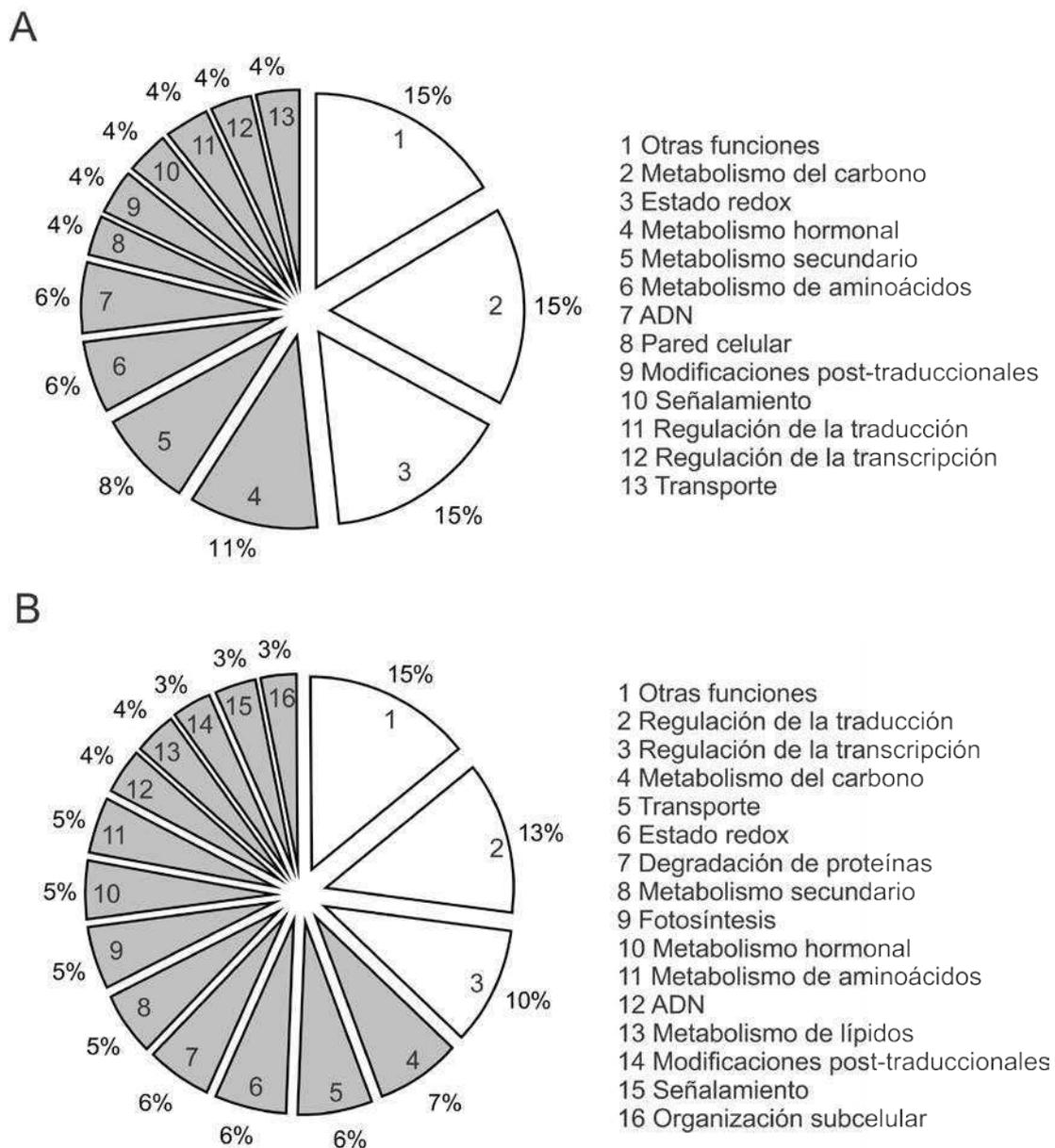


Figura 12: Gráficos circulares mostrando el aporte de los principales grupos funcionales al total de las funciones asignadas. Los grupos funcionales se encuentran ordenados según su porcentaje del total de los genes con función asignada. Los números en el gráfico se corresponden al orden en las listas a la derecha de los gráficos. El gráfico A corresponde a Gifu, el gráfico B corresponde a MG-20.

En el ecotipo Gifu, los grupos funcionales más representados fueron: "metabolismo del carbono", "estado redox" y "metabolismo hormonal" (figura 12A). El hecho de que "estado redox" sea uno de los grupos funcionales más representados en este ecotipo (14%) se correlaciona con los resultados observados durante la primer parte de esta tesis, en la cual se detectó un *burst*

oxidativo en las primeras horas posteriores al tratamiento, e indica que a las 24 hs, aunque la producción de EROs ha descendido, aún se regulan de manera importante los genes relacionados con su producción y con el sistema antioxidante. Es interesante destacar que los grupos relacionados con la regulación de la expresión génica, si bien en conjunto alcanzan un 12%, son menos de la mitad en proporción que en el ecotipo MG-20.

Utilizando el *software* MAPMAN se pudo distinguir un grupo de transcritos posiblemente asociados a la respuesta a estrés biótico. De los genes regulados frente al tratamiento con la bacteria en MG-20, 326 resultaron asociados al estrés biótico (figura 13B), mientras que en Gifu fueron 32 genes (figura 13A), alcanzando un 30% y un 38% del total de los genes identificados respectivamente. A continuación se describirá con mayor detalle los diferentes grupos de genes regulados, involucrados a esta categoría.

8.4.1.3 Genes relacionados a la percepción del patógeno y señalamiento de las vías de defensa

Como fue mencionado en el primer capítulo, se considera que las plantas reconocen a los organismos potencialmente patógenos utilizando principalmente dos estrategias [158]. Por un lado, PAMPs son reconocidos por receptores transmembrana, los que inducen PTI [159, 160]. Por otro lado, la planta puede reconocer a las moléculas efectoras del patógeno a través de proteínas que presentan repeticiones ricas en leucina y secuencias homólogas a sitios de unión a nucleótidos (NB-LLR), las cuales son codificadas por genes de resistencia específicos (R). Esta estrategia depende de que la planta posea el gen R adecuado para el tipo de efector utilizado por el patógeno, de ser así, se induce la ETI, que en general se traduce en una respuesta del tipo HR. Tanto la PTI como la ETI inician cascadas de señalización que eventualmente llevan a una reprogramación del metaboloma de la planta, apuntando a la producción de compuestos antimicrobianos y a restringir el acceso de patógenos a recursos necesarios para su proliferación [116].

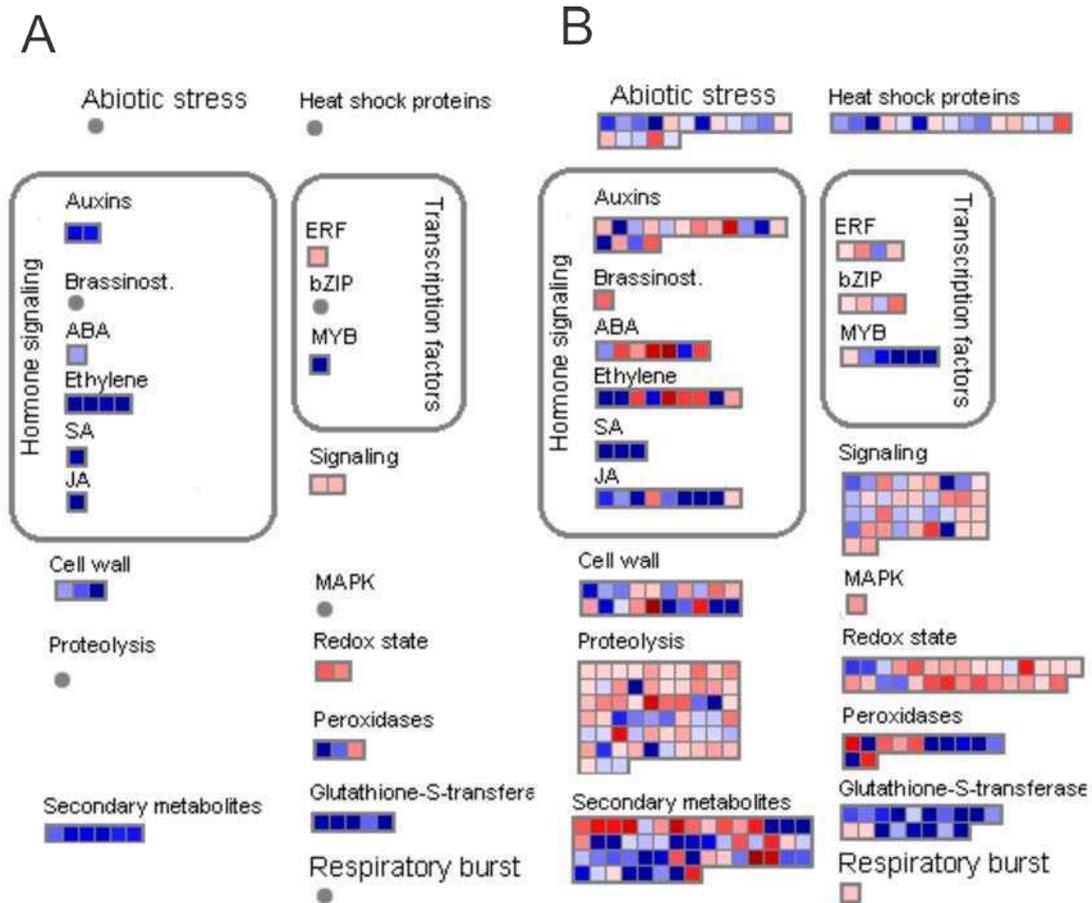


Figura 13: Representación gráfica de los genes clasificados dentro de "estrés biótico" utilizando el *software* MAPMAN. Datos transcriptómicos de folíolos infiltrados con la suspensión de bacterias fueron comparada con sus controles respectivos. Genes que mostraron diferencias significativas y que fueron asignados al grupo funcional "Biotic Stress" del *software* MAPMAN fueron graficados. Cada rectángulo coloreado corresponde a un transcripto y su expresión, en Log_2FC (inoculados vs control) es representada por la escala de colores que va de azul (más expresado en las muestras correspondientes al tratamiento con *Pto*) a rojo (más expresado en las muestras correspondientes al tratamiento control), para el ecotipo Gifu (A) y MG-20 (B).

Pto coloniza los espacios intercelulares de los tejidos aéreos de la planta, donde depende de la disponibilidad de metabolitos para sostener el crecimiento exponencial que llevará a cabo en una infección exitosa [115]. Para esto, los efectores deben ser capaces de vulnerar a las células del hospedador y reconfigurar su metaboloma de forma de poder obtener estos recursos.

En *Arabidopsis*, los receptores-quinasa con repeticiones ricas en leucinas (LRR-RLKs) *SERK3* y *SERK4* funcionan como potenciadores de la señal disparada por la percepción de PAMPs, mediante la formación de complejos

con distintos PRRs, como *FLS2* y *EFR1*. En relación a esto, se ha demostrado que *SERK3* y *SERK4* contribuyen a la resistencia contra la enfermedad provocada por *Pto* en esta especie vegetal [161]. El análisis realizado en *L. japonicus* en esta tesis, mostró que un gen con alta homología a *SERK3* se indujo en MG-20 en respuesta a la bacteria (tabla 2). Además, se detectó la regulación de 4 genes codificantes para receptores quinasa en respuesta a la inoculación con *Pto* en este ecotipo, aunque se desconoce su participación en la inducción de la respuesta de defensa (tabla 2). Por otro lado, no se pudo identificar genes de este tipo entre los transcritos regulados en Gifu.

Se han reportado varios genes que confieren resistencia a distintas cepas de *P. syringae* en *A. thaliana*. Este fenómeno es mediado por el reconocimiento específico del tipo gen por gen y dispara una respuesta del tipo HR [162 – 165]. Por ejemplo, se ha comprobado que los genes *RPS2* y *RPM1* confieren resistencia a cepas de *P. syringae* portadoras de los genes *avrRpt2* o *avrB*, respectivamente [166]. En MG-20 fue posible detectar un gen homólogo a *RPM1* cuya expresión se ve aumentada en respuesta a la inoculación con la bacteria y que no es regulado en el ecotipo Gifu (tabla 2). Si bien *Pto* no posee los efectores reconocidos por *RPM1*, existe la posibilidad que el homólogo a *RPM1* regulado en MG-20, u otro de los genes relacionados que son regulados significativamente en nuestros ensayos pero cuya función no pudo identificada, pueda reconocer alguno de los efectores de esta cepa bacteriana disparando la ETI.

Las proteínas de unión a GTP, o proteínas G, suelen estar inmediatamente río abajo de los receptores de membrana en las cascadas de señalización. En el ecotipo MG-20 se detectaron 13 genes codificantes para proteínas G regulados significativamente en respuesta a *Pto*, 7 de ellos inducidos, mientras en el ecotipo Gifu solo se observó la regulación de uno de estos genes, el mismo expresándose menos en los folíolos infectados que en los controles (tabla 2). Esto indicaría un mayor grado de regulación mediada por este tipo de proteínas en MG-20.

Entre los genes relacionados al señalamiento (aunque no específicamente a la respuesta defensiva), aquéllos asociados a la percepción del calcio fueron los más representados entre los genes regulados en el ecotipo MG-20 (tabla 2).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr2.CM0405.220.r2.d	<i>IRAK4</i>	cytoplasmatic kinase VII	ns	1.43
chr6.CM0314.410.r2.m	<i>BAK1/SERK3</i>	leucine rich repeat II	ns	1.42
chr3.CM0416.1150.r2.a	<i>IRAK4</i>	not assigned.unknown	ns	1.90
chr1.CM0163.10.r2.d	<i>IRAK4</i>	receptor kinases.misc	ns	4.57
chr1.CM0133.1530.r2.a	<i>GLR, GRIP</i>	signalling. nutrient	ns	2.33
chr1.CM0113.1340.r2.d	<i>GLR, GRIP</i>	signalling. nutrient	ns	-2.00
chr1.CM0133.1510.r2.a	<i>GLR, GRIP</i>	signalling. nutrient	ns	1.81
chr4.CM2142.90.r2.m	<i>PPP3R, CNB</i>	signalling.calcium	ns	1.26
chr2.CM0210.50.r2.m	<i>PPP3R, CNB</i>	signalling.calcium	ns	-1.00
chr3.CM0049.450.r2.m	<i>PPP3R, CNB</i>	signalling.calcium	ns	-1.19
chr1.CM0094.400.r2.m	<i>CANX</i>	signalling.calcium	ns	1.51
LjSGA_026195.1	<i>CML</i>	signalling.calcium	ns	2.00
chr4.CM0131.150.r2.m	<i>ERA</i>	signalling.G-proteins	-1.44	-1.83
chr1.LjT35H06.40.r2.m	<i>LEPA</i>	signalling.G-proteins	ns	-2.12
chr5.CM0077.860.r2.d	<i>HFLX</i>	signalling.G-proteins	ns	-2.08
LjSGA_012236.1	<i>ENGA</i>	signalling.G-proteins	ns	-1.24
chr2.CM0272.220.r2.m	<i>NOG1</i>	signalling.G-proteins	ns	1.46
chr1.LjT29L18.70.r2.d	<i>RAB1A</i>	signalling.G-proteins	ns	1.15
chr3.CM0160.970.r2.m	<i>RAB11A</i>	signalling.G-proteins	ns	1.56
chr1.CM0012.2150.r2.m	<i>RAB18</i>	signalling.G-proteins	ns	-1.33
chr4.CM0333.810.r2.d	<i>SAR1</i>	signalling.G-proteins	ns	1.17
chr1.LjT14I13.140.r2.a	<i>ACAP</i>	signalling.G-proteins	ns	-1.42
chr5.LjT34K16.130.r2.m	<i>NUG2, GNL2</i>	signalling.G-proteins	ns	1.41
chr5.CM0034.380.r2.m	<i>NUG1, GNL3</i>	signalling.G-proteins	ns	1.79
chr4.CM0288.670.r2.m	<i>RHOGDI</i>	signalling.G-proteins	ns	2.15
chr6.CM0139.840.r2.m	<i>MAPK1_3</i>	signalling.MAP kinases	ns	-1.81
chr2.CM0020.150.r2.d	<i>RPM1, RPS3</i>	stress.biotic	ns	2.25

Tabla 2: Genes relacionados a la percepción del patógeno y señalamiento de vías de defensa. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

En este sentido, se ha demostrado que la inoculación de plantas de soja con *P. syringae* causa un flujo de iones de calcio hacia el interior celular, y que este fenómeno es un componente esencial en las vías de transducción de señales

que conducen al *burst* oxidativo, a la activación de las defensas de la planta y posteriormente a la respuesta de tipo HR [167]. También se ha detectado un aumento bifásico en la entrada de calcio al citosol de plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Pto*: un aumento inicial del calcio independiente de la PTI, seguido de un segundo pico, que requiere de la interacción entre el receptor *RPM1* y el producto del gen de avirulencia *avrB* [168]. Consistentemente con esto, en MG-20 se observó la regulación de 5 genes que participan de procesos de señalización relacionados a la percepción del calcio, 3 de ellos inducidos frente a la inoculación con la bacteria (tabla 2). Además se pudo detectar la regulación de 3 receptores ionotrópicos de glutamato (*GLRs* o *GRIPs*), 2 de ellos inducidos (tabla 2). Este tipo de receptores median el ingreso de calcio a las células vegetales [169] y han sido relacionados con la producción de óxido nítrico en respuesta a patógenos de una forma similar a lo observado en mamíferos [170]. Estos resultados sugieren que la señalización mediada por el calcio cumpliría un papel importante en la inducción de la respuesta de defensa en el ecotipo MG-20. En contraposición, ningún gen de percepción o señalamiento del calcio fue regulado en Gifu frente a la inoculación con la bacteria.

8.4.1.4 Genes de respuesta a estrés abiótico

Las proteínas de choque térmico (HSP) juegan un papel importante en la respuesta al estrés por calor en microorganismos, animales y plantas [171]. Entre las HSPs, las que pertenecen a la familia de las HSP90 y HSP70 poseen función de chaperonas y se conoce su importancia en *Arabidopsis* para el cierre de los estomas y las respuestas fisiológicas moduladas por el ácido abscísico (ABA) [172]. Por otra parte, se ha demostrado que la localización de estas proteínas, así como su capacidad de unión a péptidos, es crucial para el montaje de la respuestas defensiva en plantas [173 – 175]. Esta relación de dependencia entre las respuestas de defensa de la planta y las proteínas del tipo HSP puede ser aprovechada por los microorganismos para asegurar el éxito de la infección. En este sentido, la chaperona HSP70 del hospedante es el blanco principal del efector Hop11 de *P. syringae* pv. *maculicola*, una

interacción que suprime la defensa de la planta y favorece la virulencia bacteriana [176]. La respuesta mediada por HSPs parece ser importante para la activación de defensas en el ecotipo MG-20, ya que nuestro análisis identificó 17 genes relacionados al estrés por temperatura que son regulados diferencialmente en este ecotipo, incluyendo la inducción de 3 genes codificantes para HSP90s, 1 para una HSP70 y 5 para otras HSPs (tabla 3).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
		pentatricopeptide (PPR)		
chr3.CM2103.220.r2.a	<i>DNAJC7</i>	repeat-containing protein	ns	-1.42
chr3.CM0049.330.r2.d	<i>GROEL</i>	protein.folding	ns	1.64
chr5.CM0909.250.r2.m	<i>GROEL</i>	protein.folding	ns	2.07
chr1.CM0269.620.r2.d	<i>GROES</i>	protein.folding	ns	1.43
LjSGA_026492.1	<i>GROES</i>	protein.folding	ns	1.66
chr4.CM0119.380.r2.m	<i>CNBP</i>	stress.abiotic.cold	ns	1.02
chr2.CM1882.110.r2.m	<i>CLPB</i>	stress.abiotic.heat	ns	-1.42
chr6.CM0055.230.r2.d	<i>DNAK</i>	stress.abiotic.heat	ns	1.27
chr1.CM0133.500.r2.m	<i>HSFF</i>	stress.abiotic.heat	ns	-1.11
LjSGA_064799.1	<i>HSFF</i>	stress.abiotic.heat	ns	2.06
chr1.LjT35C19.20.r2.a	<i>HSFF</i>	stress.abiotic.heat	ns	3.22
chr5.CM1324.80.r2.d	<i>HSP90B</i>	stress.abiotic.heat	ns	1.09
chr2.CM0191.240.r2.m	<i>HSP90B</i>	stress.abiotic.heat	ns	1.69
chr2.CM0210.60.r2.m	<i>HSP90A</i>	stress.abiotic.heat	ns	1.03
LjSGA_029266.1	<i>HSP20</i>	stress.abiotic.heat	ns	3.68
LjSGA_044610.1	<i>HSP20</i>	stress.abiotic.heat	ns	2.22
chr2.CM0608.1370.r2.m	<i>DNAJB4</i>	stress.abiotic.heat	ns	-2.37
chr1.CM0122.2340.r2.a	<i>DNAJB11</i>	stress.abiotic.heat	ns	1.04
chr1.CM0318.330.r2.m	<i>DNAJC9</i>	stress.abiotic.heat	ns	1.77
chr3.CM0279.1070.r2.d	<i>DNAJC14</i>	stress.abiotic.heat	ns	-1.05
LjSGA_077047.1	<i>DNAJ</i>	stress.abiotic.heat	ns	-1.31
LjT40B16.20.r2.m	<i>MLO</i>	stress.biotic	ns	2.50

Tabla 3: Genes de respuesta a estrés abiótico. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

Además se observó en este ecotipo la inducción de 4 genes pertenecientes al sistema de chaperonas groEL/groES (tabla 3), lo cual indica que el plegamiento de proteínas juega un papel importante en la inducción de la respuesta en MG-20. Por su parte, ninguno de estos genes se vio regulado en Gifu frente al tratamiento con *Pto*.

8.4.1.5 Genes relacionados al estado redox celular

Un incremento transitorio en la concentración de EROs se produce dentro de los primeros minutos después del contacto con microorganismos patógenos, seguido por una producción de estos compuestos de forma sostenida [177]. Se ha demostrado que este fenómeno no sólo conduce a la activación de las respuestas de defensa asociadas tanto a PTI como a ETI, sino que también causa un efecto directo sobre el patógeno. Además, las EROs también participan en el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular de forma de generar una barrera física contra microorganismos [99]. La enzima NADPH oxidasa (*NOX*), localizada en la membrana plasmática, es la fuente principal de EROs apoplásticas en respuesta a los patógenos. Sin embargo, no se encontró ningún representante de este grupo entre los genes regulados en MG-20 o Gifu frente a la inoculación con la bacteria, lo que sugiere que otras fuentes de EROs pueden estar a cargo del *burst* oxidativo que fue observado en respuesta a *Pto* en estas plantas. Se ha reportado que otras enzimas pueden contribuir a la acumulación de EROs en respuesta a patógenos, como las poliamino oxidasas (PAOs) y las peroxidasas de pared celular [177]. Tres genes codificantes para peroxidasas fueron regulados tanto en MG-20 como en Gifu después de la infiltración con la bacteria, mientras que otros 9 genes adicionales fueron regulados exclusivamente en MG-20 (tabla 4). A su vez, la expresión de una PAO fue inducida en respuesta al patógeno en ambos ecotipos (tabla 4).

Además, se sabe que las plantas pueden regular negativamente a las enzimas pertenecientes a la maquinaria antioxidante para favorecer la acumulación de EROs [99]. Miembros de este sistema enzimático son las catalasas (*CAT*), las superóxido dismutasas (*SOD*), las tiorredoxinas (*TRX*) y las peroxirredoxinas

(*PRDX*). Pudo detectarse un gen codificante para una *PRDX* cuya expresión se vio disminuida en respuesta a la bacteria en ambos ecotipos (tabla 4). Además, en MG-20 también descendió la expresión de otros dos genes de *PRDXs*, 6 *TRXs* y 3 *SODs* (tabla 4). En las plantas, las moléculas antioxidantes más importantes son el ascorbato (AA) y el glutatión GSH. Las reacciones de reducción y oxidación de estos compuestos forman un ciclo que es central en la regulación del estado redox de la célula vegetal: el ciclo del ascorbato-glutatión (figura 14) [178]. El AA es reducido a monodehidro ascorbato (MDHA) por la enzima ascorbato peroxidasa (*APX*) utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como dador de electrones. Si bien el MDHA es reducido nuevamente a AA por la enzima MDHA reductasa, una parte del MDHA puede transformarse espontáneamente en dehidro ascorbato (DHA). A su vez, el DHA es reducido a AA por la enzima DHA reductasa o, eventualmente, por la glutarredoxina (*GRX*), utilizando como sustrato reductor el GSH y oxidándolo a glutatión di-sulfuro (GSSG). Finalmente el GSSG es regenerado a GSH por la enzima glutatión reductasa (*GR*). En ambos ecotipos, se detectaron varios genes que codifican para enzimas de este ciclo cuya expresión desciende frente al tratamiento con *Pto*, demostrando que el ciclo del ascorbato-glutatión se encuentra reprimido a nivel transcripcional (figura 14 y tabla 5). Además, se detectó en MG-20 la regulación negativa de genes participantes de las vías de síntesis y degradación tanto de AA como de GSH (figura 14B y tabla 5).

Por último, la enzima glutatión S-transferasa (*GST*) participa de la detoxificación de una amplia variedad de compuestos oxidados [179]. En concordancia con la acumulación de EROs, los genes codificantes para *GSTs* son unos de los más representados entre los genes regulados en ambos ecotipos frente a la inoculación con la bacteria. En Gifu se inducen 5 de estos genes, mientras en MG-20 se inducen 16 y se reprimen 2 (figura 14 y tabla 5).

8.4.1.6 Regulación de la expresión génica

Durante el estrés biótico de la planta se modula la expresión génica de una amplia variedad de factores de transcripción [180]. Este proceso sigue al reconocimiento del patógeno y pone en funcionamiento una sofisticada red que regula la expresión de genes de defensa, donde miembros de la misma familia de factores de transcripción pueden funcionar como inductores y otros miembros pueden actuar como represores.

Los factores de transcripción del tipo *Myb* constituyen la familia más grande de este tipo de reguladores de la transcripción en *Arabidopsis* [181], y muchos de ellos también son inducidos por el reconocimiento de patógenos y median la señalización hormonal [182]. En este análisis se encontró un gen correspondiente a un factor de transcripción de tipo *Myb* entre los genes inducidos en ambos ecotipos durante el proceso de patogénesis (tabla 5). Además, pudieron detectarse otros 6 genes regulados en el ecotipo MG-20 pertenecientes a este grupo de factores de transcripción (tabla 6).

Solo un gen más entre los identificados como reguladores de la transcripción modificó su expresión frente al ataque por la bacteria en los dos ecotipos: un factor de transcripción de respuesta a etileno tipo 1 (*ERF1*), el cual se encontró inducido en ambos ecotipos (tabla 6). Entre los factores de unión a un elemento de respuesta a etileno (*EREBP*) se detectaron 4 reprimidos transcripcionalmente y uno inducido frente a la inoculación con la bacteria en MG-20 y uno reprimido en Gifu (tabla 6). Además, en Gifu se pudo identificar un gen correspondiente a un factor de transcripción de respuesta a ABA (*ABF*) reprimido transcripcionalmente frente a la bacteria (tabla 6).

Los factores de transcripción de la familia *TGA* han sido relacionados con la resistencia a estrés biótico en *Arabidopsis*, ya que median la regulación de genes de respuesta a patógenos y la modulación de las vías hormonales del AJ y del ET [183, 184]. En este ensayo, se observó en MG-20 la represión de dos genes codificantes para factores de transcripción del tipo *TGA* cuando las plantas fueron infiltradas con la suspensión de bacterias.

Otro grupo de factores de transcripción regulado en MG-20 es el de los *HD-zip*. Miembros de este grupo aumentan su expresión en plantas de tomate al ser

infectadas con *Pto* [185]. En este ecotipo, 4 de estos factores de transcripción fueron regulados, siendo solo uno de ellos inducido en respuesta a la inoculación con la bacteria (tabla 6).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂	Log ₂
			FC Gifu	FC MG-20
chr5.CM0696.1060.r2.a	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	2.23	4.10
LjSGA_018216.1	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	4.21	3.09
chr6.CM0314.260.r2.m	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	-1.93	-2.65
chr3.CM0634.610.r2.m	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	-1.79
chr3.CM0135.220.r2.d	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	4.03
chr2.CM1032.270.r2.m	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	-2.27
LjSGA_009410.1	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	-2.38
chr3.CM0135.190.r2.d	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	3.77
chr5.CM0052.560.r2.d	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	2.14
chr4.CM0026.520.r2.m	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	-2.87
LjT09M09.30.r2.a	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	4.18
chr1.CM0125.320.r2.d	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	ns	3.77
chr3.CM0451.450.r2.m	<i>PAO1</i>	<i>polyamin oxidase</i>	1.28	1.08
chr6.CM0472.130.r2.m	<i>SOD2</i>	<i>redox.dismutases and catalases</i>	ns	-1.79
chr3.CM0396.620.r2.m	<i>SOD1</i>	<i>redox.dismutases and catalases</i>	ns	-2.17
LjSGA_032199.1	<i>SOD1</i>	<i>redox.dismutases and catalases</i>	ns	-1.18
chr1.CM0029.120.r2.m	<i>PRDX</i>	<i>redox.peroxiredoxin</i>	-1.98	-2.39
chr5.CM1005.20.r2.m	<i>PRDX</i>	<i>redox.peroxiredoxin</i>	ns	-1.55
chr4.CM0006.420.r2.m	<i>PRXQ</i>	<i>redox.peroxiredoxin</i>	ns	-1.95
chr3.CM0634.160.r2.m	<i>TRXA</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	2.53
chr1.CM0051.240.r2.m	<i>TRXA</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	-1.04
chr2.CM0608.1310.r2.m	<i>TRXA</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	2.45
LjSGA_132520.1	<i>TRXA</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	-1.69
LjSGA_126077.1	<i>TRXA</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	-1.63
LjSGA_082631.1	<i>TRXA</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	-1.49
chr2.CM1285.220.r2.d	<i>TXNDC7</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	1.30
chr1.CM0122.100.r2.d	<i>TXNDC7</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	-2.35
chr2.CM0081.1220.r2.m	<i>FTRC</i>	<i>redox.thioredoxin</i>	ns	-1.86

Tabla 4: Genes relacionados al estado redox celular. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5

respectivamente). No corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

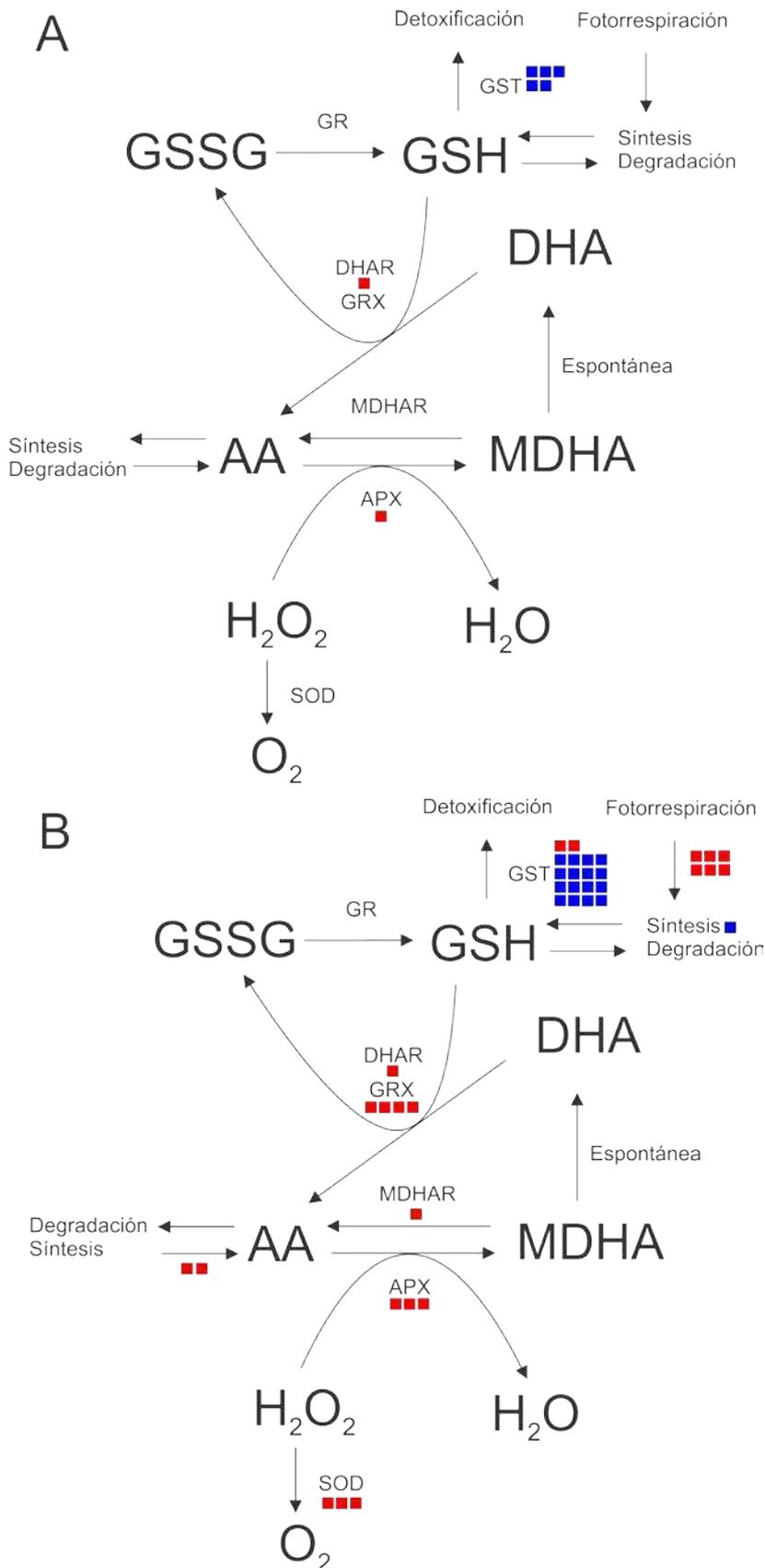


Figura 14: Ciclo del ascorbato-glutación. Representación gráfica de los principales pasos del ciclo del ascorbato-glutación. Rectángulos azules corresponden a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento con *Pto* y rectángulos rojos corresponden a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento control. AA: ascorbato; MDHA: monodehidro ascorbato; DHA: dehidro ascorbato; GSH: glutación; GSSG: glutación di-sulfuro; APX: ascorbato peroxidasa; MDHAR: MDHA reductasa; DHAR: DHA reductasa; GRX: glutarredoxina; GR: glutación reductasa; GST: glutación s-transferasa; SOD: superóxido dismutasa.. Se muestran los resultados obtenidos para Gifu (A) y MG-20 (B).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC Gifu	Log ₂ FC MG-20
	<i>monodehydroascorbate</i>			
LjSGA_065200.1	<i>reductase</i>	<i>ascorbate</i>	ns	-1.05
LjSGA_054875.1	<i>L-ascorbate peroxidase</i>	<i>ascorbate</i>	ns	-1.13
LjSGA_026118.1	<i>DHAR</i>	<i>ascorbate</i>	-1.72	-1.91
chr3.LjT15F17.80.r2.d	<i>L-ascorbate peroxidase</i>	<i>ascorbate</i>	ns	-1.15
chr1.CM0016.170.r2.m	<i>L-ascorbate peroxidase</i>	<i>ascorbate</i>	-2.26	-2.73
LjSGA_049053.1	<i>GME</i>	<i>ascorbate.GME</i>	ns	-1.87
LjSGA_021839.1	<i>grxC, GLRX, GLRX2</i>	<i>glutaredoxins</i>	ns	-2.40
chr4.CM0004.1610.r2.a	<i>GRXCR1</i>	<i>glutaredoxins</i>	ns	-2.59
chr1.CM0109.220.r2.d	<i>grxC, GLRX, GLRX2</i>	<i>glutaredoxins</i>	ns	-1.88
chr1.CM1413.390.r2.m	<i>grxD, GLRX5</i>	<i>glutaredoxins</i>	ns	-1.32
chr1.CM0544.610.r2.m	<i>gshB, GSS</i>	<i>glutathione</i>	ns	2.20
		<i>glutathione S</i>		
LjSGA_072403.1	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	1.57
		<i>glutathione S</i>		
LjSGA_061228.1	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	4.61	7.49
		<i>glutathione S</i>		
LjSGA_037557.1	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	-1.30
		<i>glutathione S</i>		
LjSGA_020173.1	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	2.23
		<i>glutathione S</i>		
LjSGA_018999.1	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	2.11
		<i>glutathione S</i>		
LjSGA_014259.1	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	1.63
		<i>glutathione S</i>		
chr5.CM0909.260.r2.m	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	4.38	6.22
		<i>glutathione S</i>		
chr5.CM0909.220.r2.m	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	4.52
		<i>glutathione S</i>		
chr5.CM0909.210.r2.m	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	3.81
		<i>glutathione S</i>		
chr5.CM0909.200.r2.m	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	3.80	6.18
		<i>glutathione S</i>		
chr5.CM0909.180.r2.m	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	ns	3.40

chr5.CM0909.170.r2.m	GST	<i>glutathione S transferases</i>	4.06	6.80
chr5.CM0909.150.r2.m	GST	<i>glutathione S transferases</i>	ns	1.88
chr4.CM0046.1530.r2.m	GST	<i>glutathione S transferases</i>	ns	2.41
chr4.CM0046.1480.r2.m	GST	<i>glutathione S transferases</i>	2.21	3.52
chr4.CM0004.290.r2.m	GST	<i>glutathione S transferases</i>	ns	-1.18
chr1.LjT37A17.120.r2.m	GST	<i>glutathione S transferases</i>	ns	2.66
chr1.LjT37A17.110.r2.m	GST	<i>glutathione S transferases</i>	ns	1.26
chr4.CM0288.560.r2.m	VTC4	<i>inositol phosphatase</i>	ns	-2.21

Tabla 5: Genes relacionados al ciclo del ascorbato-glutatión. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

Las proteínas del tipo *Argonauta* son uno de los componentes del complejo RISK que participa del silenciamiento génico, proceso que está íntimamente ligado a la defensa de planta [186, 187]. Dos genes codificantes para proteínas *Argonautas* se encontraron reprimidos luego de la inoculación con la bacteria en MG-20 (tabla 6), sugiriendo que el sistema de silenciamiento génico puede encontrarse comprometido en este ecotipo durante la infección.

8.4.1.7 Dergradación de proteínas

Otra estrategia para regular la actividad celular es a través de la degradación post traduccional de proteínas. Las enzimas cuya función está ligada a la degradación proteica no solo intervienen en la modulación de las actividades enzimáticas sino también en la regulación de la respuesta hormonal al degradar reguladores proteicos como en el caso de AJ y las auxinas [115]. En

MG-20, los genes relacionados con la degradación de proteínas fueron unos de los más representados entre los regulados frente a *Pto* (un total de 46 transcritos, tabla 7). De éstos, 25 correspondieron a distintos tipos de proteasas, de los cuales solo 3 se encontraron inducidos frente a la inoculación con la bacteria, revelando una inhibición transcripcional de este sistema de degradación de proteínas. Los 21 genes restantes corresponden a distintos componentes del sistema de degradación proteica que integran el complejo proteosomal (tabla 6), así como también a genes codificantes para proteínas relacionadas con el proceso de ubiquitinación.

8.4.1.8 Metabolismo Hormonal

Tradicionalmente, se considera que la cascada de señalización activada por ácido salicílico (AS) es esencial para la resistencia contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos y, por otro lado, que el ácido jasmónico (AJ) y el etileno inducen la defensa de la planta contra microorganismos necrotrofos [40]. Si bien estos mecanismos fueron considerados por mucho tiempo antagónicos, varios estudios han demostrado que existe una regulación sinérgica entre ellos (una característica importante de cara a ajustar las respuestas de defensa de modo sincronizado) [188]. Además, una buena parte de la investigación llevada a cabo en los últimos años ha sacado a la luz información que demuestra que otras hormonas, tales como auxinas y ABA también participan en la activación de las defensas de las plantas [189].

8.4.1.8.1 Ácido salicílico

Las plantas sintetizan AS por dos vías diferentes [190]. Las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL) e isocorismato sintasa (ICS) catalizan los primeros pasos de estos caminos metabólicos utilizando fenilalanina y corismato como sustratos, respectivamente. Cabe señalar en este punto que el cinamato, producto de la actividad de la *PAL*, es un intermediario clave en la biosíntesis de fenilpropanoides [191]. Por lo tanto, como los fenilpropanoides también están relacionados con la defensa de la planta, se debe tener en

cuenta que la regulación de esta enzima modula no solo la síntesis de AS, sino también la de un espectro más amplio de metabolitos defensivos. Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación con *Pto* indujo la expresión de 3 genes correspondientes a *PAL* y reprimió la de uno de estos transcritos exclusivamente en el ecotipo MG-20 (tabla 8). Además, se observó la regulación negativa de un gen codificante para la enzima *ICS* en este ecotipo (tabla 8). Por su parte, ningún gen relacionado al metabolismo del AS fue regulado en el ecotipo Gifu.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	
			Gifu	MG-20
chr2.CM0608.180.r2.m	<i>AGO</i>	<i>Argonaute</i>	ns	-1.26
chr2.CM0031.300.r2.m	<i>AGO</i>	<i>Argonaute</i>	ns	-1.61
		<i>bHLH,Basic Helix-Loop-Helix</i>		
chr5.CM0048.80.r2.d	<i>PIF3</i>	<i>family</i>	ns	-1.10
		<i>bHLH,Basic Helix-Loop-Helix</i>		
LjSGA_030731.1	<i>PIF4</i>	<i>family</i>	ns	-1.91
chr3.CM1468.200.r2.d	<i>GBF</i>	<i>bZIP transcription factor family</i>	ns	1.40
LjT15A14.110.r2.d	<i>TGA</i>	<i>bZIP transcription factor family</i>	ns	-1.54
chr5.CM0909.500.r2.m	<i>TGA</i>	<i>bZIP transcription factor family</i>	ns	-2.16
chr3.CM0005.340.r2.m	<i>ABF</i>	<i>bZIP transcription factor family</i>	ns	-1.02
		<i>EIN3-like(EIL) transcription</i>		
chr2.CM0031.190.r2.m	<i>EIN3</i>	<i>factor family</i>	ns	-1.47
chr6.CM1613.110.r2.m	<i>ERF1</i>	<i>ethylene.signal transduction</i>	3.85	5.17
		<i>Ethylene-responsive element</i>		
LjSGA_134387.1	<i>EREBP</i>	<i>binding protein family</i>	-1.62	ns
		<i>Ethylene-responsive element</i>		
LjSGA_004289.2	<i>EREBP</i>	<i>binding protein family</i>	ns	-1.36
		<i>Ethylene-responsive element</i>		
CM0905.90.r2.d	<i>EREBP</i>	<i>binding protein family</i>	ns	-1.99
		<i>Ethylene-responsive element</i>		
chr3.CM0080.270.r2.m	<i>EREBP</i>	<i>binding protein family</i>	ns	2.06
		<i>Ethylene-responsive element</i>		
LjSGA_005424.1	<i>AP2</i>	<i>binding protein family</i>	ns	-1.04
LjSGA_012913.2	<i>MCRS1</i>	<i>FHA transcription factor</i>	ns	-1.24
		<i>HB,Homeobox transcription</i>		
chr1.LjT36I04.30.r2.a	<i>HD-ZIP</i>	<i>factor family</i>	ns	-1.14
chr3.CM0136.50.r2.m	<i>HD-ZIP</i>	<i>HB,Homeobox transcription</i>	ns	-1.63

		<i>factor family</i>		
		<i>HB,Homeobox transcription</i>		
chr6.CM0041.360.r2.d	HD-ZIP	<i>factor family</i>	ns	-2.31
		<i>HB,Homeobox transcription</i>		
LjSGA_015479.1	HD-ZIP	<i>factor family</i>	ns	3.00
		<i>MYB domain transcription</i>		
chr3.LjT11G09.150.r2.m	MYBP	<i>factor family</i>	ns	-1.18
		<i>MYB domain transcription</i>		
LjSGA_014958.1	MYBP	<i>factor family</i>	ns	2.02
		<i>MYB domain transcription</i>		
LjSGA_007368.1	MYBP	<i>factor family</i>	ns	2.90
		<i>MYB domain transcription</i>		
chr1.CM0295.180.r2.m	MYBP	<i>factor family</i>	ns	5.90
		<i>MYB domain transcription</i>		
chr3.CM0711.160.r2.d	MYBP	<i>factor family</i>	ns	5.67
		<i>MYB domain transcription</i>		
chr4.CM0042.700.r2.m	MYBP	<i>factor family</i>	3.53	5.95
chr3.CM0152.60.r2.m	MYBP	<i>not assigned.unknown</i>	ns	5.10
		<i>Psudo ARR transcription</i>		
chr3.CM0208.230.r2.m	PRR5	<i>factor family</i>	ns	-2.06
		<i>Psudo ARR transcription</i>		
chr3.CM0616.60.r2.d	PRR7	<i>factor family</i>	ns	-2.06
chr6.CM0169.80.r2.d	PCNA	<i>putative transcription regulator</i>	ns	1.59
		<i>regulation of transcription.</i>		
chr4.CM0042.810.r2.m	BTS	<i>C2H2 zinc finger family</i>	ns	-1.48
		<i>regulation of transcription.</i>		
chr3.CM1570.100.r2.a	ELF3	<i>ELF3</i>	ns	-1.28

Tabla 6: Genes relacionados a la regulación de la expresión génica. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log_2 FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

En *Arabidopsis*, la inducción de la expresión de genes relacionados a patógenos (PR) es mediada por el AS y requiere co-reguladores transcripcionales como *NPR1* y *EDS1* [192]. El AS facilita el movimiento de *NPR1* hacia el núcleo, permitiéndole interactuar con factores de transcripción TGA para activar la expresión de una gran cantidad de genes de defensa,

incluyendo *PR1* [193]. En el presente trabajo de tesis, no se detectaron genes PR ni tampoco reguladores del tipo *NPR1* ni *EDS1* entre los transcriptos regulados frente a la bacteria en ninguno de los ecotipos de *L. japonicus* evaluados, además, como se comentó en el apartado dedicado a regulación de la transcripción, se observó una regulación negativa sobre la expresión de factores de transcripción tipo *TGA* en MG-20 (tabla 6).

En su conjunto, estos resultados sugieren que la vía del AS estaría reprimida en el ecotipo MG-20 en respuesta a la inoculación con *Pto*. Sin embargo, dada la complejidad de la regulación de los mecanismos de defensa, es difícil deducir el rol que juega esta vía hormonal en la respuesta de defensa de *L. japonicus* basándose en el estudio del transcriptoma a un solo tiempo posterior al tratamiento.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC Gifu	Log ₂ FC MG-20
chr5.LjT02L13.100.r2.m	<i>DNPEP</i>	<i>aspartate protease</i>	ns	-1.01
chr1.CM0195.250.r2.m	<i>CTSF</i>	<i>cysteine protease</i>	ns	-1.89
LjSGA_015484.1	<i>CTSH</i>	<i>cysteine protease</i>	ns	-1.74
chr4.CM0173.150.r2.m	<i>CEP</i>	<i>cysteine protease</i>	ns	6.50
chr6.CM0830.490.r2.d	<i>ftsH</i>	<i>metalloprotease</i>	ns	-1.63
chr4.CM0007.340.r2.m	<i>ftsH</i>	<i>metalloprotease</i>	ns	-1.08
chr4.CM0288.930.r2.d	<i>UBX1</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-1.18
LjSGA_015660.1	<i>UBX1</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	1.14
chr4.CM0075.450.r2.d	<i>PRCP</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-2.16
chr2.CM0065.490.r2.d	<i>NAALAD</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-1.90
LjSGA_084036.1	<i>PRCP</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-1.16
LjSGA_130252.1	<i>pcp</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-1.13
LjSGA_113851.1.1	<i>GGH;</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-1.05
chr6.CM0037.600.r2.a	<i>CARP</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-1.04
chr5.CM0200.2600.r2.m	<i>CLPP</i>	<i>protein.degradation</i>	ns	-1.03
chr6.CM0037.430.r2.m	<i>SCPL-II</i>	<i>serine protease</i>	ns	-3.05
chr1.CM0410.330.r2.m	<i>SCPL-II</i>	<i>serine protease</i>	ns	-2.25
chr6.CM1650.130.r2.m	<i>SCPL-I</i>	<i>serine protease</i>	ns	-2.18
chr3.CM0846.100.r2.d	<i>SCPL-I</i>	<i>serine protease</i>	ns	-1.97
chr5.CM0180.120.r2.m	<i>ptrB</i>	<i>serine protease</i>	ns	-1.96
chr2.CM0021.1080.r2.m	<i>lon</i>	<i>serine protease</i>	ns	-1.93
chr6.CM1650.150.r2.m	<i>SCPL-I</i>	<i>serine protease</i>	ns	-1.79

chr4.CM0227.860.r2.m	<i>CPVL</i>	<i>serine protease</i>	ns	-1.18
chr5.CM0239.220.r2.m	<i>clpP</i>	<i>serine protease</i>	ns	-1.17
chr1.CM0113.600.r2.d	<i>SERPINB</i>	<i>serine protease</i>	ns	-1.01
chr1.CM0094.170.r2.m	<i>clpC</i> ;	<i>serine protease</i>	ns	2.16
chr6.CM0118.310.r2.d	<i>SCPL-I</i>	<i>serine protease</i>	ns	4.39
chr4.CM0179.60.r2.a	<i>USP36_42</i>	<i>ubiquitin protease</i>	ns	1.24
chr4.CM0432.1480.r2.m	<i>UBE2O</i>	<i>ubiquitin.E2</i>	ns	-2.06
LjSGA_057858.1	<i>UBE2I</i>	<i>ubiquitin.E2</i>	ns	1.21
chr2.CM0018.420.r2.d	<i>DET1</i>	<i>ubiquitin.E3.DCX</i>	ns	-1.12
chr4.CM0288.630.r2.m	<i>NEDD4</i>	<i>ubiquitin.E3.HECT</i>	ns	1.10
LjSGA_017740.1	<i>ATL6S</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	-2.84
LjSGA_008269.2	<i>ATL76S</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	-1.73
chr3.LjT05F15.110.r2.d	<i>BB</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	-1.70
LjSGA_141075.1	<i>RNF115_126</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	-1.67
LjSGA_025986.1	<i>MUL1</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	-1.59
chr1.CM0113.270.r2.m	<i>RCHY1</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	-1.16
chr4.CM0004.1660.r2.a	<i>ATL7_58_59</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	-1.04
chr2.CM0008.260.r2.m	<i>BOI</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	1.13
chr1.CM0760.250.r2.m	<i>RCHY1</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	1.14
chr1.CM0375.430.r2.d	<i>DRIP</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	1.24
chr6.CM0139.300.r2.m	<i>RHF</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	1.39
chr2.CM0021.1120.r2.a	<i>BOI</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	1.55
LjSGA_024534.1	<i>ATL6S</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	2.57
chr3.CM0160.1050.r2.m	<i>ATL41</i>	<i>ubiquitin.E3.RING</i>	ns	4.40

Tabla 7: Genes relacionados a la degradación de proteínas. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el \log_2 FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

8.4.1.8.2 Ácido jasmónico

El AJ es una hormona derivada de lípidos cuya síntesis depende de las actividades sucesivas de las enzimas lipoxigenasa (*LOX*), aleno óxido sintasa (*AOS*), aleno óxido cilasa (*AOC*) y 12-oxophytodienoate-10,11-reductasa 3 (*OPR3*), seguidas de tres etapas de β -oxidación [194]. Por otra parte, la enzima biosintética jasmonoil-isoleucina sintasa (*JAR1*) forma el conjugado AJ-

isoleucina (AJ-Ile), uno de los derivados naturales más activos del jasmonato. El AJ-Ile es necesario para la unión entre la proteína F-box *COI1*, una ubiquitín ligasa, y el represor *JAZ*, de modo de enviar a este último a degradación mediada por el proteosoma e inducir la expresión de genes de respuesta a jasmonato [195]. En esta tesis se detectará la inducción de la transcripción de 2 genes *LOX*, 2 *AOS*, 1 *AOC* y 2 *OPR* en el ecotipo MG-20 frente a la inoculación con *Pto*, mientras que la transcripción de una *OPR* fue regulada negativamente en las mismas condiciones en este ecotipo (tabla 9). Esto indica que en las condiciones estudiadas, la síntesis de AJ está inducida transcripcionalmente en MG-20 pero no así en Gifu. Además, la activación de la señalización de AJ en MG-20 puede no depender de mediadores clásicos, ya que se redujeron los niveles de expresión de *JAR1* y *COI1* y se indujo la expresión de 2 represores *JAZ* en respuesta a la inoculación con la bacteria (tabla 9). Mas aún, la expresión de un gen que corresponde a un homólogo al factor de transcripción *MYC2* se encuentra reprimida en este ecotipo en respuesta a la bacteria (tabla 9). *MYC2* ha sido reportado como uno de los factores de transcripción que median la activación de las defensas disparadas por AJ [195]. Además, esta vía de activación transcripcional de las defensas dependientes de AJ necesita de la acción de NADPH oxidasas del tipo *Rboh* para ser efectiva [196], y en MG-20 se observó la regulación negativa de solo un gen codificantes para oxidasas del tipo *Rboh* en las plantas infectadas con respecto a las controles (tabla 9).

Otra forma activa del AJ, distinta al AJ-Ile, es el metil-jasmonato (MeAJ), sintetizado a partir de AJ por la enzima AJ-O-metiltransferasa. Se ha demostrado que el MeAJ modula el cierre de estomas [197], el cual es un proceso central en la defensa contra *P. syringae* [115]. En este trabajo se detectó la inducción de un gen codificante para una AJ-O-metiltransferasa en ambos ecotipos frente a la bacteria, y de otros 2 inducidos exclusivamente en MG-20 (tabla 9). Esto señala que la vía del MeAJ estaría favorecida sobre la de AJ-Ile en *L. japonicus* en respuesta a *Pto*.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
LjSGA_018584.1	<i>menF</i> <i>phenylalanine</i>	<i>isochorismate synthase</i>	ns	-2.18
chr1.CM0012.1210.r2.m	<i>ammonia-lyase</i> <i>phenylalanine</i>	<i>lignin biosynthesis.PAL</i>	ns	1.50
chr1.CM0012.1040.r2.m	<i>ammonia-lyase</i> <i>phenylalanine</i>	<i>lignin biosynthesis.PAL</i>	ns	1.50
chr1.CM0012.1070.r2.m	<i>ammonia-lyase</i> <i>phenylalanine</i>	<i>lignin biosynthesis.PAL</i>	ns	-2.36
chr2.CM0191.870.r2.m	<i>ammonia-lyase</i>	<i>lignin biosynthesis.PAL</i> <i>UDP glucosyl and glucoronyl</i>	ns	2.89
LjSGA_015360.1	<i>SGT1</i>	<i>transferases</i> <i>UDP glucosyl and glucoronyl</i>	ns	-1.28
LjSGA_086482.1	<i>SGT1</i>	<i>transferases</i> <i>UDP glucosyl and glucoronyl</i>	ns	-2.59
LjT01K14.20.r2.d	<i>SGT1</i>	<i>transferases</i>	ns	-2.74

Tabla 8: Genes relacionados con el metabolismo del AS. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

8.4.1.8.3 Etileno

El etileno a menudo actúa sinérgicamente con el AJ durante la respuesta a patógenos [40]. Es sintetizado a partir de S-adenosyl-metionina por la acción de dos enzimas, 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO). Tras la inoculación con la bacteria, se observó la inducción de solo un gen de la biosíntesis de etileno, una ACS, en ambos ecotipos. Además, como se describió en el apartado dedicado a factores de transcripción, se observó la regulación de 2 factores de respuesta a etileno en el ecotipo Gifu y 6 en MG-20 (tabla 6), casi la mitad de estos fueron inducidos en cada ecotipo respectivamente.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr1.CM0591.340.r2.d	OPR	12-Oxo-PDA-reductase	ns	-1.25
chr1.CM0591.260.r2.m	OPR	12-Oxo-PDA-reductase	ns	4.99
chr4.LjT10E17.80.r2.d	OPR	12-Oxo-PDA-reductase	ns	6.76
chr2.CM0903.700.r2.m	AOC	allene oxidase cyclase	ns	3.63
chr5.CM0089.580.r2.d	AOS	allene oxidase cyclase	ns	2.19
chr6.CM0314.80.r2.d	AOS	allene oxidase cyclase	ns	5.07
chr1.CM0105.550.r2.d	JAR1	auxin.induced-regulated-responsive-activated bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	ns	-1.56
chr2.CM0177.810.r2.m	MYC2	Helix family	ns	-1.48
LjB17J04.70.r2.m	LOX2S	lipoxygenase	ns	1.89
chr3.CM0115.260.r2.m	LOX1_5	lipoxygenase	ns	2.64
chr4.CM0006.230.r2.d	JAZ	not assigned.unknown	ns	4.79
chr6.CM0013.820.r2.d	JAZ	not assigned.unknown	ns	2.82
chr1.CM0955.70.r2.a	jasmonate O-methyltransferase	salicylic acid.synthesis-degradation	ns	6.23
chr1.CM0952.190.r2.m	jasmonate O-methyltransferase	salicylic acid.synthesis-degradation	ns	5.02
chr1.CM0113.890.r2.m	jasmonate O-methyltransferase	salicylic acid.synthesis-degradation	ns	5.14
chr1.CM0094.220.r2.m	RBOH	stress.biotic.respiratory burst	ns	-1.37
chr1.CM0269.1230.r2.a	COI-1	ubiquitin.E3.SCF.FBOX	ns	-1.70

Tabla 9: Genes relacionados con el metabolismo del AJ. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

8.4.1.8.4 Ácido Abscísico

El ABA juega un papel crucial en la regulación del crecimiento y la adaptación al estrés abiótico de la planta [198]. La participación de esta hormona en la respuesta a microorganismos invasores parece ser bastante compleja y

depende del tipo de interacción planta-patógeno [199], aunque se ha relacionado generalmente a la regulación negativa de los mecanismos de defensa. Algunos autores han sugerido que *P. syringae* pv. tomato induce la biosíntesis de ABA en *Arabidopsis* como estrategia de virulencia [200]. El ABA es sintetizado en plantas a través de la epoxidación de los carotenoides zeaxantina y anteraxantina, una reacción catalizada por la zeaxantina epoxidasa (*ZEP*). Esta reacción es seguida por las acciones de las enzimas 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (*NCED*), la deshidrogenasa de alcohol de cadena corta (*DEG*) y la aldehído oxidasa (*AAO*) [200]. En MG-20, la mayoría de los genes del metabolismo del ABA fueron regulados negativamente después de la infiltración con la bacteria. (tabla 10) Además, se observó un descenso significativo en la expresión de un gen correspondiente a un factor de respuesta a ABA (*ABF*, Tabla 10), lo que sugiere que la biosíntesis de ABA se encuentra afectada. Por su parte, en Gifu no se observó la regulación de ningún gen relacionado a este metabolismo hormonal. Estas características indican que *P. syringae* no es capaz de inducir el metabolismo del ABA en *L. japonicus* como lo hace en otras plantas hospedantes. Además, como el ABA juega un papel crucial durante la respuesta a sequía [201], el descenso en la expresión de genes relacionados a esta vía en la MG-20 es congruente con la observación de síntomas de deshidratación en los folíolos infiltrados con la suspensión de bacterias.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr1.CM0794.180.r2.d	<i>NCED</i>	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>	ns	2.76
LjSGA_013491.1.1	<i>NCED</i>	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>	ns	-3.49
chr3.CM0005.340.r2.m	<i>ABF</i>	<i>bZIP transcription factor family</i>	ns	-1.02
LjSGA_036557.1	<i>ABA2</i>	<i>short chain ehydrogenase/reductase</i>	ns	-2.20
LjSGA_059500.1	<i>ZEP</i>	<i>zeaxanthin epoxidase</i>	ns	-3.13
chr3.LjT13N17.140.r2.m	<i>ZEP</i>	<i>zeaxanthin epoxidase</i>	ns	-1.86

Tabla 10: Genes relacionados con el metabolismo del ABA. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control

no significativa.

8.4.1.8.5 Auxinas

El ácido 3-indolacético (IAA) es la más abundante de las auxinas en plantas. Existe evidencia de que esta hormona aumenta la susceptibilidad a enfermedades en plantas y que la inactivación de la señalización del IAA participa de la inducción de las respuestas de defensa que se producen en estos organismos [202]. Esto parece explicarse por la capacidad que tiene esta hormona de inducir varios genes que codifican para expansinas (y en consecuencia de provocar un debilitamiento de la pared celular), así como de la supresión de la vía de señalización del AS mediada por IAA. La biosíntesis de IAA es bastante compleja e involucra muchos caminos que se pueden clasificar como triptofano dependientes y triptofano independientes. Estas rutas metabólicas, junto con la síntesis de IAA conjugadas, son los principales mecanismos utilizados por las plantas para regular la actividad de esta hormona. La acción de las auxinas está mediada por la inducción de tres familias de genes, los represores transcripcionales *Aux/IAA*, los activadores *ARF* y las proteínas F-box *TIR* [202]. La acumulación de IAA facilita la unión de *TIR* al represor *Aux/IAA*, lo que en consecuencia promueve su degradación. De esta manera, el activador es liberado y se activan los genes de respuesta a IAA. Entre los genes de respuesta se destacan los *small auxin-up RNA* (*SAUR*), los *GH3* y los propios *AUX/IAA* [203 - 205]. En el presente trabajo no se detectaron transcritos relacionadas con las rutas biosintéticas del IAA regulados en respuesta a la inoculación con la bacteria. Sin embargo, se detectó un descenso en la expresión de genes correspondientes al represor *Aux/IAA* en MG-20 (tabla 11), sugiriendo que esta vía de señalización hormonal podría ser activada en este ecotipo durante el estrés biótico. Consistentemente con lo anterior, se observó la inducción de genes de respuesta a IAA en ambos ecotipos. Dos genes *GH3* fueron inducidos en ambos ecotipos, mientras que un gen *GH3* adicional y un gen *SAUR* fueron además inducidos exclusivamente en MG-20 (tabla 11). Los genes *GH3* codifican para la IAA-aminoácido sintetasa, la expresión de esta enzima en arroz evita la acumulación de IAA libre y conduce a una mayor resistencia a la enfermedad producida por

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* [206]. Además, *GH3* es capaz de modular tanto el AS como la señalización por IAA durante el estrés biótico en *Arabidopsis* [207]. Por otro lado, las enzimas hidrolasas ácidas de IAA-aminoácido, liberan el IAA conjugado en un mecanismo inverso al de las *GH3* [208]. En esta tesis se detectaron varios genes codificantes para estas enzimas regulados significativamente en el ecotipo MG-20, algunos inducidos y otros reprimidos frente a la inoculación con *Pto* (tabla 11). En conjunto, estos datos parecen indicar que la concentración de IAA libre es modulada frente a la bacteria mediante una ajustada regulación sobre su fracción conjugada. Además, la reducción transcripcional del represor de este sistema *Aux/IAA* mediaría la activación de la ruta del IAA en el ecotipo MG-20.

8.4.1.9 Fotosíntesis

La maquinaria fotosintética fue una de las más afectadas en respuesta a la inoculación con la bacteria, en particular en el ecotipo MG-20. Consistentemente con la clorosis observada en este ecotipo y con la caída de la eficiencia fotosintética detectada por medio del análisis de la fluorescencia directa de la clorofila, la mayoría de los procesos fotosintéticos fueron afectados a nivel transcripcional frente al tratamiento. Así, una gran cantidad de genes asociados a la etapa lumínica de la fotosíntesis disminuyeron su expresión frente al ataque bacteriano, tales como genes codificantes para proteínas de los complejos antena asociados a ambos fotosistemas (figura 15A y tabla 12). A su vez, 7 componentes del PSII fueron reprimidos transcripcionalmente, no así los componentes del fotosistema I que no fueron regulados a nivel de la expresión génica (figura 15B y tabla 12). Otros componentes de este proceso también se vieron afectados, tales como el complejo citocromo b6/f, la plastocianina, la ferredoxina, la ferredoxina reductasa y la ATP sintasa, observándose la represión transcripcional de al menos un miembro de cada uno de estos componentes (figura 15B y tabla 12).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC Gifu	Log ₂ FC MG-20
chr2.CM0177.540.r2.m	AUX/IAA	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	ns	-1.26
chr5.CM1574.440.r2.m	AUX/IAA	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	ns	-1.74
chr5.CM0071.620.r2.m	AUX/IAA	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	ns	-2.29
chr3.CM0711.400.r2.d	GH3	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	ns	-3.06
chr2.CM0124.1040.r2.m	GH3	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	ns	1.87
LjSGA_019565.1	GH3	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	2.96	3.23
chr2.CM0250.160.r2.m	GH3	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	2.76	4.50
chr1.CM0012.1380.r2.m	SAUR	<i>auxin.induced-regulated-responsive-activated</i>	ns	2.30
chr1.CM0269.740.r2.m	PIN	<i>auxin.signal transduction</i>	ns	1.42
chr1.CM1413.300.r2.m	PIN	<i>auxin.signal transduction</i>	ns	-2.04
chr1.CM0027.120.r2.m	ILR1	<i>auxin.synthesis-degradation</i>	ns	1.65
chr1.CM0207.170.r2.m	ILR1	<i>auxin.synthesis-degradation</i>	ns	-1.53
chr3.CM1570.50.r2.a	ILR1	<i>auxin.synthesis-degradation</i>	ns	7.34

Tabla 11: Genes relacionados con el metabolismo de las auxinas. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

Consistentemente con la fuerte represión transcripcional de los procesos asociados a la etapa lumínica de la fotosíntesis, se detectó en MG-20 una represión importante de los genes correspondientes a las enzimas participantes del ciclo de Calvin-Benson de fijación del carbono y del proceso de fotorrespiración. Unos 15 y 7 genes, respectivamente, mostraron una menor expresión en las muestras de plantas infiltradas con la suspensión de bacterias con respecto a las que recibieron el tratamiento control (tabla 13).

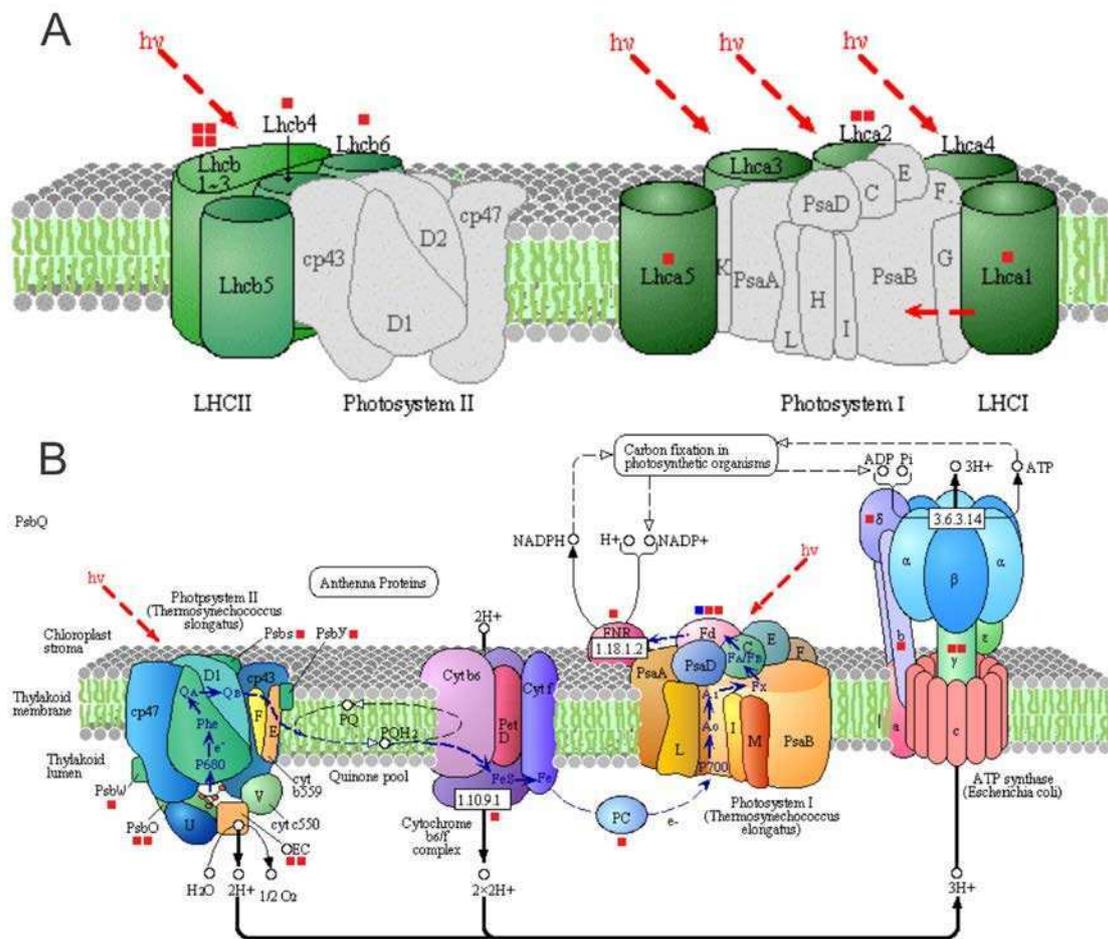


Figura 15: Regulación a nivel transcripcional de la maquinaria fotosintética asociada a los procesos lumínicos en el ecotipo MG-20 en respuesta a la inoculación con *Pto*. Se grafica la expresión génica de los genes que codifican para la maquinaria de los complejos antena (A) y de los fotosistemas y complejos asociados (B). Rectángulos azules corresponden a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento con *Pto* y rectángulos rojos corresponden a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento control, la figura está basada en una imagen tomada del KEGG (*Kanehisa Laboratories*, japon).

Además, se observó una regulación negativa de la transcripción de tres componentes (*CRY1*, *PHYA* y *SPA1*) del sistema de regulación en respuesta a la luz (*COP1*), el cual se encuentra fuertemente ligado a la fotomorfogénesis, síntesis de clorofila y el comportamiento de los estomas (tabla 14) [209, 210]. De la misma manera, la síntesis de clorofila fue inhibida a nivel transcripcional, observándose la regulación negativa de genes codificantes para la clorofila *a* reductasa (*HCAR*), la clorofila *b* reductasa (*NOL*) y la clorofila *a* oxigenasa

(CAO) (tabla 14). La degradación de los pigmentos fotosintéticos no fue uno de los procesos afectados a nivel transcripcional por la bacteria, aunque se detectó un descenso en la expresión de un gen codificante para la enzima reductasa del catabolito rojo de la clorofila (*ACD2*, tabla 14), la cual tiene como función catabolizar los productos de degradación de estos pigmentos. Plantas de *Arabidopsis* mutantes para este gen muestran un fenotipo que presenta muerte celular espontánea [211, 212]. Además, se ha postulado que la aparición de síntomas en *A. thaliana* durante el ataque de *Pto* se debe en parte a la acumulación de productos de degradación de la clorofila, los cuales inducirían el daño celular por su capacidad de absorber energía lumínica produciendo a su vez radicales libres [213].

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr1.LjT04O21.180.r2.d	<i>ATPF0B, atpF</i>	<i>ATP synthase</i>	ns	-2.01
LjSGA_028054.1.2	<i>ATPF1D, atpH</i>	<i>ATP synthase</i>	ns	-1.66
LjSGA_007659.1	<i>ATPF1G, atpG</i>	<i>ATP synthase</i>	ns	-3.63
LjSGA_015583.2	<i>ATPF1G, atpG</i>	<i>ATP synthase</i>	ns	-2.48
chr3.CM0711.10.r2.d	<i>petC</i>	<i>cytochrome b6/f</i>	ns	-2.19
chr6.CM0508.470.r2.m	<i>petF</i>	<i>ferredoxin</i>	ns	-1.38
chr1.CM0591.90.r2.m	<i>petF</i>	<i>ferredoxin</i>	ns	-1.69
LjSGA_059344.1	<i>petF</i>	<i>ferredoxin</i>	ns	2.40
chr4.CM0119.370.r2.m	<i>petH</i>	<i>ferredoxin reductase</i>	ns	-2.18
LjSGA_028870.1	<i>LHCA2</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-2.01
chr1.CM2113.290.r2.a	<i>LHCA5</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-3.15
LjSGA_008354.1	<i>LHCA1</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-1.73
chr6.CM0013.900.r2.d	<i>LHCA2</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-2.74
LjSGA_017687.2	<i>LHCB1</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-2.55
LjSGA_061139.1	<i>LHCB1</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-3.07
chr2.CM0191.170.r2.m	<i>LHCB2</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-1.27
chr3.CM0590.850.r2.m	<i>LHCB3</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-1.66
LjT24M21.140.r2.a	<i>LHCB4</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-2.37
chr6.CM0314.310.r2.m	<i>LHCB6</i>	<i>LHC-II</i>	ns	-1.83
chr1.CM0121.20.r2.m	<i>petE</i>	<i>plastocyanin</i>	ns	-1.57
chr5.CM0200.1370.r2.d	<i>psaD</i>	<i>PSI polypeptide subunits</i>	ns	-1.70
chr3.CM0164.190.r2.d	<i>psaO</i>	<i>PSI polypeptide subunits</i>	ns	-1.65
LjSGA_026446.2	<i>psaH</i>	<i>PSI polypeptide subunits</i>	ns	-1.66

LjSGA_005432.2	<i>psaK</i>	<i>PSI polypeptide subunits</i>	ns	-1.24
chr1.CM1413.440.r2.d	<i>psaL</i>	<i>PSI polypeptide subunits</i>	ns	-1.55
chr4.CM0680.370.r2.m	<i>psaN</i>	<i>PSI polypeptide subunits</i>	ns	-1.82
chr3.CM0047.220.r2.m	<i>psaG</i>	<i>PSI polypeptide subunits</i>	ns	-1.74
chr4.CM0194.200.r2.m	<i>psbO</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-1.73
chr2.CM0323.140.r2.m	<i>psbO</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-2.28
LjSGA_035553.0.1	<i>psbP</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-2.80
chr2.LjT36E17.80.r2.d	<i>psbP</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-2.43
chr5.CM1574.770.r2.d	<i>psbW</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-1.24
LjT45D24.160.r2.d	<i>psbY</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-2.53
LjSGA_046311.1	<i>psbY</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-2.62
chr1.LjT04N09.190.r2.d	<i>psbS</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-1.22
chr2.CM0608.350.r2.d	<i>psbQ</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-2.83
chr3.CM0846.280.r2.d	<i>psbQ</i>	<i>PSII polypeptide subunits</i>	ns	-1.87

Tabla 12: Genes relacionados con reacciones lumínicas de la fotosíntesis. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

8.4.1.10 Comparación entre los transcriptomas basales de los ecotipos MG-20 y Gifu

El análisis de componentes principales descrito al comienzo de este capítulo indicó que podrían existir diferencias transcripcionales basales importantes entre ambos ecotipos. Con el objetivo de estudiar estas diferencias, se realizó un análisis estadístico similar al utilizado para detectar genes regulados frente a la inoculación con *Pto*, pero esta vez se compararon las muestras infiltradas con la solución de MgCl₂ de Gifu con las que recibieron el mismo tratamiento de MG-20. Utilizando los mismos criterios estadísticos considerados anteriormente, de esta comparación surgieron 402 genes cuya expresión es significativamente diferente entre los transcriptomas basales de estos ecotipos.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr2.CM0008.660.r2.m	GGAT	<i>alanine aminotransferase</i> <i>aminotransferases</i>	ns	-1.20
chr2.LjB15M17.30.r2.m	AGXT	<i>peroxisomal</i>	ns	-3.16
chr3.CM0091.1890.r2.m	ALDO	<i>calvin cyle.aldolase</i>	2.96	-2.46
chr4.CM0087.710.r2.m	ALDO	<i>calvin cyle.aldolase</i>	2.76	-2.24
chr1.CM2049.20.r2.m	FBP	<i>calvin cyle.FBPase</i>	ns	-3.72
chr4.CM0100.110.r2.m	FBP	<i>calvin cyle.FBPase</i>	ns	-2.69
chr1.CM0104.1510.r2.m	GAPA	<i>calvin cyle.GAP</i>	ns	-2.22
chr1.CM0113.1350.r2.d	GAPA	<i>calvin cyle.GAP</i> <i>calvin cyle.</i>	ns	-1.99
chr3.CM0996.1190.r2.d	PGK	<i>phosphoglycerate kinase</i>	ns	-2.99
chr2.CM0020.250.r2.m	PRK, <i>prkB</i>	<i>calvin cyle.PRK</i>	ns	-2.42
chr4.CM0087.330.r2.m	RPE	<i>calvin cyle.RPE</i> <i>calvin cyle. rubisco</i>	ns	-2.48
chr4.CM0075.150.r2.m	E2.1.1.127	<i>interacting</i> <i>calvin cyle. rubisco small</i>	ns	-2.31
chr1.CM0017.20.r2.m	<i>rbcS</i>	<i>subunit</i>	ns	-2.13
chr3.CM0226.250.r2.m	GLYK	<i>glycerate kinase</i>	ns	-2.53
chr3.LjT36L22.30.r2.a	HAO	<i>glycolate oxydase</i>	ns	-3.58
chr2.CM0210.260.r2.m	ALDO	<i>glycolysis.aldolase</i>	ns	-3.18
chr5.CM0359.200.r2.d	ALDO	<i>glycolysis.aldolase</i>	2.25	3.48
LjSGA_011418.2	HPR1	<i>hydroxypyruvate reductase</i> <i>phosphoglycolate</i>	ns	-1.90
LjSGA_014290.1	PGP, PGLP	<i>phosphatase</i> <i>ribose 5-phosphate</i>	ns	-1.72
chr6.CM1034.240.r2.d	<i>rpiA</i>	<i>isomerase</i>	ns	-2.44
	<i>sedoheptulose-</i>	<i>seduheptulose</i>		
LjT09F12.60.r2.d	<i>bisphosphatase</i>	<i>bisphosphatase</i> <i>serine</i>	ns	-3.07
chr2.CM0177.310.r2.m	<i>glyA, SHMT</i>	<i>hydroxymethyltransferase</i>	ns	-2.31

Tabla 13: Genes relacionados con reacciones el ciclo de Calvin-Benson y el proceso de fotorrespiración. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

Para validar estas comparaciones se seleccionaron 6 de estos genes y se compararon los resultados obtenidos de los microarreglos con los obtenidos por la técnica de RT-PCR en un nuevo conjunto de muestras provenientes de plantas a las cuales no se les realizó ningún tipo de tratamiento (estos folíolos no fueron infiltrados con la solución de MgCl₂ y por lo tanto no presentaron daño mecánico). En este caso, pudo observarse un comportamiento similar en los genes seleccionados independientemente de la técnica utilizada para evaluar la abundancia relativa de los transcritos y del daño mecánico inflingido a las muestras control (tabla 15).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
LjSGA_045700.1.1	CAO	<i>chlorophyll b synthase</i>	ns	-2.36
LjSGA_042365.1	HCAR	<i>not assigned.no ontology short chain</i>	ns	-2.67
LjB09N08.90.r2.a	NOL	<i>dehydrogenase/reductase short chain</i>	ns	-2.17
LjB09N08.90.r2.a	NOL	<i>dehydrogenase/reductase</i>	ns	-2.17
LjT09A12.110.r2.m	CRY1	<i>signalling.light</i>	ns	-1.68
chr5.CM0048.230.r2.m	PHYA	<i>signalling.light</i>	ns	-1.23
chr2.CM0060.180.r2.a	SPA1	<i>signalling.light</i>	ns	-1.39
chr2.LjT48A12.210.r2.d	ACD2	<i>stress.biotic</i>	ns	-1.88

Tabla 14: Genes relacionados con la síntesis y degradación de clorofila. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

De los genes cuya expresión fue significativamente diferente entre los transcriptomas basales de los ecotipos estudiados, y que además pudieron ser asignados a alguna función, un 40% fue asociado a la respuesta a estrés biótico (figura 16) y de éstos, un 75% fueron más expresados en el ecotipo Gifu que en MG-20. Entre ellos podemos destacar genes relacionados al estado redox, peroxidases, glutatión-S-transferasas, genes relacionados a la pared celular, HSPs, factores de transcripción y estrés abiótico. También estuvieron

más representados en Gifu la mayoría de los genes relacionados al metabolismo secundario (que incluyeron genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides y flavonoides) y los relacionados al señalamiento, (que incluyeron un homólogo a un *EDS1* y un homólogo a un *MLO1*). *EDS1* ha sido descrito como un gen que media la respuesta a varios patógenos en *Arabidopsis*, [214, 215], mientras *MLO1* confiere resistencia a patógenos fúngicos [216, 217]. Además, es interesante destacar que un 30% de los 402 genes detectados fue además regulado significativamente en MG-20 frente a la bacteria, mientras que pocos de éstos fueron regulados en Gifu al ser inoculado con *Pto* (tabla 16). Esto último indicaría que muchos de los genes inducidos en MG-20 se expresan significativamente más en Gifu en condiciones control, lo cual sugiere que este ecotipo presenta un estado basal menos propenso a la infección.

Gen ID	Log ₂ FC microarreglo	p	Log ₂ Ratio RT-PCR	p
chr5.CM0344.440.r2.d	7,35	0,000004	8,12	0.01
chr3.CM2163.270.r2.m	4,88	0,000007	1,78	0.03
chr5.LjT17N18.60.r2.d	3,32	0.01	2,34	0.02
chr5.CM0062.220.r2.d	2,70	0.0002	8,21	0.01
chr3.CM0091.1150.r2.d	2,38	0.0009	2,95	0.009
chr1.LjT46A21.140.r2.a	-2,39	0.002	-0,74	0.02

Tabla 15: Validación de la comparación de la expresión génica a nivel de los transcriptomas basales de Gifu y MG-20. Los genes utilizados (columna 1) fueron evaluados comparando los resultados obtenidos con los microarreglos (columna 2) o comparando los obtenidos con un nuevo conjunto de muestras intactas por la técnica de RT-PCR (columna 4). Los datos se expresan como la relación de la expresión basal en Gifu con respecto a la expresión basal en MG-20.

8.4.2 Análisis metabolómico de los ecotipos MG-20 y Gifu frente a la inoculación con la bacteria fitopatógena *Pto*

Con el fin de profundizar nuestro entendimiento de las respuestas transcripcionales, se realizó la medición de metabolitos polares utilizando una técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Esta metodología se llevó a cabo sobre muestras de plantas infiltradas con una

suspensión de bacterias o con una solución de MgCl₂ luego de 6 y 24 hs de haberse realizado el tratamiento.

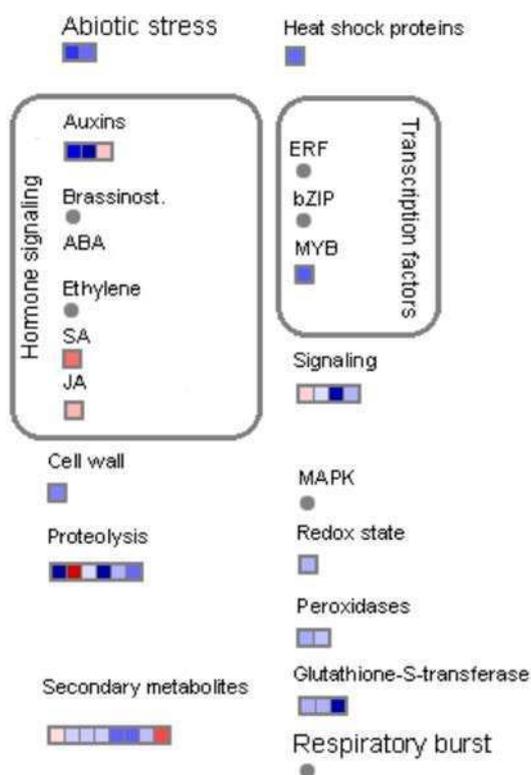


Figura 16: representación gráfica de los genes clasificados dentro de "estrés biótico" a partir de la clasificación realizada con el *software* MAPMAN de la comparación entre los transcriptomas basales de Gifu y MG-20. Datos transcriptómicos obtenidos a partir de muestras de folíolos infiltrados con la solución de MgCl₂ fue comparada y los genes que mostraron diferencias significativas y que fueron asignados al grupo funcional "Biotic Stress" del *software* MAPMAN fueron graficados. Cada rectángulo coloreado corresponde a un transcripto y su expresión, en Log₂ FC, es representada por la escala de colores que va de azul (más expresado en las muestras correspondientes al ecotipo Gifu) a rojo (más expresado en las muestras correspondientes al ecotipo MG-20).

En la figura 17 pueden observarse dos cromatogramas, uno correspondiente a una de las muestras del ecotipo Gifu (figura 17A) y otro correspondiente a una del ecotipo MG-20 (figura 17B). En cada muestra pudieron detectarse alrededor de 50 picos, independientemente del tratamiento al cual correspondieron. Los perfiles de fragmentos obtenidos por MS fueron comparados de forma automática contra bases de datos comerciales (Nist, Nist_msms, mainlib, replib y wiley7n) y caracterizados con el nombre del compuesto más probable. Posteriormente se realizó una confirmación manual

de cada metabolito contra la base de datos de la Golm *metabolome database* (GMD, <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) y contra la biblioteca de espectros de MS generada por nuestro grupo a partir de ensayos realizados con *L. japonicus* en estrés abiótico [148]. Solo se analizaron los metabolitos que fueron detectados consistentemente a lo largo de al menos un tratamiento, y solo se los consideró como metabolitos identificados cuando su identidad pudo ser confirmada mediante la comparación manual. Así por ejemplo, el ácido glicérico solo fue detectado en muestras del ecotipo MG-20 correspondientes al tratamiento con la bacteria, entonces para aumentar la robustez de resultados se consideró que en el resto de las muestras este metabolito se encontraba cercano al límite de detección. Este criterio de análisis fue recomendado por Desabrosses y colaboradores en el *Lotus japonicus Handbook* [218]. El estudio realizado permitió detectar un total de 34 metabolitos de los cuales fueron identificados 29, entre los que pudieron observarse aminoácidos, ácidos orgánicos, polioles, glúcidos y ácidos grasos (tabla 17).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC basal	Log ₂ FC Gifu	Log ₂ FC MG-20
chr2.CM0249.740.r2.m	<i>ROT3</i>	<i>cytochrome P450</i>	-3.28	ns	-5.98
chr2.CM0249.600.r2.d	<i>CYP84A</i>	<i>cytochrome P450</i>	1.61	-1.58	-0.05
	<i>FLOWERING</i>	<i>development.</i>			
chr1.CM0017.410.r2.a	<i>LOCUS T</i>	<i>unspecified</i>	-2.85	ns	-5.90
chr1.CM1255.110.r2.m	<i>vestitone reductase</i>	<i>dihydroflavonols</i>	2.23	ns	-0.12
chr1.CM1255.100.r2.m	<i>vestitone reductase</i>	<i>dihydroflavonols</i>	1.43	ns	-1.63
		<i>ethylene.synthesis-</i>			
chr3.CM0059.100.r2.d	<i>gibberellin 2-oxidase</i>	<i>degradation</i>	-2.15	-0.19	-0.53
chr1.LjT46A21.140.r2.a	<i>FLS</i>	<i>flavonols</i>	-2.39	ns	-6.20
		<i>gluco-, galacto- and</i>			
chr5.LjT34K16.50.r2.m	<i>beta-glucosidase</i>	<i>mannosidases</i>	5.51	ns	0.95
		<i>glutathione S</i>			
chr4.CM0046.1530.r2.m	<i>GST</i>	<i>transferases</i>	1.56	ns	-1.12
	<i>caffeoyl-CoA O-</i>	<i>lignin biosynthesis.</i>			
chr4.CM0227.500.r2.m	<i>methyltransferase</i>	<i>CCoAOMT</i>	1.26	ns	-1.46
		<i>lignin biosynthesis.</i>			
chr1.CM0476.410.r2.a	<i>COMT</i>	<i>COMT</i>	2.22	ns	-1.35
chr2.CM0903.220.r2.a	<i>mmuM</i>	<i>methionine</i>	1.89	ns	0.44

		<i>misc ribosomal</i>			
chr2.CM0323.320.r2.m	NSA2	<i>protein</i>	2.61	ns	-2.00
chr4.CM0128.410.r2.m	<i>formamidase</i>	<i>misc.misc2</i>	2.21	ns	-5.44
		<i>misc.oxidases -</i>			
chr6.CM0013.530.r2.m	FMO	<i>copper, flavone</i>	2.76	-1.12	-0.08
chr5.CM0696.1060.r2.a	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	1.36	-1.30	0.57
chr1.CM0125.320.r2.d	<i>peroxidase</i>	<i>misc.peroxidases</i>	1.62	ns	0.24
		<i>MYB domain</i>			
		<i>transcription factor</i>			
LjSGA_007368.1	MYBP	<i>family</i>	2.27	ns	-0.62
		<i>not</i>			
chr4.CM0458.300.r2.m	GBA2	<i>assigned.unknown</i>	1.82	ns	-2.17
chr3.CM0452.240.r2.d	HCT	<i>phenylpropanoids</i>	1.24	ns	-2.24
		<i>inorganic</i>			
chr3.CM0208.500.r2.m	<i>pyrophosphatase</i>	<i>pyrophosphatases</i>	2.52	ns	-1.95
		<i>protein.synthesis.elo</i>			
chr5.CM0909.990.r2.m	EEF1A	<i>ngation</i>	1.17	-1.19	-1.05
		<i>redox.ascorbate and</i>			
	<i>glutathione</i>	<i>glutathione.</i>			
chr4.CM0042.1400.r2.m	<i>peroxidase</i>	<i>glutathione</i>	1.55	ns	-1.40
chr6.CM0118.310.r2.d	SCPL-I	<i>serine protease</i>	4.20	ns	0.86
		<i>signalling.14-3-3</i>			
chr2.CM0120.420.r2.m	YWHAE	<i>proteins</i>	1.01	ns	-1.82
chr2.CM0081.930.r2.a	DOX1	<i>stress.abiotic</i>	2.53	ns	-0.93
chr3.CM0282.630.r2.m	TAT	<i>tyrosine</i>	1.53	-1.77	-1.02

Tabla 16: Genes cuya expresión basal es significativamente diferente entre Gifu y MG-20 y que además son regulados en respuesta a *Pto* en alguno de estos ecotipos. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (Gifu vs MG20) obtenido en la comparación de los transcriptomas basales (columna 4) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 5 y 6 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa. Solo se muestran los genes a los cuales pudo asignarse un ortólogo por medio del KAAS.

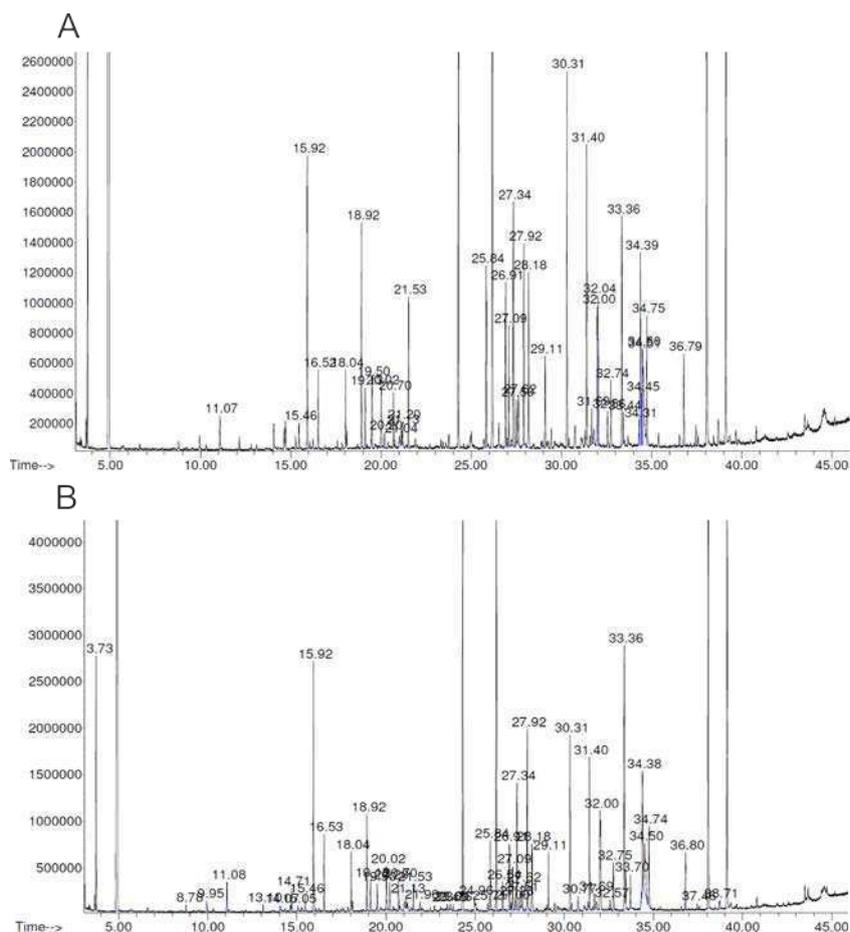


Figura 17: Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por GC-MS. Cromatogramas mostrando los perfiles cromatográficos típicos obtenidos por la técnica de GC-MS para muestras de Gifu (A) y MG-20 (B).

De los 34 metabolitos detectados, 3 mostraron modificaciones en sus niveles a las 6 hs posteriores a la infiltración con la solución de bacterias en el ecotipo Gifu, y 2 hicieron lo propio en el ecotipo MG-20, comparando con el tratamiento control (tabla 17).

A las 24 hs la cantidad de metabolitos afectados por el tratamiento ascendió a 5 en Gifu y a 8 en MG-20 (tabla 17). Estos metabolitos pertenecieron a distintas familias moleculares con excepción de los ácidos grasos, incluyendo 3 metabolitos de estructura desconocida. Es interesante destacar que al observar los perfiles de respuesta de los metabolitos a lo largo del tiempo, se distingue un alto nivel de contraste entre ambos ecotipos (tabla 17). Este resultado difiere de lo observado mediante los microarreglos, en los cuales los genes regulados en su mayoría son compartidos por ambos ecotipos y siguen patrones de expresión similar (figura 9).

Metabolitos Identificados	RR MG-20 6		RR MG-20 24	
	RR Gifu 6 hs	hs	RR Gifu 24 hs	hs
Aminoácidos				
L-alanina	0.478	2.059	1.000	1.305
Ácido piroglutámico*	0.538	0.961	1.078	1.216
Ácido 4-aminobutíricod (GABA)	1.000	0.959	0.329	8.600
L-asparagina	0.943	1.659	0.236	0.648
Glúcidos				
Xylulosa	0.922	4.080	0.442	0.887
Fructosa	0.298	2.754	4.181	3.893
Glucosa	0.189	5.725	0.851	5.514
Sacarosa	0.720	1.795	1.596	3.562
Ácido glicérico	1.000	1.000	1.000	2.032
Ácido treónico-1,4-lactona	0.770	1.432	1.000	1.000
Ácido eritrónico	0.390	1.355	1.000	1.829
Ácido treónico	0.528	0.291	0.237	13.449
Ácido galactónico	1.000	1.000	1.000	2.974
Ácido glucárico (sacárico)	0.295	3.307	1.000	1.000
Ácidos Orgánicos				
Ácido succínico	0.090	9.066	0.074	58.031
Ácido malónico	0.997	1.488	0.065	0.476
Ácido citramálico	0.399	0.432	0.113	0.655
Ácido málico	1.469	3.120	0.125	1.121
Ácido cítrico	0.722	0.458	0.396	0.582
Ácido trans-p cumárico	0.088	1.987	0.872	0.399
Polioles				
Glicerol	0.486	2.502	1.000	7.934
4-o-metil- <i>myo</i> -inositol (Ononitol)	0.755	0.957	0.474	1.000
<i>myo</i> -inositol	0.607	1.320	0.427	1.597
Ácidos Grasos				
Ácido hexadecanóico (palmítico)	0.573	1.553	0.477	1.818
Ácido linoléico	0.393	1.616	0.437	1.485
Ácido esteárico	0.833	0.928	0.379	1.021
Oleamida	0.933	0.988	0.380	1.297
Otros				
Ácido fosfórico	0.107	0.389	1.000	1.783
Metabolitos no identificados				

<i>2-butenedioic acid</i> (2TMS)	1.367	0.891	0.116	1.287
<i>Arabinofuranose</i> (4TMS)	0.499	2.008	1.502	4.024
<i>D-xylofuranose</i> (4TMS)	1.000	1.671	1.000	1.411
<i>Floridoside</i> (6TMS)	1.000	1.000	1.000	4.620
<i>Melibiose</i> (6TMS)	0.776	1.335	0.636	0.758

Tabla 17: Abundancia relativa de los metabolitos detectados. La abundancia relativa, expresada como *Response Ratio* infectado vs control (RR), fue calculada para los ecotipos Gifu (columnas 2 y 4) y MG-20 (columnas 3 y 5) luego de la inoculación con *Pto* a las 6 hs (columnas 2 y 3) y a las 24 hs (columnas 4 y 5) posteriores al tratamiento. Los valores en negrita indican diferencias significativas entre el tratamiento con la bacteria y el control, según el *test* de Student ($p \leq 0.05$). *valores combinados de glutamina, glutamato y piroglutamato debido a interconversión química.

8.4.2.1 Análisis de correlaciones

Tomando todos los datos obtenidos, se realizó un análisis de correlación de pares entre metabolitos, donde pudo observarse en general un bajo grado de correlación (figura 18).

A continuación se realizó un estudio de la correlación entre los niveles de los metabolitos detectados y la expresión génica de un subgrupo de transcritos relacionado con dichos metabolitos.

En este caso, el nivel de correlación fue relativamente bajo (en significancia) y no se observaron clusters definidos de correlación entre grupos de metabolitos o genes, con una clara excepción: la mayoría de los metabolitos mostraron una correlación fuerte con los genes cuya función se encuentra relacionada a los procesos fotosintéticos (figura 19), lo que sugiere que la fuerte represión transcripcional de estos procesos sería el factor principal que modula el metaboloma de *L. japonicus* durante la respuesta a *Pto*.

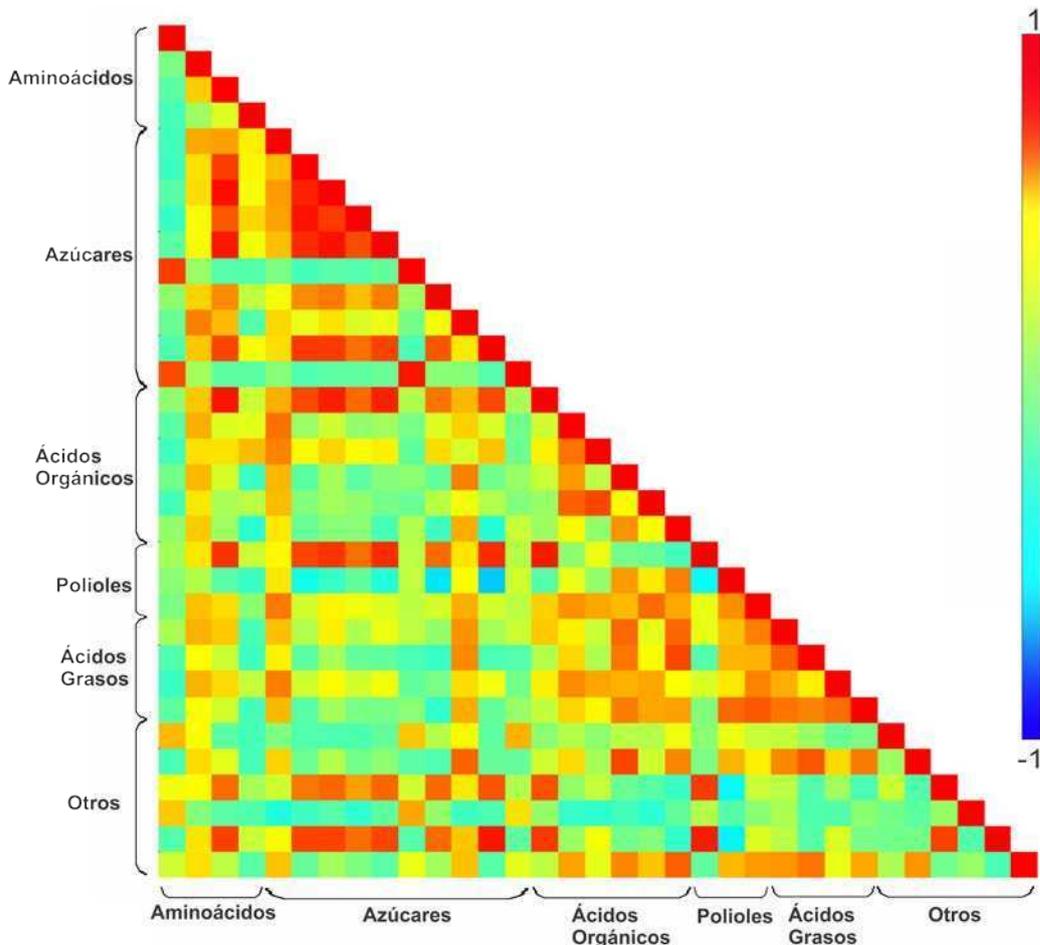


Figura 18: análisis de correlaciones metabolito-metabolito. Visualización de las correlaciones metabolito-metabolito por medio de un mapa de calor de las correlaciones entre los datos obtenidos. Los metabolitos se agrupan por clase de compuestos, y cada cuadrado representa la correlación entre el metabolito al final de la columna con el metabolito al frente de la fila. Los coeficientes de correlación se calcularon aplicando el algoritmo de Spearman utilizando. Cada cuadrado indica un valor del coeficiente de correlación de Spearman en una escala de color (rojo corresponde a correlación positiva y azul a correlación negativa).

Las relaciones entre grupos de transcriptos determinados, con vías metabólicas puntuales y con los niveles de los metabolitos que participan de éstas como sustratos, compuestos intermediarios o productos, serán descritas en lo que resta de este capítulo.

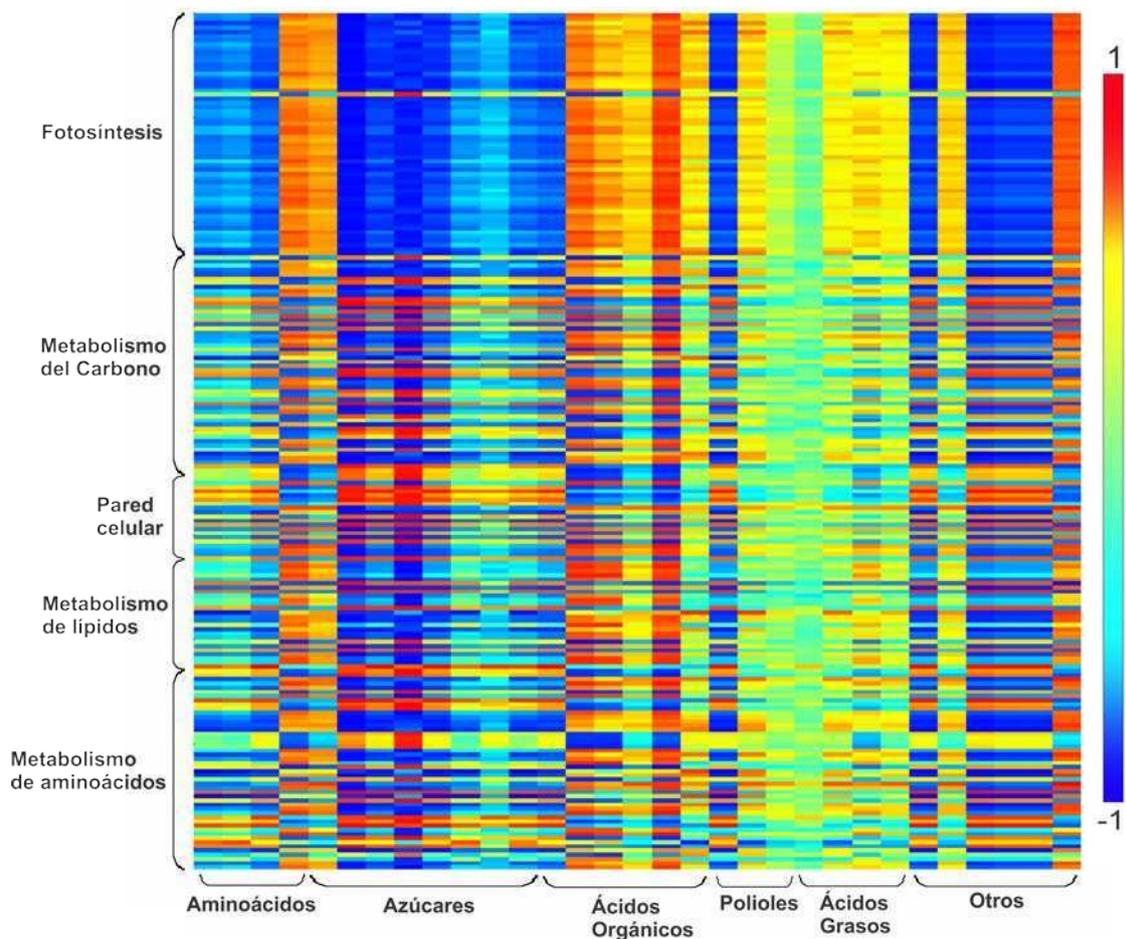


Figura 19: análisis de correlaciones metabolito-transcripto. Visualización de las correlaciones metabolito-transcripto por medio de un mapa de calor de las correlaciones entre los datos obtenidos. Los metabolitos se agrupan por clase de compuestos y los transcritos seleccionados se agrupan con función, cada cuadrado representa la correlación entre el metabolito al final de la columna con el transcritto al frente de la fila. Los coeficientes de correlación se calcularon aplicando el algoritmo de Spearman. Cada cuadrado indica un valor del coeficiente de correlación de Spearman en una escala de color (rojo corresponde a correlación positiva y azul a correlación negativa).

8.4.2.2 Aminoácidos

Entre los aminoácidos se destaca el ácido γ -aminobutírico (GABA) por ser uno de los metabolitos que más modificó su nivel en respuesta al tratamiento. Este aminoácido no proteico posee características importantes en relación a la interacción de la planta con la bacteria *P. syringae* y es reconocida su participación en algunos mecanismos defensivos. Existen numerosos trabajos que reportan un aumento de este aminoácido en plantas bajo estrés biótico,

como por ejemplo en las infecciones de tomate por *Cladosporium fulvum* [219] y en las de *A. thaliana* por *Pto* [220]. Además, Park y colaboradores han reportado un menor crecimiento de esta bacteria en medios de cultivo suplementados con altas concentraciones de GABA y en plantas mutantes que acumulan dicho metabolito [221]. En contraste, se observó un mayor crecimiento bacteriano cuando se suplementaron los medios con concentraciones moderadas de este aminoácido [221]. El catabolismo de GABA ha sido relacionado con las EROs y se ha propuesto que podría participar en el sistema antioxidante [222], aunque los resultados reportados en relación a esta posible función son controversiales [223]. También se lo ha asociado a la defensa de la planta frente al ataque de invertebrados [224]. El GABA se sintetiza en plantas a partir de glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa y puede ser catabolizado a ácido succínico por la acción en serie de las enzimas GABA-transaminasa y succinato semi-aldehído deshidrogenasa [225].

Este compuesto aumenta más de 8 veces su concentración a las 24 hs posteriores al tratamiento en el ecotipo MG-20 y se observa una fuerte tendencia a su descenso frente al tratamiento en Gifu, aunque esta no es significativa (tabla 17).

En MG-20, una de las glutamato descarboxilasas se encuentra inducida frente a la bacteria, mientras que la GABA transaminasa se encuentra reprimida, lo cual explicaría la acumulación de este metabolito (figura 20B y tabla 18). En Gifu por otro lado, ninguno de estos genes es regulado frente a la inoculación con *Pto* y en cambio se observa una tendencia del GABA a disminuir frente a la bacteria, aunque no significativa (tabla 17). En MG-20 se observa la inducción de un transcripto con homología a GABA permeasas frente a la inoculación con la bacteria, cuyo producto podría estar involucrado en la movilización de este metabolito (figura 20B y tabla 18).

Es importante señalar que *Pto*, a diferencia de cepas de *P. syringae*, no posee la enzima glutamato descarboxilasa, si bien puede utilizar este compuesto como única fuente de carbono y nitrógeno en cultivos *in vitro* [221]. Así, para utilizar este aminoácido debe tomarlo del medio, por lo que la acumulación de este compuesto en nuestros ensayos solo puede ser producto del metabolismo de la

planta. *Pto* coloniza el apoplasto de la planta hospedante y se ha demostrado que puede metabolizar al GABA en este espacio intercelular [115], el cual ha sido reportado como uno de los metabolitos no proteicos más abundantes en tomate [115]. En relación a esto, esta bacteria posee 3 copias del gen de la GABA transaminasa y 3 copias de la succinato semi-aldehído deshidrogenasa, mostrando una habilidad excepcional para catabolizar GABA a succinato [95]. El otro aminoácido cuyo nivel se ve modificado frente a *Pto* es la alanina. Los niveles de este aminoácido descienden durante las primeras horas de tratamiento en Gifu, pero a las 24 hs recupera su concentración basal (tabla 17). MG-20 muestra también un incremento, si bien no es significativo, de este compuesto a las 6hs posteriores al tratamiento.

8.4.2.3 Glúcidos

Los glúcidos son los principales compuestos carbonados de las células. Su metabolismo reviste de especial importancia con respecto a la defensa de la planta ya que los oligo y polisacáridos son los componentes mayoritarios de la pared celular de la célula vegetal, siendo ésta la primer barrera defensiva. Por otro lado, el éxito de un patógeno vegetal depende de su capacidad de adquirir de forma efectiva una fuente de carbono a partir de los tejidos del hospedante. Como ya se ha comentado en la descripción de los resultados de los microarreglos, en el ecotipo MG-20 existe un correlato entre el descenso en la eficiencia del PSII (figuras 7 y 8) y la expresión de genes relacionados con los procesos fotosintéticos (figura 15 y tablas 12-14).

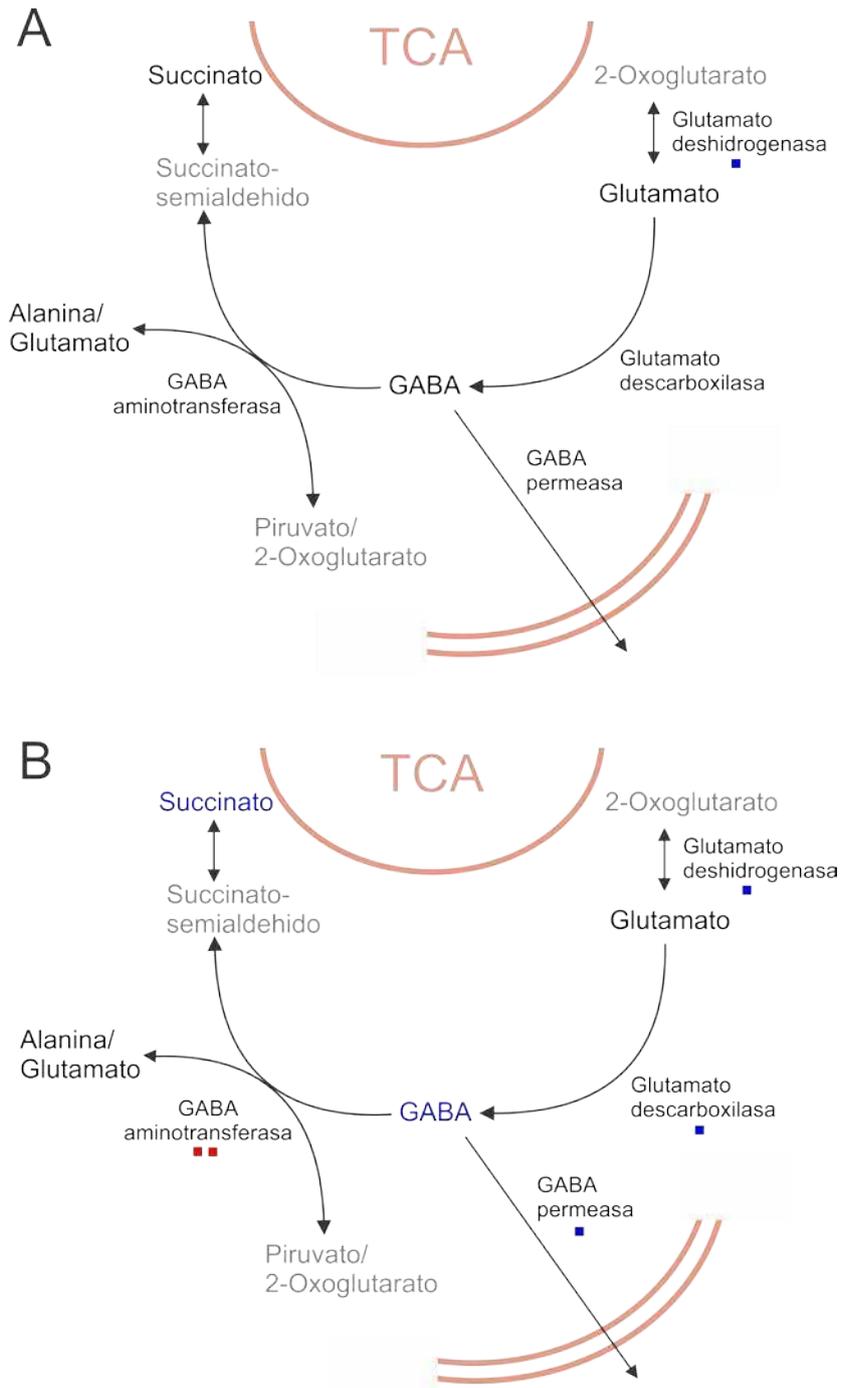


Figura 20: Representación gráfica del metabolismo del GABA. Se grafica la expresión génica de los genes que codifican para enzimas relacionadas al metabolismo del GABA con rectángulos azules que representan a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento con *Pto* y rectángulos rojos que representan a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento control. Los metabolitos en letra azul corresponden a los más abundantes en las muestras infiltradas con *Pto* y metabolitos en letra roja corresponden a los más abundantes en las muestras control. Metabolitos en letra gris no fueron detectados con la técnica utilizada. A) corresponde al ecotipo Gifu, B) corresponde al ecotipo MG-20. TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	
			Gifu	MG-20
		<i>glutamate</i>		
chr1.CM0104.2530.r2.m	<i>GLUD1_2, gdhA</i>	<i>dehydrogenase</i>	2.47	ns
		<i>glutamate</i>		
chr2.CM0021.1320.r2.m	<i>GLUD1_2, gdhA</i>	<i>dehydrogenase</i>	ns	1.95
		<i>Glutamate</i>		
chr4.CM0026.910.r2.m	<i>gadB, gadA, GAD</i>	<i>decarboxylase</i>	ns	2.21
chr1.CM0036.250.r2.m	<i>GABA permease</i>	<i>transport.amino acids</i>	ns	2.18
chr3.CM0460.230.r2.d	<i>POP2</i>	<i>GABA transaminase</i>	ns	-1.52

Tabla 18: Genes relacionados con el metabolismo del GABA. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

Además, durante la infección podría esperarse que las relaciones fuente-destino de metabolitos de transporte se vean modificadas, siendo la sacarosa uno de los más característicos de esta clase [226]. En este trabajo pudo identificarse la acumulación de fructosa a las 24hs posteriores al tratamiento en MG-20 y una tendencia hacia el aumento de los niveles de glucosa, aunque no significativa (tabla 17). Además de la acumulación de exosas simples, en este ecotipo fue observada una tendencia al aumento de los niveles de sacarosa a las 24hs, aunque las diferencias resultaron no significativas (tabla 17). Al observar la expresión de los genes que participan de vías de síntesis y de vías de degradación de oligo y polisacáridos, se observa que en MG-20 existe una fuerte regulación de estas vías metabólicas (figura 21B y tablas 19-21), favoreciendo el catabolismo de azúcares complejos a azúcares simples y otros productos de degradación como azúcares ácidos. En Gifu, no se detectaron variaciones significativas en los niveles de glúcidos frente a la bacteria (tabla 15). Esto es consistente con el menor nivel de regulación a nivel de expresión de genes del metabolismo de oligo y polisacáridos que se observan en este ecotipo comparado a MG-20 (figura 21A y tablas 19-21), así como a la también menor modificación de los parámetros de eficiencia del PSII descritos en el Capítulo 1 (figura 7 y figura 8).

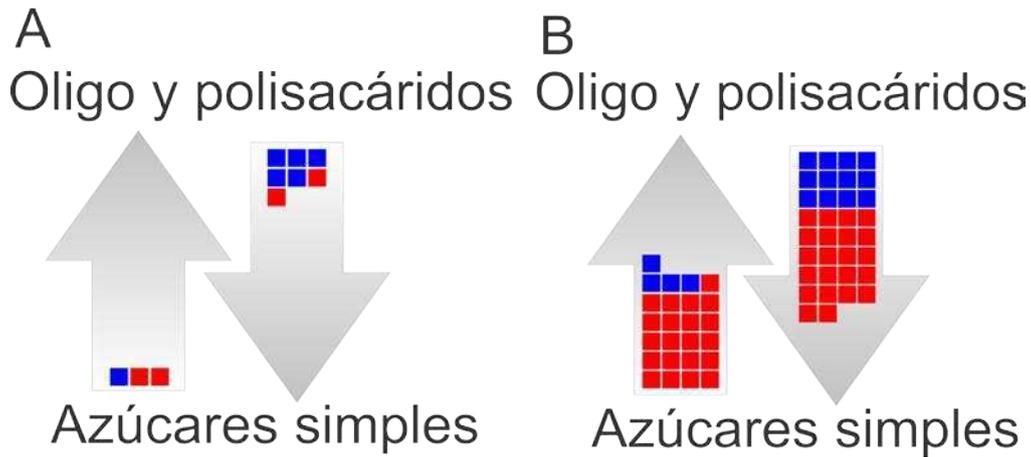


Figura 21: representación gráfica del metabolismo del glúcidos. Se grafica la expresión génica de los genes que codifican para enzimas relacionadas al metabolismo del glúcidos con rectángulos azules que representan a los genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento con *Pto* y rectángulos rojos que representan a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento control.

El ácido treónico es un azúcar ácido de cuatro carbonos derivado de la treosa. Si bien se han descrito cepas de *Pseudomonas* capaces de utilizar este compuesto como única fuente de carbono [227], no ha sido reportada la modificación de sus niveles frente al estrés biótico en plantas ni se ha considerado una posible función en la respuesta a patógenos. En el ecotipo MG-20 se observa un aumento de más de 13 veces en los niveles de ácido treónico a las 24hs posteriores al tratamiento (tabla 17). Una de las posibles vías de síntesis de este metabolito es la degradación del ácido ascórbico, el cual, como se comenta en este capítulo, participa del sistema antioxidante de la planta a través del ciclo del ascorbato-glutati6n. La vía de degradaci6n del ascorbato, que tiene como uno de sus productos el ácido tre6nico, involucra tambi6n a una de las formas oxidadas de este compuesto, el dehidro ascorbato (DHS). El DHS es luego convertida en oxalato y treonato por una serie de reacciones cuyas enzimas han sido parcialmente caracterizadas en plantas o bien puede formarse espontáneamente dependiendo de la concentraci6n de sus reactivos (figura 14) [227, 228]. Como se comenta en el apartado dedicado a genes relacionados al estado redox celular, los datos que arrojan los microarreglos indican un fuerte descenso en la expresi6n de las enzimas del ciclo del ascorbato-glutati6n (figura 14 y tabla 5). Esto parecería indicar que la acumulaci6n de treonato no se debería al aumento de la actividad catab6lica.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr4.CM0087.710.r2.m	ALDO	<i>calvin cycle.aldolase</i>	ns	-2.24
chr3.CM0091.1890.r2.m	ALDO	<i>calvin cycle.aldolase</i>	ns	-2.46
chr4.CM0100.110.r2.m	FBP	<i>calvin cycle.FBPase</i>	ns	-2.69
chr1.CM2049.20.r2.m	FBP	<i>calvin cycle.FBPase</i>	ns	-3.72
		<i>calvin cycle.</i>		
chr3.CM0996.1190.r2.d	PGK	<i>phosphoglyceratekinase</i>	ns	-2.99
chr3.CM0396.140.r2.m	CSLA	<i>cellulose synthesis</i>	ns	-1.76
chr5.CM0359.200.r2.d	ALDO	<i>glycolysis.aldolase</i>	2.25	3.48
chr2.CM0210.260.r2.m	ALDO	<i>glycolysis.aldolase</i>	ns	-3.18
		<i>glycolysis.</i>		
chr1.LjT29N14.30.r2.d	GPI	<i>G6PIsomerase</i>	-1.12	-1.27
LjSGA_037882.1	<i>pgm</i>	<i>glycolysis.PGM</i>	ns	-1.76
chr5.CM0200.200.r2.m	<i>pgm</i>	<i>glycolysis.PGM</i>	ns	-2.21
	<i>glucose-6</i>			
	<i>phosphate 1-</i>	<i>minor CHO</i>		
chr2.CM0249.1490.r2.m	<i>epimerase</i>	<i>metabolism.others</i>	-2.13	-2.99
	<i>glucose-6-</i>			
	<i>phosphate 1-</i>	<i>minor CHO</i>		
chr2.CM0060.30.r2.m	<i>epimerase</i>	<i>metabolism.others</i>	ns	-1.78
		<i>synthesis.starch.AGPas</i>		
chr4.CM0387.950.r2.m	<i>glgC</i>	<i>e</i>	ns	-2.94
		<i>synthesis.starch.AGPas</i>		
chr2.CM0191.60.r2.m	<i>glgC</i>	<i>e</i>	ns	-2.14
		<i>synthesis.starch.starch</i>		
chr1.CM0178.250.r2.m	<i>glgB</i>	<i>branching</i>	ns	-1.70
		<i>synthesis.starch.starch</i>		
chr2.CM1835.140.r2.m	<i>glgA</i>	<i>synthase</i>	ns	-1.70
	<i>sucrose-phosphate</i>			
chr4.CM0003.1230.r2.m	<i>synthase</i>	<i>synthesis.sucrose.SPS</i>	ns	-1.94
		<i>trehalose.potential</i>		
chr5.CM0328.790.r2.d	TPS	<i>TPS/TPP</i>	ns	-2.54

Tabla 19: Genes relacionados con la síntesis de oligo y polisacáridos. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr2.CM0249.1150.r2.d	MAN	<i>degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose</i>	-2.13	-1.52
chr1.CM0952.130.r2.m	MAN	<i>degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose</i>	ns	-2.16
chr1.CM1911.70.r2.m	malQ	<i>degradation.starch.D enzyme</i>	ns	-2.27
chr6.LjB08M07.90.r2.m	glgP, PYG	<i>degradation.starch.starch phosphorylase</i>	ns	-3.96
chr6.CM0114.510.r2.m	glgP, PYG	<i>degradation.starch.starch phosphorylase</i>	ns	-1.90
chr3.CM0106.300.r2.m	scrK	<i>degradation.sucrose.fructokinase</i>	1.72	2.76
chr2.CM0065.20.r2.d	HK	<i>degradation.sucrose.hexokinase</i>	1.65	2.12
chr3.CM0049.80.r2.m	sacA	<i>degradation.sucrose.invertases.cell wall</i>	2.02	2.86
chr1.CM0133.450.r2.m	sacA	<i>degradation.sucrose.invertases.cell wall</i>	ns	-1.92
chr6.CM0013.460.r2.m	sucrose synthase	<i>degradation.sucrose.Susy</i>	ns	1.45
chr1.CM0125.80.r2.a	galA, rafA	<i>galactose.alpha-galactosidases</i>	ns	-1.86
chr6.CM0139.260.r2.m	bgIB	<i>gluco-, galacto- and mannosidases</i>	ns	-2.45
chr6.CM0139.240.r2.m	bgIB	<i>gluco-, galacto- and mannosidases</i>	ns	-2.76
chr5.LjT34K16.50.r2.m	beta-glucosidase	<i>gluco-, galacto- and mannosidases</i>	ns	4.48
chr1.CM0104.660.r2.a	mannosidase	<i>gluco-, galacto- and mannosidases</i>	ns	-1.28
chr1.LjT29N14.30.r2.d	GPI	<i>glycolysis.G6PIsomerase</i>	-1.12	-1.27
LjSGA_037882.1	pgm	<i>glycolysis.PGM</i>	ns	-1.76
chr5.CM0200.200.r2.m	pgm	<i>glycolysis.PGM</i>	ns	-2.21
chr2.CM0249.1490.r2.m	glucose-6-phosphate 1-epimerase	<i>minor CHO</i>	ns	-2.99
chr2.CM0060.30.r2.m	glucose-6-phosphate 1-	<i>metabolism.others</i>	ns	-1.78

	<i>epimerase</i>			
	<i>diphosphoinosit</i>			
	<i>ol-</i>			
	<i>polyphosphate</i>			
LjSGA_013136.1	<i>diphosphatase</i>	<i>not assigned.no ontology</i>	ns	2.08
	<i>diphosphoinosit</i>			
	<i>ol-</i>			
	<i>polyphosphate</i>			
chr6.CM0014.450.r2.m	<i>diphosphatase</i>	<i>not assigned.no ontology</i>	ns	-2.26
	<i>diphosphoinosit</i>			
	<i>ol-</i>			
	<i>polyphosphate</i>			
chr1.CM0104.1370.r2.d	<i>diphosphatase</i>	<i>not assigned.no ontology</i>	ns	-3.11
	<i>abfA; alpha-N-</i>			
	<i>arabinofuranosi</i>			
chr1.CM0098.260.r2.m	<i>dase</i>	<i>not assigned.no ontology</i>	ns	-1.65
	<i>AXY8,</i>			
chr5.CM0200.3060.r2.m	<i>FUC95A, afcA</i>	<i>not assigned.unknown</i>	ns	-1.78
		<i>pectate lyases and</i>		
LjSGA_003602.1	<i>pel</i>	<i>polygalacturonases</i>	ns	-1.75
		<i>pectate lyases and</i>		
chr5.CM0696.20.r2.a	<i>pel</i>	<i>polygalacturonases</i>	ns	-1.88
chr4.CM0004.1850.r2.a	<i>treA, treF</i>	<i>trehalose.trehalase</i>	ns	3.63

Tabla 20: Genes relacionados con la degradación de oligo y polisacáridos. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

Sin embargo, en un ambiente oxidante con altas concentraciones de ascorbato como es el cloroplasto, es posible que este compuesto sea oxidado a monodehidroascorbato (MDHS) a una alta velocidad [229]. Por lo tanto, si el MDHS no es reducido a ascorbato por la enzima MDHS reductasa, este se transformará espontáneamente en DHS y luego en treonato [178]. En una segunda instancia, el DHS puede también ser reciclado a ascorbato por la enzima DHS reductasa. Los datos transcriptómicos sugieren que en el ecotipo MG-20 existió una regulación negativa de estas enzimas, tanto de la MDHS

como de la DHS reductasas (figura 14B y tabla 5). Esto podría provocar una acumulación del producto oxidado del ciclo, DHS, el cual podría ser degradado a las formas más estables como treonato y oxalato.

Además en MG-20 se observó el aumento de los niveles del ácido treónico-1,4-lactona a las 6hs de tratamiento (tabla 17). La acumulación de esta forma del ácido treónico puede indicar que los procesos descritos podrían estar sucediendo desde las primeras horas de la infección. En el ecotipo Gifu por el contrario, se observa una disminución (no significativa) de ambas formas del ácido treónico frente a la inoculación con *Pto* (tabla 17), y sólo dos genes del ciclo del ascorbato-glutatión se encuentran regulados (figura 14A y tabla 5).

El ácido galactónico es un azúcar ácido de 6 carbonos derivado de la galactosa. Sus niveles se encuentran aumentados casi tres veces en el ecotipo MG-20 frente a la bacteria (tabla 17). Al analizar la expresión de los genes que participan del catabolismo de la galactosa, no se observa regulación alguna de los mismos. Otra posible vía de síntesis del ácido galactónico es a partir de la degradación de la pectina. La pectina es uno de los polisacáridos más importantes de las paredes celulares de plantas. Participa en el fortalecimiento de la pared y forma una barrera contra la entrada de patógenos, además de impedir el contacto directo célula a célula entre la célula vegetal y la célula patogénica. La degradación de la pectina, facilita el ensamblado y funcionamiento del SSTIII que permite el transporte de efectores al interior de las células hospedantes por parte de la bacteria [230, 231]. De esta manera, las enzimas que participan de la degradación de la pectina pueden incrementar la fragilidad osmótica de la célula y eventualmente provoca muerte celular [232]. Una de las vías de catabolismo de la pectina involucra una serie de pasos enzimáticos que degradan a esta molécula en fragmentos pequeños conocidos como pectatos. A continuación los pectatos pueden ser transformados a ácido galacturónico y este en ácido galactónico (figura 22). En el ecotipo MG-20 la expresión de genes de esta vía de degradación de la pectina se encuentra aumentada con respecto al tratamiento control (figura 22B y tabla 21). Además, la principal vía de síntesis de pectina se encuentra reprimida a nivel transcripcional respecto de varias de sus enzimas principales (figura 22B y tabla 21). En cambio, en el ecotipo Gifu no se detectaron

productos de degradación de la pectina, ni se observó una importante regulación de genes de las vías de síntesis o degradación de este componente de la pared celular (figura 22A y tabla 21). *P. syringae*, al igual que otros patógenos bacterianos y fúngicos, posee una batería de enzimas capaces de degradar pectinas. En el pv. *glycinea* se detectó la actividad de enzimas pectinolíticas [233] y en *Pto* se pudo identificar un gen que codifica para una pectin metilesterasa por la técnica de IVET (*in vivo* expression technology), la cual permite evidenciar genes que se expresan específicamente cuando la bacteria se encuentra en la planta [234]. Así, es posible que la bacteria contribuya activamente a la degradación de la pectina de la pared celular de las células vegetales. Tanto la presencia de productos de la degradación de la pectina, como la regulación transcripcional de las vías de síntesis y degradación de la misma, indicarían que este proceso es de vital importancia para el desarrollo de los síntomas observados en MG-20. Además, esto explicaría en parte los fenotipos contrastantes entre ambos ecotipos.

.

8.4.2.4 Polioles

En el ecotipo Gifu se pudo observar la reducción de los niveles de dos ciclitoles (polioles cíclicos), el ononitol y el *myo*-inositol, a las 24hs de realizado el tratamiento (tabla 17). El ononitol puede ser sintetizado por las plantas a partir del *myo*-inositol por el agregado de un grupo metilo [235], aunque en la actualidad aún no se conoce demasiado sobre la regulación de su metabolismo. Este metabolito es uno de los sustratos en la síntesis de uno de los componentes principales de las membranas celulares, los fosfolípidos. La acumulación de *myo*-inositol y de ononitol ha sido asociada a condiciones estresantes donde existe un retardo en el desarrollo y por lo tanto una demanda menor de fosfolípidos [235, 236]. Lo anterior permite suponer que en condiciones en que la planta se encuentra reparando el daño en los tejidos infectados, la mayor demanda de fosfolípidos pueda provocar un descenso en los niveles de *myo*-inositol y por consiguiente en los niveles de ononitol.

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			Gifu	MG-20
chr1.CM0122.2570.r2.m	<i>pectinesterase</i>	<i>cell wall.pectin*esterases.</i> <i>PME</i>	ns	-2.70
LjSGA_026321.1	<i>pectinesterase</i>	<i>cell wall.pectin*esterases.</i> <i>PME</i>	2.33	3.36
chr1.LjT44L17.10.r2.d	<i>pectinesterase</i>	<i>cell wall.pectin*esterases.</i> <i>PME</i>	ns	2.25
LjSGA_036708.1	<i>pectinesterase</i>	<i>cell wall.pectin*esterases.</i> <i>PME</i>	5.60	6.89
chr2.CM0021.2400.r2.m	<i>UDP-glucuronate 4-epimerase</i>	<i>cell wall.precursor synthesis. GAE</i>	ns	-1.37
chr6.CM1034.220.r2.d	<i>UXE</i>	<i>cell wall.precursor synthesis. MUR4</i>	ns	2.02
chr2.CM0120.550.r2.d	<i>UGDH</i>	<i>cell wall.precursor synthesis. UGD</i>	ns	1.71
chr5.CM0239.1090.r2.d	<i>UXS1</i>	<i>cell wall.precursor synthesis. UXS</i>	ns	2.06
LjSGA_008071.1	<i>galacturan 1,4-alpha-galacturonidase</i>	<i>pectate lyases and polygalacturonases</i>	ns	1.03
chr4.CM0229.70.r2.m	<i>polygalacturonase</i>	<i>pectate lyases and polygalacturonases</i>	ns	3.08
chr6.CM0836.320.r2.m	<i>GAUT</i>	<i>UDP glucosyl and glucoronyl transferases</i>	ns	-1.85
chr4.CM0525.140.r2.m	<i>GAUT</i>	<i>UDP glucosyl and glucoronyl transferases</i>	ns	-1.70

Tabla 21: Genes relacionados con metabolismo de la pectina. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

8.4.2.5 Ácidos orgánicos

En esta categoría, junto a los azúcares, se encuentra la mayor cantidad de los metabolitos modificados en respuesta a *Pto* (tabla 17). Los ácidos orgánicos participan de los principales caminos metabólicos del metabolismo primario de la planta, tal como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), la síntesis de nucleótidos, biosíntesis de lípidos en los plástidos, la fotorespiración, etc. El TCA es la principal fuente de electrones para la fosforilación oxidativa [237]. La modificación observada sobre el metabolismo de los ácidos orgánicos, junto a los azúcares, sugiere que una profunda reprogramación del metabolismo primario ocurre en ambos ecotipos frente a la inoculación con la bacteria. Sin embargo, ninguno de los ácidos orgánicos o azúcares modificaron significativamente sus niveles en ambos ecotipos a la vez (tabla 17), señalando perfiles de regulación diferentes entre ecotipos e indicando otra vez un contraste entre Gifu y MG-20 a nivel de la respuesta metabólica. Por otro lado, los ácidos orgánicos cuyos niveles se modifican a las 6 hs no muestran diferencias significativas con respecto a los controles a las 24 hs de tratamiento (tabla 17), sugiriendo que existiría una rápida reconfiguración del metaboloma en estas plantas, independientemente de cómo se desarrolle finalmente la enfermedad.

Entre los ácidos orgánicos se encuentra el ácido succínico, siendo éste el metabolito cuyos niveles se ve modificados en mayor medida frente a la infección (tabla 17). El ácido succínico es un intermediario importante que participa tanto del TCA como de la fosforilación oxidativa, donde es utilizado como sustrato por la succinato deshidrogenasa (complejo II de la fosforilación oxidativa). Esta reacción produce ácido fumárico y reduce la co-enzima Q. El ácido succínico es producido en el TCA a partir de succinil co-enzima A por acción de la succinil co-A sintetasa. Además puede ser sintetizado a partir de succinato semi-aldehído por la succinato semi-aldehído deshidrogenasa y por lo tanto producirse como resultado del catabolismo del GABA (figura 20) [225]. Otra vía alternativa de síntesis de este ácido orgánico es a partir de isocitrato. En este caso, la enzima isocitrato liasa cataboliza el isocitrato produciendo succinato y glioxilato, una reacción que forma parte de lo que se conoce como

el ciclo del glioxilato y permite a la célula utilizar ácidos grasos como fuente de energía [238].

En el ecotipo MG-20, los niveles de succinato aumentaron 58 veces a las 24hs posteriores al tratamiento (tabla 17). Sin embargo, no se detectó la inducción de ninguna de las enzimas que participan de su síntesis en la planta. En cambio, la capacidad que posee *P. syringae* pv. tomato de catabolizar GABA transformándolo a succínico [239] podría explicar la acumulación de este ácido orgánico en nuestros ensayos. En cambio, en el ecotipo Gifu se observa una disminución, aunque no significativa, de los niveles tanto de GABA como de ácido succínico en respuesta a la bacteria (tabla 17).

El ácido malónico es un ácido orgánico de tres carbonos que posee dos grupos ácidos. Este ácido participa de las vías de síntesis de ácidos grasos, al ser catabolizado en una serie de reacciones que dan como producto una molécula de acetoacetato unido a una proteína *carrier* [240]. A partir del acetoacetato se sintetizan y elongan los diferentes ácidos grasos, triacil glicéridos (TAGs) y otros lípidos como las ceras [241]. El ácido malónico es el metabolito más fuertemente regulado en el ecotipo Gifu. Aquí, el ácido malónico reduce sus niveles más de 18 veces en respuesta a la inoculación con la bacteria luego de 24hs del tratamiento (tabla 17). En este ecotipo se observa una regulación positiva sobre los genes relacionados con la síntesis de TGAs a partir de ácidos grasos (figura 23A y tabla 22), lo cual podría explicar el descenso del ácido malónico. Además, se observa una reducción, aunque no significativa, en la concentración de todos los ácidos grasos detectados por esta técnica (tabla 17). En MG-20 también se observa una reducción, aunque no significativa, del ácido malónico (tabla 17). Esto está acompañado de un aumento en la expresión de genes que codifican para la síntesis de acetoacetato, si bien no existe un descenso en los niveles de ácidos grasos tal como ocurre en Gifu (figura 23B y tabla 22). Además, en MG-20 la regulación de la expresión génica estaría indicando más bien una tendencia a la degradación tanto de los triglicéridos como de los fosfolípidos y ácidos grasos (figura 23B y tabla 22). Otro posible rol del acetoacetato, producto del catabolismo de ácido malónico, es la síntesis de ácido jasmónico [242, 243]. Como se comentó anteriormente (apartado 8.4.1.8.2), nuestros datos indican que la síntesis de AJ está inducida

transcripcionalmente en MG-20 pero no así en Gifu en las condiciones estudiadas (tabla 9).

En el ecotipo Gifu, también se modificaron significativamente los niveles del ácido citramálico y málico durante el ataque de Pto. El primero descendió casi 10 veces a las 24hs posteriores al tratamiento y el segundo aumentó 1,47 veces a las 6 hs (tabla 17).

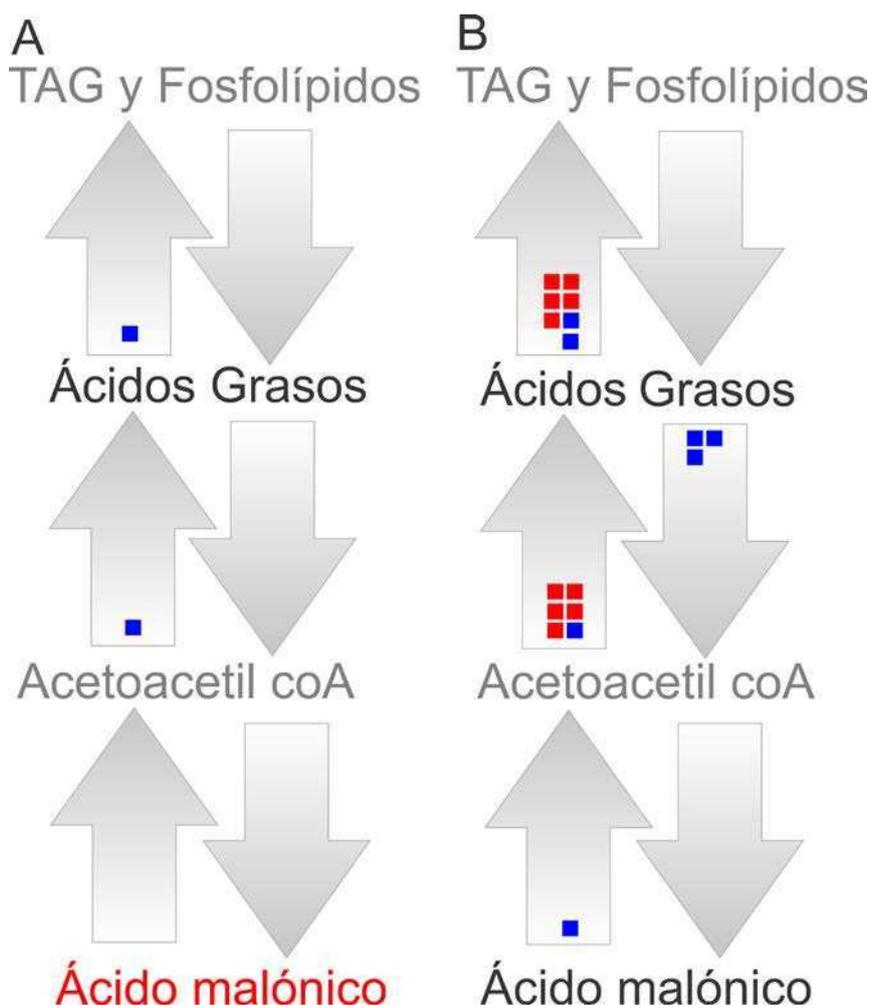


Figura 23: representación gráfica del metabolismo de lípidos. Se grafica la expresión génica de los genes que codifican para enzimas relacionadas al metabolismo del lípidos con rectángulos azules que representan a los genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento con *Pto* y rectángulos rojos que representan a genes más expresados en las muestras correspondientes al tratamiento control. La figura A corresponde al ecotipo Gifu y la figura B corresponde al ecotipo MG-20.

8.5 Discusión

En este capítulo se realizó un análisis detallado de los cambios que ocurren en el transcriptoma y en el metaboloma de *L. japonicus* durante la interacción con la bacteria fitopatógena *Pto*, a partir de una estrategia en la cual se combinó resultados de ensayos de hibridación con microarreglos de ADN con perfiles metabólicos obtenidos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Muchos de los resultados obtenidos durante este capítulo permiten profundizar en los interrogantes planteados durante el Capítulo 1, mientras que otros resultados nos invitan a plantear otras nuevas preguntas.

Tao y colaboradores analizaron la respuesta de *A. thaliana* a patógenos virulentos y avirulentos, y propusieron que la respuesta del tipo HR, observada al inocular las hojas con el patógeno avirulento estaba asociada a una regulación cuantitativamente diferente del mismo set de genes que era regulado cuando la planta era infectada con la cepa virulenta [244]. Este fenómeno fue observado también por Zou y colaboradores en plantas de soja infectadas con *P. syringae* pv. *glycinea* portando o no el gen *avrB* [106]. Los resultados obtenidos del análisis de los microarreglos en esta tesis revelaron una alta similitud en la regulación de los transcriptomas de ambos ecotipos (figura 9) los cuales comparten una alta proporción de los genes regulados, pero observándose una respuesta cuantitativamente más importante en MG-20 que en Gifu (figura 10). Esto refuerza la hipótesis de que las interacciones entre estos ecotipos y *Pto* son contrastantes, comportándose MG-20 como un material compatible y Gifu como uno incompatible a la infección con esta bacteria.

A nivel transcripcional pudo observarse que existe una inducción importante en la expresión de genes que codificarían para enzimas productoras de EROs en ambos ecotipos frente a la inoculación con la bacteria, tales como peroxidasas y poliamino oxidasas (tabla 4). Además, pudo observarse una regulación negativa mucho más importante de genes relacionados con los sistemas antioxidantes en MG-20 que en Gifu (figura 14, tablas 4 y 5). Si bien es tentador relacionar esta regulación de la expresión génica con los niveles de EROs, se debe señalar que el *burst* oxidativo observado en Gifu fue observado

en las mediciones realizadas durante las primeras horas del tratamiento (figura 5). Para las 24hs posteriores al mismo, tiempo al cual se tomaron las muestras para el análisis transcritoómico, no se observaron grandes diferencias entre los ecotipos a nivel de las EROs (figura 5).

ID del gen	KAAS	MAPMAN	Log ₂ FC	
			Gifu	MG-20
chr1.CM0133.770.r2.m	<i>(S)-coclaurine N-methyltransferase</i>	<i>(S)-coclaurine-N-methyltransferase</i>	ns	-1.55
chr4.LjT10E17.80.r2.d	<i>OPR</i>	<i>12-Oxo-PDA-reductase</i>	4.32	6.76
chr2.CM1882.210.r2.a	<i>accB, bccP</i>	<i>Acetyl CoA Carboxylation</i>	ns	-2.06
LjSGA_013315.1	<i>FATB</i>	<i>ACP thioesterase</i>	ns	-2.20
chr2.CM0021.1610.r2.d	<i>ACOX1, ACOX3</i>	<i>acyl CoA DH</i>	ns	2.23
chr6.CM0679.310.r2.m	<i>ACSL, fadD</i>	<i>acyl coa ligase</i>	ns	-1.20
LjSGA_017763.1	<i>MFP2</i>	<i>beta-oxidation.mutifunctional choline-phosphate</i>	ns	1.22
chr6.LjT34O10.110.r2.d	<i>PCYT1</i>	<i>cytidyltransferase</i>	ns	-1.57
chr5.CM0052.370.r2.a	<i>CHK</i>	<i>holine kinase</i>	ns	1.40
chr4.CM0006.310.r2.m	<i>fabF</i>	<i>ketoacyl ACP synthase</i>	ns	-1.32
chr5.CM0335.90.r2.d	<i>OPCL1</i>	<i>lignin biosynthesis.4CL</i>	ns	1.44
chr6.CM0013.570.r2.d	<i>fabF</i>	<i>lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.ketoacyl ACP synthase</i>	ns	-2.50
LjB14E16.40.r2.a	<i>PLD1_2</i>	<i>phospholipase D</i>	ns	1.00
chr3.CM0127.570.r2.m	<i>methyltransferase</i>	<i>tocopherol O-Phospholipid synthesis</i>	ns	-1.87
LjSGA_020827.1	<i>GPAT</i>	<i>Phospholipid synthesis</i>	ns	-2.30
chr6.CM0778.90.r2.d	<i>DGAT1</i>	<i>TAG synthesis</i>	2.05	3.05

Tabla 22: Genes relacionados con el metabolismo de lípidos. Se muestra el ID del gen (columna 1), el ortólogo asignado por el KAAS (columna 2), la clasificación funcional arrojada por el MAPMAN (columna 3) y el Log₂ FC (inoculado vs control) obtenido en Gifu y en MG-20 (columnas 4 y 5 respectivamente). Ns corresponde a una diferencia entre inoculado y control no significativa.

Otro grupo de genes que mostró un contraste en su regulación transcripcional fue el de los genes relacionados con los procesos fotosintéticos. Consistentemente con la caída en el desempeño fotosintético sufrida por el ecotipo MG-20 a las 24 hs posteriores al tratamiento (figuras 7 y 8), se detectó también una caída en la expresión de genes relacionados a este proceso (figura 15, tablas 12-14). Como planteamos en la discusión del Capítulo 1, los resultados de la fluorescencia directa de la clorofila muestran un efecto negativo a nivel del flujo energético que ocurre en la cadena de transporte de electrones en el ecotipo MG-20 en respuesta a la bacteria (figura 8). Por otro lado, se pudieron detectar transcriptos correspondientes a componentes del citocromo b6/f, a la plastocianina, a la ferredoxina, a la ferredoxina oxidasa y a la ATP sintasa regulados de manera exclusiva en MG-20 en respuesta a *Pto*, todos ellos reprimidos (figura 15B y tabla 12). Además, se observó la regulación transcripcional de genes asociados a la biosíntesis de clorofila cuya expresión desciende frente a la inoculación con *Pto* en MG-20 (tabla 14), lo cual puede explicar en parte la clorosis observada en este ecotipo. Otro gen asociado a los procesos fotosintéticos, cuya expresión se redujo en respuesta al tratamiento fue la reductasa del catabolito rojo de la clorofila (*ACD2*, tabla 14). Como ya se comentó en este capítulo, la represión de este gen ha sido relacionada con la aparición de daño en tejidos de *A. thaliana* infectados con esta misma cepa de *P. syringae* [211, 212], [213]. Así, la regulación de los procesos fotosintéticos podría ser uno de los mecanismos claves en el desarrollo de los síntomas observados en el ecotipo MG-20.

Durante este capítulo se analizaron los perfiles transcripómicos y metabólicos que describen las respuestas de estos ecotipos frente a la inoculación con *Pto*. Uno de los fenómenos más interesantes que surgieron de este análisis es la regulación del metabolismo del ácido γ -aminobutírico (GABA). Como se comentó en el análisis de los resultados, el GABA apoplástico puede ser absorbido y catabolizado por esta bacteria [115] [221]. Al analizar la expresión génica en conjunto con los niveles de los metabolitos se observó que la síntesis de GABA a partir de ácido glutámico se encuentra favorecida a nivel transcripcional en MG-20 y que en este ecotipo aumentan los niveles de GABA frente a la bacteria (figura 20B, tablas 17 y 18). Además, los niveles de ácido

succínico, principal producto del catabolismo de GABA, también aumentaron en este ecotipo (tabla 17). Esto último nos permite proponer que la acumulación de ácido succínico podría deberse al catabolismo de GABA por *Pto*, sustentado por las características metabólicas propias de esta bacteria [95]. El catabolismo del GABA se encuentra también relacionado con la capacidad antioxidante de la células vegetales, específicamente la inducción de la vía metabólica graficada en la figura 20 ha sido reportada como necesaria para restringir los niveles de EROs en plantas [222]. Este metabolismo diferencial del GABA podría explicar quizás las diferencias observadas entre los ecotipos a nivel del estado redox en respuesta a la bacteria (figura 5).

Los patógenos biotróficos, suelen llevar a cabo la mayor parte de su ciclo dentro del hospedante sin producir muerte celular y son especialmente efectivos modificando el metabolismo celular y las relaciones fuente/destino de los metabolitos primarios de forma de satisfacer sus necesidades energéticas [41]. En nuestros ensayos, la acumulación de compuestos metabolizables por la bacteria o productos del metabolismo de la misma (tabla 17), en conjunto con la marcada reprogramación transcriptómica de procesos importantes para el metabolismo primario de la planta, como la represión de los genes relacionados con la maquinaria fotosintética (figura 15, tablas 12-14), la inducción del catabolismo de azúcares complejos (figura 21, tablas 19 y 20) y la regulación transcripcional positiva de las vías de degradación de lípidos (figura 23 y tabla 22), en el ecotipo MG-20 refuerzan la afirmación realizada durante la discusión del Capítulo 1 de que *Pto* se comportaría durante las primeras etapa de la infección como un patógeno biotrófico.

La acumulación de moléculas orgánicas en los tejidos foliares de *L. japonicus* en respuesta a la inoculación con la bacteria, es importante no solo a nivel de la patogenia y el desarrollo del patógeno, sino también desde un punto de vista fisiológico, si se tienen en cuenta la naturaleza de los síntomas observados en los tejidos inoculados. Como se describe en el Capítulo 1, entre los 2 y 3 días posteriores a la inoculación se observó en MG-20 (y en menor medida en Gifu) la aparición de zonas de desecación en los folíolos inoculados (figura 2). La acumulación de moléculas orgánicas puede genera una disminución del potencial hídrico de las células vegetales con respecto del potencial del

apoplasto. Así, las células del hospedante (que por otra parte se encuentran comprometidas a nivel de la maquinaria fotosintética, lo que puede a su vez provocar que acumulen menos fotosintatos osmóticamente activos), cederían agua al apoplasto, explicando en parte los síntomas observados en *L. japonicus* frente a *Pto*.

Como resultado del análisis transcripcional presentado en este capítulo, se han detectado una serie de genes que revisten de interés como parte del mecanismo de respuesta defensiva frente a *Pto*. Con el objetivo de obtener información más detallada del papel que cumplen estos genes en dicho mecanismo, en esta tesis se han realizado ensayos complementarios utilizando una estrategia de genética reversa. Los resultados de estos ensayos se presentan en el siguiente capítulo.

La genética reversa ha sido utilizada durante años para complementar los estudios de biología molecular, de modo de confirmar la función o implicancia en un proceso celular de un determinado gen. Esta técnica involucra el apagado o descenso de la expresión del gen en cuestión y la posterior observación del fenotipo del organismo modificado. Para esto suelen utilizarse líneas defectivas en el gen blanco, conocidas como líneas mutantes, o bien técnicas de silenciamiento génico [245]. La genética reversa ha sido ampliamente utilizada en leguminosas [246, 247], si bien existen pocos ejemplos de uso de estas herramientas en el género *Lotus* [248 – 250].

A continuación se analizará la respuesta al estrés biótico de líneas mutantes insercionales del ecotipo Gifu de *L. japonicus* para genes que revisten de interés. Estos genes fueron seleccionados según los siguientes criterios:

- los genes más regulados frente a la inoculación con la bacteria
- genes solo inducidos en MG-20 frente a la inoculación con la bacteria y, a su vez, más expresados en Gifu que en MG-20 en condiciones basales
- genes cuya función sea de importancia para la respuesta a patógenos y estén regulados en alguno de los ecotipos frente a la inoculación con la bacteria.

Cabe aclarar que no se encuentran disponibles líneas mutantes para el ecotipo MG-20.

9 Capítulo 3: Caracterización de líneas mutantes de *L. japonicus* ecotipo Gifu frente a la inoculación con Pto

9.1 Introducción

9.1.1 Genética reversa mediante la utilización de mutantes insercionales LORE1

Desde hace varios años se encuentran disponibles en el *Centre for Carbohydrate Recognition and Signalling* de la *Aarhus University*, más de 40.000 líneas mutantes del ecotipo Gifu de *L. japonicus*, las cuales fueron obtenidas mediante la inserción al azar del Chromovirus LORE1 [74, 251]. La información sobre estas líneas mutantes se encuentra disponible en la página web <http://users-mb.au.dk/pmgrp/>.

Estas mutantes fueron utilizadas previamente para identificar genes involucrados en la nodulación. Así, a partir de una colección de las mismas que mostraban fenotipos aberrantes en la nodulación, Małolepszy y colaboradores identificaron un gen codificante para la enzima *AMSH1* involucrada en la deubiquitinación postraduccional [252]. Hasta la fecha, este trabajo es el único que incluye resultados obtenidos utilizando la colección de mutantes LORE1.

9.2 Materiales y métodos

9.2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Ver Capítulo 1.

9.2.2 Preparación del inóculo bacteriano

Ver Capítulo 1.

9.2.3 Método de inoculación

Ver Capítulo 1.

9.2.4 Diseño experimental

En todos los ensayos correspondientes a este Anexo se utilizaron plantas de 4 semanas de edad (con 6 hojas verdaderas expandidas), las cuales fueron infiltradas con la suspensión de bacterias o con la solución de $MgCl_2$ (control). El *screening* de las líneas mutantes consistió de un único ensayo que contó con al menos 20 plantas por línea. A las 48 hs posteriores al tratamiento los folíolos infiltrados fueron cosechados para determinar la aparición de síntomas y la proliferación bacteriana. Todos los resultados obtenidos para la línea mutante en el gen *PAO1* del ecotipo Gifu fueron confirmados en experimentos independientes, utilizando al menos 6 réplicas independientes y cada medición se repitió al menos dos veces. A las 6 hs posteriores al tratamiento se determinaron los niveles de EROs y a las 24 se realizaron las mediciones de niveles de poliaminas y de fluorescencia directa de la clorofila.

9.2.5 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, muestras de aproximadamente 100 mg de peso fresco fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas en mortero. Al material pulverizado se le agregaron 500 μ l de buffer de extracción y se incubó 45 min a 60°C con agitación. A continuación se agregaron 200 μ l de cloroformo:isoamílico 24:1 y se mezcló con un vortex. Se centrifugó 10 min a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó 2 volúmenes de EtOH 96° frío, incubándose 20 min a -20°C. Al finalizar la incubación se

centrifugó durante 15 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 μ L de EtOH 70% en agua. Finalmente se resuspendió el precipitado en 30 μ L de H₂O miliQ esteril.

9.2.6 Selección de líneas homocigotas para las inserciones LORE1

Las líneas mutantes insercionales LORE1 del ecotipo Gifu de *L. japonicus* fueron evaluadas en cuanto a su homocigosis para la inserción utilizando una serie de PCRs *touchdown* según Urbanski y colaboradores [74]. El programa utilizado se detalla en la tabla 22.

Paso	Temperatura	Duración	Repeticiones
1	95°C	3min	1x
2	95°C	30sec	
3	72°C	1min 15sec	5x
4	95°C	30sec	
	72°C to 68°C		
5	(-0.5°C por ronda)	30sec	
6	72°C	45sec	10x
7	95°C	30sec	
8	68°C	30sec	
9	72°C	45sec	20x
10	72°C	10min	1x

Tabla 22: Programa de la *touchdown* PCR utilizado para evaluar la homocigosis de las inserciones LORE1 en las líneas mutantes del ecotipo Gifu de *L. japonicus*.

En esta estrategia se utiliza una combinación de cebadores directos y reversos que se detallan en la tabla 23 para amplificar el gen sin inserción y la combinación del cebador directo de cada gen con el cebador P2 para evaluar el gen interrumpido por el inserto LORE1 (figura 23).

Todos los cebadores fueron diseñados utilizando el *software* Primer 3 [253], con la siguiente configuración (mínimo-óptimo-máximo):

Tamaño del cebador: 18-24-27

Tm: 65-68-71

GC%: 20-50-80

Tamaño del producto: 500-600-700

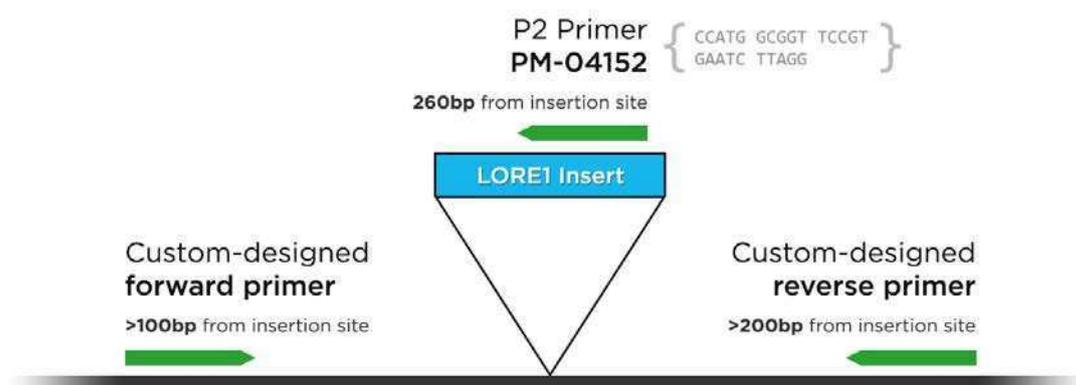


Figura 23: diseño de cebadores de genotipado para las líneas LORE1. Los cebadores directos e inversos se diseñaron basándose en la región ± 1000 pb flanqueando la inserción con criterios predefinidos (el primero al menos a 100 pb de distancia y el segundo al menos a 200 pb de distancia del sitio de inserción). El cebador P2 une a 260 bp de distancia del sitio de inserción y se encuentra en todas las inserciones LORE1. Imagen tomada de la página web del *Lotus base* (<http://users-mb.au.dk/pmgrp/>)

Se utilizó ADN genómico de Gifu wt como control positivo de la presencia del gen intacto así como también como control negativo de inserción LORE1 (utilizando el cebador P2). La homocigosis fue evaluada al menos 3 veces en cada línea a partir de ADN genómico de muestras independientes.

9.2.7 Evaluación del área afectada

Ver Capítulo 1.

Línea	Cebador directo	Cebador reverso
30054671	TGCTTCCTGGTGGTGCATGGTCA	TGCCACTGCCTCAGCTCTTGTGTC
30020319	TGCCAATGGCTCCCTTTACCATTTG	GACACAAGAGCTGAGGCAGTGGCA
30009344	CGCAATTTTCAGCCCTTGCAAAGAA	GCCTCCAAATCCAACAAAGATGCCA
30011080	TTGCTGAGGAGATCGTGGCCCTTC	TGGCTAGGGCCCTGCATCATTTTG
30011139	TTGCTGAGGAGATCGTGGCCCTTC	TGGCTAGGGCCCTGCATCATTTTG
30033198	CGCAATTTTCAGCCCTTGCAAAGAA	GGGCCACGATCTCCTCAGCAATGT
30008872	AGCCTCAACTGAAGCAACTAGCAGTC	CGCAGAGGCCTACACGCAGAAAGG
30011042	GCATGTGGGGCACTAGAGCTTTGGA	CAAGCTCTCGGTCGTGTTACCCCA
30054041	TGCGTGTAGGCCTCTGCGTTGAAG	GGTCACCAAGCATGTGGGGCACTA
30005001	TCCTGATCAAACCTCCAGCACGCGA	CCCTGATTTCTGGGCATTCGAGCA
30036323	GGGGTGAGGGTTGCTCTGCCTTTT	GGATGCTGAGGGGGTTCAGAGGGA
30036323	GCAGTTCCTGCTGTGACACCCCT	TTTCGTGCACGTTTGGATGCACAG
30019967	CTCTGGGATCCCCAGCTTGCCACT	CATGGGCTTGAGATCCTGTGCTGTG
30050595	TGGGGTCGGTGACACCACAGATAA	TGAGTCGAGGGAAAAGACAAAGAACCTCA
30030482	CGCACATGAAGTAAATTGGCTTACGCA	GGATTGATCCCGCGGTCACAACAT
30051760	GGAAGGGCGTTGGAATTTGCTTGC	CTGTCCTGCCTGGCAAATGCTGTG
30011237	GTTGTTTCATGCCCTGGAGAACTTGA	TTGGTTGATGGACCCAATGGAGGG
30011225	GTTGTTTCATGCCCTGGAGAACTTGA	TTGGTTGATGGACCCAATGGAGGG
30006029	GCAGCACCCTCACGTATCTTCCCA	TGCGAACATTGCACTAACCTCCTTGA
30006522	GGCGTGTTCGAAGCTCATTGGG	GCCATGCAATCCTGTGAGCCTGGT
30020083	CCAATGATGAGAAACCACAGTCACGGG	TCATCTGCAGGGATTTTGAGCCCC
30030850	TGGCTTTGCAACTGGTTTTTGGGG	GCAATCCTGAGCCAGCTTGCCAAC
30054019	TTCAGTGTGACCCATTGGTGCCG	TCCCCAGGTCCTTGAATAGGGC
30008189	ACCCTGGCCCTCCATCTCCTTCAA	TGTGTTTCATGTGTGCGTGAGAGTTCA
30031268	GGTTTGGGATCCGTGAAGCACAAGG	CCCAGAAGAGCAGAGAAAAACAGGGCA
30034049	TGGCACAACTCAAACATATGCACCA	TGTGTTTCATGTGTGCGTGAGAGTTCA
30036331	TCCATTGGCCTTCCCTCTCATCAA	CCCAGATAGGAATGCCTTCACCTTTGTCA
30011134	TGGGGTTGGGGCAGGTTTTCTAC	TCAAATTGAGCCTTTAACGGAGCAACAA
30017662	CAGCAGAGTGCTGAAAATGCAGCAGAA	GCAACCTTGAATACTTGGCACATGCGAT
30007503	AGCCAGCCTTTTGCATGCTGGTTG	TGGACAAGCCAATGATGAGCCGTG
Primer P2		CCATGGCGGTTCCGTGAATCTTAGG

Tabla 23: cebadores utilizados para evaluar la homocigosis de la inserción LORE1 en las distintas líneas mutantes de *L. japonicus* del ecotipo Gifu. La combinación de cebadores directos y reversos se utilizó para amplificar el gen sin inserción, mientras la combinación de cebador directo de cada gen y el cebador P2 se utilizó para evaluar el gen interrumpido por el inserto LORE1.

9.2.8 Evaluación de la proliferación del patógeno

Ver Capítulo 1.

9.2.9 Detección de especies reactivas del oxígeno

Ver Capítulo 1.

9.2.10 Estudio de la fluorescencia directa de la clorofila

Ver Capítulo 1.

9.2.11 Análisis bioinformático del gen chr3.CM0451.450.r2

Se analizó la secuencia proteica del gen chr3.CM0451.450.r2.m (el cual fue caracterizado en el Capítulo 2 como una poliamina oxidasa) con el programa PFAM [254]. La secuencia utilizada fue la siguiente:

```
>chr3.CM0451.450.r2
MDSPSHSRSSVIVVGAGISGITAAKVLAENDVEDLVILEASDRIGGRIRKEPFGGVS
AELGAGWIVGVGGRKINPIWELAAEHGLRTCFSDYSNARYNIYDRSGKIFPSGIAADSY
QKAVDSAIQKLRNQEEAKFEADGYGGDDDDDDNDGGNDGFKLTCLPPSPETPIELAI
FILHDFEMPEVEPIATYVDYGEKEFLVADERGYDYLLYKMAEEFLFTSEGRILDDRKL
NKVVRELQHSRNGVKVITEDGCVYEANYVILSVSIGVLKSDLLAFNPPLPRWKLEAFKK
CDVMVYTKIFLKFYPYKFWPSGPEKEFFIYAHERRGYTTFWQHMENAYPGSNILVVTITN
GESKRVEAQSDIEDTLREAMAVLRDMFGPDIPDAIDILVPRWNNRFRQGSYSNYPPIISN
RKVCRNIKAPVDHIFFTGEHTSEKFSGYVHGAYLAGIDTSKSLLEEMRKDKETKSENQT
LLEPLLLALTGSLTMSKPETVSNIIHKCDIPTQLYLSGKLGIPAIL
```

Se realizó un alineamiento múltiple (figura 24) utilizando el programa Clustal Omega [255], a partir de las las secuencias proteicas de las poliamina oxidasas *ATPAO1* (AT5G13700), *ATPAO2* (AT2G43020), *ATPAO3* (AT3G59050), *ATPAO4* (AT1G65840) y *ATPAO5* (AT4G29720), las diamina oxidasas *CuAO1* (AT1G62810), *CuAO2* (AT1G31710) y *CuAO3* (AT2G42490), y del gen chr3.CM0451.450.r2 de *L. japonicus*.

Del resultado del alineamiento múltiple se confeccionó un árbol del tipo Neighbour-joining utilizando el *software* Clustal omega [255]. Estas mismas secuencias fueron analizadas en busca de señales de localización subcelular con el *software* TargetP [256].

```

CUAO3          MASASKKTSACPHHGGSLPPPKLVSAA---PDTVAVWSDADDQRASKVSLSESVIRPVDSF
CUAO1          -----MAEPSFARLFLFFSFLIFA-----TYSWVFGPDSGF
CUAO2          -----MAPLHFT--ILILFSFVI-----
ATPAO5          -----
ATPAO1          -----
chr3.CM0451.450.r2.m -----
ATPAO4          -----
ATPAO2          -----
ATPAO3          -----

CUAO3          PDNTA-KKP---ANKGISVMPRTETKHPLDPLSAAEISVAVATVRAAGANPEVRDG-MRF
CUAO1          LFGTRVRKTLGSNRQVHVDHSLEKPHHPLDPLTVREINRVRTILSNH--DPGFGSGSATI
CUAO2          -----VVSSSFTPPRHPFDPLTETELKLVRTIINKS--YPVGNHKKFTF
ATPAO5          -----
ATPAO1          -----
chr3.CM0451.450.r2.m -----
ATPAO4          -----
ATPAO2          -----
ATPAO3          -----

CUAO3          IEVASVEPKQVVALADAYFFPPFQPSLLPRTKSGPVI PMKLPPRRARLVVYNQKSNETS
CUAO1          HSMALDEPEK-----SRVVQWKKGNKL----LSRRAAVVAYWGGQTHEI
CUAO2          QYVGLNEPNK-----SLVLSWYSSPNHTIKPPPRQAFVIARDNGKTREI
ATPAO5          -----
ATPAO1          -----
chr3.CM0451.450.r2.m -----
ATPAO4          -----MDKKKNSF-
ATPAO2          -----MESRKNSD-
ATPAO3          -----MESGGKTN-

CUAO3          VWIVALSEVHAVTRGGHHRGRVSSQVIPDV-QPPMDAAEYAECEAIVKDFPPFIEAMKR
CUAO1          --TVDL-----DSGRVSDVINRTSGYPILTLNDVFAASQVPLKSLEFNRSIEA
CUAO2          --VLDF-----SSRAIVSDKIHVGNYPMLSNDEQEASTELVVKFKPFIDSVAK

```

```

ATPAO5 -----MAKKARIVIIIGAGMAGLTAANKLYTSSNNTFELSVVEGGSR
ATPAO1 -----MSTASVIIIGAGISGISAAKVLVENG--VEDVLILEATDR
chr3.CM0451.450.r2.m -----MDSPSHSRSRSSVIVGAGISGITAAKVLAEEND--VEDLVILEASDR
ATPAO4 ---PDNLPEGTISELMQKQNNVQPSVIVIGSGISGLAAARNLSEAS--F-KVTVLESRDR
ATPAO2 ---RQMRRANCFSAGERMK-TRSPSVIVIGGGGGISAARTLQDAS--F-QVMVLESRDR
ATPAO3 ---RQLRKAICVSTDEKMKKKRSPSVIVIGGGMAGISAARTLQDAS--F-QVVVLESRDR
: : .
CUAO3 RG-----IEDMDLVMVDPWCVGYHSEADAPSRRLAKPLIYCR-----TDSDSP
CUAO1 RG-----VKFSDLACITPFAGWFGSE--EEGRVIRVQCFT-----LQG
CUAO2 RG-----LNVSEIVFTTSTIGWYGETK-AEAERVIRLMPFY-----LDG
ATPAO5 IGGRINTSEFSSEKIEMGATWIHGIGGS---PVYRIAKETGSLVSD---EPWECMDSTID
ATPAO1 IGGRIHKQNFQDVPVELGAGWIAGVGGKESNPVWELASRFLNRT-----CFSDYTNA
chr3.CM0451.450.r2.m IGGRIKKEPFQGVSAELGAGWIVGVGGRKINPIWELAAEHGLRT-----CFSDYSNA
ATPAO4 IGGRIHTDYSFGCPVDMGASWLHGVSDD--ENPLAPIIRRLGLTLTYRTSGDDSIYDHDLE
ATPAO2 IGGRVHTDYSFGFPVDLGASWLHGVCCK--ENPLAPVIGRLGLPLYRTSGDNSVLYDHDLE
ATPAO3 IGGRVHTDYSFGFPVDLGASWLHGVCCK--ENPLAAVIGRLGLPLYRTSGDNSVLYDHDLE
* :
CUAO3 MENGYAR-----PVEGIY-VLVDMQNMVVEFEDRKFVPLP-----
CUAO1 TTNYFMR-----PLEGLY-VTVDLKLEVIKIIDKGPPIP-----
CUAO2 TVNMYLR-----PIEGMT-IIVNLDEMKVSEFKDRSVVTMP-----
ATPAO5 KAKTFAEGGFIEIPEIVESISGLFTALMELAQGKEISQSDADLSRLAHIYETATRVCSKG
ATPAO1 RFNIYDRSGKIFPTGIASDS---YKKAVD SAILKLSLEAQ-----
chr3.CM0451.450.r2.m RYNIYDRSGKIFPSGIAADS---YQKAVD SAIQKLRNQEEA-----
ATPAO4 SYGLFDMHGNIKIPQLVTKVGDFAFKRIL-EETEKIRDET-----
ATPAO2 SYALFDMGNQVPQELVTQIGVTFERIL-EEINKVRDEQ-----
ATPAO3 SYALFDKAGNQVSQELVTKVGENFEHIL-EEICKVRDEQ-----
: : .
CUAO3 -----PPDPLRNYTPGESRGGVDRSDVKPLQ- IIQPEGPSFRV-RGYFV---EWQKW
CUAO1 -----KASG-TEYRFGVQNKPVHMDRINPIS-MEQPDGPSFRVEDGHLV---KWANW
CUAO2 -----IANG-TEYRISKLNPPFGPT-LHNAV-LLQPDGPGFKV-DGHIV---RWANW
ATPAO5 SSTSVMGFLKSGFDAYWDSISNGG-EEG-VKGYG----KWSRKSLE-EAIFTM--FSN
ATPAO1 -----CSGQVAEEAPSSPKTPIE-LAI---DFILH
chr3.CM0451.450.r2.m -----KFEADGYGGGDDDDDD-N-DGG-NDGFKLTKLPPSPETPIE-LAI---DFILH
ATPAO4 -----A-N-DMSVLQGIS-IVLDRNPELRQE-GMAYEVLQWYLC
ATPAO2 -----D-A-DISISQAFS-IVFSRKPELRLE-GLAHNVLQWYVC
ATPAO3 -----D-E-DMSIAQAFS-IVFKRNPELRLE-GLAHNVLQWYLC

CUAO3 NFRIGFTPREGLVIHLSVA-----YVDG----SRGR-RPVAHRLSFVEMVVPYGD PNE---
CUAO1 VFHV KADQRAGMIISQAT-----VRDS----ETGEPRSVMYKGFPSSELFVPYMDPEE---
CUAO2 EFHISFDVRAGIVISLAS-----LFDT----DVNKYRQVLYKGLHSEMFI PYMDPSD---
ATPAO5 TQRTYTSADELSTLDFAAESEYQMFPGEEITIAKGYLSVIHHLASVL-----PQGV I
ATPAO1 DF---EMAEVEPISTYVDFGEREFLVA---DERGYECLLYKMAEEFLVTSHGNILDYRL
chr3.CM0451.450.r2.m DF---EMPEVEPIATYVDYGEKEFLVA---DERGYDYLLYKMAEEFLFTSEGRILDDRL
ATPAO4 RMEAWFAVDANLISL-KCWDQDECLSGHGLMVQGYEPVIRTIK-----DLDIRL
ATPAO2 RMEGWFAADAETISA-KCWDQEELLPGGHGLMVRGYRPVINTLAK-----GLDIRV
ATPAO3 RMEGWFAADAETISA-KCWDQEELLPGGHGLMVRGYRPVINTLSK-----GLDIRL
: :

```

```

CUAO3 -----PHYRKNAFDAGEDGLGKNAHSLKKGCDCLGSIKYFDAHFTNFTGGVETIEN
CUAO1 -----GWYYKGYMDAGELGLGPTAMPLVPLNDCPRNSYYIDGVFASPDGKPIQVQN
CUAO2 -----DWYFITYLDCGDFGCGQCAVSLQPYTDCPAGAVFMDGIFAGQDGTPAKIPK
ATPAO5 QLNKRVTKIEWQSNEVKLHFS DG-----SVVFADHVIVTVSLGVLK---
ATPAO1 KLNQVVREVQQSRNGVVVKTEDG-----SVYEANYVIVSASIGVLQ---
chr3.CM0451.450.r2.m KLNKVVRELQHSRNGVKVITEDG-----CVYEANYVILSVSIGVLK---
ATPAO4 N-HRVTKVVRTSNKVIIVAVEGG-----TNFVADAVIITVPIGVLK---
ATPAO2 G-HRVTKIVRRYN-GVKVTTENG-----QTFVADA AVI AVPLGVLK---
ATPAO3 S-HRITKISRYS-GVKVTEKG-----DTFVADA AVI ALPLGVLK---
. * : .

CUAO3 CVCLHEEDHG-ILWKHQDWR TGLAEVR---RSRRLTVSFLCTVANYEYGF---YWHFYQD
CUAO1 MICLFFERYAGDISWRHSEILFANADIRESRPKVTLVARMATSVGN DYIF---DWEFQTD
CUAO2 VMCIFEKYAGDIMWRHTEAEIPNLEITEV RPDVSLVARI VTVGN DYIV---DYEFKPS
ATPAO5 -----AGIETDAELFSPPLPDFKSDAIRRLGYGVNKL FVEMSQ RKFPS
ATPAO1 -----SDL---LSFQPLLPRWKTEAIQKCDVMVYTKIFLKFQCFWPC
chr3.CM0451.450.r2.m -----SDL---LAFNPPLPRWKLEAFKKCDVMVYTKIFLKFYKFWPS
ATPAO4 -----ANL---IQFEPELPQWKTS AISGLGVGNENKIALRFDR AFWPN
ATPAO2 -----SGT---IKFEPKLEPWKQEAINDLGVGIENKIILHF EKVF WPK
ATPAO3 -----SGM---ITFEPKLPQWKQEAINDLGVGIENKIILNF DN VFWPN
. .

CUAO3 GKIEAEVKLTGILSLGALQPGET-----RKYGT TIAPGLYAPVHQHFFIARMDMSVDC
CUAO1 GLIRVTVAAASGMLMVKGTPYDNVDDLGDREDDAGPLISENVIGVVDHDFITFHLDMDIDG
CUAO2 GSIKMGVGLTGVLEV KPV EYIHTSEIKLGEDIHGTIVADNTVGVNHDHVFTRLHLDIDG
ATPAO5 LQLVF-----DREDESEFRFVKIPWMMRR TATI
ATPAO1 GPGQE-----FFIYAHEQRGYFTFWQHME---
chr3.CM0451.450.r2.m GPEKE-----FFIYAHERRGYFTFWQHME---
ATPAO4 VEFLG-----MVAPTSYACGYFL---NLH---
ATPAO2 VEFLG-----VVAETSYGCSYFL---NLH---
ATPAO3 VEFLG-----VVAETSYGCSYFL---NLH---

CUAO3 KPAAEFNQVVEVNRVDE-----RGENNVHNNAFY-AEEK-----LLK
CUAO1 PMNNSLVKVHLEKQRV-----PTGKSPRKS YLKVKKY-----IAK
CUAO2 TENSFVRNELVTTTRSP-----KSVNTPRKYWTTPK-----TAK
ATPAO5 TPIHSNSKVLLSWFAGKEALELEKLTDEEIKDAVMTTISCLTGKEVKNDTAKPLTNGSLN
ATPAO1 -NAYPGSNILVVTITNEQSKRVEAQSDQETMKEAMSVLRDMFGAT-----
chr3.CM0451.450.r2.m -NAYPGSNILVVTITNGESKRVEAQSD EDTLREAMAVLRDMFGPD-----
ATPAO4 --KATGHPVLVYMAAGNLAQDLEKLSDEATANFVMLQLK KMF-PD-----
ATPAO2 --KATGHPVLVYMPAGQLAKDIEKMSDEAAANFAVLQLQRIL-PD-----
ATPAO3 --KATSHPVLVYMPAGQLARDIEKKSDEAAANFAFSQLQKIL-PD-----

CUAO3 SEAVAMRDCDPLSARHWIVNRTRTVNRTGQLTGYKLVPGSNCLPLARPEAKFLR-----
CUAO1 TEKDAQIKLSLYDPYEFHIVNPNRKS RVGNPAGYRIVPGGNAASLLDHDPPQI-----
CUAO2 TEAEARVKLGLK-AEELVVNPNRKT KHGNEVG YRLLHGSAAGPLLAQDDFPQI-----
ATPAO5 DDDEAMKITKVLKSKWG-----SDPLFRGSYSYVAVGSSGDDLDAMA EPLPKINKV
ATPAO1 ----IPYATDILVPRWW-----NNRFQRGSYSNYPMISDNQLLQNIKAPVG-----
chr3.CM0451.450.r2.m ----IPDAIDILVPRWW-----NNRFQRGSYSNYP IISNRKVCRN I KAPVD-----
ATPAO4 ----APDPAQYLVTRWG-----TDPNTLGCYAYDVVGMPE DLYPRLGEPVD-----
ATPAO2 ----ALPPVQYLVSRWG-----SDVNSMGYSYDIVGKPHDLYERLRVPVD-----
ATPAO3 ----ASSPINYLVS RWG-----SDINSLGSYSYDIVNKPHDLYERLRVPLD-----
. *

```

```

CUAO3          -----RAAFLKHNLWVTRYAPDEKFPGGFPPNQNP--RAGEGLATWVKQNRS--LEES
CUAO1          -----RGAFNTNNQIWWTPYNRSEQYAGGVLIYQS---QGDDTLQVWSDRDRS--IENK
CUAO2          -----RAAFTNYNVWITPYNRSEVWAGGLYADRS---QGDDTLAVWSQRNRK--IEKE
ATPAO5         GQVNGHDQAKVHELQVMFAGEATHRTHYSTHGAYYSGLREANRLKHYKCNF-----
ATPAO1         -----RIFFTGEHTSEKFSGYVHGGYLAGIDTSKSLLEEMK-----Q
chr3.CM0451.450.r2.m -----HIFFTGEHTSEKFSGYVHGAYLAGIDTSKSLLEEMRKDKETKSENQ
ATPAO4         -----NIFFGGEAVNVEHQSAHGAFLAGVSASQNCQRYIFERLG---AWE
ATPAO2         -----NLFFAGEATSSSFPGSVHGAYSTGLMAAEDCRMVLERYG---ELD
ATPAO3         -----NLFFAGEATSSSYPGSVHGAYSTGVLA AEDCRMVLERYG---ELE
                . : .
CUAO3          DVVLWYVFGITHVPRLEDWPVMPVEHIGFTLMPHGFFNCSPA VDVPPNPCELETKESEVK
CUAO1          DIVLWYTLGFHHVPCQEDYPVMPPTVAASFELK PANFFESNP ILGSAPFFEKDLPV-----
CUAO2          DIVMWYTVGFHHVPSQEDYPTMPTLSGGFELRPTNFFERNPVLKTKPVKVT TARK-----
ATPAO5         -----
ATPAO1         SLLLQPLLAF-----TESLTLTHQKPNNSQIYT---NVK
chr3.CM0451.450.r2.m TLLLEPLLAL-----TGSLTMSKPETVSNIHKCDIPTQL
ATPAO4         --KLKLV-SL-----MGNSDILETATVPL-----
ATPAO2         --LFQPV-----MG---EEGPASVPL-----
ATPAO3         ----HE-----ME---EEAPASVPL-----

CUAO3          EVVAPKALQTGLLSKL
CUAO1          --CRPFASS-----
CUAO2          --CTPKND-----
ATPAO5         -----
ATPAO1         FISGTS-----
chr3.CM0451.450.r2.m YLSGKLG IPEAIL---
ATPAO4         QISRM-----
ATPAO2         LISRL-----
ATPAO3         LISRM-----

```

Figura 24: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las enzimas *AtPAO1-5* y *CuAO1-3* de *A. thaliana*, y de la secuencia peptídica predicha a partir del gen chr3.CM0451.450.r2.m de *L. japonicus* utilizando el software Clustal Omega [255].

9.2.12 Extracción de poliaminas (PAs) libres

Se extrajeron PAs libres de folíolos de *L. japonicus* congelando el material vegetal en N₂ líquido y homogeneizándolo. El homogenato (200 mg) se resuspendió en 600 µl de PCA 5% (v/v), se lo incubó en hielo durante 30 min y luego se centrifugó a 10,000 g (5 min). Se desechó el precipitado y se mantuvo el sobrenadante a -20°C.

9.2.13 Determinación de los niveles de poliaminas libres

La determinación de PAs libres en folíolos de *L. japonicus* se realizó de acuerdo a una versión modificada de Jiménez-Bremont y colaboradores [257]. Para dansilar se añadieron 60 μl del extracto de poliaminas libres a 6 μl de 0,1 mM heptanodiamina (patrón interno, HTD) más 60 μl de Na_2CO_3 saturado y 75 μl de cloruro de dansilo-acetona 10 mg ml^{-1} . Después de 16 hs a 25°C en oscuridad, se añadió 20 μl de prolina 100 mg ml^{-1} para detener la reacción. Las PAs derivatizadas se extrajeron con 200 μl de tolueno. La fase orgánica (175 μl) se evaporó al vacío y se volvió a suspender en 40 μl de acetonitrilo. Las PAs derivatizadas se separaron utilizando un equipo HPLC (ISCO 2350, ISCO Inc, Lincoln, NE) con una columna de fase inversa Sephasil C18 (Amersham Pharmacia) y se detectó con un espectrofluorómetro (Variant Fluorichrom). La mezcla solvente se obtuvo con un programador de gradiente ISCO 2360, con un flujo de 1,5 ml min^{-1} de la siguiente manera: 0-4,5 min, acetonitrilo:H₂O 70:30 v/v; 4.5-9 min, acetonitrilo 100; 9-15 min, acetonitrilo:H₂O 70:30 v/v). Las áreas de los picos fueron integradas, normalizadas por el área de la HTD e interpoladas a una curva de calibración de estándares para cada PA.

9.3 Resultados y Discusión

9.3.1 Selección de genes de interés

Se buscaron líneas mutantes para estos genes en la base de datos Lotus base del *Centre for Carbohydrate Recognition and Signalling de la Aarhus University* (tabla 6). Finalmente se seleccionaron las líneas homocigotas para la inserción mediante series de PCRs *touchdown* [74] y se multiplicaron en cámaras de cultivo. Del total de los genes de interés (tabla 24), solo pudieron obtenerse semillas viables de líneas homocigotas de 5 de ellos (tabla 25). En la tabla 25 se informa el identificador que será utilizado de acá en adelante para referirse a cada línea mutante.

9.3.2 Screening de la tolerancia a la inoculación con Pto en líneas Gifu mutantes insercionales LORE1

Para caracterizar los niveles de tolerancia de las líneas Gifu mutantes insercionales LORE1 para los genes de interés se evaluó el porcentaje de área foliar afectada y la multiplicación de la bacteria en los tejidos vegetales. Para todos los ensayos se utilizaron las líneas *salvajes* (wt) de los ecotipos Gifu y MG-20 como controles positivos o negativos, dependiendo del ensayo.

Gen ID	MAPMAN	Gi-Gc	Mi-Mc	Gc-Mc	Líneas mutantes
	<i>moderately similar to</i>				
chr1.CM0012.2250.r2.d	<i>pathogenesis-related</i>	5.14	5.53	ns	30004738
	<i>thaumatin family protein</i>				
	<i>similar S-ADENOSYL-L-</i>				30020319 -
chr1.CM0113.890.r2.m	<i>METHIONINE:SALICYLIC</i>	3.78	5.13	ns	30054671
	<i>ACID CARB</i>				30009344 -
	<i>similar MYB-related</i>				30011080 -
chr1.CM0295.180.r2.m	<i>protein</i>	ns	5.90	ns	30011139 -
					30033198
	<i>similar PATHOGEN-</i>				30008872 -
chr2.CM0081.930.r2.a	<i>INDUCIBLE ALPHA-</i>	ns	2.59	2.53	30011042 -
	<i>DIOXYGENASE</i>				30054041
	<i>nearly identical Arginine</i>				
chr3.CM0091.1980.r2.m	<i>decarboxylase</i>	1.39	ns	ns	30005001
	<i>moderately similar JAR1</i>				
chr3.CM0406.430.r2.d	<i>(JASMONATE</i>	ns	ns	1.98	30036323 -
	<i>RESISTANT 1)</i>				30036667
	<i>similar polyamine oxidase</i>				30019967 -
chr3.CM0451.450.r2.m		1.28	1.08	ns	30050595
	<i>similar transcription factor</i>				
chr4.CM0042.700.r2.m	<i>(MYB62)</i>	3.52	5.95	ns	30030482 -
	<i>similar PATHOGENESIS</i>				30051760
chr4.CM1622.120.r2.d	<i>RELATED PROTEIN</i>	5.29	4.36	ns	30011225 -
	<i>similar to disease</i>				30011237
chr5.CM0148.470.r2.m	<i>resistance protein</i>				30006029 -
	<i>similar to ATSERK2,</i>				30006522
chr5.CM0344.440.r2.d	<i>SERK2 SERK2</i>	ns	3.27	7.35	30054019

chr6.CM0573.210.r2.m	<i>very weakly similar to pathogenesis-related protein 1</i>	2.64	2.68	ns	30008189 - 30031268 - 30034049
LjSGA_007368.1	<i>similar to putative transcription factor (MYB4)</i>	ns	2.90	2.27	30036331
LjSGA_028626.1	<i>similar to EREBP-3 like</i>	5.24	4.41	ns	30049533
LjSGA_045519.1	<i>similar tobZip transcription factor AtbZip65</i>				30011134
LjSGA_073332.1	<i>very weakly similar to NHL25 NHL25 (NDR1/HIN1-LIKE 25)</i>	2.71	4.87	2.91	30017662
LjT10O10.140.r2.d	<i>similar to disease resistance protein</i>	ns	-2.97	ns	30007503

Tabla 24: Genes seleccionados para la caracterización utilizando líneas mutantes. De los genes de interés (columna 1) se seleccionó una serie de líneas mutantes del ecotipo Gifu (columna 6). Se informa la probable función asignada por el *software* MAPMAN (columna 2) y los niveles de expresión relativa en las distintas comparaciones realizadas (columnas 3-5).

Gen	KAAS	MAPMAN	Líneas mutantes
chr1.CM0113.890.r2.m	<i>jasmonate O-methyltransferase (JMT)</i>	<i>similar to S-ADENOSYL-L-METHIONINE:SALICYLIC ACID CARB</i>	30054671
chr3.CM0451.450.r2.m	<i>polyamine oxidase (PAO1)</i>	<i>similar to polyamine oxidase</i>	30050595
chr4.CM0042.700.r2.m	<i>myb proto-oncogene protein, plant (MYB62)</i>	<i>similar to putative transcription factor (MYB62)</i>	30051760
chr5.CM0344.440.r2.d	<i>SERK2 (SERK2)</i>	<i>similar to ATSERK2, SERK2 SERK2</i>	30054019
LjSGA_007368.1	<i>myb proto-oncogene protein, plant (MYB4)</i>	<i>similar to putative transcription factor (MYB4)</i>	30036331

Tabla 25: Lista de los genes para los cuales se obtuvieron líneas mutantes homocigotas. De los genes obtenidos (columna 1) se obtuvo una serie de líneas mutantes homocigotas del ecotipo Gifu (columna 4). En la columna 3 se informa la probable función asignada por el *software* MAPMAN y en la columna 2 el ortólogo obtenido con el *software* KAAS. Entre paréntesis en la columna 2 se informa un identificador que será utilizado de acá en adelante para referirse a cada línea mutante.

9.3.2.1 Porcentaje de área foliar afectada

Para estudiar respuesta de las líneas mutantes de Gifu en respuesta a la inoculación con *Pto* a nivel del área foliar afectada, se calculó el porcentaje del área afectada de los folíolos infiltrados 48 hs después del tratamiento.

La única línea que presentó diferencias con respecto a Gifu *wt* fue la *pao1*, mutante para el gen de la poliamina oxidasa (PAO), que mostró un menor daño foliar (por debajo del 20%, figura 25).

9.3.2.2 Proliferación de *Pto* en tejidos foliares

Para evaluar la capacidad de *Pto* de proliferar en los tejidos de las líneas mutantes de Gifu, se realizaron recuentos de las UFCs que pudieron ser recuperadas de los tejidos infectados 48 hs después del tratamiento.

Cuatro de las cinco líneas estudiadas no mostraron diferencias significativas con respecto a la línea Gifu *wt* (figura 26). En cambio, en la línea mutante *pao1* se recuperó un menor número de UFCs que de la línea Gifu *wt* (figura 26), lo cual es consistente con los resultados de porcentaje de área foliar afectada (figura 25).

Dado los resultados obtenidos en este *screening*, la línea *pao1* fue seleccionada para la realización de los siguientes experimentos fisiológicos.

9.3.3 Caracterización genética y fisiológica de la línea *pao1*

Las poliaminas (PAs) son aminas alifáticas relativamente pequeñas. Las más abundantes en plantas son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y la tetramina espermina (Spm) y pueden presentarse en forma libre o conjugadas a pequeñas moléculas o proteínas [258]. Estos compuestos comparten ciertas características con fitohormonas, como una distribución ubicua, y la participación en la regulación de diferentes procesos celulares como apertura y cierre de canales iónicos, organización de la cromatina, replicación del ADN, transcripción del ARN, síntesis proteica, proliferación celular

y apoptosis [259, 260]. Además, las poliaminas juegan roles centrales en la tolerancia o mitigación de un amplio rango de estreses, durante los cuales se acumulan, atribuyéndoseles un posible rol como secuestradores de radicales libres.

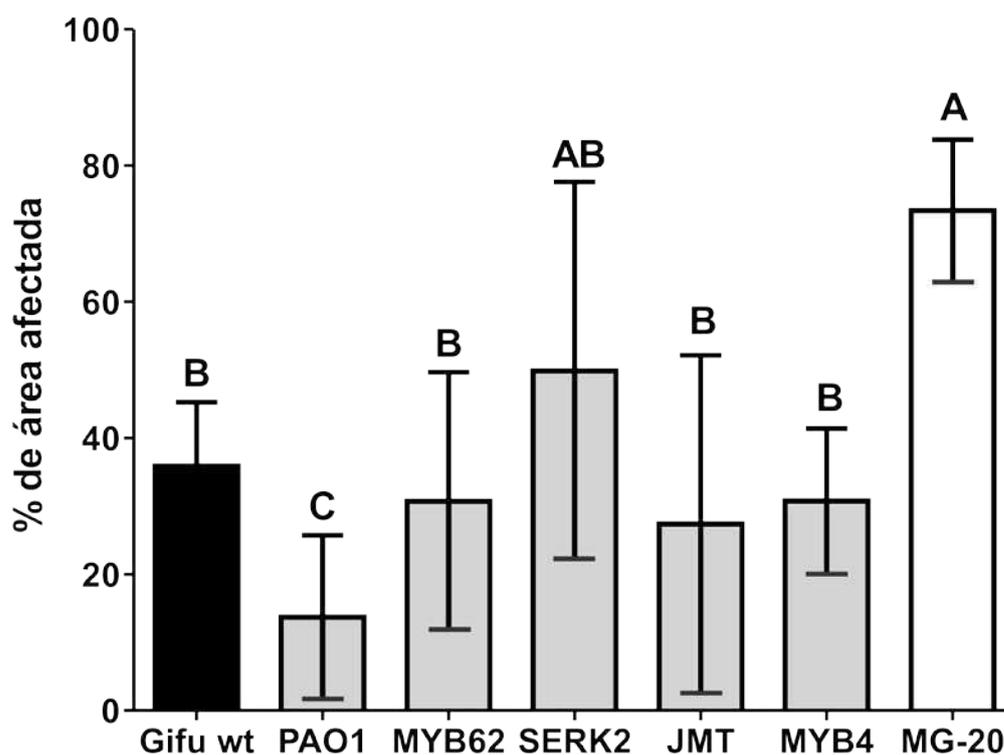


Figura 25: Porcentaje de área afectada medido en las líneas Gifu mutantes insercionales infectadas con *Pto* con respecto a su control. MG-20 y Gifu wt se presentan como controles. Las barras corresponden al desvío estándar, diferentes letras corresponden a diferencias significativas según el *test* de Tukey ($p \leq 0,05$).

El catabolismo de poliaminas superiores (espermidina y espermina) por enzimas de la familia de las PAOs ha sido reportado como uno de los mecanismos de tolerancia a infecciones con patógenos del tipo biotrófico. Esto se debe a que uno de sus productos de reacción es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual participa en la activación de la respuesta hipersensible [261].

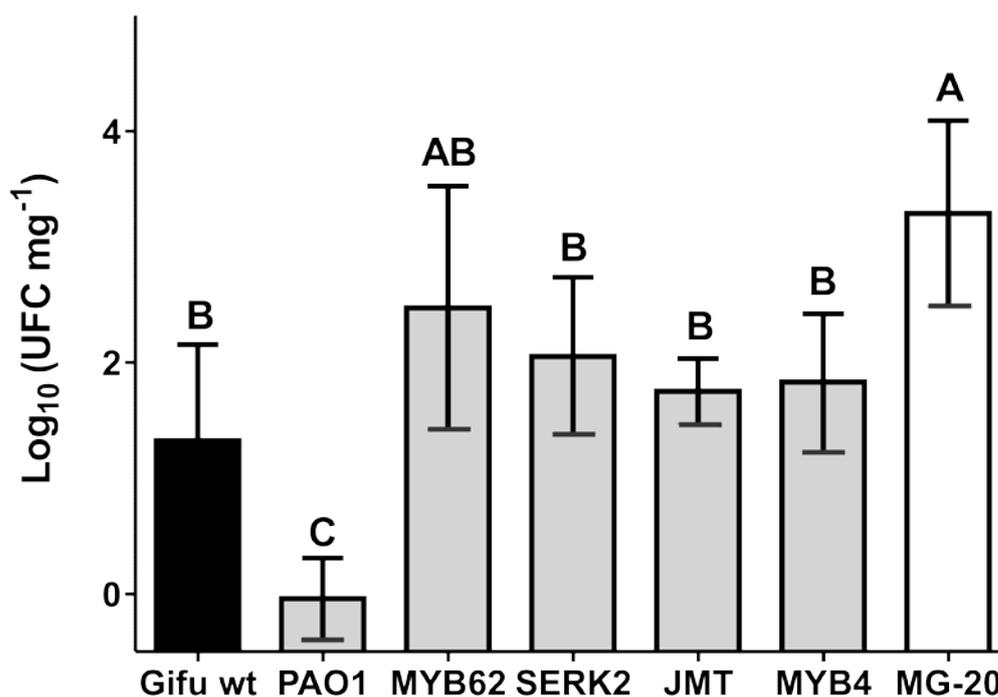


Figura 26: recuentos de unidades formadoras de colonias para las líneas Gifu mutantes insercionales infectadas con *Pto*. MG-20 y Gifu wt se presentan como controles. Se grafican las medias del Log₁₀ UFC mg⁻¹. Las barras corresponden al desvío estándar, diferentes letras corresponden a diferencias significativas según el *test* de Tukey ($p \leq 0,05$).

9.3.3.1 Análisis bioinformático del gen chr3.CM0451.450.r2 de *L. japonicus*

La mutante insercional *pao1* posee una sola inserción en el cromosoma 3, posición 10387079. Esta inserción interrumpe la secuencia del gen chr3.CM0451.450.r2.m., el cual en los datos del análisis transcriptómico presentados en el Capítulo 2 mostró una inducción significativa frente a la bacteria en los dos ecotipos de *L. japonicus* evaluados. Este gen es caracterizado en la base de datos del *Kazusa DNA Research Institute* como una poliamino oxidasa, similar a *AtPAO1* de *A. thaliana*.

Para confirmar la función de este transcripto, se analizó la secuencia proteica del gen chr3.CM0451.450.r2.m con el *software* PFAM [254]. Este programa usa modelos ocultos de Markov para asignar la secuencia buscada a alguna de

aminopropil)-4-aminobutanal dependiendo en si SPD o SPM fueron usados como sustratos, respectivamente.

Existen numerosos trabajos en los que esta familia de genes fue caracterizada en la planta modelo *A. thaliana*, incluyendo estudios donde se describe su ubicación subcelular [266 - 270]. Las enzimas AtPAO2– AtPAO4 fueron descritas como peroxisomales [266, 267] y AtPAO1 y AtPAO5 fueron reportadas como enzimas citosólicas [268, 269]. Además, Fincato y colaboradores han descrito el perfil de expresión órgano y tejido específico de los genes correspondientes a la familia de las PAO con una técnica de gen reportero bajo la regulación del promotor de cada uno de estos genes [269]. Por otro lado, las enzimas que oxidan diaminas (AtDAOs o AtCuAOs) fueron caracterizadas por Planas y colaboradores, quienes observaron que la AtCuAO1 de *A. thaliana* se encuentra ubicada en apoplasto [270].

Para obtener más información sobre esta amino oxidasa de *L. japonicus* se estudió su grado de identidad con respecto a las amino oxidasas de la familia de las PAOs y de las CuAOs en *A. thaliana*. Para esto, se realizó un alineamiento múltiple (figura 24) utilizando el programa Clustal Omega [255], a partir de las las secuencias proteicas de las poliamina oxidasas *ATPAO1* (AT5G13700), *ATPAO2* (AT2G43020), *ATPAO3* (AT3G59050), *ATPAO4* (AT1G65840) y *ATPAO5* (AT4G29720), las diamina oxidasas *CuAO1* (AT1G62810), *CuAO2* (AT1G31710) y *CuAO3* (AT2G42490), y del gen chr3.CM0451.450.r2 de *L. japonicus*. Del resultado del alineamiento múltiple se confeccionó un árbol del tipo Neighbour-joining utilizando el *software* Clustal omega [255], en el cual se observa que efectivamente chr3.CM0451.450.r2.m y la *AtPAO1* poseen una elevada identidad (figuras 24 y 28).

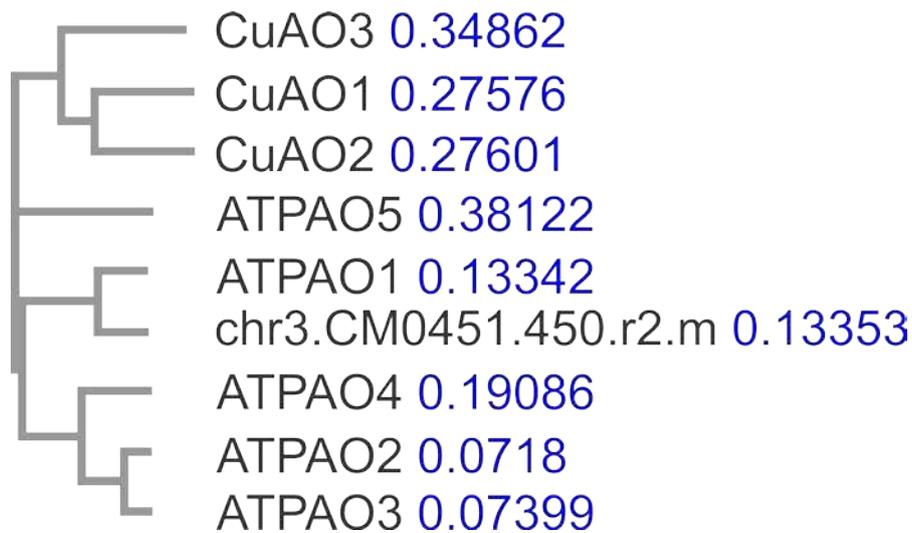


Figura 28: Árbol del tipo *Neighbour-joining* construido a partir de la alineación múltiple de las secuencias aminoacídicas de las AtPAO1-5 y CuAO1-3 de *A. thaliana*, y chr3.CM0451.450.r2.m de *L. japonicus* utilizando el software Clustal Omega [255]. Las secuencias utilizadas y las alineaciones obtenidas se encuentran en los materiales y métodos de este anexo del Capítulo 2. Los números al lado de los nombres de las secuencias corresponden a las distancias.

En la parte aérea de *A. thaliana*, *AtPAO1* se expresa en estípulas, meristema apical e hidátodos [269] y se la ha considerado como una proteína citosólica por estudios bioinformáticos y por el análisis de expresión heteróloga en *Escherichia coli* [268].

En esta tesis, se realizó un estudio bioinformático en busca de señales de localización en la secuencia peptídica de la PAO1 de *L. japonicus* y en las secuencias de las AtPAO1-5 y CuAO1-3 de *A. thaliana*, utilizando el software TargetP [256]. Este estudio arrojó como resultado que *AtPAO1* posee una señal de secreción, con un alto grado de confianza (RC=2, tabla 26). Si bien es posible que la PAO1 de *L. japonicus* también posea un destino extracelular, dado la similitud de secuencia y la cercanía filogenética con *AtPAO1*, el hecho de que el puntaje obtenido para esta proteína correspondiente la señal de secreción sea igual al de localización en otros sitios y que el grado de confianza sea el más bajo otorgado por este programa (RC=5), torna dudosa la predicción de la localización de esta proteína (tabla 26). Estudios más profundos en este aspecto deberán ser realizados para dilucidar la ubicación subcelular de esta enzima.

ID de la secuencia	Largo	cTP	mTP	SP	Otro	Loc	RC
ATPAO1	472	0.081	0.028	0.902	0.278	S	2
ATPAO2	490	0.249	0.438	0.011	0.439	_	5
ATPAO3	488	0.098	0.26	0.03	0.859	_	3
ATPAO4	497	0.302	0.056	0.032	0.889	_	3
ATPAO5	533	0.174	0.14	0.499	0.057	S	4
CUAO1	712	0.005	0.021	0.976	0.017	S	1
CUAO2	681	0.225	0.006	0.908	0.022	S	2
CUAO3	776	0.636	0.111	0.037	0.255	C	4
chr3.CM0451.450.r2.m	518	0.024	0.145	0.449	0.449	_	5

Tabla 26: Predicción de la localización subcelular de los productos de los genes chr3.CM0451.450.r2.m de *L. japonicus*, AtPAO1-5 y CuAO1-3 de *A. thaliana*. Se utilizó el *software* TargetP [256]. La columna Largo corresponde al largo de las secuencias analizadas, las columnas cTP, mTP, SP y otros muestran el puntaje para la predicción de sitios N-terminales de localización en cloroplastos, mitocondrias, secreción u otras señales de localización respectivamente. La columna Loc muestra con un código de letras la localización predicha, C corresponde a cloroplastos, M a mitocondrias, S a secreción y "-" a otras ubicaciones (por lo general correspondiente a citosol). La columna RC corresponde al grado de confianza en un rango del 1-5, donde 1 corresponde al máximo grado de confianza y 5 al mínimo.

9.3.3.2 Producción de especies reactivas del oxígeno en plantas del ecotipo Gifu mutantes para el gen PAO1 durante la interacción con *Pto*.

Las reacciones catalizadas tanto por las enzimas PAOs como DAOs, tienen como uno de sus productos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [21].

Como se explica en la introducción del Capítulo 1, las EROs pueden ser detectadas por medio del uso de la sonda fluorescente DCFH. Al medir esta fluorescencia a las 6 hs posteriores al tratamiento con la bacteria *Pto*, se observó un descenso de la señal en folíolos de la línea PAO1 en comparación con folíolos de la línea salvaje Gifu sometidas al mismo tratamiento (figura 30). En los folíolos infiltrados con la solución de $MgCl_2$ o en los folíolos adyacentes a los infiltrados con la suspensión de bacterias no se observó señal

fluorescente (figura 29).

Estos resultados indican que el producto del gen *PAO1* de *L. japonicus*, estaría directamente involucrado en el *burst* oxidativo observado en el ecotipo Gifu.

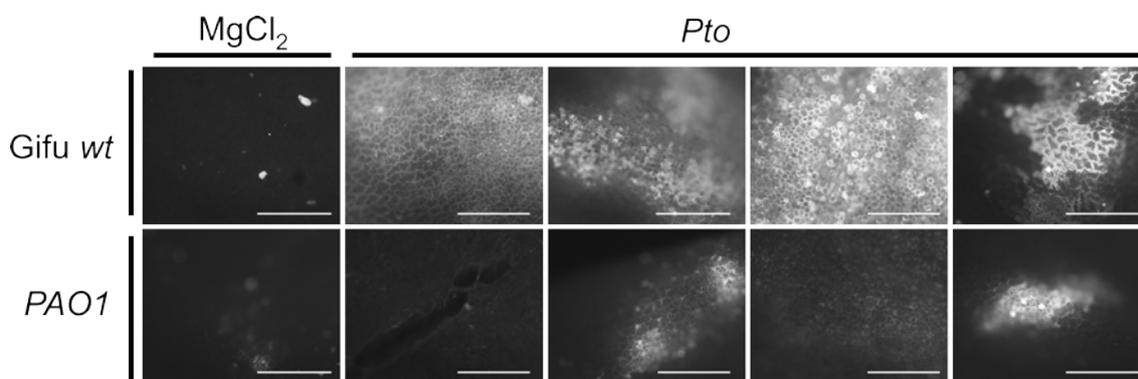


Figura 39: Fluorescencia producto de la oxidación de la DCFH a 6 hs posteriores al tratamiento. Los folíolos de la línea salvaje del ecotipo Gifu (*Gifu wt*) o los de la línea mutante *pao1* fueron infiltrados con una solución de $MgCl_2$ o con una suspensión de *Pto*. La fluorescencia fue observada con un microscopio de epifluorescencia (filtro de excitación, 460 nm; filtro de emisión, >515 nm). La barra horizontal en cada imagen corresponde a 500 μm .

9.3.3.3 Fluorescencia directa de la clorofila

Se realizó un estudio de la fluorescencia directa de la clorofila en la línea mutante para el gen *PAO1* del ecotipo Gifu, de forma de poder observar el efecto de la interacción con *Pto* en el aparato fotosintético de estas plantas. A partir de los datos de la fluorescencia directa se calculó el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y el índice de desempeño (PI_{abs}) a las 24 hs del tratamiento (figura 30). Estos parámetros no mostraron diferencias significativas entre la línea Gifu salvaje y la línea mutante para el gen *PAO1*, aunque se observó una tendencia, no significativa, a aumentar el rendimiento cuántico máximo de la mutante en comparación a *Gifu wt* (figura 30A).

9.3.3.4 Determinación de los niveles de poliaminas en *L. japonicus* durante la interacción con la bacteria fitopatógena *Pto*

En el presente trabajo se realizaron mediciones de los niveles de poliaminas en extractos de folíolos de plantas de *L. japonicus* ecotipos MG-20 y Gifu infectados con la bacteria fitopatógena *Pto* a las 24 hs después del tratamiento, utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Mediante esta técnica fue posible medir los niveles de las diaminas putrescina (PUT) y 1,3-diaminopropano (DAP), la triamina espermidina (SPD) y la tetraamina espermina (SPM). Estos resultados muestran que ambos ecotipos responden al ataque de la bacteria aumentando los niveles de PUT y SPD (figura 31B y C). El ecotipo MG-20 además responde aumentando los niveles de SPM (figura 31D). Este aumento en general de las PAs es una respuesta bien conocida en plantas ante el ataque por un patógeno [271-273]. Además, los resultados del análisis a nivel transcripcional presentados en el Capítulo 2 muestran una regulación positiva en ambos ecotipos de genes involucrados en la biosíntesis de PAs, particularmente de la arginina descarboxilasa (ADC), enzima que cataliza un paso limitante en este camino metabólico.

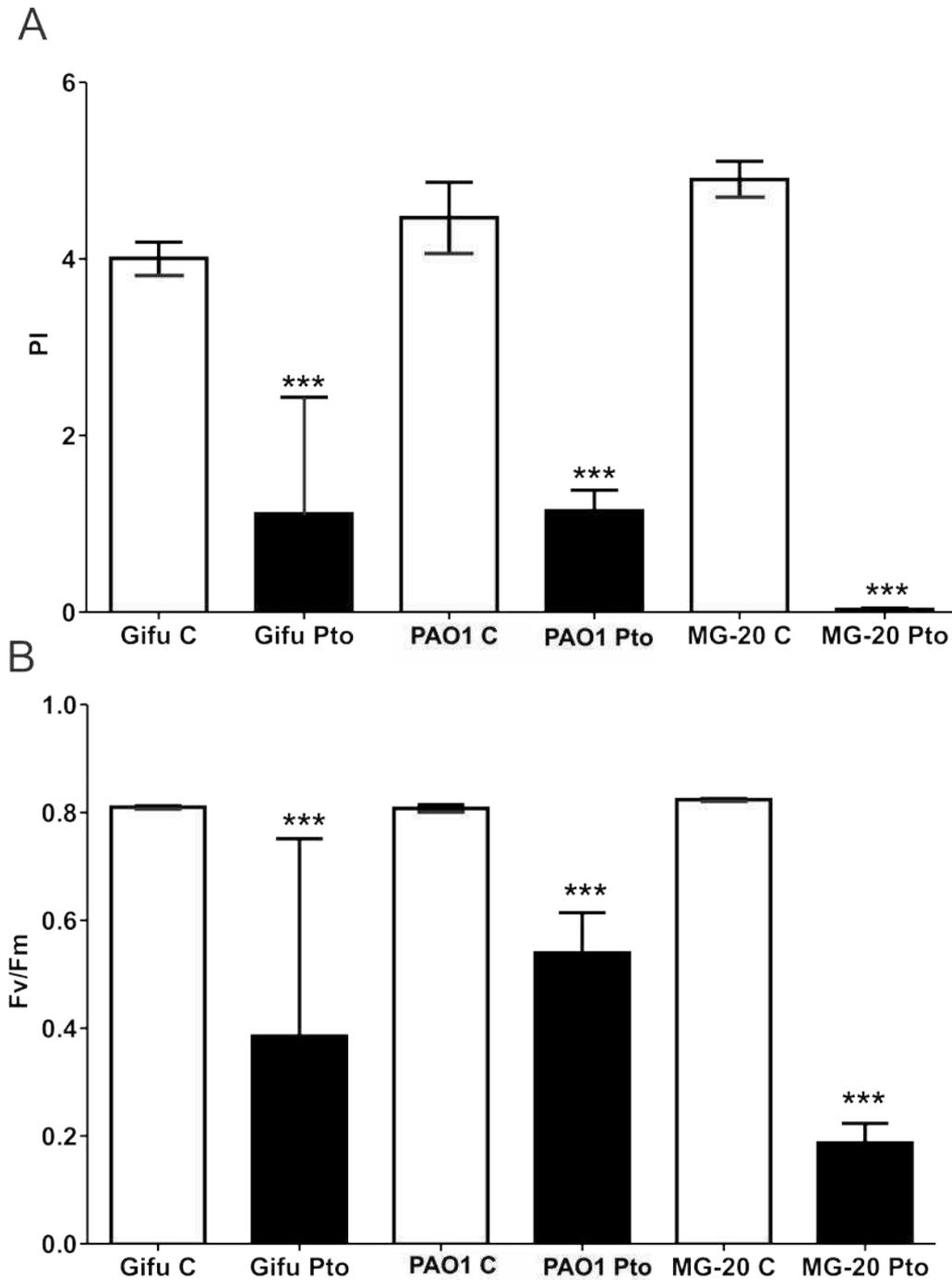


Figura 30: Análisis de la fluorescencia directa de la clorofila. A: rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm). B: índice de desempeño (PI). Gifu *wt* C, MG-20 C y PAO1 C corresponden a los ecotipos Gifu y MG-20, y a la línea mutante *pao1*, en condición control, respectivamente. Gifu *wt* I, MG-20 *wt* I y PAO1 I corresponden a los ecotipos Gifu y MG-20, y a la línea mutante *pao1*, respectivamente, bajo tratamiento con *Pto*. Las barras corresponden al desvío estándar, los asteriscos corresponde a diferencias significativas entre plantas infectadas con su control, según el *test* de Student (***) $p \leq 0.0005$).

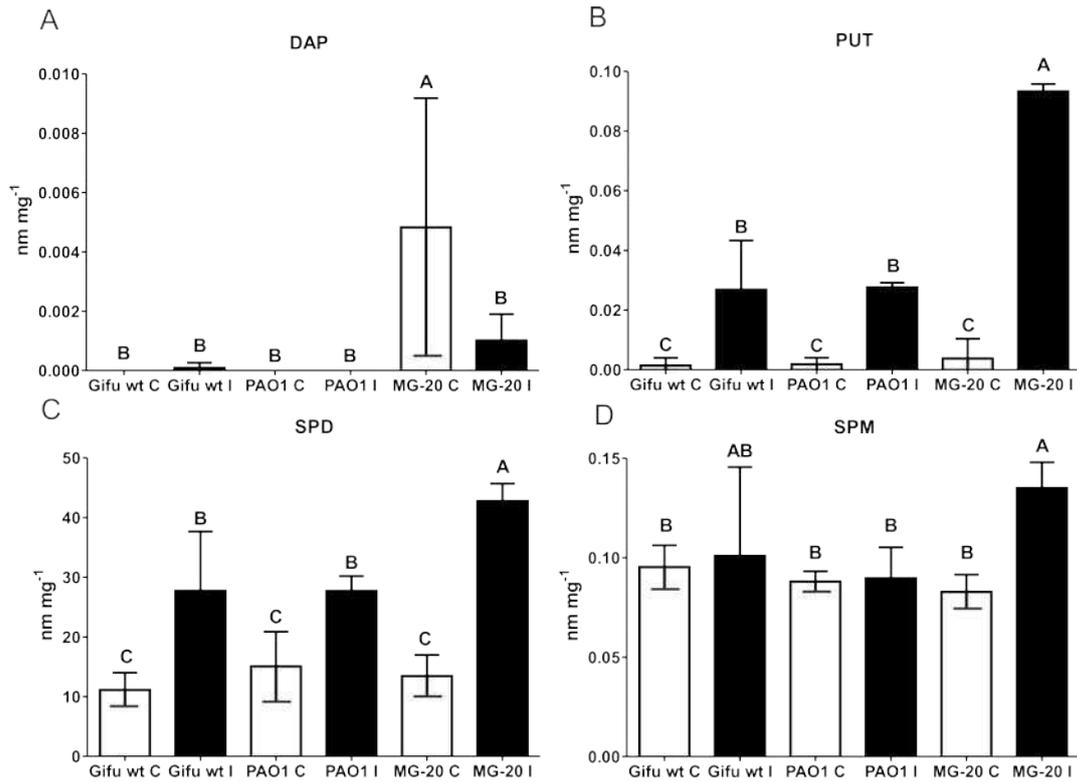


Figura 31: Niveles de las PAs 1,3-diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en folíolos de *L. japonicus* inoculados con *Pto.* Barras blancas corresponden a las mediciones realizadas en folíolos infiltrados con la solución de MgCl₂, barras negras corresponden a las mediciones realizadas en folíolos infiltrados con la suspensión de bacterias. Se informa la media en nanomoles relativos al peso fresco de la muestra en miligramos y el desvío estándar (barras de error) de las mediciones realizadas utilizando un equipo de HPLC después de derivatizar las muestras con cloruro de dansilo. Letras diferentes indican diferencias significativas según el *test* de Duncan ($p \leq 0.05$). Gifu wt C y Gifu wt I corresponden al tratamiento control e inoculado con la bacteria, respectivamente, en plantas del ecotipo Gifu salvajes. PAO1 C y PAO1 I corresponden al tratamiento control e inoculado con la bacteria, respectivamente, en plantas de la línea *pao1* del ecotipo Gifu. MG-20 C y MG-20 I corresponden al tratamiento control e inoculado con la bacteria, respectivamente, en plantas del ecotipo MG-20.

No obstante, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de PAs al comparar la línea $\Delta PAO1$ y la línea *salvaje* (tabla 27).

Poliamina	Grupo 1	Grupo 2	Media(1)	Media(2)	p
DAP	PAO1 C	Gifu wt C	0,0000	0,0000	-
PUT	PAO1 C	Gifu wt C	0,0019	0,0015	0,8349
SPD	PAO1 C	Gifu wt C	15,0894	11,1655	0,3519
SPM	PAO1 C	Gifu wt C	0,0880	0,0953	0,3536
DAP	PAO1 I	Gifu wt I	0,0000	0,0001	0,4226
PUT	PAO1 I	Gifu wt I	0,0276	0,0269	0,946
SPD	PAO1 I	Gifu wt I	27,7101	27,7364	0,9967
SPM	PAO1 I	Gifu wt I	0,0897	0,1009	0,7005

Tabla 27: Comparación de los niveles de las PAs detectadas en muestras de la línea *salvaje* del ecotipo Gifu con los niveles de las PAs detectadas en la línea PAO1. 1,3-diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM) fueron detectadas en folíolos de *L. japonicus* inoculados con *Pto* o en condiciones control. Se informa la media en nanomoles relativos al peso fresco de la muestra en miligramos de las mediciones realizadas utilizando un equipo de HPLC después de derivatizar las muestras con cloruro de dansilo. En la columna 6 se informa el p de la prueba de el *test* de Student. Gifu wt C y Gifu wt I corresponden al tratamiento control e inoculado con la bacteria, respectivamente, en plantas del ecotipo Gifu salvajes. PAO1 C y PAO1 I corresponden al tratamiento control e inoculado con la bacteria, respectivamente, en plantas de la línea PAO1 del ecotipo Gifu.

En este capítulo hemos caracterizado una mutante del ecotipo Gifu de *L. japonicus* para un gen poliamina oxidasa. Este trabajo conforma el primer reporte de resultados obtenidos utilizando líneas provenientes de la colección de mutantes insercionales LORE1 del *Centre for Carbohydrate Recognition and Signalling* de la *Aarhus University*, fuera del grupo que desarrolló esta herramienta.

A partir de estos resultados pudo relacionarse este gen con los niveles de EROs durante la interacción con *Pto*, observándose un menor nivel de estos compuestos en respuesta a la inoculación con la bacteria fitopatógena en comparación con la línea salvaje (figura 29). Sin embargo, los niveles de EROs observados en esta línea mutante siguen siendo altos en comparación con el tratamiento control y aún en comparación con los niveles presentados por el ecotipo MG-20 frente a *Pto*. Esto puede deberse a la acción simultánea de distintos mecanismos de producción de EROs como DAOs, NADPH oxidasas e inclusive otras PAOs, o bien a una regulación mediada por los sistemas antioxidantes.

Además, pudieron caracterizarse los niveles de poliaminas en ambos ecotipos frente a la inoculación con *Pto*. En este caso, la concentración de estos compuestos en general se vió aumentada frente al ataque bacteriano (figura 31). Este comportamiento ha sido reportado en trabajos con otros patosistemas, pero este es el primer reporte de regulación de los niveles de PAs en *L. japonicus* frente a un patógeno.

El comportamiento observado en relación a las EROs en la línea *pao1* estuvo acompañado de un nivel menor de síntomas macroscópicos, que se tradujo en un menor porcentaje de área foliar afectada (figura 25), un descenso en la multiplicación de las células bacterianas en los tejidos vegetales (figura 26) y un mejor desempeño del PSII frente a la bacteria (figura 31). En la discusión del Capítulo 1, se contempla como una posibilidad que las EROs estén ejerciendo un efecto tóxico sobre las bacterias, contribuyendo de esta manera las defensas de Gifu. Sin embargo, los resultados reportados en este capítulo muestran una mayor tolerancia en la línea mutante *pao1*, aun cuando presenta un menor nivel de EROs. Esto sugiere que la actividad de la enzima PAO1 en el ecotipo Gifu, y la consiguiente producción de peróxido de hidrógeno, favorecerían el desarrollo del patógeno.

El otro producto del catabolismo de PAs en común a las reacciones mediadas por DAOs y PAOs es el 4-aminobutanal. Este compuesto es convertido espontáneamente en Δ 1-pirrolina, el cual posteriormente puede ser metabolizado a ácido γ -aminobutírico (GABA). Como se comenta en el capítulo 2, el GABA es un metabolito de importancia para la respuesta a estrés biótico [274] y es especialmente importante para el ciclo de vida de *Pto*, ya que es capaz de utilizar GABA como única fuente de carbono y de nitrógeno [221] y este metabolito puede acumularse naturalmente en el espacio apoplástico de los tejidos foliares [115]. Por otro lado, un aumento excesivo de este metabolito en este espacio intercelular puede inhibir la expresión de genes necesarios para la patogenia de esta bacteria, *hrpL* y *avrPTo*, produciendo un aumento de la tolerancia a la infección en plantas de *A. thaliana* [221]. Los resultados transcripcionales y metabolómicos obtenidos en esta tesis revelaron que en el ecotipo MG-20, la vía de síntesis de GABA a partir de ácido glutámico se encuentra favorecida (figura 20B y tabla 18) y que este aminoácido se acumula

frente a la inoculación con la bacteria (tabla 17). En Gifu no se observa inducción de los genes de la biosíntesis de GABA (figura 20A y tabla 18) ni acumulación del mismo (tabla 17), sin embargo, en ambos ecotipos se induce la expresión de la PAO1 frente a *Pto* (tabla 4). Así, la mutación del gen de la *PAO1* en Gifu podría estar privando a la bacteria de una fuente de nutrientes, sea por una disminución de los productos de degradación celular causados por un descenso en los niveles de EROs, que conllevaría un menor daño a las células vegetales, o por una menor producción de GABA como producto del catabolismo de poliaminas. Estudios adicionales de los niveles de GABA en esta mutante, así como también de los niveles de la actividad PAO, serán necesarios para terminar de dilucidar la relación entre la expresión del gen de la *PAO1* y la resistencia a la infección mostrada por este ecotipo.

10 Conclusiones y consideraciones finales

Este trabajo de tesis describe por primera vez la interacción entre la leguminosa modelo *L. japonicus* y un microorganismo fitopatógeno a nivel fisiológico, transcripómico y metabólico. Parte de estos resultados han sido publicados en el manuscrito titulado "Defense responses in two ecotypes of *Lotus japonicus* against non-pathogenic *Pseudomonas syringae*" [275] y presentados en disertaciones y congresos [276-279].

La hipótesis "los ecotipos de *Lotus japonicus* Gifu B-129 y Miyakojima MG-20 divergen en su respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. tomato" fue puesta a prueba realizando mediciones de diversos parámetros fisiológicos, analizando el transcriptoma de la planta mediante hibridación con microarreglos de ADN y estudiando los perfiles metabólicos a partir de una estrategia de CG-MS. Se obtuvieron resultados contrastantes entre ambos ecotipos de manera consistente a lo largo de todas las determinaciones lo cual corrobora la validez de nuestra hipótesis. A su vez se ha podido concluir que la interacción entre el ecotipo Gifu y la bacteria fitopatógena *Pto* es incompatible, mientras que la interacción entre esta bacteria y MG-20 es compatible.

En el Capítulo 1 se caracterizó a nivel fisiológico la interacción entre *L. japonicus* y *Pto*. MG-20 presentó desecación en una extensa área foliar y una defoliación de casi la totalidad de los folíolos inoculados con la bacteria hacia las 72 hs posteriores al tratamiento (figura 2). Esto estuvo acompañado de un moderado, pero sostenido incremento de los niveles de EROs (figura 5), una caída en la eficiencia de los procesos fotosintéticos (figuras 7 y 8) y una explosiva multiplicación de la bacteria en los tejidos de la planta (figura 4). El ecotipo Gifu rara vez presentó clorosis, desecación o defoliación de los folíolos inoculados con *Pto* (figura 2) y la bacteria fue incapaz de multiplicarse en estos tejidos (figura 4). Además se detectó un temprano *burst* oxidativo en este ecotipo (figura 5), seguido de un moderado efecto negativo en los parámetros fotosintéticos evaluados (figuras 7 y 8).

En la primera parte del Capítulo 2 se analizó la interacción entre los ecotipos Gifu y MG-20 de *L. japonicus*, y *P. syringae* a nivel transcripómico. Los ecotipos evaluados presentaron un solapamiento en los genes regulados frente al tratamiento (figura 9), pero mostraron diferencias en los niveles de expresión

de estos genes (figura 10). Pudo describirse la regulación transcripcional de genes relacionados con la percepción del patógeno (tabla 2), el señalamiento (tabla 2), la regulación de la expresión génica (tabla 6), el estado redox (figura 14 y tablas 4 y 5), la respuesta hormonal (tablas 8-11) y la fotosíntesis (figura 15 y tablas 12-14).

Del análisis de la expresión de los genes relacionados al metabolismo del AJ y respuesta a esta hormona (tabla 9), se concluyó que la vía de señalización mediada por la forma Me-JA de esta hormona estaría favorecida sobre la AJ-Ile en la respuesta de *L. japonicus* frente a *Pto*, y que esta respuesta sería más importante en MG-20 que en Gifu. Como es sabido, *P. syringae* utiliza su SSTIII para “inyectar” una batería de moléculas en las células blanco con el fin de vulnerar las defensas de la planta y modificar el comportamiento de estas células para lograr una infección exitosa [114]. Entre las moléculas “inyectadas” por *Pto* se encuentra la fitotoxina coronatina, una molécula compleja conformada por ácido coronafácico y ácido coronámico [280]. La coronatina actúa como un análogo estructural y funcional del AJ, AJ-Ile y MeJA [281-284], por lo que la inducción de esta vía de señalamiento hormonal podría estar relacionada a la presencia de esta toxina u otro efector bacteriano. Existen líneas mutantes de *Pto* incapaces de sintetizar coronatina, las cuales pueden ser utilizadas para probar si esta bacteria es capaz de modular la respuesta hormonal en plantas de *L. japonicus* de una forma dependiente de la coronatina.

Además de observar una caída en la eficiencia de los procesos fotosintéticos por medio del análisis de la fluorescencia directa de la clorofila (figuras 7 y 8), se detectó la represión transcripcional de una gran cantidad de genes involucrados en los complejos antena, en distintos componentes de los fotosistemas, en la cadena de transporte de electrones, y en el ciclo de Calvin-Benson en el ecotipo MG-20, en respuesta a la inoculación con la bacteria (figura 15 y tablas 12 y 13). A su vez, en este ecotipo se observó la represión del sistema regulador COP1, el cual está involucrado en la respuesta a los niveles y calidad de la luz, regulando la fotomorfogénesis y la síntesis de clorofila (tabla 12) [209, 210]. Consistentemente con esto, y con la clorosis observada en MG-20, se detectó la represión de genes involucrados con la

síntesis de clorofila (tabla 14). Relacionado con esto, también se pudo identificar un gen, cuya expresión disminuye con el tratamiento, que participa del catabolismo de los productos de degradación de la clorofila, y cuya represión está relacionada con la aparición de síntomas en *Arabidopsis* frente a *Pto* [211, 212]. El sistema COP1 también regula la apertura y cierre de estomas [209], el cual es un proceso clave en la respuesta a esta bacteria [114]. Los estomas, junto con heridas presentadas sobre la superficie de los tejidos foliares, son la principal puerta de entrada de *Pto* a los tejidos de la planta [285]. Así, esta bacteria posee efectores cuya función es provocar la apertura estomática, de forma de aumentar la susceptibilidad de la planta a la reinfección [114]. Esto es vital para este patógeno ya que una de sus características es que no coloniza tejidos de hojas no infectadas a partir de hojas infectadas [114], un fenómeno que también fue observado en nuestros resultados ya que no detectamos la presencia de la bacteria ni observamos la aparición de síntomas en folíolos que no fueron inoculados. Además, una regulación del comportamiento de los estomas favoreciendo la apertura de los mismos, puede generar una pérdida de agua por evaporación que como consecuencia generaría los síntomas de desecación observados. Nuestro grupo de trabajo ha puesto a punto para *L. japonicus* protocolos para detectar la conductancia estomática (y los niveles de evaporación y de intercambio de gases) por medio de un analizador de gases infrarrojo (IRGA) [83]. Estudios de estos parámetros serán realizados en el futuro para dilucidar si la (des)regulación de este mecanismo está involucrado en el desarrollo de síntomas en MG-20 frente a la infección con esta bacteria.

Al comparar los transcriptomas basales (o sea, bajo la condición control) de Gifu y MG-20 se observó que un 40% de los genes, cuya expresión difiere significativamente entre estos ecotipos, estaban relacionados con la respuesta a estrés biótico. De éstos, un 70% se encontraron más expresados en Gifu que en MG-20, lo que nos permite contemplar la posibilidad de que la resistencia a la infección observada en Gifu esté mediada por mecanismos y barreras inducidos previamente al encuentro con el patógeno. A partir de esta comparación también se pudieron identificar transcritos cuya expresión basal es significativamente diferente entre los ecotipos evaluados que codificarían

para receptores de membrana asociados al reconocimiento de patógenos (figura 16). También se detectaron transcritos inducidos significativamente en el ecotipo MG-20, homólogos a receptores de membrana de reconocimiento de patógenos, en respuesta a la inoculación con la bacteria (tabla 2). A su vez, en este ecotipo se observó una gran cantidad de genes inducidos asociados a la movilización del Ca^{++} y al sensado de sus niveles (tabla 2), proceso que está asociado a la respuesta a estrés biótico y la HR [168, 169].

En la segunda parte del Capítulo 2 se analizó la interacción entre los ecotipos Gifu y MG-20, y *P. syringae* a nivel metabolómico y se integraron los resultados con los obtenidos en la primer parte de este capítulo. Vimos que los resultados obtenidos del análisis del metaboloma acompañaban en gran medida a los obtenidos del análisis del transcriptoma. Entre los procesos observados de este análisis integrado del transcriptoma y metaboloma se destacó:

- la tendencia en MG-20 a acumular azúcares simples en detrimento de los niveles de polisacáridos (figura 21B y tablas 19 y 20)
- un contraste en el metabolismo de lípidos, observándose en Gifu una tendencia hacia la biosíntesis de lípidos complejos utilizando como precursor al ácido malónico (figura 23A y tabla 22), mientras en MG-20 esta biosíntesis pareció estar regulada negativamente (figura 23B y tabla 22).

De este análisis surge también que frente a la inoculación con la bacteria la biosíntesis de pectina se encuentra reprimida, mientras su degradación se encuentra inducida, de manera exclusiva en el ecotipo MG-20 (figura 22 y tabla 21). Esta observación es especialmente importante si se tiene en cuenta el alto porcentaje de defoliación mostrado en este ecotipo 24 hs después de realizadas estas mediciones. La pectina como uno de los principales componentes de la pared celular podría estar jugando un rol central en el proceso de defoliación exhibido por estas plantas, lo cual invita a estudiar más en profundidad los mecanismos y procesos involucrados en la defoliación en respuesta a *Pto* en *L. japonicus*.

El ácido γ -aminobutírico se acumuló en MG-20 en respuesta a la infección (tabla 17) y esa acumulación es acompañada por la inducción de varios genes que participan de su biosíntesis y de la regulación negativa de algunos de los

que participan de su catabolismo (figura 20 y tabla 18). Este metabolito puede ser utilizado por *Pto* como fuente de C y N [115, 221], y ha sido reportado como una molécula importante en la respuesta a patógenos [219, 220, 221, 224], por ejemplo modulando la expresión de genes de virulencia en la cepa bacteriana utilizada en esta tesis [221]. Además detectamos en este ecotipo frente a *Pto*, la acumulación de ácido succínico, principal producto del catabolismo de GABA, el cual permite a la célula utilizar a este aminoácido como fuente de C a través del TCA. En Gifu no se observó acumulación de ninguno de estos metabolitos (tabla 17). La reprogramación metabólica exhibida por MG-20 (pero no por Gifu) es otra prueba más de que en este ecotipo la interacción con *Pto* es compatible y que durante las primeras etapas de la infección la bacteria se comporta como biotrófica. Por otro lado, como fue descrito por Park y colaboradores [221], la acumulación de GABA (que fue observada a las 24hs posteriores al tratamiento, tiempo que coincide con la máxima población de la bacteria) puede reprimir la expresión de genes necesarios para que la bacteria mantenga su virulencia, permitiéndole a la planta desplegar en forma efectiva sus defensas, disparando una respuesta en los tejidos infectados [221]. A su vez, esta respuesta podría inducir a *Pto* a elicitar una respuesta en la planta que beneficie la siguiente etapa de la infección, en la cual se comportaría como necrotrófica. Estos resultados nos motivan a plantear la siguiente hipótesis: "*Pto* exhibe en MG-20 un comportamiento del tipo hemibiotrófico". Para probar esta hipótesis se propone estudiar la expresión de genes de virulencia en *Pto* durante las distintas etapas de la infección, analizando la dinámica de aparición de síntomas en MG-20 al ser inoculada con líneas de esta bacteria deficientes en dichos genes.

En el Capítulo 3 se seleccionaron distintas líneas mutantes insercionales del ecotipo Gifu B-129 para un conjunto de genes que podrían jugar un rol importante en la defensa vegetal (tabla 25), sobre la base del análisis realizado en el Capítulo 2. La mayoría de tales líneas demostró una tolerancia equivalente a la observada en la línea salvaje, sugiriendo que estos genes no son necesarios en la respuesta de defensiva en este ecotipo. Sin embargo, una línea incapaz de expresar el gen de la enzima *Polyamina oxidasa I* demostró una mayor tolerancia durante la patogénesis, lo que indicaría que la expresión

de tal gen estaría involucrada en el mecanismo de respuesta de la planta frente al ataque del patógeno (figuras 25, 26, 29 y 30). También se estudiaron los niveles de PAs durante la interacción *L. japonicus-P. syringae*, observándose una acumulación de PAs en respuesta a la infección en ambos ecotipos (figura 31).

Finalmente, los resultados presentados en esta tesis constituyen un aporte al conocimiento de las respuestas en leguminosas frente al ataque de microorganismos fitopatógenos y permiten proponer al patosistema *L. japonicus-P. syringae* pv. tomato DC3000 como un sistema experimental útil para el estudio de la interacción planta-patógeno en leguminosas.

11 Bibliografía

- [1] J. B. Harborne, "Biochemical Plant Pathology", *Phytochemistry*, vol. 23, no. 7, p. 1520, 1984.
- [2] H. J. Bohnert and E. Sheveleva, "Plant stress adaptations — making metabolism move", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 1, no. 3, pp. 267–274, Jun. 1998.
- [3] Z. Q. Fu y X. Dong, "Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 64, no. January, pp. 839–63, 2013.
- [4] G. N. Agrios, "Plant Pathology. 3rd Edition" *Academic Press*. San Diego. California, 1997.
- [5] W. D. Hamilton, R. Axelrod y R. Tanese, "Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review)", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 9, pp. 3566–3573, 1990.
- [6] K. S. Mysore y C. M. Ryu, "Nonhost resistance: How much do we know?", *Trends Plant Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 97–104, 2004.
- [7] J. D. G. Jones y J. L. Dangl, "The plant immune system", *Nature*, vol. 444, no. 7117, pp. 323–329, 2006.
- [8] T. Nuernberger y V. Lipka, "Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon", *Mol. Plant Pathol.*, vol. 6, pp. 335–345, 2005.
- [9] U. Lipka, R. Fuchs, C. Kuhns, E. Petutschnig y V. Lipka, "Live and let die - *Arabidopsis* nonhost resistance to powdery mildews", *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 89, no. 2–3, pp. 194–199, 2010.
- [10] S. Gimenez-Ibanez y J. P. Rathjen, "The case for the defense: plants versus *Pseudomonas syringae*", *Microbes Infect.*, vol. 12, no. 6, pp. 428–437, 2010.
- [11] T. Boller y G. Felix, "A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 60, pp. 379–406, 2009.
- [12] F. M. Ausubel, "Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?", *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 10, pp. 973–979, 2005.

- [13] V. Göhre, T. Spallek, H. Häweker, S. Mersmann, T. Mentzel, T. Boller, M. de Torres, J. W. Mansfield y S. Robatzek, "Plant pattern-recognition receptor *FLS2* is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase *AvrPtoB*", *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 23, pp. 1824–1832, 2008.
- [14] X. Li, H. Lin, W. Zhang, Y. Zou, J. Zhang, X. Tang y J.-M. Zhou, "Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 36, pp. 12990–12995, 2005.
- [15] N.-C. Lin y G. B. Martin, "An *avrPto/avrPtoB* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 does not elicit *Pto*-mediated resistance and is less virulent on tomato", *Mol. plant-microbe Interact.*, vol. 18, no. 1, pp. 43–51, 2005.
- [16] G. B. Martin, "Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 2, no. 4, pp. 273–279, 1999.
- [17] J. M. Salmeron, G. E. Oldroyd, C. M. Rommens, S. R. Scofield, H.-S. Kim, D. T. Lavelle, D. Dahlbeck y B. J. Staskawicz, "Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster", *Cell*, vol. 86, no. 1, pp. 123–133, 1996.
- [18] C. Lamb y R. a. Dixon, "The oxidative burst in plant disease resistance", *Annu. Mol.Biol.*, vol. 48, no. 1, pp. 251–275, 1997.
- [19] J. Caplan, M. Padmanabhan y S. P. Dinesh-Kumar, "Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming", *Cell Host Microbe*, vol. 3, no. 3, pp. 126–135, 2008.
- [20] K. Apel y H. Hirt, "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 55, pp. 373–399, 2004.
- [21] H. Yoda, Y. Hiroi y H. Sano, "Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells", *Plant Physiol.*, vol. 142, no. 1, pp. 193–206, 2006.
- [22] R. Mittler, S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V. B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev y F. Van Breusegem, "ROS signaling: The new wave?", *Trends Plant Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 300–309, 2011.
- [23] W. El-Gendy, M. D. Brownleader, H. Ismail, P. J. Clarke, J. Gilbert, F. El-Bordiny, M. Trevan, J. Hopkins, M. Naldrett y P. Jackson, "Rapid deposition of

wheat cell wall structural proteins in response to *Fusarium*-derived elicitors", *J. Exp. Bot.*, vol. 52, no. 354, pp. 85–90, 2001.

[24] R. Hüchelhoven, "Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility", *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 45, pp. 101–127, 2007.

[25] D. J. Bradley, P. Kjellbom y C. J. Lamb, "Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response", *Cell*, vol. 70, no. 1, pp. 21–30, Jul. 1992.

[26] R. Tenhaken, a Levine, L. F. Brisson, R. a Dixon y C. Lamb, "Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 10, pp. 4158–4163, 1995.

[27] M. F. Ouf, A. A. Gazar, Z. A. Shehata, Z. Király y B. Barna, "The effect of superoxide anion on germination and infectivity of wheat stem rust (*Puccinia graminis Pers. f. sp. tritici Eriks and Henn.*) uredospores", *Cereal Res. Commun.*, pp. 31–37, 1993.

[28] S. X. Chen y P. Schopfer, "Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase", *Eur. J. Biochem.*, vol. 260, no. 3, pp. 726–735, 1999.

[29] H. Vanacker, T. L. Carver y C. H. Foyer, "Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction", *Plant Physiol.*, vol. 123, no. 4, pp. 1289–1300, 2000.

[30] R. G. Alscher, J. L. Donahue y C. L. Cramer, "Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells", *Physiol. Plant.*, vol. 100, no. 2, pp. 224–233, 1997.

[31] M. R. Grant y J. D. G. Jones, "Hormone (dis) harmony moulds plant health and disease", *Science* , vol. 324, no. 2009, p. 750, 2009.

[32] W. Truman, M. H. Bennett, I. Kubigsteltig, C. Turnbull y M. Grant, "*Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 3, pp. 1075–1080, 2007.

[33] Z. Mou, W. Fan y X. Dong, "Inducers of plant systemic acquired resistance Regulate *NPR1* function through redox changes", *Cell*, vol. 113, no. 7, pp. 935–944, 2003.

- [34] A. Robert-Seilaniantz, M. Grant y J. D. G. Jones, "Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism", *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 49, pp. 317–343, 2011.
- [35] J. Sels, J. Mathys, B. M. a De Coninck, B. P. a Cammue y M. F. C. De Bolle, "Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides", *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 11, pp. 941–950, 2008.
- [36] X. Dong, "NPR1, all things considered", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 547–552, 2004.
- [37] Y. Tada, S. H. Spoel, K. Pajerowska-Mukhtar, Z. Mou, J. Song, C. Wang, J. Zuo y X. Dong, "Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins", *Science*, vol. 321, no. 5891, pp. 952–956, 2008.
- [38] U. Conrath, "Systemic acquired resistance", *Plant Signal. Behav.*, vol. 1, no. 4, pp. 179–184, 2006.
- [39] J. Kuc, "Translocated signals for plant immunization", *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 494, no. 1, pp. 221–223, 1987.
- [40] J. Glazebrook, "Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens", *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 43, pp. 205–227, 2005.
- [41] M. Melotto, W. Underwood y S. Y. He, "Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases", *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 46, pp. 101–122, 2008.
- [42] E. M. Govrin y A. Levine, "The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*", *Curr. Biol.*, vol. 10, no. 13, pp. 751–757, 2000.
- [43] S. E. Perfect y J. R. Green, "Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens", *Mol. Plant Pathol.*, vol. 2, no. 2, pp. 101–108, 2001.
- [44] R. P. Oliver y S. V. S. Ipcho, "*Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs vs biotrophs classification of fungal pathogens", *Mol. Plant Pathol.*, vol. 5, no. 4, pp. 347–352, 2004.
- [45] F. Rohwer, K. H. Fritzemeier, D. Scheel y K. Hahlbrock, "Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*", *Planta*, vol. 170, no. 4, pp. 556–561,

1987.

[46] A.J. Márquez, J. Stougaard, M. Udvardi, M. Parniske, H. Spaink, G. Saalbach, J. Webb, M. Chiurazzi, "*Lotus japonicus* Handbook", Springer, 2005.

[47] P. H. Graham y C. P. Vance, "Legumes: importance y constraints to greater use", *Plant Physiol.*, vol. 131, no. 3, pp. 872–877, 2003.

[48] R. M. Polhill, P. H. Raven y C. H. Stirton, "Evolution y systematics of the *Leguminosae*", *Adv. Legum. Syst. Part 1.*, vol. 1, p. 34, 1978.

[49] K. E. Gibson, H. Kobayashi y G. C. Walker, "Molecular determinants of a symbiotic chronic infection", *Annu. Rev. Genet.*, vol. 42, pp. 413–441, 2008.

[50] J. Pretty, "Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence", *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.*, vol. 363, no. 1491, pp. 447–465, 2008.

[51] H. Gamper, M. G. Van Der Heijden y G. Kowalchuk, "Molecular trait indicators: Moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology", *New Phytol.*, vol. 185, no. 1, pp. 67–82, 2010.

[52] G. E. D. Oldroyd y J. A. Downie, "Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 59, pp. 519–546, 2008.

[53] J. I. Sprent y E. K. James, "Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in?", *Plant Physiol.*, vol. 144, no. 2, pp. 575–581, 2007.

[54] A. Savouré, Z. Magyar, M. Pierre, S. Brown, M. Schultze, D. Dudits, a Kondorosi y E. Kondorosi, "Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions", *EMBO J.*, vol. 13, no. 5, pp. 1093–1102, 1994.

[55] D. a Samac y M. a Graham, "Recent advances in legume-microbe interactions: recognition, defense response and symbiosis from a genomic perspective", *Plant Physiol.*, vol. 144, no. 2, pp. 582–587, 2007.

[56] F. J. Escaray, A. B. Menendez, A. Gárriz, F. L. Pieckenstain, M. J. Estrella, L. N. Castagno, P. Carrasco, J. Sanjuán y O. A. Ruiz, "Ecological y agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils", *Plant Sci.*, vol. 182, no. 1, pp. 121–133, 2012.

- [57] A. Santos, "A global survey of genus *Lotus* (Loteae-Fabaceae)", *Lotus Newsl.*, vol. 37, no. 2, pp. 52 – 53, 2007.
- [58] A. M. Arambarri, "A cladistic analysis of the Old World species of *Lotus* (Fabaceae: Loteae)", *Can. J. Bot.*, vol. 78, no. 3, pp. 351–360, 2000.
- [59] G. V. Degtjareva, T. E. Kramina, D. D. Sokoloff, T. H. Samigullin, G. a. S yral y C. M. Valiejo-Roman, "New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae)", *Wulfenia*, vol. 15, pp. 35–49, 2008.
- [60] D. P. Belesky, "*Lotus* species used in reclamation, renovation and revegetation", *Trefoil Sci. Technol. Lotus*, no. 28, pp. 133–143, 1999.
- [61] P. Díaz, O. Borsani y J. Monza, "*Lotus*-related species and their agronomic importance", *Lotus japonicus Handbook*, Springer, 2005, pp. 25–37.
- [62] M. J. Blumenthal y R. L. McGraw, "*Lotus* adaptation, use and management", *Trefoil Sci. Technol. Lotus*, no. trefoiltheskien, pp. 97–119, 1999.
- [63] S. Sato y S. Tabata, "*Lotus japonicus* as a platform for legume research", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 128–132, 2006.
- [64] M. K. Udvardi, S. Tabata, M. Parniske y J. Stougaard, "*Lotus japonicus*: legume research in the fast lane", *Trends Plant Sci.*, vol. 10, no. 5, pp. 222–228, 2005.
- [65] T. Kato, S. Sato, Y. Nakamura, T. Kaneko, E. Asamizu y S. Tabata, "Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. Sequence Features and mapping of sixty-four TAC clones which cover the 6.4 Mb regions of the genome", *DNA Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 277–285, 2003.
- [66] M. Kawaguchi, T. Motomura, H. Imaizumi-Anraku, S. Akao y S. Kawasaki, "Providing the basis for genomics in *Lotus japonicus*: The accessions Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses", *Mol. Genet. Genomics*, vol. 266, no. 2, pp. 157–166, 2001.
- [67] F. J. Escaray, J. Pesqueira, F. L. Pieckenstain, P. Carrasco y O. A. Ruiz, "Taninos condensados y antocianinas en el género *Lotus*: su relación con el estrés salino en especies forrajeras para zonas marginales", *Innovación y Tecnol. Agroaliment.*, vol. 2, pp. 113–123, 2007.
- [68] M. Kawaguchi, A. Pedrosa-Har, K. Yano, M. Hayashi, Y. Murooka, K. Saito, T. Nagata, K. Namai, H. Nishida, D. Shibata, S. Sato, S. Tabata, M. Hayashi, K. Harada, N. S yral, J. Stougaard, A. Bachmair y W. F. Grant, "*Lotus burttii* takes a

position of the third corner in the *Lotus* molecular genetics triangle", *DNA Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 69–77, 2005.

[69] S. Sato, Y. Nakamura, T. Kaneko, E. Asamizu, T. Kato, M. Nakao, S. Sasamoto, A. Watanabe, A. Ono, K. Kawashima, T. Fujishiro, M. Katoh, M. Kohara, Y. Kishida, C. Minami, S. Nakayama, N. Nakazaki, Y. Shimizu, S. Shinpo, C. Takahashi, T. Wada, M. Yamada, N. Ohmido, M. Hayashi, K. Fukui, T. Baba, T. Nakamichi, H. Mori y S. Tabata, "Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*", *DNA Res.*, vol. 15, no. 4, pp. 227–239, 2008.

[70] L. Schausser, a Roussis, J. Stiller y J. Stougaard, "A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules", *Nature*, vol. 402, no. 6758, pp. 191–195, 1999.

[71] J. Harrison, M.-A. Pou de Crescenzo, O. Sené y B. Hirel, "Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus*?", *Plant Physiol.*, vol. 133, no. 1, pp. 253–262, 2003.

[72] H. Kumagai y H. Kouchi, "Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules", *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 16, no. 8, pp. 663–668, 2003.

[73] O. Schumpp, M. E. Ramel, P. Gugerli, W. J. Broughton y W. J. Deakin, "Identification of a *Lotus* viral pathogen", *J. Plant Res.*, vol. 120, no. 5, pp. 651–654, 2007.

[74] D. F. Urbański, A. Małolepszy, J. Stougaard y S. U. yersen, "Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*", *Plant J.*, vol. 69, no. 4, pp. 731–741, 2012.

[75] D. H. Sanchez, M. R. Siahpoosh, U. Roessner, M. Udvardi y J. Kopka, "Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity", *Physiol. Plant.*, vol. 132, no. 2, pp. 209–219, 2008.

[76] D. H. Sanchez, F. L. Pieckenstain, J. Szymanski, A. Erban, M. Bromke, M. a. Hannah, U. Kraemer, J. Kopka y M. K. Udvardi, "Comparative functional genomics of salt stress in related model y cultivated plants identifies and overcomes limitations to translational genomics", *PLoS One*, vol. 6, no. 2, pp. 14–19, 2011.

[77] M. F. Babuin, M. P. Campestre, R. Rocco, C. D. Bordenave, F. J. Escaray, C. Antonelli, P. Calzadilla, A. Gárriz, E. Serna, P. Carrasco, O. a. Ruiz y A. B.

Menendez, "Response to long-term NaHCO₃-derived alkalinity in model *Lotus japonicus* ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic profiling and physiological characterization", *PLoS One*, vol. 9, no. 5, 2014.

[78] M. Guether, R. Balestrini, M. Hannah, J. He, M. K. Udvardi y P. Bonfante, "Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*", *New Phytol.*, vol. 182, no. 1, pp. 200–212, 2009.

[79] N. Høglund, S. Radutoiu, L. Krusell, V. Voroshilova, M. a Hannah, N. Goffard, D. H. Sanchez, F. Lippold, T. Ott, S. Sato, S. Tabata, P. Liboriussen, G. V Lohmann, L. Schausser, G. F. Weiller, M. K. Udvardi y J. Stougaard, "Dissection of symbiosis and organ development by integrated transcriptome analysis of *Lotus japonicus* mutant y wild-type plants", *PLoS One*, vol. 4, no. 8, p. e6556 (1–14), 2009.

[80] J. Stougaard y P. R. Beuselinck, "Registration of GIFU B-129-S9 *Lotus japonicus* Germplasm", *Crop Sci.*, vol. 36, no. 2, p. 476, 1996.

[81] M. Kawaguchi, "*Lotus japonicus* 'Miyakojima' MG-20: An early-flowering accession suitable for indoor Handling", *J. Plant Res.*, vol. 113, no. 4, pp. 507–509, 2000.

[82] M. Hashiguchi, S. Tsuruta y R. Akashi, "Morphological traits of *Lotus japonicus* (regal) ecotypes collected in Japan", *Interdiscip. Bio Cent.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2011.

[83] P. I. Calzadilla, S. Maiale y O. a. Ruiz, "Comportamiento de dos ecotipos de *Lotus japonicus* frente al estrés por bajas temperaturas", *XV Congreso Latinoamericano XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*, 2014.

[84] G. Arimura, R. Ozawa, S. Kugimiya, J. Takabayashi y J. Bohlmann, "Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*", *Plant Physiol.*, vol. 135, no. 4, pp. 1976–1983, 2004.

[85] A. M. Alippi, "Bacterial diseases of *Lotus* spp", *Lotus Newsl.*, vol. 35, no. 1, pp. 17–18, 2005.

[86] N. a. Altier y J. Groth, "Characterization of aggressiveness and vegetative compatibility diversity of *Fusarium oxysporum* associated with crown and root

- rot of birdsfoot trefoil", *Louts Newsl.*, vol. 35, pp. 59–74, 2005.
- [87] O. Schumpp, M. E. Ramel, P. Gugerli, W. J. Broughton y W. J. Deakin, "Identification of a *Lotus* viral pathogen", *J. Plant Res.*, vol. 120, no. 5, pp. 651–654, 2007.
- [88] G. N. Agrios, "Plant Pathology, Fourth Edition", *Exp. Agric.*, vol. 34, no. 01, pp. 125–130, 1997.
- [89] B. Barna, J. Fodor, B. D. Harrach, M. Pogány y Z. Király, "The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens", *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 59, pp. 37–43, 2012.
- [90] G. M. Preston, "*Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time", *Mol. Plant Pathol.*, vol. 1, no. 5, pp. 263–275, 2000.
- [91] S. S. Hirano y C. D. Upper, "Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus y epiphyte", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 3, pp. 624–653, 2000.
- [92] B. Cunnac, M. Lindeberg y A. Collmer, "*Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions", *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 12, no. Table 1, pp. 53–60, 2009.
- [93] D. C. Gross, "Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*", *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 29, no. 1, pp. 247–278, 1991.
- [94] J. M. Lorang, H. Shen, D. Kobayashi, D. Cooksey y N. T. Keen, "*avrA* and *avrE* in *Pseudomonas syringae* pv. tomato PT23 play a role in virulence on tomato plants", *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 7, no. 4, pp. 508–515, 1994.
- [95] C. R. Buell, V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. Deboy, a S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M. J. Beanan, D. H. Haft, W. C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S. E. Van Aken, T. V Feldblyum, M. D'Ascenzo, W.-L. Deng, A. R. Ramos, J. R. Alfano, S. Cartinhour, A. K. Chatterjee, T. P. Delaney, S. G. Lazarowitz, G. B. Martin, D. J. Schneider, X. Tang, C. L. Bender, O. White, C. M. Fraser y A. Collmer, "The complete genome sequence of the *Arabidopsis* y

tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 18, pp. 10181–10186, 2003.

[96] F. Katagiri, R. Thilmony y S. Y. He, "The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction", *Arab. B.*, vol. 20, no. 1, p. 1, 2002.

[97] B. Program, "Deciphering host resistance y pathogen virulence: the *Arabidopsis* / *Pseudomonas* interaction as a model", *Mol. Plant Pathol.*, vol. 4, no. 6, pp. 517–530, 2003.

[98] M. Nagata, E. Murakami, Y. Shimoda, F. Shimoda-Sasakura, K. Kucho, A. Suzuki, M. Abe, S. Higashi y T. Uchiumi, "Expression of a class 1 hemoglobin gene y production of nitric oxide in response to symbiotic y pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*", *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 21, no. 9, pp. 1175–1183, 2008.

[99] M. A. Torres, "ROS in biotic interactions", *Physiol. Plant.*, vol. 138, no. 4, pp. 414–429, 2010.

[100] A. Gomes, E. Fernandes y J. L. F. C. Lima, "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species", *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 65, no. 2–3, pp. 45–80, 2005.

[101] A. S. Keston y R. Brandt, "The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide", *Anal. Biochem.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–5, 1965.

[102] H. Wang y J. A. Joseph, "Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader", *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 27, no. 5, pp. 612–616, 1999.

[103] M. M. Tarpey, D. A. Wink y M. B. Grisham, "Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations", *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 286, no. 3, pp. R431–R444, 2004.

[104] N. R. Baker, "Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 59, pp. 89–113, 2008.

[105] S. A. Rolfe y J. D. Scholes, "Chlorophyll fluorescence imaging of plant–pathogen interactions", *Protoplasma*, vol. 247, no. 3–4, pp. 163–175, 2010.

[106] J. Zou, S. Rodriguez-Zas, M. Aldea, M. Li, J. Zhu, D. O. Gonzalez, L. O. Vodkin, E. DeLucia y S. J. Clough, "Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis", *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol.

18, no. 11, pp. 1161–1174, 2005.

[107] K. B. Bonfig, U. Schreiber, A. Gabler, T. Roitsch y S. Berger, "Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves", *Planta*, vol. 225, no. 1, pp. 1–12, 2006.

[108] G. H. Krause y E. Weis, "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 42, no. 1, pp. 313–349, 1991.

[109] R. Strasser, a Srivastava y M. Tsimilli-Michael, "The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples", *Probing Photosynth. Mech. Regul. Adapt.*, pp. 445–483, 2000.

[110] H. Kautsky y A. Hirsch, "Neue versuche zur kohlenensäureassimilation", *Naturwissenschaften*, vol. 19, no. 48, p. 964, 1931.

[111] S. G. Moreno, H. P. Vela y M. O. S. Alvarez, "La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas", *Revista de Educación Bioquímica*, vol. 27, no. 4, pp. 119–129, 2008.

[112] D. R. Hoagland y D. I. Arnon, "The water-culture method for growing plants without soil", *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.*, vol. 347, no. 2nd edit, 1950.

[113] G. H. J. Krüger, M. Tsimilli-Michael y R. J. Strasser, "Light stress provokes plastic y elastic modifications in structure y function of photosystem II in camellia leaves", *Physiol. Plant.*, vol. 101, no. 2, pp. 265–277, 1997.

[114] X. F. Xin y S. Y. He, "*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants", *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 51, no. May, pp. 473–98, 2013.

[115] A. Rico y G. M. Preston, "*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast", *Mol. plant-microbe Interact.*, vol. 21, no. 2, pp. 269–282, 2008.

[116] P. Bednarek y A. Osbourn, "Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense", *Science*, vol. 324, no. 5928, pp. 746–748, 2009.

[117] M. Endo, H. Hakoziaki, T. Kokubun, H. Masuko, Y. Takahata, T. Tsuchiya, A. Higashitani, S. Tabata y M. Watanabe, "Generation of 919 expressed sequence tags from immature flower buds and gene expression analysis using expressed sequence tags in the model plant *Lotus japonicus*", *Genes Genet.*

- Syst.*, vol. 77, no. 4, pp. 277–282, 2002.
- [118] M. Endo, T. Kokubun, Y. Takahata, A. Higashitani, S. Tabata y M. Watanabe, "Analysis of expressed sequence tags of flower buds in *Lotus japonicus*", *DNA Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 213–216, 2000.
- [119] G. Colebatch, S. Kloska, B. Trevaskis, S. Freund, T. Altmann y M. K. Udvardi, "Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays", *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 15, no. 5, pp. 411–420, 2002.
- [120] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis y P. O. Brown, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray", *Science*, vol. 270, no. 5235, pp. 467–470, 1995.
- [121] J. Verdier y K. B. yopadhyay, "The *Lotus japonicus* Genome", pp. 183–199, 2014.
- [122] J. Verdier, I. Torres-Jerez, M. Wang, A. yriankaja, S. N. Allen, J. He, Y. Tang, J. D. Murray y M. K. Udvardi, "Establishment of the *Lotus japonicus* Gene Expression Atlas (LjGEA) and its use to explore legume seed maturation", *Plant J.*, vol. 74, no. 2, pp. 351–362, 2013.
- [123] D. H. Sanchez, F. Lippold, H. Redestig, M. a. Hannah, A. Erban, U. Krämer, J. Kopka y M. K. Udvardi, "Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*", *Plant J.*, vol. 53, no. 6, pp. 973–987, 2008.
- [124] P. Díaz, M. Betti, D. H. Sánchez, M. K. Udvardi, J. Monza y A. J. Márquez, "Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress", *New Phytol.*, vol. 188, no. 4, pp. 1001–1013, 2010.
- [125] M. Betti, C. Pérez-Delgado, M. García-Calderón, P. Díaz, J. Monza y A. J. Márquez, "Cellular stress following water deprivation in the model legume *Lotus japonicus*", *Cells*, vol. 1, no. 4, pp. 1089–1106, 2012.
- [126] C. M. Pérez-Delgado, M. García-Calderón, D. H. Sánchez, M. K. Udvardi, J. Kopka, A. J. Márquez y M. Betti, "Transcriptomic and metabolic changes associated with photorespiratory ammonium accumulation in the model legume *Lotus japonicus*", *Plant Physiol.*, vol. 162, no. 4, pp. 1834–1848, 2013.
- [127] D. Shelton, M. Stranne, L. Mikkelsen, N. Pakseresht, T. Welham, H.

- Hiraka, S. Tabata, S. Sato, S. Paquette y T. L. Wang, "Transcription factors of *Lotus*: regulation of isoflavonoid biosynthesis requires coordinated changes in transcription factor activity", *Plant Physiol.*, vol. 159, no. 2, pp. 531–547, 2012.
- [128] K. Takanashi, H. Takahashi, N. Sakurai, A. Sugiyama, H. Suzuki, D. Shibata, M. Nakazono y K. Yazaki, "Tissue-specific transcriptome analysis in nodules of *Lotus japonicus*", *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 25, no. 7, pp. 869–876, 2012.
- [129] G. Colebatch, G. Desbrosses, T. Ott, L. Krusell, O. Montanari, S. Kloska, J. Kopka y M. K. Udvardi, "Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*", *Plant J.*, vol. 39, no. 4, pp. 487–512, 2004.
- [130] H. Kouchi, K. Shimomura, S. Hata, A. Hirota, G. J. Wu, H. Kumagai, S. Tajima, N. Suganuma, A. Suzuki, T. Aoki, M. Hayashi, T. Yokoyama, T. Ohyama, E. Asamizu, C. Kuwata, D. Shibata y S. Tabata, "Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*", *DNA Res.*, vol. 11, no. 4, pp. 263–274, 2004.
- [131] W. Truman, M. T. Zabala y M. Grant, "Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance", *Plant J.*, vol. 46, no. 1, pp. 14–33, 2006.
- [132] C. Torregrosa, S. Cluzet, J. Fournier, T. Huguet, P. Gamas, J.-M. Prospéri, M.-T. Esquerré-Tugayé, B. Dumas y C. Jacquet, "Cytological, genetic and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* y *Colletotrichum trifolii*", *Mol. plant-microbe Interact.*, vol. 17, no. 8, pp. 909–920, 2004.
- [133] S. Cluzet, C. Torregrosa, C. Jacquet, C. Lafitte, J. Fournier, L. Mercier, S. Salamagne, X. Briand, M. Esquerré-Tugayé y B. Dumas, "Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp", *Plant. Cell Environ.*, vol. 27, no. 7, pp. 917–928, 2004.
- [134] O. Fiehn, "Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes", *Plant Mol. Biol.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 155–171, 2002.
- [135] R. J. Bino, R. D. Hall, O. Fiehn, J. Kopka, K. Saito, J. Draper, B. J.

Nikolau, P. Mendes, U. Roessner-Tunali y M. H. Beale, "Potential of metabolomics as a functional genomics tool", *Trends Plant Sci.*, vol. 9, no. 9, pp. 418–425, 2004.

[136] H. K. Kim, Y. H. Choi y R. Verpoorte, "NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?", *Trends Biotechnol.*, vol. 29, no. 6, pp. 267–275, 2011.

[137] J. Lisec, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer y A. R. Fernie, "Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants", *Nat. Protoc. Ed.*, vol. 1, no. 1, p. 387, 2006.

[138] O. Fiehn, O. Fiehn, J. Kopka, J. Kopka, P. Doermann y P. Doermann, "Metabolite profiling for plant functional genomics", *Nat Biotech*, vol. 18, pp. 1157–1161, 2000.

[139] U. Roessner, a Luedemann, D. Brust, O. Fiehn, T. Linke, L. Willmitzer y a Fernie, "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems", *Plant Cell*, vol. 13, no. 1, pp. 11–29, 2001.

[140] U. Roessner, L. Willmitzer y a R. Fernie, "High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies", *Plant Physiol.*, vol. 127, no. 3, pp. 749–764, 2001.

[141] A. R. Fernie, R. N. Trethewey, A. J. Krotzky y L. Willmitzer, "Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 9, pp. 763–769, 2004.

[142] J. M. Halket, D. Waterman, A. M. Przyborowska, R. K. P. Patel, P. D. Fraser y P. M. Bramley, "Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS", *J. Exp. Bot.*, vol. 56, no. 410, pp. 219–243, 2005.

[143] S. Kumari, D. Stevens, T. Kind, C. Denkert y O. Fiehn, "Applying in-silico retention index and mass spectra matching for identification of unknown metabolites in accurate mass GC-TOF mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 15, pp. 5895–5902, 2011.

[144] T. Kind, G. Wohlgemuth, D. Y. Lee, Y. Lu, M. Palazoglu, S. Shahbaz y O. Fiehn, "FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics

based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 24, pp. 10038–10048, 2009.

[145] J. Kopka, N. Schauer, S. Krueger, C. Birkemeyer, B. Usadel, E. Bergmüller, P. Dörmann, W. Weckwerth, Y. Gibon y M. Stitt, "GMD@ CSB. DB: the Golm metabolome database", *Bioinformatics*, vol. 21, no. 8, pp. 1635–1638, 2005.

[146] K. A. VandenBosch y G. Stacey, "Summaries of Legume Genomics Projects from around the Globe. Community Resources for Crops and Models", *Plant Physiol.*, vol. 131, no. 3, pp. 840–865, 2003.

[147] G. Desbrosses, J. Kopka y M. K. Udvardi, "*Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions", *Plant Physiol.*, vol. 137, no. April, pp. 1302–1318, 2005.

[148] C. D. Bordenave, R. A. Rocco, M. F. Babuin, M. P. Campestre, P. Carrasco, A. B. Menéndez y O. A. Ruiz, "Caracterización de la respuesta metabólica a largo plazo en ecotipos de *Lotus japonicus* Gifu B-129 y Miyakojima MG-20 bajo estrés alcalino", in *V Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*, 2014.

[149] K. Kráľová, J. Jampílek y I. Ostrovský, "Metabolomika - užitečné narzędzie do oceny wpływu czynników abiotycznych na rośliny", *Ecol. Chem. Eng. S*, vol. 19, no. 2, pp. 133–161, 2012.

[150] M. Lohse, A. Nunes-Nesi, P. Krueger, A. Nagel, J. Hannemann, M. Giorgi, L. Childs, S. Osorio, D. Walther, J. Selbig, N. Sreenivasulu, M. Stitt, A. R. Fernie y B. Usadel, "Robin: An intuitive wizard application for R-based expression microarray quality assessment and analysis", *Plant Physiology*, 153:642-51, 2010.

[151] O. Thimm, O. Bläsing, Y. Gibon, A. Nagel, S. Meyer, P. Krüger, J. Selbig, L. a. Müller, S. Y. Rhee y M. Stitt, "MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes", *Plant J.*, vol. 37, no. 6, pp. 914–939, 2004.

[152] Y. Moriya, M. Itoh, S. Okuda, A. C. Yoshizawa y M. Kanehisa, "KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server", *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. suppl 2, pp. W182–W185, 2007.

- [153] F. Paolocci, T. Bovone, N. Tosti, S. Arcioni y F. Damiani, "Light and an exogenous transcription factor qualitatively and quantitatively affect the biosynthetic pathway of condensed tannins in *Lotus corniculatus* leaves", *J. Exp. Bot.*, vol. 56, no. 414, pp. 1093–1103, 2005.
- [154] M. W. Pfaffl, G. W. Horgan y L. Dempfle, "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR", *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 9, pp. e36–e36, 2002.
- [155] A. Jacobs, C. Lunde, A. Bacic, M. Tester y U. Roessner, "The impact of constitutive heterologous expression of a moss Na⁺ transporter on the metabolomes of rice and barley", *Metabolomics*, vol. 3, no. 3, pp. 307–317, 2007.
- [156] Ø. Hammer, D. A. T. Harper y P. D. Ryan, "PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis", *Palaeontologia Electronica* 4, 2001.
- [157] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer y T. L. Madden, "BLAST+: architecture and applications", *BMC Bioinformatics*, vol. 10, p. 421, 2009.
- [158] M. Bernoux, J. G. Ellis y P. N. Dodds, "New insights in plant immunity signaling activation", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 14, no. 5, pp. 512–518, 2011.
- [159] S. Postel y B. Kemmerling, "Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns", in *Seminars in cell & developmental biology*, 2009, vol. 20, no. 9, pp. 1025–1031.
- [160] P. Matzinger, "Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?", *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 1, pp. 11–13, 2007.
- [161] M. Roux, B. Schwessinger, C. Albrecht, D. Chinchilla, A. Jones, N. Holton, F. G. Malinovsky, M. Tör, S. de Vries y C. Zipfel, "The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases *BAK1/SERK3* and *BKK1/SERK4* are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens", *Plant Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 2440–2455, 2011.
- [162] S. R. Bisgrove, M. T. Simonich, N. M. Smith, A. Sattler y R. W. Innes, "A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes", *Plant Cell*, vol. 6, no. 7, pp. 927–933, 1994.

- [163] T. Debener, H. Lehnackers, M. Arnold y J. L. Dangl, "Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate", *Plant J.*, vol. 1, no. 3, pp. 289–302, 1991.
- [164] M. C. Whalen, R. W. Innes, A. F. Bent y B. J. Staskawicz, "Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* y soybean", *Plant Cell*, vol. 3, no. 1, pp. 49–59, 1991.
- [165] X. Dong, M. Mindrinos, K. R. Davis y F. M. Ausubel, "Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene", *Plant Cell*, vol. 3, no. 1, pp. 61–72, 1991.
- [166] R. T. Leister, F. M. Ausubel y F. Katagiri, "Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes *RPS2* y *RPM1*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. December, pp. 15497–15502, 1996.
- [167] A. Levine, R. I. Pennell, M. E. Alvarez, R. Palmer y C. Lamb, "Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response", *Curr. Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 427–437, 1996.
- [168] M. Grant, I. Brown, S. Adams, M. Knight, A. Ainslie y J. Mansfield, "The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death", *Plant J.*, vol. 23, no. 4, pp. 441–450, 2000.
- [169] Z. Qi, N. R. Stephens y E. P. Spalding, "Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile", *Plant Physiol.*, vol. 142, no. 3, pp. 963–971, 2006.
- [170] P. Vatsa, A. Chiltz, S. Bourque, D. Wendehenne, A. Garcia-Brugger y A. Pugin, "Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production", *Biochimie*, vol. 93, no. 12, pp. 2095–2101, 2011.
- [171] S. S. Teves y S. Henikoff, "The heat shock response: A case study of chromatin dynamics in gene regulation 1", *Biochem. Cell Biol.*, vol. 91, no. 1, pp. 42–48, 2013.
- [172] M. Clément, N. Leonhardt, M.-J. Droillard, I. Reiter, J.-L. Montillet, B.

- Genty, C. Laurière, L. Nussaume y L. D. Noël, "The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, vol. 156, no. 3, pp. 1481–1492, 2011.
- [173] D. A. Hubert, P. Tornero, Y. Belkhadir, P. Krishna, A. Takahashi, K. Shirasu y J. L. Dangl, "Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein", *EMBO J.*, vol. 22, no. 21, pp. 5679–5689, 2003.
- [174] L. Chen, S. Hamada, M. Fujiwara, T. Zhu, N. P. Thao, H. L. Wong, P. Krishna, T. Ueda, H. Kaku y N. Shibuya, "The Hop/Sti1-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity", *Cell Host Microbe*, vol. 7, no. 3, pp. 185–196, 2010.
- [175] J. Liu y S. A. Whitham, "Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance", *Plant J.*, vol. 74, no. 1, pp. 110–121, 2013.
- [176] J. Jelenska, J. A. Van Hal y J. T. Greenberg, "*Pseudomonas syringae* hijacks plant stress chaperone machinery for virulence", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 29, pp. 13177–13182, 2010.
- [177] A. K. Nya, E. yrio, D. Marino, N. Pauly y C. Dun y, "Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions", *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 52, no. 2, pp. 195–204, 2010.
- [178] G. Noctor y C. H. Foyer, "ASCORBATE and GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 49, no. 1, pp. 249–279, 1998.
- [179] I. Cummins, D. P. Dixon, S. Freitag-Pohl, M. Skipsey y R. Edwards, "Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification", *Drug Metab. Rev.*, vol. 43, no. 2, pp. 266–280, 2011.
- [180] K. B. Singh, R. C. Foley y L. Oñate-Sánchez, "Transcription factors in plant defense and stress responses", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 430–436, 2002.
- [181] C. Yanhui, Y. Xiaoyuan, H. Kun, L. Meihua, L. Jigang, G. Zhaofeng, L. Zhiqiang, Z. Yunfei, W. Xiaoxiao y Q. Xiaoming, "The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison

- with the rice *MYB* family", *Plant Mol. Biol.*, vol. 60, no. 1, pp. 107–124, 2006.
- [182] T. Eulgem, "Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome", *Trends Plant Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 71–78, 2005.
- [183] I. Ndamukong, A. Al Abdallat, C. Thurow, B. Fode, M. Z yer, R. Weigel y C. Gatz, "SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription", *Plant J.*, vol. 50, no. 1, pp. 128–139, 2007.
- [184] M. Kesarwani, J. Yoo y X. Dong, "Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, vol. 144, no. 1, pp. 336–346, 2007.
- [185] E. Mayda, P. Tornero, V. Conejero y P. Vera, "A tomato homeobox gene (*HD-Zip*) is involved in limiting the spread of programmed cell death", *Plant J.*, vol. 20, no. 5, pp. 591–600, 1999.
- [186] V. Vance y H. Vaucheret, "RNA silencing in plants--defense y counterdefense", *Science* , vol. 292, no. 5525, pp. 2277–2280, 2001.
- [187] A. Agorio y P. Vera, "ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, vol. 19, no. 11, pp. 3778–3790, 2007.
- [188] J. S. Thaler, P. T. Humphrey y N. K. Whiteman, "Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk", *Trends Plant Sci.*, vol. 17, no. 5, pp. 260–270, 2012.
- [189] P. Barah, P. Winge, A. Kusnierczyk, D. H. Tran y A. M. Bones, "Molecular signatures in *Arabidopsis thaliana* in response to insect attack and bacterial infection", *PLoSone* 8(3): e58987, 2013.
- [190] Z. Chen, Z. Zheng, J. Huang, Z. Lai y B. Fan, "Biosynthesis of salicylic acid in plants", *Plant Signal. Behav.*, vol. 4, no. 6, pp. 493–496, 2009.
- [191] C. M. Fraser y C. Chapple, "The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*", *Arab. Book/American Soc. Plant Biol.*, vol. 9, 2011.
- [192] G. Loake y M. Grant, "Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 466–472, 2007.
- [193] Y. Wu, D. Zhang, J. Y. Chu, P. Boyle, Y. Wang, I. D. Brindle, V. De Luca y C. Després, "The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid", *Cell Rep.*, vol. 1, no. 6, pp. 639–647, 2012.

- [194] E. Kombrink, "Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths", *Planta*, vol. 236, no. 5, pp. 1351–1366, 2012.
- [195] P. Fernández-Calvo, A. Chini, G. Fernández-Barbero, J.-M. Chico, S. Gimenez-Ibanez, J. Geerinck, D. Eeckhout, F. Schweizer, M. Godoy y J. M. Franco-Zorrilla, "The *Arabidopsis* bHLH transcription factors *MYC3* and *MYC4* are targets of JAZ repressors and act additively with *MYC2* in the activation of jasmonate responses", *Plant Cell*, vol. 23, no. 2, pp. 701–715, 2011.
- [196] T. Maruta, T. Inoue, M. Tamoi, Y. Yabuta, K. Yoshimura, T. Ishikawa y S. Shigeoka, "*Arabidopsis* NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by *MYC2* transcription factor", *Plant Sci.*, vol. 180, no. 4, pp. 655–660, 2011.
- [197] S. Munemasa, K. Oda, M. Watanabe-Sugimoto, Y. Nakamura, Y. Shimoishi y Y. Murata, "The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production", *Plant Physiol.*, vol. 143, no. 3, pp. 1398–1407, 2007.
- [198] K. Nakashima y K. Yamaguchi-Shinozaki, "ABA signaling in stress-response and seed development", *Plant Cell Rep.*, vol. 32, no. 7, pp. 959–970, 2013.
- [199] R. Bari y J. D. G. Jones, "Role of plant hormones in plant defence responses", *Plant Mol. Biol.*, vol. 69, no. 4, pp. 473–488, 2009.
- [200] M. de Torres-Zabala, W. Truman, M. H. Bennett, G. Lafforgue, J. W. Mansfield, P. Rodriguez Egea, L. Bogre, M. Grant y L. Bögre, "*Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease", *EMBO J.*, vol. 26, no. 5, pp. 1434–43, 2007.
- [201] J. Zhang, W. Jia, J. Yang y A. M. Ismail, "Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses", *Field Crops Research*, 97(1), 111-119, 2006.
- [202] S. Spaepen y J. Verleyden, "Auxin and plant-microbe interactions", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 4, p. a001438, 2011.

- [203] R. Imai, M. S. Moses y E. A. Bray, "Expression of an ABA-induced gene of tomato in transgenic tobacco during periods of water deficit", *Journal of Experimental Botany*, 46(9), 1077-1084, 1995.
- [204] P. J. Seo y C. M. Park, "Auxin homeostasis during lateral root development under drought condition", *Plant signaling & behavior*, 4(10), 1002-1004, 2009.
- [205] J. Y. Park, H. J. Kim y J. Kim, "Mutation in domain II of IAA1 confers diverse auxin-related phenotypes and represses auxin-activated expression of Aux/IAA genes in steroid regulator-inducible system", *The Plant Journal*, 32(5), 669-683, 2002.
- [206] X. Ding, Y. Cao, L. Huang, J. Zhao, C. Xu, X. Li y S. Wang, "Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression y promotes salicylate- y jasmonate-independent basal immunity in rice", *Plant Cell*, vol. 20, no. 1, pp. 228–240, 2008.
- [207] Z. Zhang, Q. Li, Z. Li, P. E. Staswick, M. Wang, Y. Zhu y Z. He, "Dual regulation role of GH3. 5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction", *Plant Physiol.*, vol. 145, no. 2, pp. 450–464, 2007.
- [208] S. LeClere, R. Tellez, R. A. Rampey, S. P. T. Matsuda y B. Bartel, "Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*", *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 23, pp. 20446–20452, 2002.
- [209] C.-Y. Kang, H.-L. Lian, F.-F. Wang, J.-R. Huang y H.-Q. Yang, "Cryptochromes, phytochromes and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*", *Plant Cell Online*, vol. 21, no. 9, pp. 2624–2641, 2009.
- [210] S. F. Kwok, B. Piekos, S. Misera y X.-W. Deng, "A complement of ten essential and pleiotropic *Arabidopsis* COP/DET/FUS genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness", *Plant Physiol.*, vol. 110, no. 3, pp. 731–742, 1996.
- [211] J. M. Mach, A. R. Castillo, R. Hoogstraten y J. T. Greenberg, "The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 2, pp. 771–776, 2001.

- [212] N. Yao y J. T. Greenberg, "Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH2 modulates programmed cell death", *Plant Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 397–411, 2006.
- [213] L. a J. Mur, S. Aubry, M. Mondhe, A. Kingston-Smith, J. Gallagher, E. Timms-Taravella, C. James, I. Papp, S. Hörtensteiner, H. Thomas y H. Ougham, "Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*", *New Phytol.*, vol. 188, no. 1, pp. 161–174, 2010.
- [214] P. Brodersen, M. Petersen, H. B. Nielsen, S. Zhu, M. A. Newman, K. M. Shokat, S. Rietz, J. Parker y J. Mundy, "Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via *EDS1* and *PAD4*", *Plant J.*, vol. 47, no. 4, pp. 532–546, 2006.
- [215] A. Falk, B. J. Feys, L. N. Frost, J. D. G. Jones, M. J. Daniels y J. E. Parker, "EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 6, pp. 3292–3297, 1999.
- [216] R. Büschges, K. Hollricher, R. Panstruga, G. Simons, M. Wolter, A. Frijters, R. van Daelen, T. van der Lee, P. Diergaarde y J. Groenendijk, "The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance", *Cell*, vol. 88, no. 5, pp. 695–705, 1997.
- [217] C. A. Frye y R. W. Innes, "An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew", *Plant Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 947–956, 1998.
- [218] G. Desbrosses y D. Steinhauser, "Metabolome analysis using GC-MS", *Lotus Jpn. Hyb.*, vol. 4, no. 6, pp. 165–174, 2005.
- [219] P. S. Solomon y R. P. Oliver, "Evidence that γ -aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato", *Planta*, vol. 214, no. 3, pp. 414–420, 2002.
- [220] J. L. Ward, S. Forcat, M. Beckmann, M. Bennett, S. J. Miller, J. M. Baker, N. D. Hawkins, C. P. Vermeer, C. Lu, W. Lin, W. M. Truman, M. H. Beale, J. Draper, J. W. Mansfield y M. Grant, "The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato", *Plant J.*, vol. 63, no. 3, pp. 443–457, 2010.
- [221] D. H. Park, R. Mirabella, P. a. Bronstein, G. M. Preston, M. a. Haring, C. K.

- Lim, A. Collmer y R. C. Schuurink, "Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence", *Plant J.*, vol. 64, no. 2, pp. 318–330, 2010.
- [222] N. Bouché, A. Fait, D. Bouchez, S. G. Møller y H. Fromm, "Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 11, pp. 6843–6848, 2003.
- [223] F. Ludewig, A. Hüser, H. Fromm, L. Beauclair, N. Bouché y M. Grebe, "Mutants of GABA transaminase (*POP2*) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (*ssadh*) mutants in *Arabidopsis*", *PLoS One*, vol. 3, no. 10, p. e3383, 2008.
- [224] A. W. Bown, K. B. MacGregor y B. J. Shelp, "Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests?", *Trends Plant Sci.*, vol. 11, no. 9, pp. 424–427, 2006.
- [225] A. Fait, H. Fromm, D. Walter, G. Galili y A. R. Fernie, "Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants", *Trends Plant Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 14–19, 2008.
- [226] R. Giaquinta, "Source and sink leaf metabolism in relation to phloem translocation carbon partitioning and enzymology", *Plant Physiol.*, vol. 61, no. 3, pp. 380–385, 1978.
- [227] W. B. J. Anita J. Aspen, "L-Threonic acid dehydrogenase : purification and properties", *J. Biol. Chem.*, vol. 239, no. 3, 1964.
- [228] M. a Green y S. C. Fry, "Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate", *Nature*, vol. 100, pp. 83–88, 2005.
- [229] E. Cadenas y L. Packer, "*Handbook of antioxidants*", *Marcel Dekker Inc.*, 1996.
- [230] J. R. Alfano y A. Collmer, "The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death", *J. Bacteriol.*, vol. 179, no. 18, p. 5655, 1997.
- [231] W. Hu, J. Yuan, Q.-L. Jin, P. Hart y S. Y. He, "Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. tomato assembled in minimal medium and in planta", *Mol. plant-microbe Interact.*, vol. 14, no. 2, pp. 234–241, 2001.
- [232] D. C. Gross y Y. S. Cody, "Mechanisms of plant pathogenesis by

- Pseudomonas* species", *Can. J. Microbiol.*, vol. 31, no. 4, pp. 403–410, 1985.
- [233] P. Magro, G. Chilosi y C. Avanzo, "Pectolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*", vol. 117, pp. 6–10, 1994.
- [234] J. Boch, V. Joardar, L. Gao, T. L. Robertson, M. Lim y B. N. Kunkel, "Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*", *Mol. Microbiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 73–88, 2002.
- [235] W. Wanek y A. Richter, "Biosynthesis and accumulation of D-ononitol in *Vigna umbellata* in response to drought stress", *Physiol. Plant.*, vol. 101, no. 2, pp. 416–424, 1997.
- [236] E. Sheveleva, W. Chmara, H. J. Bohnert y R. C. Jensen, "Increased salt y drought tolerance by d-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum*", *Plant Physiol.*, vol. 115, no. 1 997, pp. 1211–1219, 1997.
- [237] H. A. Krebs y W. A. Johnson, "The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues", *FEBS Lett.*, vol. 117, pp. K2–K10, 1980.
- [238] H. L. Kornberg y H. Beevers, "The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 26, no. 3, pp. 531–537, 1957.
- [239] C. R. Buell, V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. Deboy, A. S. Durkin y J. F. Kolonay, "The complete genome sequence of the *Arabidopsis* y tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 18, pp. 10181–10186, 2003.
- [240] V. Gueguen, D. Macherel, M. Jaquinod, R. Douce y J. Bourguignon, "Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria", *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 7, pp. 5016–5025, 2000.
- [241] Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson, M. X. yersson, V. Arondel, P. D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. DeBono y T. P. Durrett, "Acyl-lipid metabolism", *Arab. book/American Soc. Plant Biol.*, vol. 11, 2013.
- [242] B. A. Vick y D. C. Zimmerman, "The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 111, no. 2, pp. 470–477, 1983.
- [243] M. Hamberg y M. A. Hughes, "Fatty acid allene oxides. III. Albumin-

induced cyclization of 12, 13 (S)-epoxy-9 (Z), 11-octadecadienoic acid", *Lipids*, vol. 23, no. 5, pp. 469–475, 1988.

[244] Y. Tao, Z. Xie, W. Chen, J. Glazebrook, H.-S. Chang, B. Han, T. Zhu, G. Zou y F. Katagiri, "Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible y incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*", *Plant Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 317–330, 2003.

[245] A. J. Hamilton y D. C. Baulcombe, "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants", *Science*, vol. 286, no. 5441, pp. 950–952, 1999.

[246] P. Krishnamurthy, J. Lee, B. Ha, J. Chae, J. T. Song, C. Tsukamoto, R. J. Singh y G. Chung, "Genetic characterization of group A acetylsaponin-deficient mutants from wild soybean (*Glycine soja* Sieb. y Zucc.)", *Plant Breed.*, 2015.

[247] C. Shen, R. Yue, Y. Bai, R. Feng, T. Sun, X. Wang, Y. Yang, S. Tie y H. Wang, "Identification and analysis of *Medicago truncatula* auxin transporter gene families uncover their roles in responses to *Sinorhizobium meliloti* infection", *Plant Cell Physiol.*, p. pcv113, 2015.

[248] Y. Kawaharada, S. Kelly, M. W. Nielsen, C. T. Hjuler, K. Gysel, A. Muszyński, R. W. Carlson, M. B. Thygesen, N. S yal y M. H. Asmussen, "Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection", *Nature*, vol. 523, no. 7560, pp. 308–312, 2015.

[249] L. Xue, H. Cui, B. Buer, V. Vijayakumar, P.-M. Delaux, S. Junkermann y M. Bucher, "Network of *GRAS* transcription factors involved in the control of arbuscule development in *Lotus japonicus*", *Plant Physiol.*, vol. 167, no. 3, pp. 854–871, 2015.

[250] J. Wopereis, E. Pajuelo, F. B. Dazzo, Q. Jiang, P. M. Gresshoff, F. J. De Bruijn, J. Stougaard y K. Szczyglowski, "Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype", *Plant J.*, vol. 23, no. 1, pp. 97–114, 2000.

[251] E. Fukai, T. Soyano, Y. Umehara, S. Nakayama, H. Hirakawa, S. Tabata, S. Sato y M. Hayashi, "Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1", *Plant J.*, vol. 69, no. 4, pp. 720–730, Feb. 2012.

[252] A. Małolepszy, D. F. Urbański, E. K. James, N. S yal, E. Isono, J.

- Stougaard y S. U. yersen, "The deubiquitinating enzyme AMSH1 is required for rhizobial infection and nodule organogenesis in *Lotus japonicus*", *Plant J.*, 2015.
- [253] T. Koressaar y M. Remm, "Enhancements and modifications of primer design program Primer3", *Bioinformatics*, vol. 23, no. 10, pp. 1289–1291, 2007.
- [254] A. Bateman, L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon y E. L. L. Sonnhammer, "The Pfam protein families database", *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. suppl 1, pp. D138–D141, 2004.
- [255] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert y J. Söding, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega", *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 539, 2011.
- [256] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak y G. von Heijne, "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence", *J. Mol. Biol.*, vol. 300, no. 4, pp. 1005–1016, 2000.
- [257] J. F. Jiménez-Bremont, O. A. Ruiz y M. Rodríguez-Kessler, "Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress", *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 45, no. 10, pp. 812–821, 2007.
- [258] R. Kaur-Sawhney, A. F. Tiburcio, T. Altabella y A. W. Galston, "Polyamines in plants: an overview", *J Cell Mol Biol*, vol. 2, pp. 1–12, 2003.
- [259] H. P. Bais, R. Vepachedu, S. Gilroy, R. M. Callaway y J. M. Vivanco, "Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions", *Science*, vol. 301, no. 5638, pp. 1377–1380, 2003.
- [260] N. Steiner, C. Santa-Catarina, V. Silveira, E. I. S. Floh y M. P. Guerra, "Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures", *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 89, no. 1, pp. 55–62, 2007.
- [261] R. Hüchelhoven, J. Fodor, C. Preis y K.-H. Kogel, "Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation", *Plant Physiol.*, vol. 119, no. 4, pp. 1251–1260, 1999.
- [262] a. Borrell, F. a. Cullianez-Macia, T. Altabella, R. T. Besford, D. Flores y a. F. Tiburcio, "Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts", *Plant Physiol.*,

vol. 109, no. 3, pp. 771–776, 1995.

[263] R. Pistocchi, F. Keller, N. Bagni y P. Matile, "Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles", *Plant Physiol.*, vol. 87, no. 2, pp. 514–518, 1988.

[264] P. Torrigiani, D. Serafini-Fracassini, S. Biondi y N. Bagni, "Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells", *J. Plant Physiol.*, vol. 124, no. 1–2, pp. 23–29, 1986.

[265] R. Angelini, R. Federico y P. Bonfante, "Maize polyamine oxidase: antibody production y ultrastructural localization", *J. Plant Physiol.*, vol. 145, no. 5–6, pp. 686–692, 1995.

[266] P. N. Moschou, M. Sanmartin, A. H. yriopoulou, E. Rojo, J. J. Sanchez-Serrano y K. A. Roubelakis-Angelakis, "Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, vol. 147, no. 4, pp. 1845–1857, 2008.

[267] T. Kamada-Nobusada, M. Hayashi, M. Fukazawa, H. Sakakibara y M. Nishimura, "A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Cell Physiol.*, vol. 49, no. 9, pp. 1272–1282, 2008.

[268] P. Tavladoraki, M. N. Rossi, G. Saccuti, M. A. Perez-Amador, F. Polticelli, R. Angelini y R. Federico, "Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion", *Plant Physiol.*, vol. 141, no. 4, pp. 1519–1532, 2006.

[269] P. Fincato, P. N. Moschou, A. Ahou, R. Angelini, K. a. Roubelakis-Angelakis, R. Federico y P. Tavladoraki, "The members of *Arabidopsis thaliana* PAO gene family exhibit distinct tissue- and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development", *Amino Acids*, vol. 42, no. 2–3, pp. 831–841, 2012.

[270] J. Planas-Portell, M. Gallart, A. F. Tiburcio y T. Altabella, "Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*", *BMC Plant Biol.*, vol. 13, no. 1, p. 109, 2013.

[271] M. Marina, S. J. Maiale, F. R. Rossi, M. F. Romero, E. I. Rivas, A. Gárriz,

O. A. Ruiz y F. L. Pieckenstein, "Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*", *Plant Physiol.*, vol. 147, no. 4, pp. 2164–2178, 2008.

[272] M. Rodríguez-Kessler, O. a. Ruiz, S. Maiale, J. Ruiz-Herrera y J. F. Jiménez-Bremont, "Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*", *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 8–9, pp. 805–814, 2008.

[273] J. F. Jiménez-Bremont, M. Marina, M. D. L. L. Guerrero-González, F. R. Rossi, D. Sánchez-Rangel, M. Rodríguez-Kessler, O. a. Ruiz y A. Gárriz, "Physiological y molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions", *Front. Plant Sci.*, vol. 5, no. March, p. 95, 2014.

[274] A. M. Kinnersley y F. J. Turano, "Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509, 2000.

[275] C. D. Bordenave, F. J. Escaray, A. B. Menendez, E. Serna, P. Carrasco, O. a. Ruiz y A. Gárriz, "Defense responses in two ecotypes of *Lotus japonicus* against non-pathogenic *Pseudomonas syringae*", *PLoS One*, vol. 8, no. 12, pp. 1–16, 2013.

[276] C. D. Bordenave, D. Sanchez, P. Carrasco, E. Serna, F. Escaray, O. A. Ruiz, A. B. Menéndez y A. Garriz, "Transcription reprogramming in *Lotus japonicus* plants under foliar infection by *Pseudomonas syringae*", *46 Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology*, Puerto Madryn, 2010.

[277] C. D. Bordenave, F. Babuin, F. J. Escaray, M. P. Campestre, R. a Rocco, C. Antonelli, E. Serna y O. A. Ruiz, "Basal gene transcription contributes to disease tolerance in *Lotus japonicus* ecotype Gifu," *Biocell*, vol. 35, no. November, pp. 46–46, 2011.

[278] A. Gárriz, C. D. Bordenave y O. A. Ruiz, "Análisis del transcriptoma de *Lotus japonicus* durante la respuesta a la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*", *V taller interdisciplinario sobre aspectos genéticos, moleculares y ecofisiológicos de Lotus spp. y sus simbioses*, Chascomús, 2011.

[279] C. D. Bordenave, C. Antonelli, P. Calzadilla, R. A. Rocco, M. F. Babuin, M. P. Campestre, P. Carrasco, A. Gárriz, O. A. Ruiz y A. B. Menéndez,

"Caracterización de la respuesta metabólica del ecotipo Miyakojima MG-20 de *Lotus japonicus* al ataque de la bacteria *Pseudomonas syringae*", *V Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*, Mar del Plata, 2014.

[280] C. L. Bender, F. Alarcon-Chaidez y D. C. Gross, "*Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases", *Microbiol Mol Biol Rev*, 63:266-92, 1999.

[281] B. J. F. Feys, C. E. Benedetti, C. N. Penfold y J. G Turner, "*Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen", *Plant Cell*, 6:751-9, 1994.

[282] P. E. Staswick y I. Tiryaki, "The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 16:2117-27, 2004.

[283] E. W. Weiler, T. M. Kutchan, T. Gorba, W. Brodschelm, U. Neisel y F. Bublitz, "The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signaling molecules of higher plants", *FEBS Lett*, 345:9-13, 1994.

[284] S. R. Uppalapati, A. Patricia, H. Weng, D. A. Palmer, R. E. Mitchell y W. Jones, "The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato", *Plant J*, 42:201-17, 2005.

[285] M. Melotto, W. Underwood, J. Koczan, K. Nomura y S. Y. He, "Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion", *Cell* 126:969–80, 2006.