

UNIVERSITAT JAUME I

Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales



MASTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN Y  
BIOTECNOLOGÍA AGRARIAS

MECANISMOS GENÉTICOS DE LA RESISTENCIA INDUCIDA POR  
MICORRIZA FRENTE A ESTRESSES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS EN RAÍZ  
DE *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Estudiante: Diego Mateu García

Tutores: Miguel Cerezo García

Víctor Flors Herrero

Convocatoria: Julio 2016

## Resumen

Los hongos micorrícicos formadores de arbusculos (AMF) forman una simbiosis con las raíces de una gran cantidad de plantas. Esta simbiosis aporta nutrientes y agua a la planta, mientras que la micorriza obtiene fotoasimilados e hidratos de carbono. Además, la micorriza induce en la planta un estado de alerta defensivo conocido como “priming”. Este estado conlleva una respuesta defensiva de la planta más rápida y efectiva. Las propiedades fertilizantes y protectoras de la micorriza la han convertido en un organismo importante de investigación como alternativa al uso de fertilizantes y pesticidas químicos, con el objetivo de realizar una agricultura más sostenible. Nuestra hipótesis de trabajo es que la micorrización de las plantas de tomate debería resultar en una menor incidencia de los estreses causados por *B. cinerea* y por la carencia de nitrógeno. Para ello se estudiaron plantas de *Solanum lycopersicum* que fueron micorrizadas con el hongo *Rhizophagus irregularis* y sometidas a diferentes estreses bióticos (*Botrytis cinerea*) y abióticos (carencia temporal de nitrógeno). Se utilizaron dos clases de plantas de tomate, la variedad *Better Boy* usada como control y el mutante 35S::PS que sobreexpresa prosistemina. El RNA extraído de las raíces de las plantas de tomate se cuantificó mediante PCR cuantitativa. Los datos obtenidos revelaron que la micorriza protege a la planta frente a la infección de *B. cinerea*. También se estudió que la carencia de nitrógeno reduce la efectividad de la respuesta inducida por micorriza (MIR), ya que protege a la planta frente a la infección pero en menor cantidad.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>10</b>
	<b>1.1 Rol de la simbiosis planta-micorriza</b>	<b>10</b>
	<b>1.2 Funcionamiento del sistema inmune de la planta</b>	<b>13</b>
	<b>1.3 Expresión de genes defensivos</b>	<b>15</b>
	<b>1.4 Distintos papeles de los transportadores de nitrógeno</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos y plan de trabajo</b>	<b>21</b>
	<b>2.1 Objetivos</b>	<b>21</b>
	<b>2.2 Plan de trabajo</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Metodología</b>	<b>24</b>
	<b>3.1 Material vegetal</b>	<b>24</b>
	<b>3.2 Material de micorrización</b>	<b>24</b>
	<b>3.3 Material de infección</b>	<b>25</b>
	<b>3.4 Soluciones nutritivas</b>	<b>25</b>
	<b>3.5 Inoculación con la micorriza</b>	<b>26</b>
	<b>3.6 Infección con el patógeno</b>	<b>26</b>
	<b>3.7 Diseño experimental</b>	<b>27</b>
	<b>3.8 Toma de muestras</b>	<b>28</b>
	<b>3.9 Extracción de RNA</b>	<b>28</b>
	<b>3.10 Retrotranscripción y RT-PCR</b>	<b>29</b>
	<b>3.11 Análisis de la expresión génica</b>	<b>30</b>
	<b>3.12 Análisis estadístico</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>31</b>
	<b>4.1 Evaluación del grado de resistencia de cada tratamiento frente a <i>B. cinerea</i>.</b>	<b>31</b>
	<b>4.2 Efecto de la infección de <i>B. cinerea</i> y la carencia de nitrógeno a las 6 horas post-infección en la expresión de genes de defensa en plantas micorrizadas.</b>	<b>32</b>
	<b>4.3 Efecto de la micorriza sobre la infección de <i>B. cinerea</i> y la carencia de nitrógeno a las 48 horas post-infección</b>	<b>36</b>
	<b>4.4 Efecto de la sobreexpresión de prosistemina en la resistencia inducida por micorriza (MIR).</b>	<b>41</b>

4.4.1	Efecto de la prosistemina en MIR en tiempos tempranos	41
4.4.2	Efecto de la prosistemina en MIR en tiempos tardíos	46
5	Discusión	51
6	Conclusiones	54
7	Bibliografía	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de síntesis de las oxilipinas.	16
Figura 2. Ruta de síntesis de ABA.	18
Figura 3. Expresión relativa de la biomasa del hongo <i>B. cinerea</i> en cada uno de los tratamientos infectados.	31
Figura 4. Expresión relativa de <i>AOS1</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	32
Figura 5. Expresión relativa de <i>JAR1</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	33
Figura 6. Expresión relativa de <i>LOXD</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	33
Figura 7. Expresión relativa de <i>PINII</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	34
Figura 8. Expresión relativa de <i>NCED3</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	34
Figura 9. Expresión relativa de <i>NRT2.1</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	35
Figura 10. Expresión relativa de <i>NRT2.2</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	35
Figura 11. Expresión relativa de <i>NRT2.3</i> 6 horas después de la infección por <i>B. cinerea</i> . Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).	36

Figura 12. Expresión relativa de *AOSI* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 37

Figura 13. Expresión relativa de *JARI* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 37

Figura 14. Expresión relativa de *LOXD* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 38

Figura 15. Expresión relativa de *PINII* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 38

Figura 16. Expresión relativa de *NCED3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 39

Figura 17. Expresión relativa de *NRT2.1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 39

Figura 18. Expresión relativa de *NRT2.2* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 40

Figura 19. Expresión relativa de *NRT2.3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 40

Figura 20. Expresión relativa de *AOSI* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

41

Figura 21. Expresión relativa de *JAR1* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

41

Figura 22. Expresión relativa de *LOXD* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

42

Figura 23. Expresión relativa de *PINII* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

42

Figura 24. Expresión relativa de *NCED3* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

43

Figura 25. Expresión relativa de *NRT2.1* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

43

Figura 26. Expresión relativa de *NRT2.2* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

44

Figura 27. Expresión relativa de *NRT2.3* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

45

Figura 28. Expresión relativa de *AOSI* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistema (PS+). Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

45

Figura 29. Expresión relativa de *JARI* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 46

Figura 30. Expresión relativa de *LOXD* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 46

Figura 31. Expresión relativa de *PINII* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 47

Figura 32. Expresión relativa de *NCED3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 47

Figura 33. Expresión relativa de *NRT2.1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 48

Figura 34. Expresión relativa de *NRT2.2* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 49

Figura 35. Expresión relativa de *NRT2.3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%). 50



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental	26
Tabla 2. Primers específicos para la RT-PCR	28

## **1 Introducción**

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los que más importancia tiene económicamente en el mundo, de hecho es el séptimo cultivo más consumido en el mundo, sólo por detrás del maíz, el arroz, el trigo, la patata, la soja y la yuca o mandioca. Anualmente se producen unos 160 millones de toneladas tanto para consumo en fresco como para procesado (FAOSTAT, 2011). Además, es una de las plantas más usadas en investigación y de las que más información se tiene sobre su funcionamiento. Por ello resulta ser un organismo muy interesante para la realización de nuevas investigaciones.

### **1.1 Rol de la simbiosis planta-micorriza**

En la naturaleza es común la presencia de organismos beneficiosos en la rizosfera que actúan aportando importantes servicios al ecosistema (Philippot y col., 2013). Estos organismos pueden contribuir al funcionamiento de la planta mediante la mejora de su nutrición, el aumento de la tolerancia a distintos estreses y a la plasticidad fenotípica de la planta. Este último punto es de gran importancia cuando la planta se desarrolla en ambientes muy heterogéneos, donde la distribución de los recursos entre crecimiento o resistencia al estrés es un punto crítico para la supervivencia de la planta (Pozo y col., 2015). Dentro de estos organismos beneficiosos, los hongos del suelo micorrícicos formadores de arbusculos (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, en sus siglas en inglés AMF) del filum Glomeromycota, merecen una especial atención.

Las asociaciones simbióticas que forma AMF con las raíces de las plantas se denomina micorriza arbuscular (Arbuscular Mycorrhiza, en sus siglas en inglés AM). Esta asociación mutualística se encuentra en las raíces del 80% de las especies de plantas terrestres (Schüßler y col., 2001) y probablemente es la simbiosis más antigua y extendida en la Tierra. De hecho, se han encontrado evidencias filogenéticas de su existencia en fósiles de más de 450 millones de años de antigüedad (Smith y Read, 2008).

Estos hongos son organismos biótrofos obligados que necesitan a la planta huésped para completar su ciclo vital (Rivero y col., 2015). El hongo coloniza la corteza radicular y forma estructuras intracelulares llamadas arbusculos. En estas estructuras tiene lugar un intercambio de nutrientes entre ambos miembros de la simbiosis. Para

ello, las hifas extracelulares del hongo forman una red que se extiende ampliamente por el suelo, alcanzando lugares que se encuentran fuera de la zona más agotada de nutrientes. De esta forma se mejora el suministro de nutrientes inorgánicos a la planta, especialmente nitrato y fosfato (Smith y col., 2011). A cambio, la micorriza obtiene de su huésped fotoasimilados para la formación, mantenimiento y funcionamiento de sus estructuras arbusculares (Smith y Smith, 2011). El establecimiento y mantenimiento de la asociación requiere de un alto nivel de coordinación entre sus dos miembros. Por ello, un control bidireccional asegura un intercambio justo de los recursos de ambos simbioses (Kiers y col., 2011).

La formación de AM facilita la colonización de la planta en el medio. Además, la micorriza influye en la fisiología de la planta y en la estructura del suelo, así como en diversos procesos del medio, como son la diversidad de plantas, el ciclo nutritivo y la productividad de un ecosistema (Song y col., 2015). Diversos estudios han demostrado que la micorriza mejora el crecimiento y el rendimiento del cultivo, atribuido este cambio, en un principio, exclusivamente a la mejora del estatus nutricional de la planta (Linderman, 1994). Posteriormente, varios autores han estudiado que las plantas micorrizadas presentan una mayor tolerancia a estreses abióticos, como la sequía, la salinidad o la presencia de metales pesados, así como a estreses bióticos. La ayuda supeditada por la micorriza para superar los diversos estreses que sufre una planta, es la razón por la que se explica la persistencia de esta simbiosis durante la evolución, incluso en aquellos casos donde la unión no confiere beneficios en el crecimiento.

En un principio, se encontraron evidencias de los beneficios que producía la micorriza frente a patógenos del suelo, tales como hongos, bacterias, nemátodos o insectos masticadores de raíces (Azcón-Aguilar y Barea, 1997). Más recientemente se ha documentado la inducción de resistencia inducida, frente a patógenos, de partes aéreas (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Koricheva y col., 2009; Campos-Soriano y col., 2012).

Esta resistencia frente a estreses bióticos no puede ser atribuida solamente a la mejora del estatus nutricional de la planta. Las asociaciones AM producen cambios significativos tanto en la planta huésped como en su entorno. A nivel de la rizosfera, la simbiosis cambia la estructura del suelo, la deposición del carbono en el suelo y la diversidad microbiana, en parte debido a cambios en la exudación de las raíces. Estas

variaciones en las comunidades microbianas podrían influir indirectamente en el resultado de la interacción de la planta con otros organismos, tanto los beneficiosos como con los patógenos (Jung y col., 2012). A parte de estos cambios en la rizosfera, la simbiosis produce modificaciones dentro de la planta. En las raíces se producen alteraciones en su estructura, en su perfil metabolómico y en la acumulación de ciertos componentes defensivos (Schliemann y col., 2008; Péret y col., 2009).

El proceso de colonización se produce cuando, en condiciones de carencia de fósforo, las raíces de la planta exudan estrigolactonas (SLs), un compuesto señalizador derivado de los carotenoides, que promueve la ramificación de las hifas de la micorriza y el establecimiento de ésta en las células radiculares (Akiyama y col., 2005; Bouwmeester y col., 2007). Como organismo biótrofo que es, la micorriza guarda bastantes similitudes con los patógenos biótrofos, por lo que puede desencadenar respuestas defensivas de la planta en las fases iniciales de la colonización. Por ello, para que ésta sea efectiva, el hongo tiene que lidiar con estas respuestas y modularlas. Esta modulación podría resultar en un pre-acondicionamiento de la planta obteniendo una respuesta más eficiente frente a ataques de patógenos. Este fenómeno se llama *priming* (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

El *priming* mantiene a la planta en un estado de alerta en el cual las defensas no están activamente expresadas pero su respuesta frente a un ataque ocurre de forma más rápida y consistente que en aquellas que no han estado previamente expuestas al estímulo de *priming*. Por ello podríamos decir que el *priming* actúa del mismo modo que una vacuna. Este estado de alerta en la planta puede inducirse, aparte de con la inoculación de la micorriza, de forma natural o artificial con varios compuestos, como por ejemplo el ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA), el ácido jasmónico (JA) o el ácido salicílico (SA) (Jakab y col., 2001). Estudios realizados con semillas de tomate a las que se le aplicaron tratamientos con JA y BABA, revelaron que se producía un aumento de la resistencia frente a insectos herbívoros y oídio (Worrall y col., 2012).

Los cambios metabolómicos producidos por la micorriza en la planta, han sido estudiados sobre todo en el hongo *Rhizophagus irregularis* (BEG 121, antes *Glomus intraradices*). Se ha encontrado que el impacto de su colonización produce cambios en el metabolismo primario y secundario, llegando a producir variaciones en los tejidos aéreos de la planta. La simbiosis producida con plantas de tomate (*Solanum*

*lycopersicum*) han resultado en mejoras de la producción de fruto y en la resistencia a diferentes estreses (Rivero y col., 2015).

Debido a las propiedades fertilizantes y protectoras de la micorriza que se han expuesto, ésta se ha convertido en un organismo importante de investigación como alternativa al uso de fertilizantes y pesticidas químicos, con el objetivo de realizar una agricultura más sostenible (Jung y col., 2012).

## **1.2 Funcionamiento del sistema inmune de la planta**

Las plantas están equipadas para soportar la mayoría de los ataques de microbios e insectos que tienen lugar en el medio ambiente. Alguna de las respuestas de la planta, consiste en la producción de compuestos defensivos que resultan tóxicos para el patógeno. Estas respuestas son inducibles y están controladas por el sistema inmune de la planta. Este sistema permite a la planta distinguir los organismos que no son propios de ella y emitir respuestas defensivas. Éstas se desencadenan mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP, de sus siglas en inglés Pathogen-Associated Molecular Pattern), que son moléculas que la planta asocia a diferentes patógenos, como por ejemplo flagelina, lipopolisacáridos o peptidoglucanos.

Los PAMP son reconocidos por receptores transmembrana que desencadenan respuestas que tienen como resultado la inmunidad desencadenada por PAMP (PTI, de sus siglas en inglés PAMP-triggered immunity). Durante la evolución los organismos patógenos han desarrollado mecanismos para evitar los PTI, permitiendo que su ataque a la planta sea efectivo. A su vez, la planta también ha desarrollado mecanismos de reconocimiento de estos organismos virulentos (los ETI, en inglés Effector-Triggered Immunity), contra los que activa otro tipo de respuestas defensivas. Éstas requieren la expresión de unos genes específicos de resistencia, que pueden convertir un patógeno virulento en avirulento.

Todas estas respuestas vienen coordinadas por diferentes moléculas que actúan como señalizadoras y coordinadoras de la expresión de genes, siendo las fitohormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA) y etileno (ET) las que juegan un papel clave (Pieterse y col., 2009). Dependiendo del tipo de estrés al que se enfrente la planta, predomina un tipo de mecanismo de señalización sobre los otros.

Cuando el ataque viene por parte de un organismo biótrofo, la ruta del SA es la encargada de responder mediante la muerte celular programada. La ruta del JA se activa para responder frente a organismos necrótrofos e insectos masticadores (Glazebrook, 2005). Además, el JA también tiene función señalizadora en el priming producido por organismos beneficiosos, como la micorriza.

La correcta micorrización de una planta tiene como efecto, en su sistema inmune, la modificación de la regulación de respuestas producida por las rutas de SA y JA. La simbiosis da como resultado plantas más resistentes a necrótrofos e insectos masticadores, ya que se potencia la ruta del JA. El uso de mutantes de tomate en JA ha confirmado éste es necesario para que se establezcan los mecanismos de resistencia inducida por la micorriza frente a *Botrytis cinerea*. Por el contrario, la planta es más susceptible a ataques de organismos biótrofos, al estar reprimida la ruta del SA. La respuesta producida contra organismos necrótrofos o insectos masticadores consiste en la síntesis de toxinas o proteínas defensivas que afectan a algún proceso fisiológico del patógeno (Howe y Jander, 2008).

Sin embargo, la inducción de resistencia no significa necesariamente la activación directa de los mecanismos de defensa de la planta. Puede ser solo la sensibilización del tejido con un estímulo concreto que consiga que la expresión basal de los mecanismos de defensa sea más eficiente cuando se produzca un ataque. Este tipo de defensa inmune tiene beneficios en el estado físico de la planta en comparación con la activación directa de las defensas basadas en la expresión de genes (Beckers y col., 2009).

Cuando la planta detecta un ataque mediante el PAMP, las primeras respuestas defensivas vienen a cargo del sistema inmune basal (respuestas tempranas) y consisten en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) seguido de la deposición de callosa (Luna y col., 2011). Si el patógeno invasor consigue superar esta primera línea de defensas entonces la planta responde mediante la activación de una segunda línea de mecanismos de defensa inducibles tardías. Esta respuesta es regulada por rutas hormonales controladas por JA o SA dependiendo del tipo de ataque, aunque se ha descubierto que el ABA juega también un importante papel regulador, tanto en las respuestas tempranas defensivas, como en las tardías. Aparte de

su papel en el cierre estomático, el ABA también mejora la rapidez y la intensidad de la deposición de callosa o la inducción de ROS (Ton y col., 2009).

Como el ABA puede suprimir las defensas dependientes de SA contra organismos biótrofos, se ha demostrado que los AMF promueve la producción de ABA en sus raíces para favorecer el proceso de micorrización. Además, la movilidad del ABA a través del xilema y del floema, hacen que esta hormona sea una candidata muy interesante como posible señalizadora a grandes distancias de la resistencia inducida por micorriza (MIR, del inglés Mycorrhiza Induced Resistance), contribuyendo al establecimiento del priming en las hojas (Cameron y col., 2013).

### **1.3 Expresión de genes defensivos**

Como hemos visto, las respuestas defensivas de la planta están coordinadas por distintas fitohormonas. A su vez, la síntesis de estas hormonas se da por la activación de ciertos genes cuyas funciones son por tanto defensivas. En el caso que concierne a este estudio, la infección de las plantas con *B. cinerea*, al ser un organismo necrótrofo, conllevará que la planta responderá mediante la activación de la ruta del JA, con lo que el estudio de los genes implicados en esta ruta resulta de interés. Además, como ya se ha descrito, el ABA juega también un papel específico en la coordinación de las respuestas defensivas. Por tanto, para analizar la influencia que tiene la micorriza en las respuestas defensivas de la planta frente a organismos necrótrofos, hay que estudiar sobretodo la expresión de genes de la ruta del JA, y también la expresión de ABA para ver si tiene alguna función coordinadora.

El JA y sus metabolitos, entre ellos el JA-Ile (del inglés jasmonoyl) que es la forma natural más activa de JA, se sintetizan a través de la ruta de las oxilipinas (Gfeller y col., 2010), que podemos ver en la figura 1.

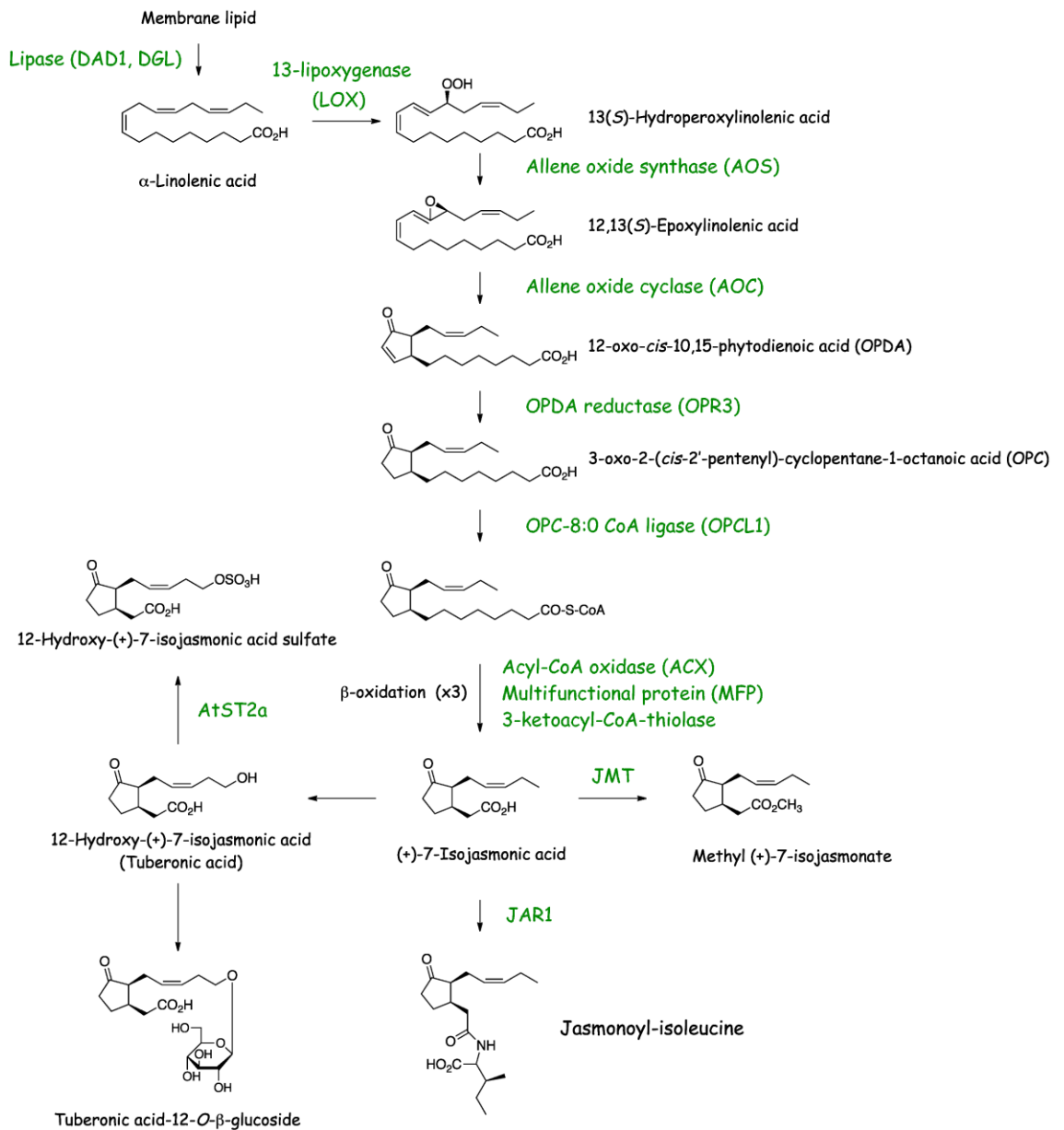


Figura 1. Ruta de síntesis de las oxilipinas.

El gen 13-lipoxygenase (LOX) codifica para una enzima que transforma los ácidos grasos poliinsaturados en ácidos hidroperóxidos. Cataliza el primer paso de la ruta de las oxilipinas (Mariutto y col., 2011). El gen Allene oxide synthase (AOS1) cataliza el segundo paso de la ruta al transformar los ácidos hidroperóxidos en ácido epoxilinooleico (Sivasankar y col., 2000). El gen Jasmonic acid-amido synthetase (JAR1) cataliza la formación de jasmonato-isoleucina al final de la ruta, que es la forma biológica activa del JA (Suza y Staswick, 2008).



Mientras, el gen Proteinase inhibitor 2 (*PINII*) sintetiza proteínas de defensa frente a daño producido en los tejidos vegetales, además de ser un marcador de JA, ya que su expresión está regulada por JA (Howe, 2004).

Adicionalmente, para examinar con mayor detenimiento el papel del JA en el priming inducido por AMF en tomate, se ha usado una línea de tomate transgénica que sobreexpresa el gen de la prosistemina (35S::PS). En las plantas de tomate, la inducción sistémica de las respuestas dependientes de JA viene mediada por un péptido señalizador, la sistemina, formada por 18 amino ácidos (Howe y Ryan, 1999). La línea transgénica de tomate 35S::prosystemin (PS+) que sobreexpresa prosistemina, un precursor de la sistemina, tiene expresadas constitutivamente las defensas dependientes de JA. Para analizar las diferencias existentes entre las plantas transgénicas y las plantas control, se estudiará la expresión del gen de la prosistemina.

En la ruta metabólica del ABA, destaca la enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED, del inglés 9-cis-epoxycarotenoid dioxigenase), que cataliza la oxidación de los 9-cis-epoxycarotenoides dando lugar a xantonina, como podemos ver en la Figura 2. Esta enzima regula la biosíntesis de ABA cuando la planta está sometida a distintos estreses (Fernández, 2013). Por tanto, el gen *NCED3* resulta de especial interés para conocer el comportamiento del ABA en esta investigación.

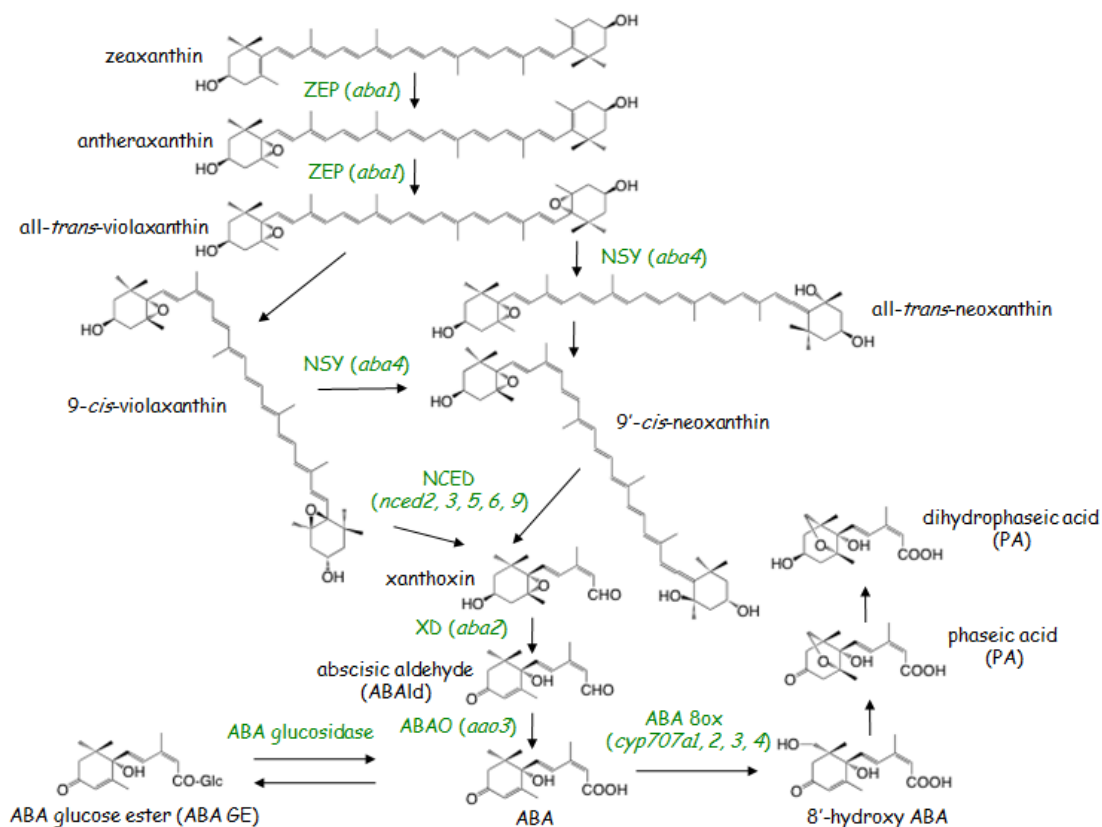


Figura 2. Ruta de síntesis de ABA.

#### 1.4 Distintos papeles de los transportadores de nitrógeno

El nitrógeno es esencial para el desarrollo vital de las plantas y además es el mayor factor limitante en su crecimiento. Debido a esto, frecuentemente en los suelos donde se realizan los distintos cultivos existe una carencia de este elemento. Por ello se añaden grandes cantidades de fertilizantes inorgánicos para poder tener una buena producción. Sin embargo, el nitrato, la urea y el amonio son unas de las principales fuentes de la contaminación global, ya que gran parte del nitrógeno añadido al suelo no es absorbido por las plantas. Este nitrógeno desaprovechado llega a los cursos fluviales, lagos y acuíferos causando desequilibrios en sus ecosistemas (Fagard y col., 2014).

El abuso de los fertilizantes nitrogenados parece tener una incidencia en el impacto de las enfermedades que afectan a las plantas. Aunque esta afirmación está clara, el mecanismo subyacente no está definido, ya que en ocasiones el exceso de nitrógeno reduce la resistencia de las plantas y en otros casos la aumenta, evidenciando un complejo mecanismo de relación entre la absorción de nitrógeno y el metabolismo de

la planta con el éxito de infección patogénica. De hecho, se ha estudiado que elevados niveles de nitrógeno promueven la susceptibilidad de la planta frente a organismos biotrófos, como por ejemplo el oídio, y en cambio reduce el desarrollo de organismos necrotrofos como *B. cinerea* (Walters y Bingham, 2007). Por tanto, queda claro que la limitación del nitrógeno disponible tiene un impacto en la defensa de la planta.

Para contrarrestar el sistema defensivo de la planta, los patógenos reconfiguran el metabolismo del huésped, haciendo que la infección tenga un fuerte impacto en el metabolismo primario y secundario de la planta (Ward y col., 2010). Estos cambios metabólicos en el metabolismo primario afectan al crecimiento y desarrollo de la planta, produciendo pérdidas en el cultivo. Sin embargo, no solo se producen cuando la planta es infectada. Cuando el ataque del patógeno no tiene éxito y no se produce la muerte celular o el desarrollo de la enfermedad, también se producen cambios metabólicos producidos por la respuesta que tiene que dar la planta. Existen tres aspectos principales en el impacto que tiene la interacción planta-patógeno sobre el metabolismo primario (Berger y col., 2007): el alto coste de la defensa de la planta, la manipulación por parte del patógeno del metabolismo de la planta para crear un flujo de nutrientes hacia él y el desarrollo de áreas necróticas y cloróticas que disminuyen la actividad fotosintética. Este coste que la planta debe soportar para sobreponerse a un ataque conlleva que tiene que darse una regulación entre crecer y defenderse.

El nitrato es la mayor fuente de nitrógeno para las plantas, por lo que juega un rol importante en el crecimiento y desarrollo. En las plantas superiores, la absorción de nitrato se realiza a través de las raíces y se lleva a cabo a través de dos familias de genes, los *NRT1* y *NRT2* (del inglés Nitrate Transporter). En *Arabidopsis thaliana* hay 53 genes *NRT1* y 7 genes *NRT2* (Tsay y col., 2007). Los genes de tipo *NRT1* codifican para componentes del sistema de transporte de baja afinidad (LATS, del inglés Low Affinity Transport System), que regulan la absorción de nitrógeno cuando este se encuentra en concentraciones altas en el entorno de las raíces. Cuando la concentración de nitrato alrededor de las raíces es baja, se activan los genes *NRT2*, que codifican componentes del sistema HATS (del inglés, High Affinity Transport System) (Gansel y col., 2001). Concretamente los HATS se activan cuando la concentración de nitrato es inferior a 1 mM, mientras que a concentraciones superiores actúan los LATS (Cerezo y col., 2001).

La contribución de los *NRT2* en la cantidad total de nitrato absorbido es baja en comparación con los *NRT1*. Mutaciones en el gen *NRT2.1* en *Arabidopsis* bajo condiciones de fertilización normal, han demostrado que no hay ninguna influencia en el crecimiento de la planta, ya que su ausencia es compensada con el gen de la misma familia *NRT2.2* (Li y col., 2007). Además, se han propuesto que los genes de esta familia tienen roles añadidos como señalizadores. El término “transceptor”, empleado primero en ciencia animal, se aplica a las proteínas de membrana que presentan un doble función: transporte y señalización (Gojon y col., 2011). Los genes *NRT2* están relacionados con la percepción ambiental y la señalización que integra los metabolismos del nitrógeno y del carbono. El gen *NRT2.1* percibe las pequeñas concentraciones de nitrato y transmite señales a la planta para mediar el crecimiento de esta con la disponibilidad de nutrientes (Krouk y col., 2010).

En tomate se han identificado 3 genes de la familia de los *NRT2* relacionados con la absorción de nitrato: *SINRT2.1*, *SINRT2.2* y *SINRT2.3*. En concreto, la secuencia proteica del *SINRT2.3* tiene un 77% de afinidad con el gen *AtNRT2.4*, un 76% de afinidad con *AtNRT2.1* y un 67% con *AtNRT2.3* (Fu y col., 2015). El gen *SINRT2.3* se ha descrito como un posible transceptor en tomate, análogo al gen *NRT2.1* de *A. thaliana* (Fu, 2015). Tiene una doble función en la planta: absorción de nitrato en las raíces y su transporte a las zonas aéreas, haciendo que la utilización del nitrato sea más eficiente. Por tanto, el nitrato puede servir tanto como fuente de nitrógeno, como señal en el metabolismo y el crecimiento de la planta.

Como se ha visto en lo expuesto anteriormente en toda la introducción, la defensa y el crecimiento de la planta vienen regulados por distintos procesos que además están relacionados entre sí. Las respuestas defensivas de la planta están condicionadas por el estado nutricional de esta, teniendo gran dependencia del nitrógeno disponible. La micorriza influye en ambos procesos, tanto en la absorción de nutrientes como en la mejora del sistema defensivo. Todo esto condiciona la expresión de los genes que actúan en respuesta a diferentes estreses, haciendo que varíe la respuesta defensiva de la planta. A su vez, los transportadores de nitrato tienen una doble función, absorbiendo nitrógeno en distintas condiciones del suelo y actuando como señalizadores del estado del medio. Por ello, se hace necesario el estudio global de todos estos procesos en común para comprender su funcionamiento.

## 2 Objetivos y plan de trabajo

### 2.1 Objetivos

De la revisión de trabajos y de otras investigaciones realizadas en los distintos campos que se han tratado en la introducción, se pueden hacer las siguientes afirmaciones:

-La formación de la simbiosis planta-micorriza proporciona a la planta una mejora en la absorción de agua y nutrientes.

-La micorriza induce en la planta un estado de pre-acondicionamiento defensivo, conocido como priming, haciendo que las respuestas defensivas sean más eficientes.

-La respuesta de la planta frente a patógenos necrótrofos viene regulada por la ruta de las oxilipinas.

-La prosistemina es un precursor de la sistemina, que induce las respuestas dependientes del JA.

-El ABA regula las diferentes rutas de respuestas defensivas, suprimiendo unas y favoreciendo otras.

-En situaciones de estrés biótico y carencia de nitrógeno, la planta debe distribuir sus recursos entre crecer o defenderse.

-Los genes de la familia *NRT2* se expresan en condiciones de baja disponibilidad de nitrato en el suelo.

-En *A. thaliana* el gen *NRT2.1* actúa como transceptor, ya que tiene función de transportador de nitrato y de señalizador del estado nutricional.

-El gen *NRT2.3* de tomate ha sido propuesto, por su analogía con el *NRT2.1* de *A. thaliana*, como posible transceptor.

Debido a todo esto, nuestra hipótesis de trabajo es que la micorrización de las plantas de tomate debería resultar en una menor incidencia de los estreses causados por *B. cinerea* y por la carencia de nitrógeno.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es:

**Estudiar cómo influye la simbiosis de *R. irregularis* en la respuesta que da la planta frente al estrés biótico producido por *B. cinerea* y el estrés abiótico producido por la carencia de nitrógeno.**

Como objetivos secundarios del trabajo se pretende:

- 1- Entender el papel de la sistemina en la resistencia inducida por micorriza.
- 2- Investigar cómo actúan los genes de la familia *NRT2* en las plantas micorrizadas y en distintas condiciones de fertilización.
- 3- Analizar las variaciones que tienen lugar en la ruta de las oxilipinas en las diferentes condiciones en que se encuentra la planta.
- 4- Estudiar la influencia que tiene el ABA como regulador en la resistencia inducida por micorriza.
- 5- Comprender como las carencias transitorias de nitrógeno pueden afectar a la resistencia inducida por micorriza.

## **2.2 Plan de trabajo**

Para llevar a cabo el objetivo principal, se medirá la expresión de los genes *NRT2.1*, *NRT2.2*, *NRT2.3*, *PINII*, *JARI*, *AOS1*, *LOXD* y *NCED3* en plantas de tomate de dos cultivares distintos, un control (*Better Boy*) y un sobreexpresor de prosistemina (PS+) mediante PCR cuantitativa.

Los objetivos secundarios se llevarán a cabo de las siguientes formas:

- 1- El papel de la sistemina se estudiará utilizando un cultivar de tomate sobreexpresor de prosistemina (PS+). Además se intentará analizar la expresión del gen de la prosistemina.
- 2- Para estudiar el papel de los genes de la familia *NRT2* en la respuesta inducida por micorriza, se analizará la expresión de los genes *NRT2.1*, *NRT2.2* y *NRT2.3*.
- 3- El análisis de las variaciones que tienen lugar en la ruta de las oxilipinas se realizará midiendo la expresión de los genes *PINII*, *JARI*, *AOS1* y *LOXD*.
- 4- El papel del ABA como regulador de la resistencia inducida por micorriza se estudiará midiendo la expresión del gen *NCED3*.

5- Los efectos de las carencias transitorias de nitrógeno sobre la resistencia inducida por micorriza se realizarán aplicando carencias de nitrógeno durante 48 horas y analizando las variaciones que tienen lugar en los genes anteriormente nombrados.

### **3. Metodología**

#### **3.1 Material vegetal**

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Better Boy (BB) usado como control y 35S::PS (PS+) como sobre expesor de prosistemina. Las semillas se esterilizaron dejándolas 5 minutos en agitación en una solución al 10% de sulfamán comercial en agua de grifo. Para su germinación, fueron sembradas en bandejas de poliestireno con alveolos de 60 cm<sup>3</sup> de capacidad con un sustrato formado por vermiculita autoclavada. Se regaron con agua de grifo hasta el momento de su trasplante. Se mantuvieron en cámara de cultivo bajo condiciones de fotoperiodo largo, a una temperatura de 24/16°C, con un ciclo día/noche de 16/8 h y una humedad relativa del 60%.

Pasados 28 días desde su siembra, cuando las plántulas tenían desarrolladas sus dos primeras hojas verdaderas, fueron trasplantadas a maceta de 330 cc de capacidad. En las plantas sin micorrizar se utilizó como sustrato 330 cc de vermiculita autoclavada, mientras que en las plantas destinadas a la micorrización, se procedió a inocularlas utilizando la metodología que se explica en el siguiente apartado (Material de micorrización).

Las plantas se regaron con agua de grifo y una vez a la semana se les aplicó una solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966), cuyo contenido se detalla en el apartado correspondiente a las soluciones nutritivas.

#### **3.2 Material de micorrización**

Se usó el hongo formador de micorrizas arbusculares *R. irregularis*, procedente de los cultivos de conservación de micorriza que se encuentran en los invernaderos de la Universidad Jaume I.

El inóculo de *R. irregularis* se propagó usando *Trifolium repens*. La técnica de propagación consiste en extraer raíces de *T. repens*, que están inoculadas con *R. irregularis*, junto con el sustrato que las rodea, para triturar las raíces y homogeneizar la mezcla. El sustrato resultante se usa para sembrar nuevas plantas de *T. repens* que serán colonizadas por la micorriza.



El material usado como inóculo de las plantas de tomate consistía en sustrato formado por vermiculita, esporas, micelio y fragmentos de las raíces de trébol colonizadas por la micorriza.

### **3.3 Material de infección**

El hongo *B. cinerea* se obtuvo a partir de su propagación en placas Petri en medio de cultivo PDA con hojas de tomate. Para la preparación del inóculo se añaden 5 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM en tubos estériles. Con una espátula se rascan las esporas de las placas Petri y se añaden en los tubos con MgSO<sub>4</sub>. Todo este proceso se realiza en campana de flujo laminar y con llama azul. Se realiza un primer filtrado con jeringa y algodón de la solución con las esporas. La solución resultante se centrifuga a 20°C y 4000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante se disuelve en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> y se centrifuga a 20°C y 12000 rpm durante 5 minutos. El precipitado de esporas se disuelve en 1 ml de Gambor B5 y se deja en reposo 2 horas para que germinen las esporas. Se toma una muestra de esta solución y se realiza una dilución 1:100 con la que se realiza el conteo en una cámara Neubauer. La concentración necesaria de esporas para producir la infección en tomate es de 10<sup>6</sup> esporas/ml.

### **3.4 Soluciones nutritivas**

Las plantas germinadas fueron regadas con una solución Long Ashton modificada, de manera que cumpla las condiciones necesarias para que se produzca la micorrización. Esta solución tiene una conductividad eléctrica de 2'5 mS cm<sup>-1</sup>, un pH de 4'4 y la siguiente composición de nutrientes: 170 µg ml<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 48 µg ml<sup>-1</sup> de S, 156 µg ml<sup>-1</sup> de K, 36 µg ml<sup>-1</sup> de Mg, 160 µg ml<sup>-1</sup> de Ca, 31 µg ml<sup>-1</sup> de Na, 0'5 µg ml<sup>-1</sup> de B, 0'06 µg ml<sup>-1</sup> de Cu, 5'6 µg ml<sup>-1</sup> de Fe, 0'6 µg ml<sup>-1</sup> de Mn, 0'05 µg ml<sup>-1</sup> de Mo, 0.07 µg ml<sup>-1</sup> de Zn y 41 µg ml<sup>-1</sup> de P (Smith y col., 1983).

Para que se produzca la micorrización se redujo a un 25% el nivel de fósforo, es decir a 10 µg ml<sup>-1</sup>. Esto se realiza para favorecer la colonización de las raíces por parte del hongo, ya que la planta al detectar una carencia de fósforo se predispone a realizar una simbiosis con otro microorganismo que le ayude a superar la falta de nutrientes. De esta forma se facilita la penetración de las hifas del hongo dentro de las células radiculares de la planta.

La solución aplicada para realizar el tratamiento de carencia de nitrógeno consistió en utilizar la formulación de Long Ashton pero sin ningún aporte de nitrógeno. Para eliminar el nitrógeno se deja de añadir  $\text{KNO}_3$  y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , por lo que se tiene que complementar la solución con otras fuentes de K y Ca, en este caso  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y  $\text{CaSO}_4$ , en las cantidades correspondientes.

### **3.5 Inoculación con la micorriza**

En el momento de producirse el trasplante de las plántulas, se produjo la inoculación de un total de 28 plantas de ambos ecotipos. Las plantas se trasplantaron a maceta con un sustrato formado por vermiculita en un 87% del volumen total y en un 13% de inóculo.

Pasados 20 días desde de la inoculación con *R. irregularis*, se evaluó el porcentaje de micorrización mediante tinción. Para ello se seleccionaron un total de 4 plantas (2 de BB y 2 de PS+) de las que se extrajeron las raíces. Después de eliminar los restos de sustrato que podían quedar adheridos a las raíces, se sumergieron en tubos que contenían KOH al 10% p/v y se introdujeron en un baño termostatado a 70-80°C durante 10 minutos. Una vez eliminado el KOH se aplicaron dos lavados con agua destilada y un lavado final con ácido acético al 2%. La tinción se realizó con una solución al 5% v/v de tinta Parker y 2% v/v de ácido acético (Vierheilig y col., 2005). Se utilizó un baño termostatado a 90°C durante 10 minutos. Posteriormente las raíces fueron lavadas dos veces con agua destilada. La extensión de la colonización de la micorriza se observó con microscopio de disección y el porcentaje total de raíces colonizadas se midió utilizando el método “gridline intersección” (Giovannetti y Mosse, 1980).

### **3.6 Infección con el patógeno**

La infección con el patógeno se produjo 48 horas después de someter las plantas al tratamiento de carencia de nitrógeno, para ello se infectaron las plantas con *B. cinerea* mediante la pulverización de las esporas sobre las hojas. Las plantas que no tenían que ser infectadas recibieron igualmente una pulverización de Gambor B5 diluido para equiparar sus condiciones a las que sí lo estaban. La infección se realiza mediante pulverización foliar para no producir ningún otro tipo de estrés a la planta, como podría ser el producido al infectar mediante la realización de una herida en las hojas.

Para cuantificar el grado de infección producida por *B. cinerea* se realizó una extracción de material vegetal en las hojas, realizando una PCR cuantitativa como describe Gamir y col. (2004). La cantidad de ADN genómico del hongo presente en las hojas de las plantas de tomate se realizó comparando el gen constitutivo de tomate SIEF1 con el gen constitutivo de *B. cinerea* *BcTubulin* (Sánchez-Vallet y col., 2010).

### 3.7 Diseño experimental

Un total de 100 plantas (96 para la realización del estudio de la expresión génica y 4 para la evaluación del porcentaje de micorrización) fueron sometidas a diversos tratamientos. El experimento estuvo formado por: plantas control (Ctrl), plantas micorrizadas (AM), plantas infectadas (INF) y plantas micorrizadas e infectadas (AM INF). A su vez la misma distribución se produjo aplicando una carencia de nitrógeno (-N). El número total de individuos en cada uno de los tratamientos fue de 6 plantas (3 por cada uno de los dos tiempos de muestra). Los tratamientos se aplicaron tanto para la variedad Better Boy (BB) como para el mutante 35S::PS (PS+) (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño experimental

Better Boy (BB)			
BB Ctrl	BB AM	BB INF	BB AM INF
BB -N	BB AM -N	BB INF -N	BB AM INF -N

35S::PS (PS+)			
PS+ Ctrl	PS+ AM	PS+ INF	PS+ AM INF
PS+ -N	PS+ AM -N	PS+ INF -N	PS+ AM INF -N

Pasadas 6 semanas después de la germinación, se sometió a las plantas al tratamiento de carencia de nitrógeno. Para ello se lavaron las raíces con agua destilada, unos 2 litros por planta. A las plantas destinadas a un tratamiento sin carencia se les aplicó una solución nutritiva Long Ashton y a las plantas en carencia la misma solución pero sin nitrógeno.

La carencia se aplicó durante 48 horas para comprobar cómo influye el estado nutricional de la planta en la respuesta defensiva frente a *B. cinerea* y para estudiar el comportamiento de los genes *NRT2* como posibles transceptores.

### **3.8 Toma de muestras**

Las muestras de raíces se obtuvieron a las 6 y 48 horas post-infección. Las raíces se limpiaron mecánicamente de los restos de sustrato y se introdujeron en tubos de 50 ml que se congelaron en nitrógeno líquido. Todo se realizó con la mayor celeridad posible y con el mayor cuidado posible para no alterar la expresión génica de las muestras. Las muestras se almacenaron en congelador a -80°C hasta su posterior utilización.

Las hojas se conservaron, de igual forma que las raíces, para realizar nuevos experimentos con posterioridad. Además, se conservó la parte de las extracciones destinadas al análisis del metaboloma para realizar otros estudios.

### **3.9 Extracción de RNA**

La expresión de los genes seleccionados se realizó mediante Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) usando muestras de RNA obtenidas a partir de las raíces de las plantas de cada uno de los distintos tratamientos.

El RNA se extrajo y se aisló mediante el método basado en el reactivo TRIzol de Kiefer y col. (2000) con algunas modificaciones. Las muestras de raíz (0.1 g) fueron molidas y trituradas en nitrógeno líquido y transferidas a tubos Eppendorf de 2 ml. Se añadieron 800 µl de una solución MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (2'5:1:0'5) y se centrifuga a 20.000 g y 4°C durante 6 minutos. El sobrenadante se guardó para realizar en un futuro el análisis del metaboloma, mientras que el "pellet" resultante se trató con 1 ml de TRIzol y se le aplicó vortex durante 30 segundos. Las muestras se mantuvieron durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 13.000 rpm y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml al que se añadió 220 µl de CHCl<sub>3</sub>. Después de aplicar vortex durante 15 segundos, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm y 4°C durante 5 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo Eppendorf de 2 ml al se añadió 350 µl de 2-propanol y 350 µl de una solución 0'8 M de citrato y 1'2 mM de NaCl. Después de mantener las muestras 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 13.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. El "pellet" resultante se lavó dos veces con 0'5 ml de etanol al 70% y se centrifugó cada en cada uno de los lavados a 13.000 rpm y 4°C durante 1 minuto. Después de secar el "pellet" durante dos horas a temperatura ambiente, se disolvió en 25 µl de agua milli-Q. Las muestra de RNA se conservaron a -20°C.

### 3.10 Retrotranscripción y RT-PCR

Para evitar contaminaciones de DNA, las muestras fueron tratadas con DNAsa I. Un total de 1 µg de RNA fue transcrito a cDNA mediante High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). En primer lugar la solución formada por la DNAsa I, el tampón DNAsa y el RNA reaccionó en un Mastercycler durante 30 minutos a 37°C. A continuación se le añadió la DNAsa Stop y reaccionó durante 10 minutos a 65°C. Finalmente se añadieron los reactivos del Kit y se produjo la retrotranscripción durante 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C. El cDNA resultante se conservó a -20°C.

En este estudio se analizó la expresión de los genes *PIN1*, *LOXD*, *JAR1*, *PROSYSTEMIN*, *NCED3*, *AOS1*, *NRT2.1*, *NRT2.2*, *NRT2.3* y *EF1* como gen constitutivo (codifica para el factor de elongación 1α de tomate). Los primers de cada uno de los genes se muestran en la tabla 2.

<b>Tabla 2. Primers específicos para la RT-PCR</b>	
<b>Gen</b>	<b>Secuencia del primer (5' a 3')</b>
<i>SIPIN2</i>	F: 5'-CGT TCA CAA GGA AAA TCG TTA AT-3' R: 5'-CTT GGG TTC ATC ACT CTC TCC-3'
<i>SILOXD</i>	F: 5'-GAC TGG TCC AAG TTC ACG ATC C-3' R: 5'-ATG TGC TGC CAA TAT AAA TGG TTC C-3'
<i>SIJAR1</i>	F: 5'-CAT TGA AAC CAT CTC CTT GA-3' R: 5'-TAA ACT GCT TGC TGC TGT AAA-3'
<i>SIPROSYS</i>	F: 5'-AAT TTG TCT CCC GTT AGA-3' R: 5'-AGC CAA AAG AAA GGA AGC AAT-3'
<i>SINCED3</i>	F: 5'-ACC CAC GAG TCC AGA TTT C-3' R: 5'-GGT TCA AAA AGA GGG TTA GC-3'
<i>SIAOS1</i>	F: 5'-AGA TTT TCT TCC CGA ATA TGC TGA A-3' R: 5'-ATA CTA CTG ATT CAT CAA CGG CAT -3'
<i>SINRT2.1</i>	F: 5'-TTC CTG TTA CAT TTT GTC ATT TCCC C-3' R: 5'-CAG ATT CAA GAC TAT CCA TTC CTC A-3'
<i>SINRT2.2</i>	F: 5'-TCA AGG GAA CGG AAG AAC ATT ATT A-3' R: 5'-GCT CAT TGA ACT AAA GAT TGA CGA T-3'
<i>SINRT2.3</i>	F: 5'-AAT GCA TGG TGT TAC TGG TAG AGA-3' R: 5'-CTA ATA ATA GGG ACT AAA GGG GCT G-3'
<i>SIEF1</i>	F: 5'-GAT TGG TGG TAT TGG AAC TGT-3' R: 5'-AGC TCG TGG TGC ATC TC-3'

Tabla 2: Primers específicos para la RT-PCR. F: forward. R: reverse.

### **3.11 Análisis de la expresión génica**

La expresión relativa de los genes se realizó con un termociclador Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La muestra de cDNA (1  $\mu$ l) fue mezclada con 5  $\mu$ l de SYBR Green, 3  $\mu$ l de agua libre de RNAsa y 0'5  $\mu$ l de cada uno de los primers. Se usó un programa de: 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 55°C y 20 segundos a 72°C. La curva de Melting se estableció a 60°C durante 10 segundos y 95°C durante 15 segundos.

La cuantificación relativa de los genes diana, se realizó respecto a la expresión del gen constitutivo. Para ello se realizaron las curvas de calibración de cada uno de los genes con diferentes diluciones de una mezcla del cDNA de cada una de las muestras.

### **3.12 Análisis estadístico**

Para analizar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos, se realizó un análisis ANOVA y un test LSD (con un intervalo de confianza al 95%) con el programa de análisis estadístico Statgraphics.

## 4 Resultados

### 4.1 Evaluación del grado de resistencia de cada tratamiento frente a *B. cinerea*.

En la figura 3 se muestra la expresión relativa del gen constitutivo *BcTubulin* de *B. cinerea* frente al gen constitutivo *EF1* de las plantas de tomate. De esta forma se calcula la cantidad de biomasa del hongo presente en la planta, indicando el éxito o el fracaso de la respuesta dada por cada planta.

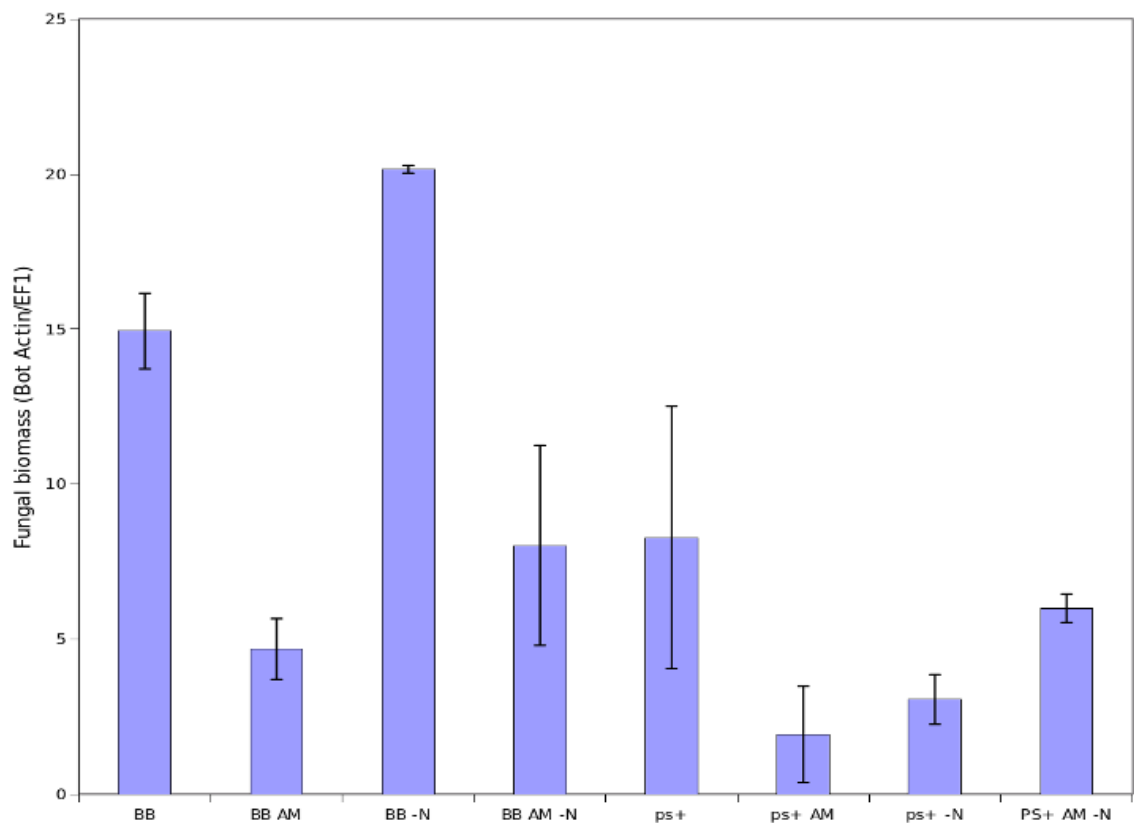


Figura 3. Expresión relativa de la biomasa del hongo *B. cinerea* en cada uno de los tratamientos infectados.

En la figura 3 se puede comprobar que en todos y cada uno de los tratamientos utilizados en el estudio, la micorriza ha protegido a la planta más que su control sin micorrizar. También se observa una tendencia cuando las plantas están en situación de carencia en la que la incidencia del hongo es mayor, indicando que el estado nutricional de la planta influye en la respuesta defensiva que la planta es capaz de dar.

Además, los tratamientos realizados con el mutante sobreexpresor de prosistemina (PS+) estuvieron menos afectados por el hongo que sus tratamientos respectivos con la variedad control *BetterBoy* (BB).

#### 4.2 Efecto de la infección de *B. cinerea* y la carencia de nitrógeno a las 6 horas post-infección en la expresión de genes de defensa en plantas micorrizadas.

Las siguientes figuras muestran la expresión relativa de los genes analizados 6 horas después de la infección con *B. cinerea*. Los datos que se muestran están expresados en Niveles de *Expresión Relativa*, y además, están normalizados respecto al control, BB en cada tiempo de muestreo.

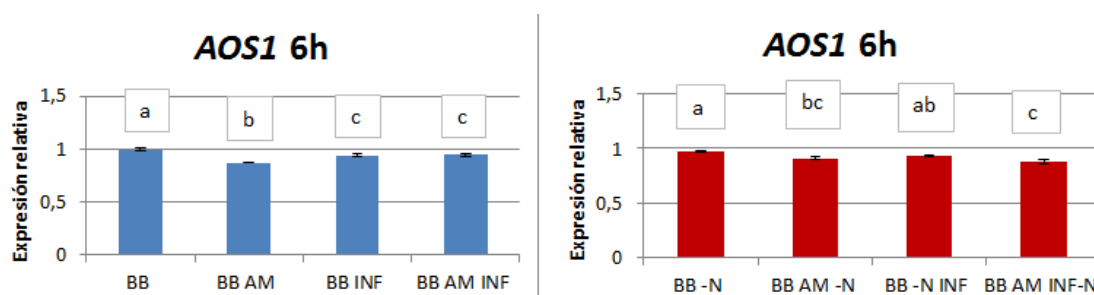


Figura 4. Expresión relativa de *AOS1* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Para poder comprobar el efecto de MIR sobre el inicio de la ruta de las oxilipinas se determinó el nivel de mRNA del gen *AOS1*. La expresión del gen *AOS1* muestra unas variaciones mínimas aunque significativas. En ausencia de carencia, las plantas micorrizadas presentan una menor expresión del gen. Las plantas infectadas, tanto las micorrizadas como las que no, no presentan diferencias entre ellas (Fig. 4).

En las plantas con carencia, aquellas que estaban micorrizadas presentaron una menor expresión que el control, mientras que las plantas infectadas sin micorrizar no presentaron diferencias.

A pesar de haber obtenido diferencias significativas en algunos de los tratamientos, la carencia y la infección no parece tener una elevada relevancia biológica sobre la expresión de *AOS1* en raíz.



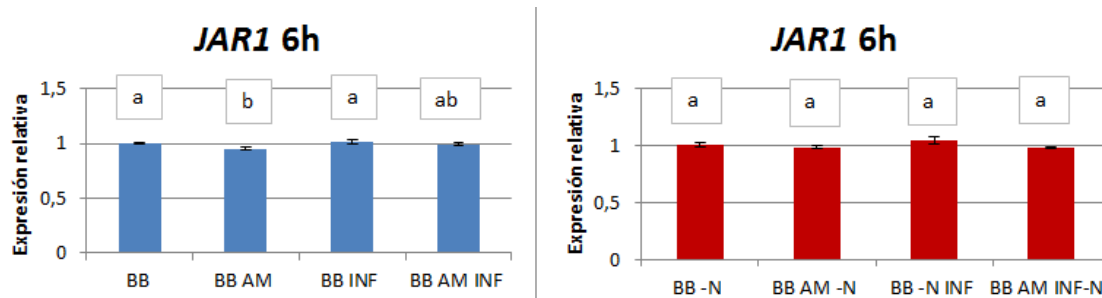


Figura 5. Expresión relativa de *JAR1* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

La expresión del gen *JAR1* disminuyó en las plantas que solamente estaban micorrizadas. Los niveles de expresión se mantuvieron cuando la planta fue infectada, lo que parece indicar que el aumento de la resistencia observada en plantas micorrizadas no está mediada por este gen al menos en la raíz (Fig. 5). En las plantas con carencia de nitrógeno no hubo diferencias entre tratamientos, pareciendo confirmar que *JAR1* no ha mediado en ningún tipo de respuesta a las 6 horas post-infección.

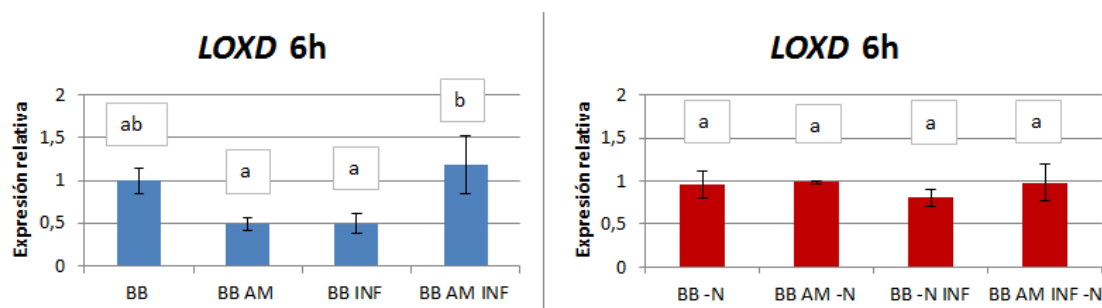


Figura 6. Expresión relativa de *LOXD* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *LOXD* aumentó su expresión en las plantas que fueron sometidas a los tratamientos de micorrización e infección (BB AM INF) respecto a aquellas que estaban solamente micorrizadas (BB AM) o infectadas (BB INF), mostrando que la micorriza induce este gen cuando la planta es atacada (Fig. 6).

En condiciones de carencia de nitrógeno, *LOXD* no muestra diferencias en su expresión en ninguno de los tratamientos, indicando que la disponibilidad de nitrógeno en la planta influye en la expresión de este gen.

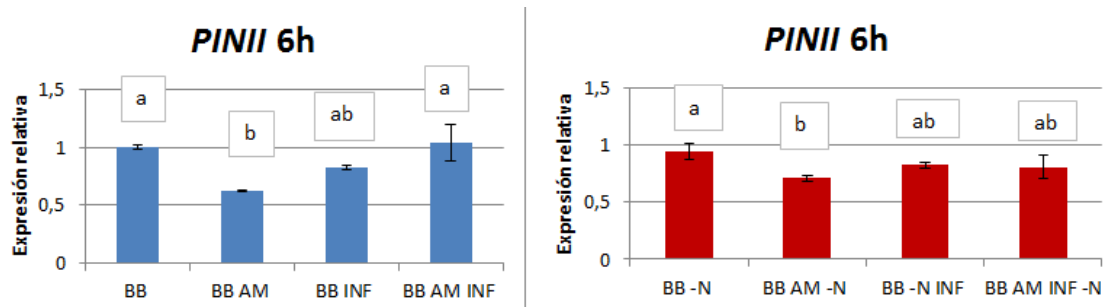


Figura 7. Expresión relativa de *PINII* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

La expresión del gen *PINII* mostró un comportamiento similar entre las plantas con y sin carencia de nitrógeno. En ambos casos la expresión relativa de *PINII* disminuyó cuando la planta estaba micorrizada (BB AM y BB AM -N) respecto a sus controles (BB Y BB -N). Cuando las plantas estaban infectadas, no hubo diferencias entre si estaban micorrizadas o no (Fig. 7).

Cabe mencionar que pese a que no son datos significativos, las plantas micorrizadas poseen los genes *LOXD* y *PINII* más inducidos en condiciones de infección cuando se comparan con los controles (BB INF).

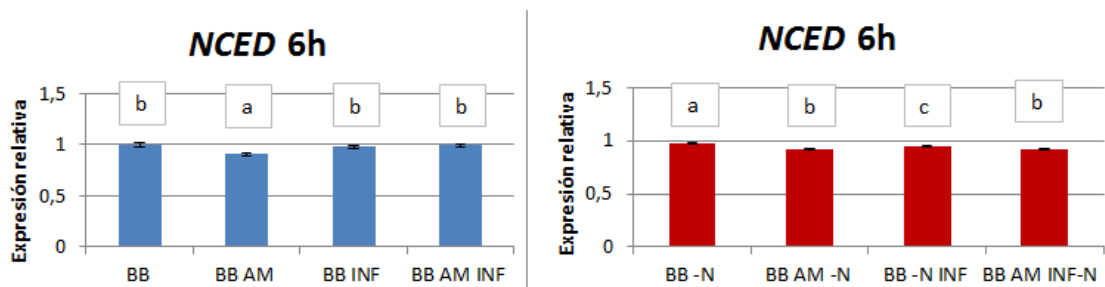


Figura 8. Expresión relativa de *NCED3* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El estudio de la expresión del gen *NCED3* reveló algunas diferencias estadísticas significativas, pero que biológicamente hablando no tienen importancia debido a su mínima variación. Esto ocurrió tanto en las plantas con carencia como en las que no tenía una limitación de nitrógeno. Este resultado sugiere que la ruta de síntesis de ABA en las raíces no parece tener influencia en los fenotipos observados (Fig. 8).

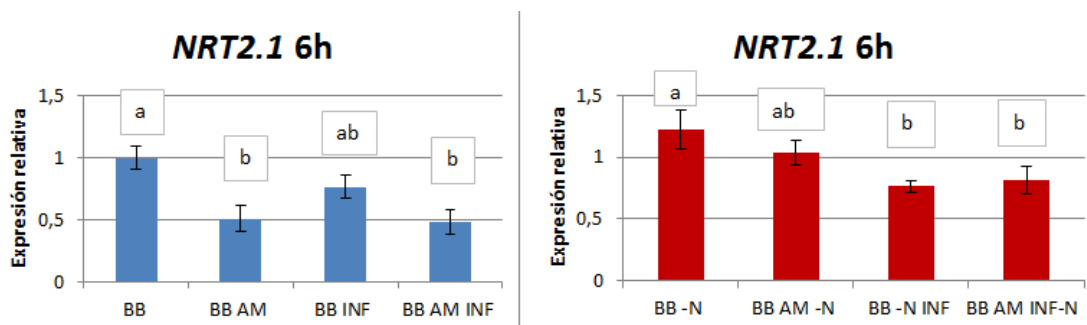


Figura 9. Expresión relativa de *NRT2.1* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

En lo referente al gen *NRT2.1*, su expresión disminuyó cuando las plantas estaban micorrizadas (BB AM y BB AM INF) respecto al control (Fig. 9).

Cuando las plantas estaban en condiciones de carencia, este gen se indujo más respecto a sus tratamientos respectivos sin carencia de nitrógeno. Esto es debido a la activación de este gen en bajas concentraciones de nitrógeno. En condiciones de infección del hongo (BB INF -N y BB AM INF -N) el gen se expresó en menor cantidad que respecto a su control (BB -N).

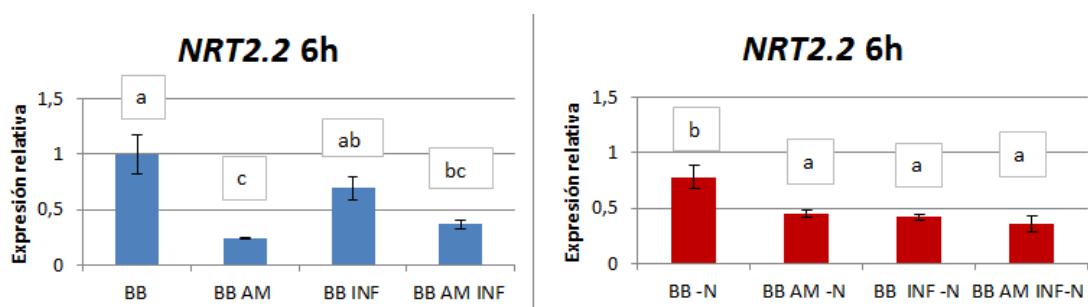


Figura 10. Expresión relativa de *NRT2.2* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Las plantas control, BB, tuvieron una mayor expresión del gen *NRT2.2* que las plantas micorrizadas (BB AM y BB AM INF). Estas dos últimas no presentaron diferencias entre ellas. BB AM tuvo una menor expresión que las plantas infectadas sin micorrizar BB INF (Fig. 10).

En las plantas con carencia de nitrógeno, la expresión del gen *NRT2.2* se redujo en los tratamientos BB AM -N, BB INF -N y BB AM INF -N respecto al control en carencia BB -N.

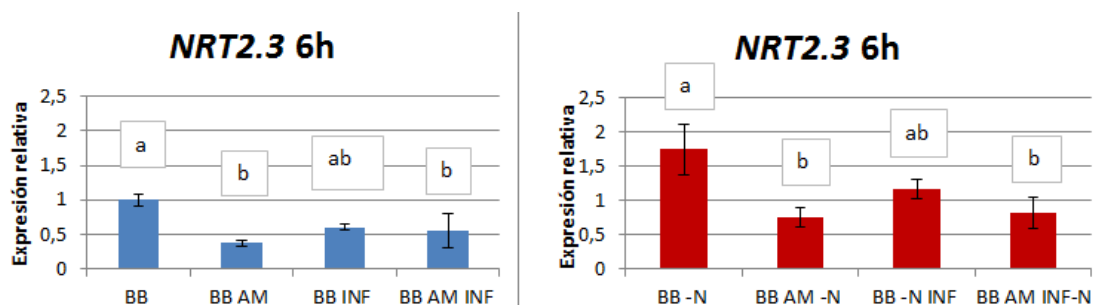


Figura 11. Expresión relativa de *NRT2.3* 6 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *NRT2.3* tuvo una menor expresión en las plantas que estaban micorrizadas (BB AM y BB AM INF) respecto al control (BB). Las plantas infectadas (BB INF) no presentaron ninguna diferencia con el resto de tratamientos (Fig. 11).

En las plantas con carencia de nitrógeno se repitió el mismo patrón que en las fertilizadas con normalidad. Ambos tratamientos con plantas micorrizadas (BB AM -N y BB AM INF -N) tuvieron una menor expresión del gen *NRT2.3* que el control en carencia (BB -N).

Comparando los tratamientos con carencia con los que no tenían la carencia, se observa que el gen *NRT2.3* se expresó en mayor cantidad cuando las condiciones de nitrógeno no eran las óptimas para las plantas. Esto sugiere que el gen *NRT2.3* de tomate tiene un comportamiento similar al gen *NRT2.1* de Arabidopsis, no solo frente a carencia de N sino también frente a la respuesta a la infección.

#### 4.3 Efecto de la micorriza sobre la infección de *B. cinerea* y la carencia de nitrógeno a las 48 horas post-infección.

Las siguientes figuras muestran la expresión relativa de los genes analizados 6 horas después de la infección con *B. cinerea*. Los datos que se muestran están expresados en *Expresión relativa*, y además, están normalizados respecto al control, BB en cada tiempo de muestreo.

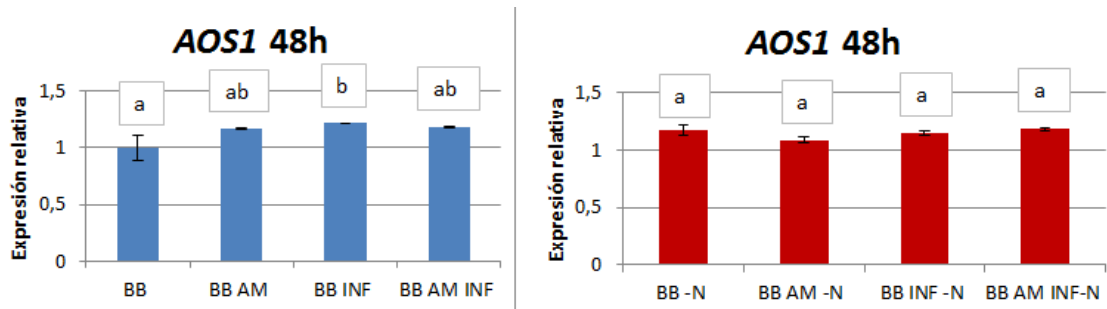


Figura 12. Expresión relativa de *AOS1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *AOS1* no muestra diferencias biológicas significativas, ya que aunque en las muestras de los tratamientos sin carencia sí que existen unas pequeñas diferencias significativas, éstas no indican que el gen *AOS1* tenga alguna incidencia en la protección de la micorriza frente a la infección por *B. cinerea* (Fig. 12)

Este hecho queda en consonancia con los resultados obtenidos a las 6 horas post-infección (Fig. 4).

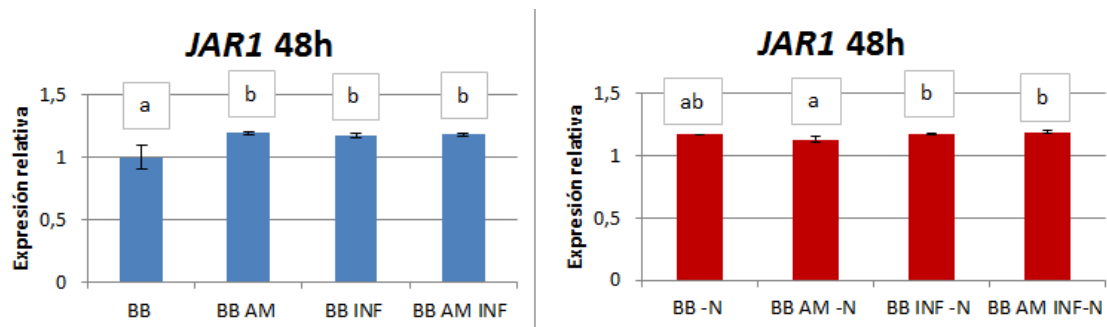


Figura 13. Expresión relativa de *JAR1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Igual que pasaba con las muestras analizadas a las 6 horas post-infección, las diferencias encontradas en la expresión del gen *JAR1*, aunque son significativas estadísticamente en algunos casos, no parece tener estas diferencias significancia biológica (Fig. 13). Esto ocurre tanto para los tratamientos con una correcta fertilización como para aquellos a los que se les aplicó una carencia de nitrógeno. Es destacable que las plantas control responden a la infección activando el gen *JAR1*, sin embargo la carencia de N antagoniza esta situación, lo que sugiere una mayor susceptibilidad de las plantas en condiciones de carencia, tal y como se ha podido comprobar en el fenotipado de resistencia (Fig. 3).

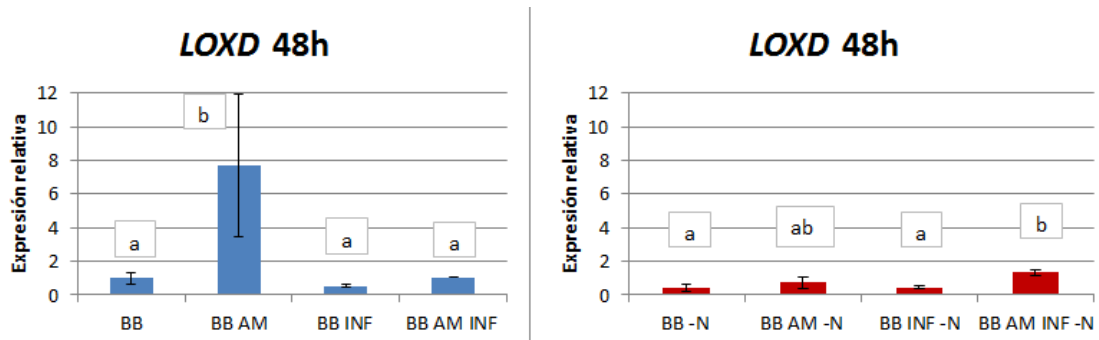


Figura 14. Expresión relativa de *LOXD* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *LOXD* se expresó en mayor cantidad en el tratamiento micorrizado (BB AM), aunque solamente presentó diferencias significativas frente a las plantas infectadas (BB INF).

En los tratamientos con carencia de nitrógeno, *LOXD* tuvo una mayor expresión en BB AM INF -N que BB -N y BB INF -N. En este tiempo de muestreo (48 horas) el análisis estadístico sí que muestra diferencias significativas, cosa que no ocurría a las 6 horas. Sin embargo, aunque son significativas, no parecen tener relevancia biológica (Fig.14).

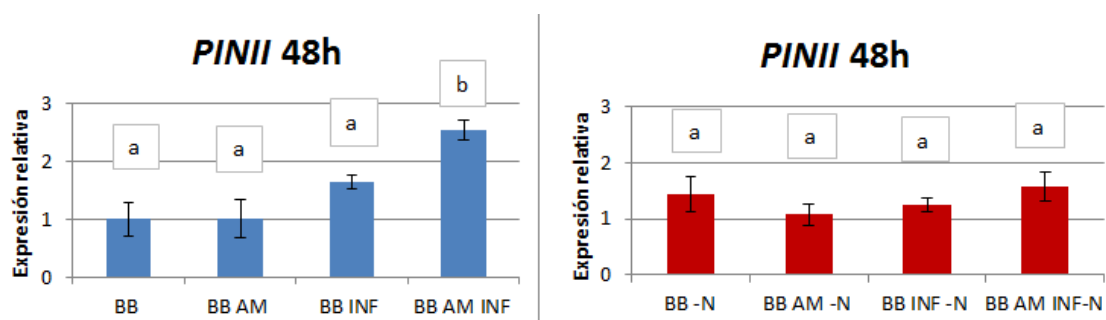


Figura 15. Expresión relativa de *PINII* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

En las plantas que recibieron una fertilización normal, la micorriza indujo una mayor expresión del gen *PINII* en las plantas que habían sido infectadas (BB AM INF). En este caso no se repite el patrón que se encontró a las 6 horas (Fig. 7). Queda claro por tanto que la influencia positiva de los genes de defensa implicados en la ruta de las oxilipinas están inducidos por los AMF, aunque es cierto que la exposición a una carencia transitoria de nitrógeno elimina esta inducción (Fig. 15).

En las plantas que recibieron una solución de carencia de nitrógeno, no se encontraron diferencias entre sí en la expresión del gen *PINII*.

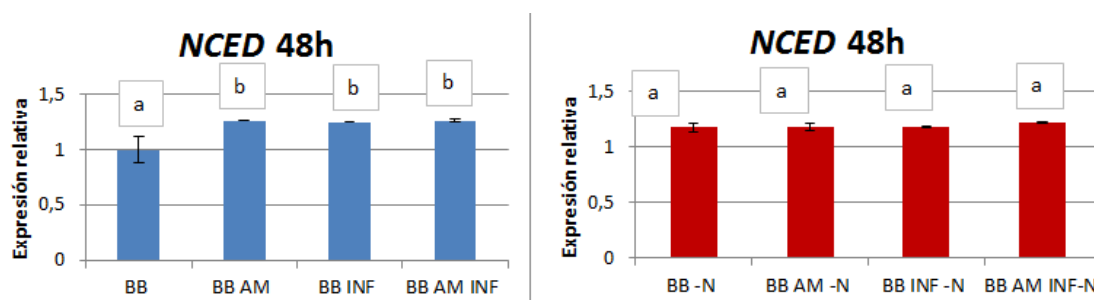


Figura 16. Expresión relativa de *NCED3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *NCED3* aumentó su expresión en las plantas que fueron micorrizadas (BB AM), infectadas (BB INF) o ambas cosas (BB AM INF). En cambio, en las plantas con carencia de nitrógeno no se encontraron diferencias entre los diferentes tratamientos (Fig. 16).

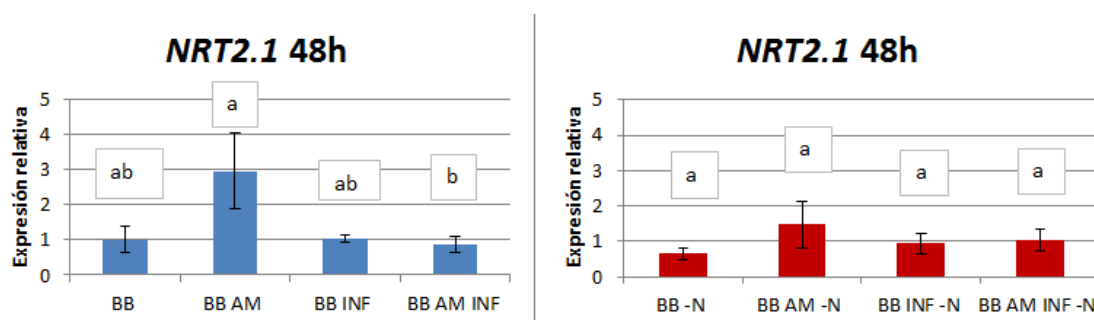


Figura 17. Expresión relativa de *NRT2.1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Pasadas 48 horas después de la infección, el gen *NRT2.1* se expresó en mayor cantidad en las plantas micorrizadas (BB AM), aunque solamente tuvo diferencias significativas con el tratamiento de micorriza e infección (BB AM INF).

En las plantas con carencia, no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos (Fig. 17).

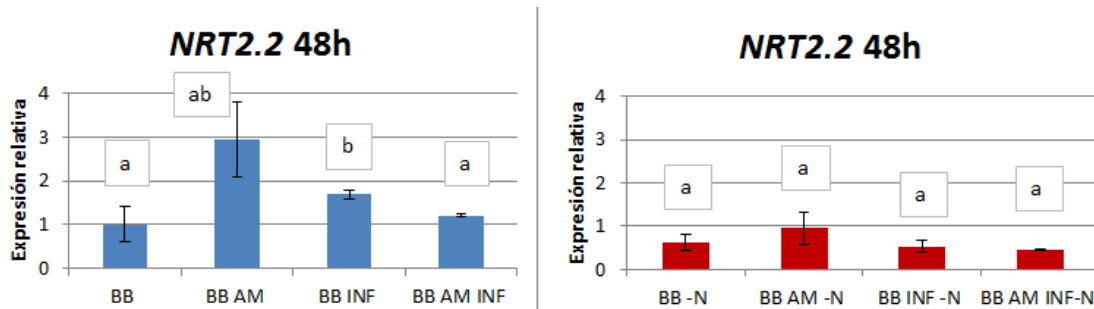


Figura 18. Expresión relativa de *NRT2.2* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Aunque la expresión del gen *NRT2.2* en las plantas micorrizadas (BB AM) es mayor que en el resto de tratamientos, no existen diferencias significativas con ellos. Las únicas diferencias existentes en condiciones de fertilización óptima, se encuentran en las plantas infectadas (BB INF), que presentan una mayor expresión que el control (BB) y las plantas micorrizadas e infectadas (BB AM INF).

En las plantas con carencia de nitrógeno no se encuentran diferencias entre tratamientos. Se observa que la expresión de este gen ha disminuido cada uno de los tratamientos respecto a las plantas que no tenían carencia (Fig.18).

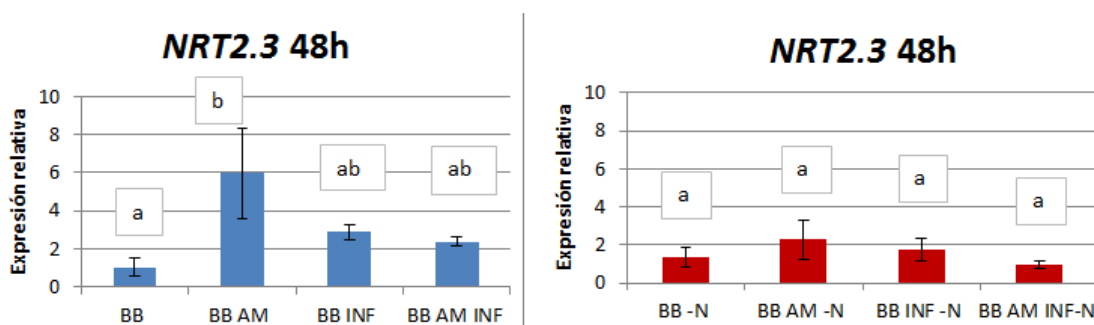


Figura 19. Expresión relativa de *NRT2.3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea*. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *NRT2.3* experimenta un aumento de su expresión en el tratamiento con micorriza (BB AM) respecto al control (BB), aunque no muestra diferencias significativas con los otros tratamientos (BB INF y BB AM INF).

La carencia parece tamponar el efecto de la micorriza, ya que la expresión de este gen se reduce, haciendo que no haya diferencias significativas. Además, la



expresión de *NRT2.3* se redujo en los tratamientos con carencia respecto a los que tenían una fertilización normal (Fig. 19).

A diferencia de lo observado a 6hpi, la carencia de N no induce la expresión de los genes de la familia NRT2, lo que muestra que éstos genes poseen una curva de inducción (de-represión) rápida que a las 54 horas (48+6) tras la imposición de la carencia, aún se aprecia, sin embargo a las 98 h post carencia se pierde.

#### 4.4 Efecto de la sobreexpresión de prosistemia en la resistencia inducida por micorriza (MIR).

En las siguientes figuras se muestran los datos obtenidos a partir de los cultivares de tomate que sobreexpresan prosistemia (PS+). Los datos se muestran en *Expresión relativa*, y además están normalizados respecto a la expresión del cultivar *BetterBoy* (BB) utilizado como control, ya que así se puede estudiar los efectos de la prosistemia.

##### 4.4.1 Efecto de la prosistemia en MIR en tiempos tempranos.

En este análisis, faltan los datos pertenecientes a las muestras del control (PS+) y de las plantas con carencia de nitrógeno e infectadas (PS+ INF -N). Esta ausencia se debe a unos problemas durante el muestreo de estas plantas, que hicieron que no se dispuso de material vegetal para la extracción del RNA. Por tanto, el siguiente análisis de resultados se hará obviando estos tratamientos.

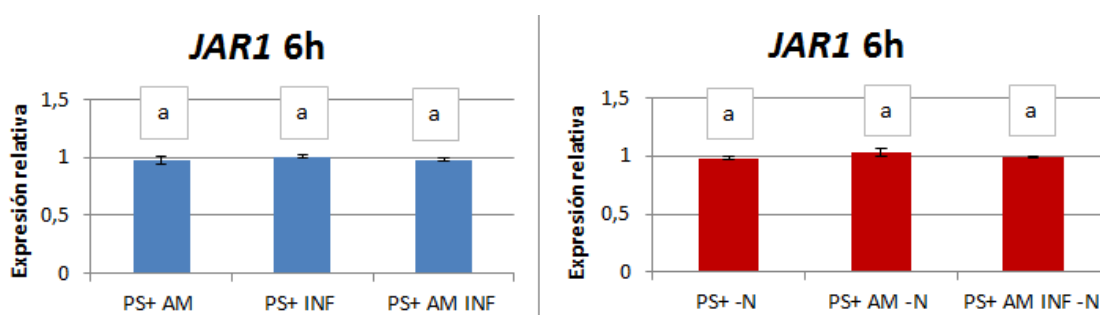


Figura 20. Expresión relativa de *AOS1* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

La expresión del gen *AOS1* ha experimentado un comportamiento similar al de los tratamientos realizados con BB (Fig. 4 y Fig. 12). PS+ INF tuvo una mayor expresión que PS+ AM y PS+ AM INF, aunque las diferencias fueron mínimas (Fig.

20). A pesar de que hay variaciones significativas, de nuevo, la relevancia biológica de esas variaciones es previsiblemente escasa.

En cuanto a los tratamientos con carencia de nitrógeno, se repite el mismo patrón obtenido con BB, ya que el nivel de expresión del gen es similar entre las dos variedades, y las diferencias encontradas entre los tratamientos de PS+ son mínimas.

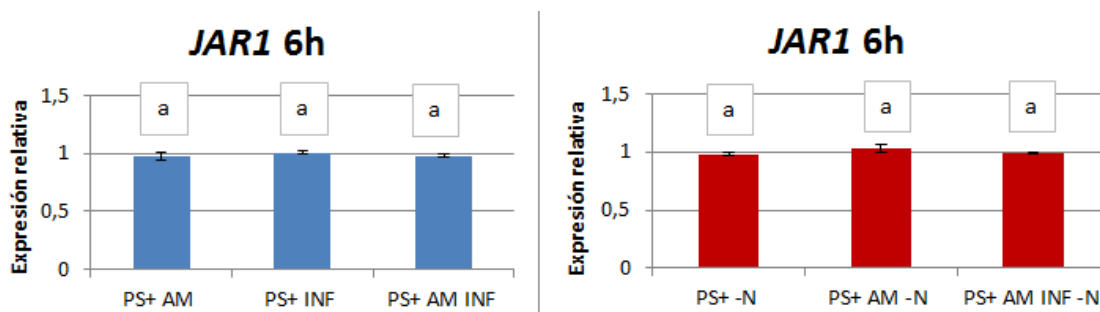


Figura 21. Expresión relativa de *JAR1* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *JAR1* no presenta ninguna variación en su expresión, tanto en las plantas con carencia como en las que no (Fig. 21). Además, los niveles de expresión del gen son iguales a los obtenidos con las variedades BB (Fig. 5 y Fig. 13).

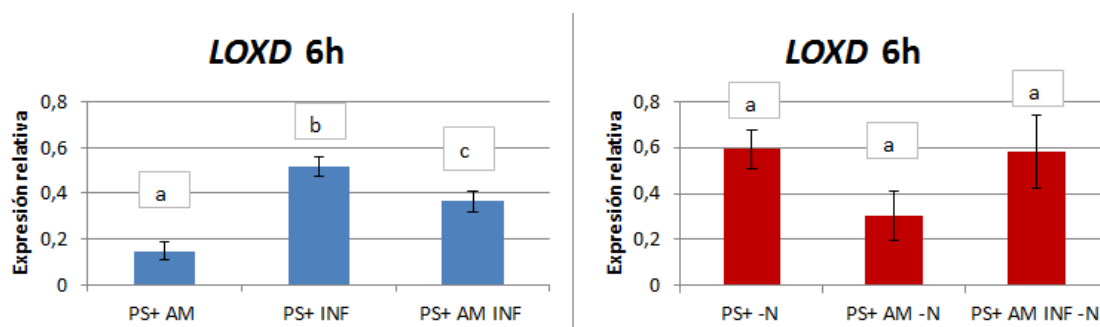


Figura 22. Expresión relativa de *LOXD* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

En los tratamientos sin carencia de nitrógeno los tratamientos infectados con *B. cinerea* (PS+ INF y PS+ AM INF) tuvieron una mayor expresión del gen *LOXD* (Fig. 22). Además, hubo diferencias entre ellos, ya que PS+ INF aumentó la expresión del gen respecto a PS+ AM INF. En este caso las plantas sobreexpresoras de prosistemia tuvieron una menor expresión de *LOXD* que las del cultivar BB.

Es destacable que al aplicar la carencia de nitrógeno, las diferencias observadas en la expresión de *LOXD* desaparecen. En las plantas con carencia no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos a tiempos tempranos (Fig. 22), igual que pasaba con las plantas BB en carencia (Fig. 6 y Fig. 14). En este caso la expresión de *LOXD* en PS+ también se redujo respecto a las plantas BB.

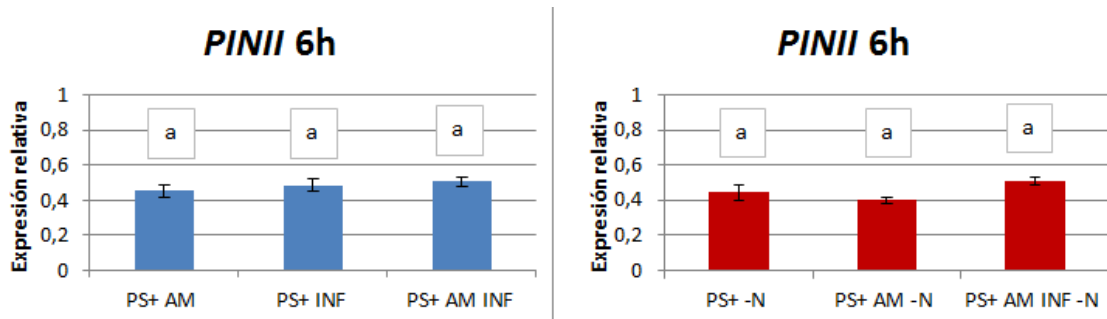


Figura 23. Expresión relativa de *PINII* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Los niveles de expresión del gen *PINII* no tuvieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, tanto en las plantas con carencia como en las que tuvieron una fertilización normal (Fig. 23). Además entre ellos tuvieron una misma expresión relativa del gen, aunque menor que en el de las variedades BB (Fig. 7 y Fig. 15).

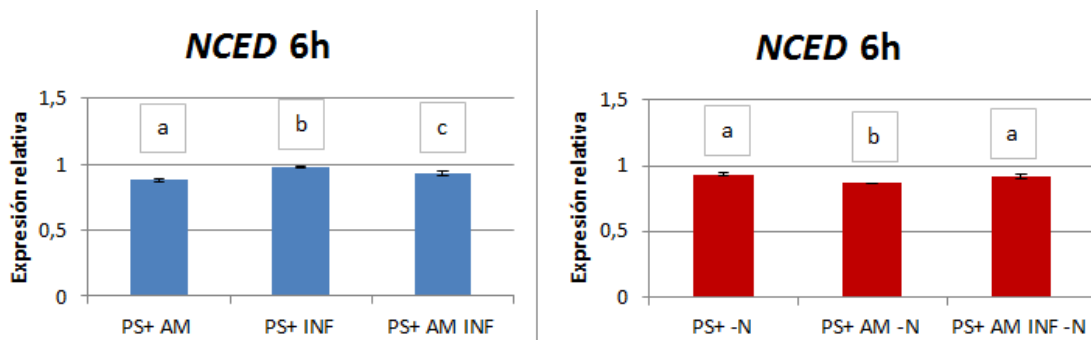


Figura 24. Expresión relativa de *NCED3* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *NCED3* se expresó en las mismas cantidades que las obtenidas en los tratamientos con BB (Fig. 8 y Fig. 16). Las pequeñas variaciones obtenidas entre los tratamientos sin carencia, mostraron que *NCED3* se expresó en cantidades un poco mayores cuando se produjo la infección del patógeno (PS+ INF y PS+ AM INF).

En las plantas con carencia la micorriza (PS+ AM -N) tuvo una menor expresión que los otros dos tratamientos (Fig. 24).

Por lo tanto es destacable que casi en todos los casos analizados, los genes que interviene en la biosíntesis o señalización de oxilipinas y ABA no muestran alteraciones destacables debido a la infección o a la carencia de N en el sobreexpresor de prosistemia.

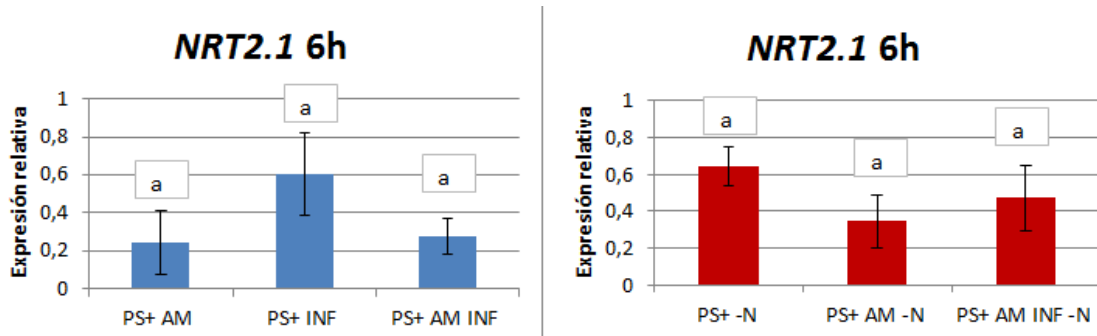


Figura 25. Expresión relativa de *NRT2.1* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

La expresión del gen *NRT2.1* en las plantas PS+ no tuvo diferencias significativas entre tratamientos, tanto en las plantas con carencia como en las que no (Fig. 25). Los niveles de expresión del gen en las plantas PS+ fueron menores que los obtenidos en los tratamientos con BB (Fig. 9 y Fig. 17).

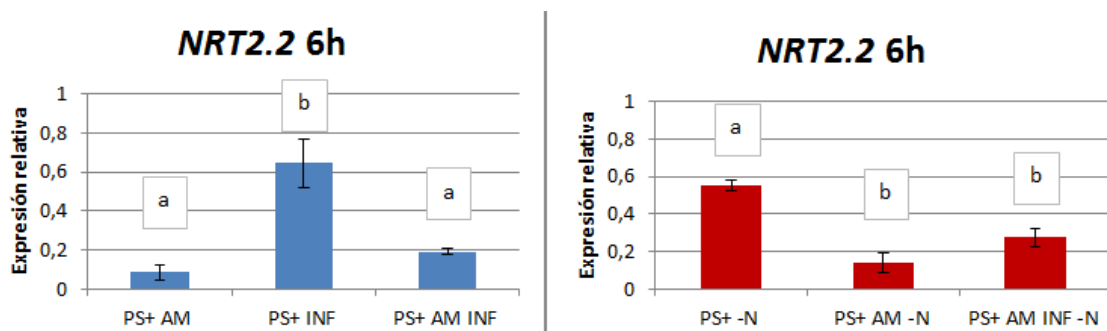


Figura 26. Expresión relativa de *NRT2.2* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *NRT2.2* se expresó en mayores cantidades cuando se produjo la infección (PS+ INF). Este comportamiento es similar al obtenido con los tratamientos con BB (Fig. 10 y Fig. 18), ya que la expresión del gen también aumentó en este caso (Fig. 26).

En los tratamientos con carencia, se repite el patrón de expresión obtenido en los tratamientos con BB, ya que las plantas del tratamiento con carencia (PS+ -N) tuvieron una mayor expresión que los otros tratamientos (PS+ AM -N y PS+ AM INF -N).

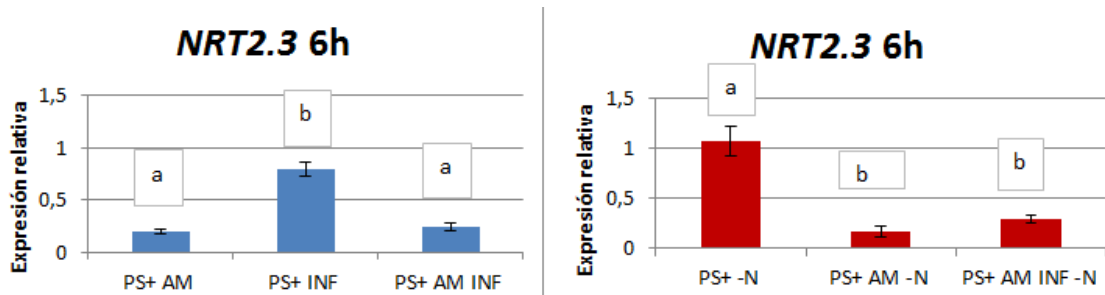


Figura 27. Expresión relativa de *NRT2.3* 6 horas post- infección en PS+. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *NRT2.3* se comportó de la misma forma que lo había hecho el gen *NRT2.2* analizado anteriormente (Fig. 26). La infección aumentó la expresión del gen (PS+ INF), mientras que la micorriza parece tamponar el efecto de la infección (Fig. 27).

En los tratamientos con carencia, también se repite el patrón de comportamiento obtenido en el gen *NRT2.2*. Las plantas micorrizadas, tanto las infectadas como las que no, tuvieron una menor expresión del gen que las plantas que solo estaban en carencia (PS+ -N).

Tras la determinación de la expresión de todos los genes de la familia *NRT2* a tiempos tempranos, es importante destacar que los tres miembros de la familia muestran un comportamiento similar en las plantas PS+, de un modo similar a lo que se observó en plantas silvestres BB.

#### 4.4.2 Efecto de la prosistemina en MIR en tiempos tardíos.

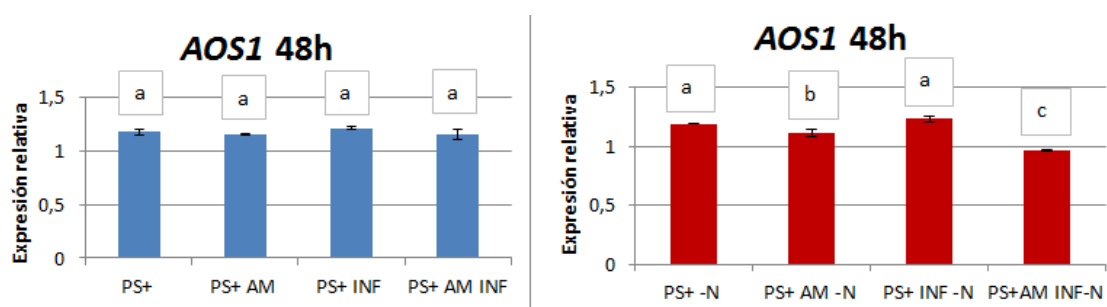


Figura 28. Expresión relativa de *AOS1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina (PS+). Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

La expresión del gen *AOS1* no mostró diferencias entre tratamientos en las plantas con una fertilización normal. En cambio en las plantas con carencia se observaron pequeñas diferencias significativas en las que fueron micorrizadas (PS+ AM -N y PS+ AM INF -N), ya que la expresión del gen fue ligeramente menor. En cualquier caso, tal y como se observó a tiempos tempranos, la variación en la expresión es realmente baja aun siendo significativa (Fig. 28).

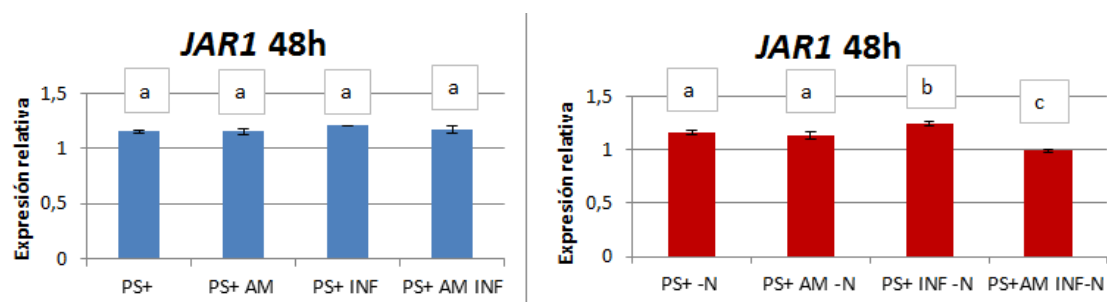


Figura 29. Expresión relativa de *JAR1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

El gen *JAR1* no tuvo diferencias entre los tratamientos con una fertilización completa (Fig. 29). Los niveles de expresión del gen fueron similares a los obtenidos con los tratamientos hechos con BB (Fig. 5 y Fig. 13).

En los tratamientos con carencia de nitrógeno se observaron diferencias en las plantas infectadas con el patógeno respecto a las que no lo estaban. La infección (PS+ INF -N) aumentó ligeramente la expresión de *JAR1*, mientras que en las plantas

infectadas y micorrizadas (PS+ AM INF -N) la expresión del gen se redujo mínimamente (Fig. 29).

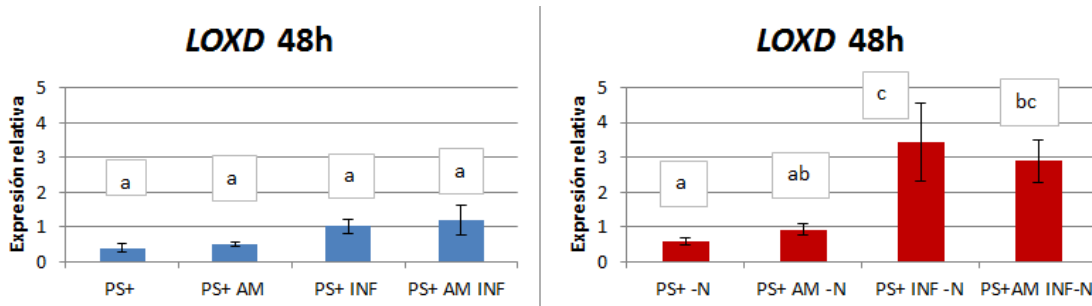


Figura 30. Expresión relativa de *LOXD* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Se observa que la expresión del gen *LOXD* en plantas sobreexpresoras es inferior a las plantas silvestres BB en ausencia de estrés por infección o por carencia de nitrógeno. En el caso de plantas fertilizadas con normalidad se observa que la infección causa un incremento en la acumulación del mRNA de *LOXD*, aunque este aumento es independiente de la micorrización. Curiosamente se aprecia que la carencia de nitrógeno tiene un efecto positivo en la expresión de este gen tanto en ausencia de infección como en plantas infectadas. Por otro lado *LOXD* se comporta del mismo modo en la micorriza y en las plantas no micorrizadas (Fig.30).

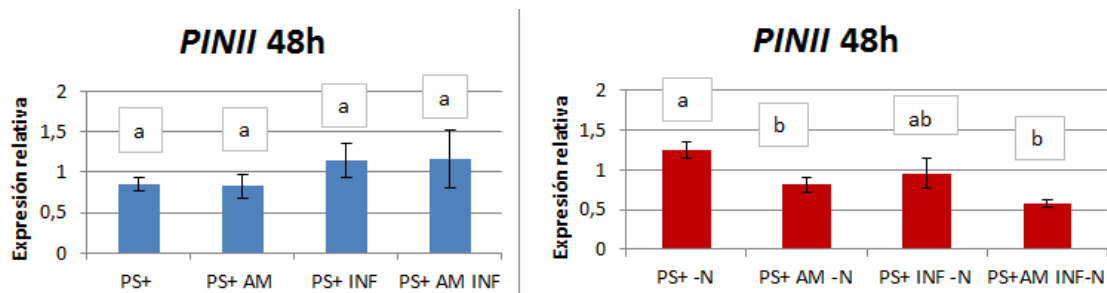


Figura 31. Expresión relativa de *PINII* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Es destacable que en ausencia de estrés los niveles basales de *PINII* en plantas PS+ son superiores a los observados en BB. Por otro lado el gen *PINII* no presenta cambios en su expresión entre los tratamientos realizados sin carencia de nitrógeno (Fig.

31). En comparación con los datos obtenidos en la variedad BB, en este caso la micorriza no ha inducido un aumento de la expresión del gen (Fig. 15).

En plantas sometidas a una carencia de nitrógeno, la micorriza tiene un efecto negativo en la expresión de *PINII*.

Tanto en las plantas con carencia como en las fertilizadas correctamente la expresión del gen fue menor que la obtenida en los tratamientos con BB (Fig. 7 y Fig. 15).

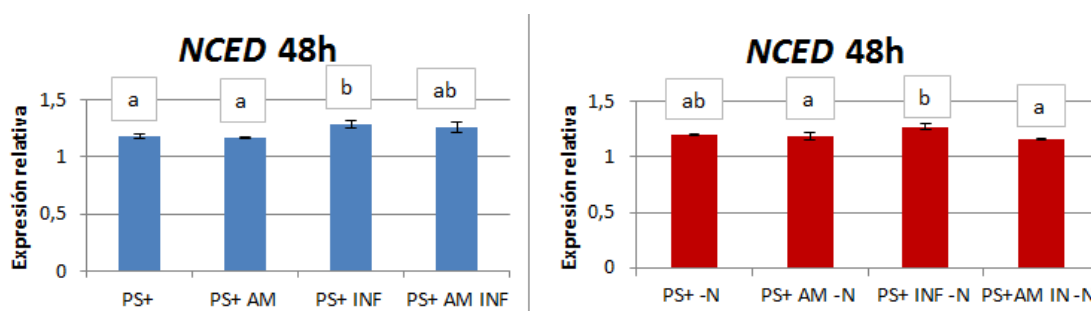


Figura 32. Expresión relativa de *NCED3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemia. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

En los tratamientos realizados sin carencia de nitrógeno se ha observado que las plantas infectadas (PS+ INF) tuvieron una mayor expresión del gen que las plantas control (PS+) y las plantas micorrizadas (PS+ AM).

En las muestras con carencia de nitrógeno también se observó el mismo comportamiento, ya que en las plantas infectadas (PS+ INF -N) el gen *NCED3* mostró un mayor nivel de expresión (Fig. 32).

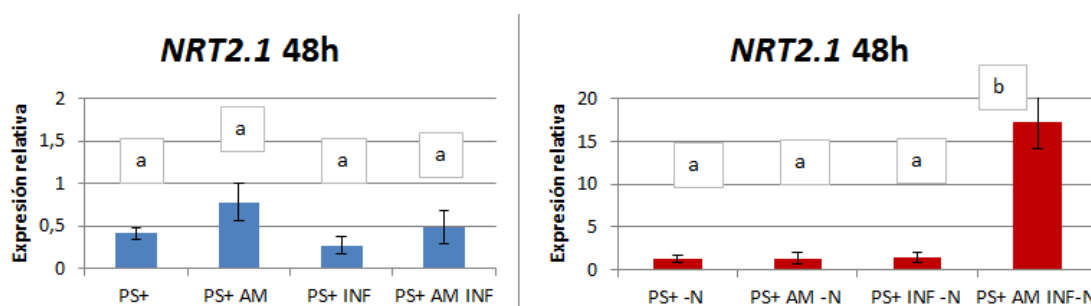


Figura 33. Expresión relativa de *NRT2.1* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemia. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).



La expresión del gen *NRT2.1* no tuvo diferencias entre los tratamientos realizados en plantas con una fertilización normal (Fig. 33). Comparando estos datos con los obtenidos en los tratamientos realizados con la variedad BB (Fig. 9 y Fig. 17), se observa que la expresión del gen en este caso ha sido menor.

Las plantas sometidas a carencia han tenido una expresión del gen *NRT2.1* 15 veces mayor en el tratamiento con plantas micorrizadas e infectadas (PS+ AM INF -N) que en el resto de las plantas. Este comportamiento no se encontró en las muestras de BB, donde no había diferencias entre tratamientos.

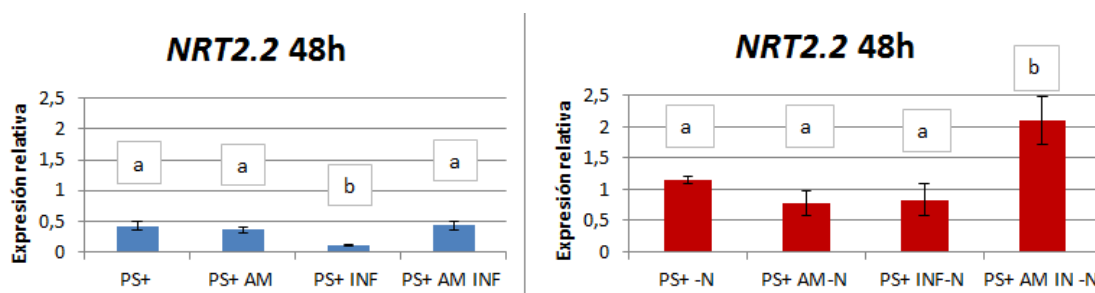


Figura 34. Expresión relativa de *NRT2.2* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemia. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

Las plantas tratadas con una fertilización normal tuvieron diferencias en el tratamiento con infección (PS+ INF), que tuvo una expresión menor que el resto de los tratamientos (Fig. 34). El gen *NRT2.2* tuvo una menor expresión en los tratamientos realizados con PS+ en comparación con los realizados con BB (Fig. 10 y Fig. 18).

Cuando las plantas se sometieron a una carencia de nitrógeno, el tratamiento con micorriza e infección (PS+ AM INF -N) tuvo el doble de expresión que el resto de tratamientos.

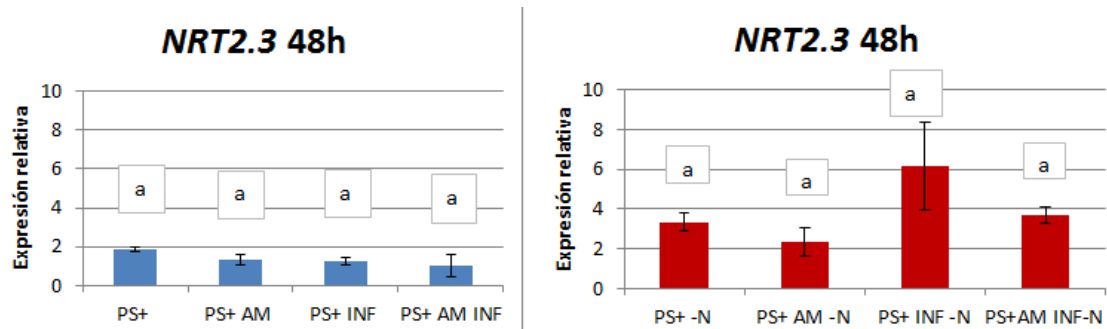


Figura 35. Expresión relativa de *NRT2.3* 48 horas después de la infección por *B. cinerea* en un sobreexpresor de prosistemina. Las letras marcan las diferencias significativas, calculadas por ANOVA y el test LSD (95%).

La expresión del gen *NRT2.3* no tuvo diferencias entre los tratamientos realizados en plantas con una fertilización normal (Fig. 35). En este caso PS+ AM no experimentó un aumento de su expresión como sí ocurría en los tratamientos con BB (Fig. 11 y Fig. 19).

Como ya ocurría con los tratamientos con BB en carencia de nitrógeno, PS+ tampoco mostró diferencias entre tratamientos cuando se les aplicó la carencia de nitrógeno. Aunque no hubo diferencias la expresión de *NRT2.3* en carencia fue mayor en las plantas de las variedades PS+ que en las variedades BB.

En plantas sobreexpresoras, tal y como se observó en plantas BB, la expresión del gen *NRT2.3* en a tiempos tardío tiene un comportamiento diferente a la mostrada por los otros miembros de la familia *NRT2*, lo que sugiere que sus función biológica en la planta puede ser diferente a la de los otros transportadores al igual que se ha descrito en *A. thaliana*.

## 5 Discusión

El análisis fenotípico de la infección ha mostrado que las plantas micorrizadas son más resistentes al ataque de *B. cinerea*, haciendo que los síntomas de la enfermedad sean menores que el control (Fig. 3). A su vez las plantas micorrizadas y sometidas a una carencia puntual de nitrógeno también experimentaron una mayor protección que el control frente al patógeno, aunque en menor medida que las plantas que no tenían reducido el aporte de nitrógeno. Por lo que se observa que la resistencia inducida por micorrizas (MIR) es funcional aunque se ve severamente afectada por una carencia transitoria de nitrógeno. Por otro lado, las plantas sobreexpresoras de prosistemina (PS+) tuvieron una mayor protección frente al patógeno que las plantas de la variedad *Better Boy*.

La carencia puntual de nitrógeno reduce la resistencia inducida por la micorriza frente al patógeno, tal y como se ha visto en el fenotipado, haciendo que el efecto de la micorriza se atenúe, ya que sigue protegiendo pero en menor medida que en las plantas crecidas con fertilización normal.

Rivero y col. (2015) mostraron que las raíces de plantas de tomate micorrizadas tenían alteraciones significativas en la ruta de las oxilipinas. En el presente trabajo, los resultados obtenidos en los genes pertenecientes a la ruta de las oxilipinas (genes *AOS1*, *JAR1* y *LOXD*) sugieren que esta ruta puede jugar un papel clave en la resistencia inducida por micorrizas frente a *B. cinerea*. Diversos autores han puesto de manifiesto la resistencia inducida por micorriza frente a hongos necrótrofos (Fiorilli y col., 2011). En tomate, el hongo *B. cinerea* es capaz de manipular al huésped incrementando los niveles de SA lo que genera una supresión de las defensas dependientes de JA (El-Oirdi y col., 2011). Esta manipulación parece no ser efectiva en el caso de las plantas micorrizadas, ya que el gene *LOXD* de la ruta biosintética del JA se ve aumentado tanto en condiciones de fertilización óptima como tras aplicar una carencia puntual de nitrógeno, aunque en menor medida.

La carencia puntual de nitrógeno, parece afectar tanto a la magnitud como la rapidez de la respuesta de la planta frente a la infección por *B. cinerea*; así el aumento de la expresión de *LOXD* en se vio a las 6 horas tras la infección en plantas micorrizadas mientras que las plantas micorrizadas sometidas a una carencia de nitrógeno transitoria, presentaron esta misma respuesta tras 48 horas desde la infección.

El hecho de que el aumento de la expresión de *LOXD* en los tratamientos con carencia solamente se observe a las 48 horas post-infección en lugar de a las 6 horas, podría demostrar que bajo estas condiciones la planta responde de manera más lenta, ya que la sobreexpresión de los genes de la familia *NRT2* concretamente *NRT2.3* produce una represión de las defensas dependientes de oxilipinas (Pastor y col., 2014).

Las plantas micorrizadas tienden a reprimir la expresión del gen *PINII* en ausencia de infección, mientras que cuando se produce la infección la micorriza muestra incrementos en la expresión de este gen. En condiciones de carencia de nitrógeno, aunque se mantiene la tendencia de una mayor expresión inducida por la micorriza tras la infección por *B. cinerea*, la magnitud de la expresión del gen es menor. Se puede deducir que la resistencia inducida por micorriza es funcional en condiciones de carencia de nitrógeno, ya que protege a la planta tal y como se ha visto en el fenotipado, aunque la magnitud de la respuesta se ve severamente afectada, perdiendo parte de su efectividad.

El ABA se ha descrito en distintos estudios como un hormona influyente en el proceso de micorrización de las raíces. Su papel como represor del SA facilita la colonización y formación de los arbusculos. De hecho se ha demostrado que la micorriza induce la producción de ABA para favorecer el proceso de micorrización (Cameron y col., 2013). En este caso, la simbiosis ya está bien establecida, con lo que podría ser que el papel del ABA ya no fuese relevante.

Esto se concluye ya que el gen *NCED3* de la ruta de biosíntesis de ABA mostró un aumento de su expresión en plantas micorrizadas, mientras que en las plantas no micorrizadas la inducción del gen fue producida por la infección de *B. cinerea*. Sin embargo, en condiciones de carencia de nitrógeno, este patrón de respuesta no se mantiene, aunque biológicamente estas diferencias no son indicativas de un patrón de comportamiento, ya que las barras de error son tan pequeñas que hacen que las pequeñas diferencias encontradas sean estadísticamente significativas, sugiriendo que la ruta de síntesis del ABA en las raíces parece no tener influencia en los fenotipos observados.

Los tres genes de la familia *NRT2* analizados tuvieron comportamientos variados en función de las condiciones experimentales. En las plantas de genotipo silvestre muestreadas 6 horas después de la infección, todos los genes se expresaron menos en

los tratamientos con plantas micorrizadas (AM y AM INF). Esto podría indicar que la mejora de la absorción de nutrientes aportada por la micorriza, tiene como consecuencia que la planta no tenga que activar sus mecanismos de absorción, reduciendo en estos casos la expresión de los genes *NRT2.1*, *NRT2.2* y *NRT2.3*. En las plantas con carencia, solamente el tratamiento AM INF vio reducida su expresión en los tres genes.

Atendiendo a que Camañes y col. (2012) mostraron que el gen *NRT2.1* de *A. thaliana*, similar en secuencia a *NRT2.3* de tomate, tiene un efecto represor de la resistencia, podría interpretarse como un efecto de la micorriza que contribuye a la resistencia en condiciones de infección.

En el mutante sobreexpresor de prosistemina (PS+) muestra también unos niveles de expresión transitorio de los genes de la familia *NRT2* en las plantas micorrizadas. Mientras que a las 6 horas la expresión de los genes *NRT2.2* y *NRT2.3*, en las plantas micorrizadas (AM) y en las micorrizadas e infectadas (AM IMF) en carencia de nitrógeno, descendió respecto al control, pasadas 48 horas después de la infección estas mismas plantas tuvieron un aumento de la expresión de los genes *NRT2.1* y *NRT2.3*.

La colonización de la micorriza tanto en ausencia como en presencia de infección produce una caída de la expresión de los genes de la familia *NRT2*. Teniendo en cuenta que estos genes se han descrito como represores de la resistencia (Camañes y col., 2012; Pastor y col., 2014), es posible que la reducción del mRNA de los *NRT2* esté contribuyendo a una mayor capacidad de la planta para defenderse de la infección.

## 6 Conclusiones

La micorriza protege frente a la infección por *B. cinerea*, aunque su efectividad se ve reducida en condiciones de carencia de nitrógeno.

La respuesta de la planta frente a *B. cinerea* en plantas micorrizadas mediada por la activación del gen *LOXD*, está influenciada por el estado nutricional de la planta, ya que las respuestas en situaciones de carencia de nitrógeno son más lentas.

En la raíz, la micorriza induce la represión del gen *PINII* en tiempos tempranos, mientras que lo activa a posteriori.

El mutante sobreexpresor de prosistemia (PS+) tuvo por norma general una menor expresión de los genes analizados que el control (BB), lo que parece indicar que sus mecanismos de defensa no requieren de una movilización de los genes defensivos.

En las raíces, la inducción de defensa frente a *B. cinerea* en las plantas micorrizadas parece no estar condicionada por la ruta del ABA.

La micorriza induce la represión de los genes de la familia *NRT2*, pudiendo ser este un mecanismo de reducción de la susceptibilidad frente a *B. cinerea*.

Por su comportamiento tanto en condiciones de carencia como en respuesta a la infección, el gen *NRT2.3* se asemeja al gen de *A. thaliana* *NRT2.1*, que está descrito como un transceptor.

El estudio del metaboloma de los distintos tratamientos resulta indispensable para comprender los mecanismos defensivos que sigue la planta en cada una de las condiciones del experimento y confirmar con mayor precisión las conclusiones extraídas con el estudio de la expresión génica.

## 7 Bibliografía

- Akiyama, K., Matsuzaki, K.I. and Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824–827.
- Azcón-Aguilar, C. and Barea, J. M. 1997. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6:457–464.
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., and Conrath, U. 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:425–431
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58, 4019–4026.
- Bouwmeester, H. J., Roux, C., Lopez-Raez, J. A., and Bécard, G. 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci.* 12:224–230.
- Camañes, G., Bellmunt, E., García-Andrade, J., García-Agustín, P. and Cerezo. M. 2012. Reciprocal regulation between *AtNRT2.1* and *AtAMT1.1* expression and the kinetics of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  influxes. *Journal of Plant Physiology* 169 (2012) 268-274
- Camañes, G., Pastor, V., Cerezo. M., García-Andrade, J., Vicedo, B., García-Agustín, P. and Flors, V. 2012. A deletion in *NRT2.1* attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiology*. Vol. 158, pp. 1054-1066.
- Cameron, D., Neal, A., van Mees, S. and Ton, J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci.* 18(10): 539-545. doi:10.1016/j.tplants.2013.06.004.
- Campos-Soriano, L., García-Martínez, J., and Segundo, B. S. 2012. The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defense-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00773.x.

Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Muños S, Daniel-Vedele F, Gojon A (2001). Major alterations of the regulation of root  $\text{NO}_3^-$  uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 127: 262–271

El-Oirdi, M., El-Rahman, T.A., Rigano, L., El-Hadrami, A., Rodriguez, M.C., Daayf, F., Vojnov, A. and Bouarab, K. 2011. Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in Tomato. *Plant Cell*. Vol 23, Issue 6, June 2011, Pages 2405-2421

Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., Krapp, A., Soulié, M. C. and Masclaux-Daubresse, C. 2014. Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/eru323

FAOSTAT, 2011. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>

Fernandez, I. 2013. Papel de los jasmonatos y prosistemina en el establecimiento y desarrollo de una simbiosis micorrízica arbuscular. Universidad de Granada.

Fiorilli, V., Catoni, M., Francia, D., Cardinale, F. and Lanfranco, L. 2011. The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* (2011), 93 (1), 237-242

Fu, Y., Yi, H., Bao, J., Gong, J. 2015. LeNRT2.3 functions in nitrate acquisition and long-distance transport in tomato. *FEBS Letters* 589 (2015) 1072-1079

Gansel, X., Muños, S., Tillard, P., Gojon, A. 2001. Differential regulation of the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J* 26: 143–155

Gfeller, A., Liechti, R., Farmer, E. 2010. Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal*. 3.

Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. Volume 84, Issue 3, 1980, Pages 489-500

Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–227.



- Gojon, A., Krouk, G., Perrine-Walker, F. and Laugier, E. 2011. Nitrate transceptor (s) in plants. *J Exp Bot* 62: 2299–2308
- Hewitt, E. J. 1966. Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. Technical Communication No. 22. Commonwealth Bureau, London.
- Howe, G. 2004. Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul* 23:223–237
- Howe, G. and Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:41–66.
- Howe, G., and Ryan, C. 1999. Suppressors of systemin signaling identify genes in the tomato wound response pathway. *Genetics* 153, 1411–1421.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J. P., et al. 2001.  $\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 29–37. doi:10.1023/A:1008730721037
- Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Raez, J. A. and Pozo, M., J. 2012. Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *J. Chem. Ecol* (2012) 38:651-664. doi 10.1007/s10886-012-0134-6
- Kiefer, E., Heller, W., and Ernst, D. 2000. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 33–39. doi:10.1007/BF02825291
- Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., et al. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333, 880–882. doi: 10.1126/science.1208473.
- Koricheva, J., Gange, A. C., and Jones, T. 2009. Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecology* 90:2088–2097.
- Krouk, G., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M., Tsay, Y. F. 2010. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr Opin Plant Biol* 13: 266–273

- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N.M., Siddiqi, M.Y. and Glass, A.D. (2007) Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol* 143: 425–433
- Linderman, R. G. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol, pp. 1–26, *in* F. L. Pfeleger and R. G. Linderman (eds.), *Mycorrhizae and Plant Health*. APS Press, St. Paul, MN.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. and Ton, J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defence response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 183-193.
- Mariutto, M., Duby, F., Adam, A., Bureau, C., Fauconnier, M.L., Ongena, M. et al. The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC plant biology.* 2011;11: 29 doi: 10.1186/1471-2229-11-29
- Pastor, V., Gamir, J., Camañes, G., Cerezo, M., Sánchez-Bel, P. and Flors, V. 2014. Disruption of the ammonium transporter *AMT1.1* alters basal defenses generating resistance against *Pseudomonas syringae* and *Plectosphaerella cucumerina*. *Front. Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2014.00231
- Péret, B., Svistoonoff, S., and Laplaze, L. 2009. When plants socialize: Symbioses and root development. *Annu. Plant Rev.* 209–238
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., and Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 789–799. doi: 10.1038/nrmicro3109.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S. C. M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5:308–316.
- Pozo, M. J. and Azcón-Aguilar, C. 2007. Unraveling mycorrhizainduced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:393–398.

Pozo, M. J., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., and García-Garrido, J. M. (2015). Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 205, 1431–1436. doi:10.1111/nph. 13252.

Rivero, J., Gamir, J., Aroca, R., Pozo, M. J. and Flors, V. 2015. Metabolic transition in mycorrhizal tomato roots. *Front. Microbiol.* 6:598. doi: 10.3389/fmicb.2015.00598.

Sanchez-Vallet, A., Ramos, B., Bednarek, P., López, G., Piślewska-Bednarek, M., Schulze-Lefert, P., Molina, A. 2010. Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi. *Plant Journal*, 63(1), 115-127. Doi: 10.1111/j

Schliemann, W., Ammer, C., and Strack, D. 2008. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69:112–146.

Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res* 105:1413–1421.

Sivasankar, S., Sheldrick, B., Rothstein, S. J. 2000. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.* 122(4):1335-42

Smith, G., Edmeades, D. and Upsdell, M. (1983). Manganese status of New Zealand pastures. I. Toxicity in ryegrass, white clover, and lucerne. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 26, 215-221.

Smith, S. and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. Academic Press, New York.

Smith, S. and Smith, F. A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:227–250.

Smith, S., Jakobsen, I., Grønlund, M., and Smith, F. A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol.* 156:1050–1057.

Song, Y., Chen, D., Lu, K., Sun, Z. and Zeng, R. 2015. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Front Plant. Sci.* 6:786. doi: 10.3389/fpls.2015.00786

Suza, W. and Staswick, P. 2008. The role of JAR1 in Jasmonoyl-L: -isoleucine production during Arabidopsis wound response. *Planta.* 227(6):1221-32. doi: 10.1007/s00425-008-0694-4.

Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14, 310–317.

Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* 581: 2290–2300

Vierheilig, H., Schweiger, P., and Brundrett, M. (2005). An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiol. Plant.* 125, 393–404. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00564.x

Walters, D., and Bingham, I. (2007). Influence of nutrients on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Ann. Appl. Biol.* 85, 901–909. doi:10.1111/j.1744-7348.2007.00176.x

Ward, J., Forcat, S., Beckmann, M., *et al.* 2010. The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *The Plant Journal* 63, 443–457.

Worrall, D., Holroyd, G. H., Moore, J. P., Glowacz, M., Croft, P., Taylor, J. E., *et al.* (2012). Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytol.* 193, 770–778. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03987.x