



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

# **Efecto del HCN en la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a patógenos a través del *priming***

Trabajo Fin de Grado

**Celia Sosa Sánchez**

Directora:

Dra. Irene García Fernández

Científica Titular del CSIC

Tutora:

Dra. María José Huertas Romera

Profesora Titular de la US

Grado en Bioquímica por la Universidad de Sevilla y la Universidad de Málaga.

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Biología.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), CSIC.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1. El cianuro .....	1
1.1. Biosíntesis de cianuro en plantas .....	2
1.2. Eliminación del cianuro .....	3
1.3. Papel del cianuro como molécula señalizadora .....	4
1.3.1. Procesos regulados por cianuro en plantas.....	5
1.4. Modificación postraducciona mediada por cianuro: S-cianilación.....	6
2. Respuesta inmune de plantas.....	7
2.1. Priming.....	8
2.1.1. Deposiciones de callosa.....	9
2.1.2. Ruta de las MAP quinasas 3 y 6.....	10
OBJETIVOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
1. Material biológico .....	12
1.1. Plantas .....	12
1.1.1. Líneas .....	12
1.1.2. Esterilización de semillas .....	12
1.1.3. Condiciones de crecimiento en placas de Petri .....	12
1.1.4. Condiciones de crecimiento en tierra .....	12
1.2. Bacterias.....	13
1.2.1. Cepas y condiciones de cultivo .....	13
1.2.1. Infección vegetal por infiltración .....	13
2. Análisis de las muestras .....	13
2.1. Genotipado.....	13

2.1.1. Extracción del RNA .....	14
2.1.2. Cuantificación del RNA .....	14
2.1.3. Retrotranscripción .....	14
2.1.4. PCR .....	14
2.1.5. Electroforesis en gel de agarosa .....	15
2.2. Tinción de deposiciones de callosa.....	15
2.3. Western blot .....	16
2.3.1. Extracción de proteínas y cuantificación.....	16
2.3.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes .....	16
2.3.3. Transferencia a la membrana e incubación con anticuerpos .....	17
2.3.4. Revelado.....	17
RESULTADOS .....	18
1. Análisis de la expresión del gen <i>CAS-CI</i> en plantas mutantes .....	18
2. Tinción de las deposiciones de callosa en las paredes celulares .....	19
3. Estudios de la activación por fosforilación de MAPK 3 y 6 .....	23
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	27

## RESUMEN

El cianuro de hidrógeno (HCN) es una molécula que, a pesar de ser tóxica, a bajas concentraciones actúa como señalizador regulando múltiples funciones en las plantas, entre las cuales se incluye la respuesta a patógenos. En este estudio se pretende comprobar si el HCN es capaz de inducir el *priming* en las plantas, un estado en el cual las plantas son capaces de responder de forma más rápida e intensa a la infección por patógenos sin que ello suponga un coste para su fisiología. Para ello, se ha utilizado el mutante *cas-c1*, que acumula una mayor concentración de HCN endógeno y presenta una mayor tolerancia a patógenos biótropos que las plantas silvestres. Hemos analizado dos marcadores del *priming*, las deposiciones de callosa y la cantidad de MAPK6 y MAPK3 fosforiladas, en el mutante *cas-c1*. Se ha demostrado que en este mutante se inducen las deposiciones de callosa de manera más temprana e intensa que en las plantas silvestres tras una infección tanto con la cepa virulenta de *Pseudomonas Pst* DC3000 como con la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *AvrRpm1*. Por otra parte, los niveles de MAPK6 y MAPK3 activas en condiciones control son mayores en el mutante que en el WT. Estos resultados apuntan a que el cianuro es capaz de inducir el estado de *priming*.

## INTRODUCCIÓN

### 1. El cianuro

El término cianuro hace referencia a todos los compuestos que derivan del ión  $\text{CN}^-$ , pudiendo encontrarse como cianuro libre ( $\text{CN}^-$  o HCN), en complejos con metales pesados o de transición como cianatos o tiocianatos (por ejemplo,  $\text{OCN}^-$  o  $\text{SCN}^-$ , respectivamente) o como organocianatos (por ejemplo, nitrilos) (Donato et al., 2007; Machingura et al., 2016). El cianuro de hidrógeno (HCN) es una sustancia líquida incolora con un olor característico a almendras amargas (Donato et al., 2007). Esta molécula gaseosa es un ácido débil que puede disolverse parcialmente en agua dando lugar a  $\text{H}^+$  y  $\text{CN}^-$ . Dado que presenta un  $\text{pK}_a$  de 9.3 y el pH citosólico está cercano a 7, el cianuro se encuentra en la célula principalmente en su estado protonado (HCN) pudiendo difundir rápidamente a través de las membranas celulares para entrar en distintos compartimentos subcelulares (García et al., 2019; Zuhra y Szabo, 2022).

El cianuro de hidrógeno y otros compuestos que liberan iones de cianuro son muy tóxicos para prácticamente todas las formas de vida (Siegień y Bogatek, 2006; Souren, 2000). Su

toxicidad se debe a que es capaz de quelar iones metálicos de los grupos prostéticos de algunas metaloproteínas afectando a su función (Nagahara et al., 1999). Así, el cianuro se une a enzimas y proteínas que contienen hierro, cobre o sulfuro requeridas para el transporte de oxígeno a las células. La principal enzima afectada es la citocromo c oxidasa o complejo IV de la cadena respiratoria, último aceptor de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Cooper y Brown, 2008). Esta proteína es esencial para la utilización de oxígeno en la función celular, de modo que cuando se forma el complejo citocromo c oxidasa-CN y se bloquea la transferencia de electrones mitocondrial ocurre una hipoxia citotóxica que conduce a la muerte celular (Brattsten et al., 1983; Donato et al., 2007). Muchas otras enzimas intracelulares involucradas en rutas metabólicas importantes se ven inhibidas por el cianuro, como son la Cu/Zn superóxido dismutasa, la catalasa, la nitrato/nitrito reductasa, la nitrogenasa y la peroxidasa (Grossmann, 2003). Por lo tanto, el cianuro es muy tóxico para todas las células, incluyendo las vegetales. La aplicación de cianuro a *Arabidopsis thaliana* causa una marcada inhibición en el crecimiento, reducción del tamaño de la planta y un descenso en el contenido de clorofila, que finalmente dará lugar a la muerte (Siegień y Bogatek, 2006; Smith y Arteca, 2000).

### **1.1. Biosíntesis de cianuro en plantas**

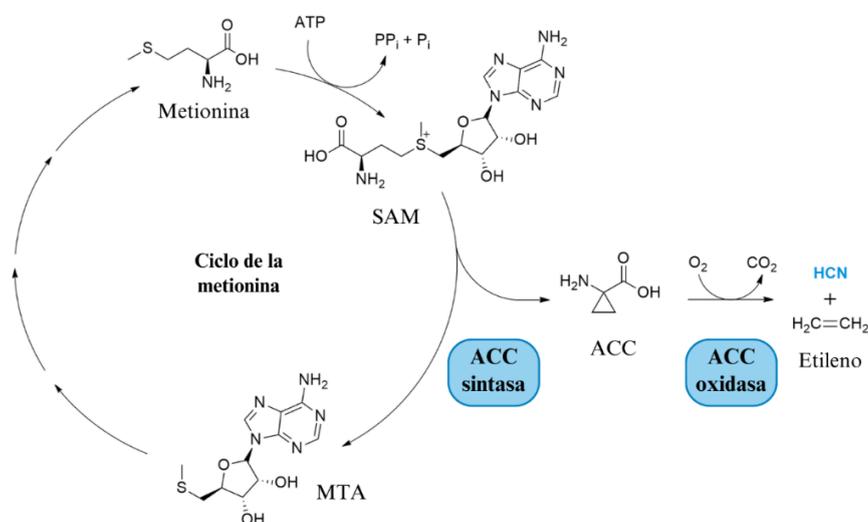
El cianuro es un compuesto común en la naturaleza que proviene tanto de fuentes antropogénicas como naturales (Machingura et al., 2016). La mayor parte del cianuro ambiental proviene de fuentes antropogénicas, siendo un subproducto derivado de la industria minera de plata y oro, producción de plásticos, plantas metalúrgicas, gases de vehículos, humo del tabaco, etc (ATSDR, 1997; Jaszczak et al., 2017). El cianuro se produce de forma endógena en las plantas y por diferentes microorganismos, incluyendo bacterias del suelo, hongos y algas (Blom et al., 2011; Knowles, 1976).

En las plantas, la biosíntesis de cianuro ocurre principalmente por dos mecanismos diferentes:

- Las plantas cianogénicas son aquellas que producen una alta concentración de cianuro gracias a la hidrólisis de glucósidos cianogénicos que almacenan, lo que se conoce como cianogénesis. La cianogénesis es una estrategia defensiva que se activa ante una disrupción del tejido desencadenada por herbívoros o daño físico, generando metabolitos tóxicos directamente dirigidos a interferir con la fisiología del fitófago (Boter y Diaz, 2023).

- En plantas no cianogénicas el cianuro se produce como un producto secundario de algunos procesos metabólicos, como son la biosíntesis de etileno y de la camalexina (Böttcher et al., 2009; Wang et al., 2002; Yip y Yang, 1988).

La principal fuente de cianuro en plantas no cianogénicas, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, es la biosíntesis de etileno. El etileno es una fitohormona que regula múltiples procesos metabólicos y fisiológicos en las plantas, incluyendo la senescencia de órganos vegetales, germinación de semillas, estrés biótico y abiótico y la maduración de los frutos climatéricos. El etileno se forma a partir de la metionina, a través de distintos intermediarios. La primera etapa en la biosíntesis de etileno es la conversión de S-adenosil metionina (SAM) a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), catalizada por la enzima ACC sintasa. En esta reacción también se produce, además de ACC, 5'-metil tioadenosina (MTA), que es reciclado a metionina por sucesivas reacciones enzimáticas, lo que constituye el ciclo de la metionina o ciclo de Yang. El segundo paso corresponde a la oxidación del ACC por la enzima ACC oxidasa, produciendo etileno, cianuro y CO<sub>2</sub> (**Figura 1**) (Arc et al., 2013; Bleecker y Kende, 2000; Smith y Arteca, 2000; Wang et al., 2002).

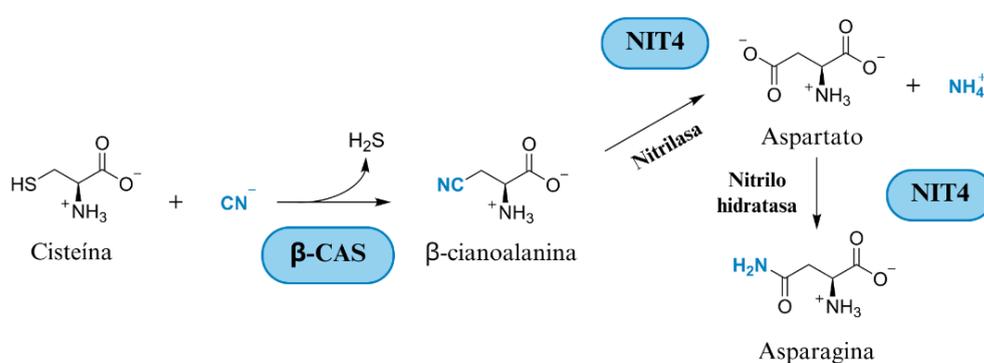


**Figura 1. Ciclo de la metionina y biosíntesis de etileno, asociados a la producción de HCN.** SAM, S-adenosil-L-metionina; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; MTA, 5'-metil tioadenosina (Adaptado de Arc et al., 2013; Bleecker y Kende, 2000).

## 1.2. Eliminación del cianuro

La producción de cianuro requiere la detoxificación de este veneno metabólico (Machingura et al., 2016). Los tejidos vegetales poseen una amplia capacidad para eliminar el HCN por diferentes vías enzimáticas, regulando estrechamente su concentración para evitar sus efectos tóxicos (Siegien y Bogatek, 2006; Yip y Yang, 1988).

La detoxificación del cianuro en plantas es llevada a cabo principalmente por la  $\beta$ -cianoalanina sintasa ( $\beta$ -CAS, E.C. 4.4.1.9), una enzima dependiente de piridoxal fosfato presente en todas las plantas (Miller y Conn, 1980; Siegi n y Bogatek, 2006; Yu, 2015). Esta enzima utiliza cisteína y cianuro para generar una molécula menos tóxica, la  $\beta$ -cianoalanina, y sulfuro de hidrógeno. La  $\beta$ -cianoalanina es posteriormente hidrolizada en una segunda etapa a aspartato gracias a la actividad nitrilasa de la enzima bifuncional NIT4 (nitrilasa 4), asociada a la producción de amonio, mientras que la actividad nitrilo hidratasa de NIT4 transforma este aspartato a asparagina (**Figura 2**) (Arenas-Alfonseca et al., 2021; Piotrowski y Volmer, 2006; Siegi n y Bogatek, 2006). Por esta vía de detoxificación el cianuro puede ser incorporado en el *pool* de aminoácidos libres en la planta (Miller y Conn, 1980; Zidenga et al., 2017).



**Figura 2. Ruta de la  $\beta$ -cianoalanina.** Constituye la vía principal para la eliminación de cianuro en plantas.  $\beta$ -CAS,  $\beta$ -cianoalanina sintasa; NIT4, nitrogenasa 4 (Adaptado de Machingura et al., 2016; Yu, 2015 y Zidenga et al., 2017).

Una vía alternativa es la llevada a cabo por sulfotransferasas, que catalizan la formación de tiocianato a partir de cianuro y un donador de sulfuro. Como ejemplo tenemos las enzimas rodanasa y mercaptopiruvato sulfotransferasa, que utilizan como donador de sulfuro las moléculas tiosulfato y mercaptopiruvato respectivamente (Moseler et al., 2021; Piotrowski y Volmer, 2006).

Finalmente, y de forma minoritaria el cianuro se elimina por volatilización a través de los tejidos aéreos de la planta (Yu, 2015).

### 1.3. Papel del cianuro como molécula se nalizadora

El HCN juega un papel dual en las plantas dependiendo de su concentración, ya que, a pesar de ser tóxico a altas concentraciones, se ha observado que a bajas concentraciones desempeña una función regulatoria en procesos metabólicos, fisiológicos y del desarrollo en plantas, considerándose una molécula se nalizadora (Díaz-Rueda et al., 2023; Gotor et al., 2019;

Siegień y Bogatek, 2006). Entre los procesos regulados por cianuro se incluyen la germinación de semillas, el desarrollo de los pelos radicales, la asimilación de nitrógeno y la respuesta a estreses bióticos.

Existen similitudes entre el HCN y otros gasotransmisores como el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Al igual que estos, el cianuro es una molécula de bajo peso molecular con una reactividad química moderada capaz de, como veremos más adelante, modificar dianas específicas. También es un gas que puede atravesar las membranas para llegar a distintos compartimentos celulares donde ejercer su acción. Otra característica común entre estas moléculas es la dualidad que presentan, ya que a partir de un cierto umbral de concentración son tóxicas, pero por debajo de este umbral poseen una función señalizadora (Díaz-Rueda et al., 2023; Gotor et al., 2019; Siegień y Bogatek, 2006).

### **1.3.1. Procesos regulados por cianuro en plantas**

Como ya hemos mencionado, el cianuro puede actuar como una molécula señalizadora. Así, se ha propuesto al cianuro como posible regulador de varios procesos biológicos como son la dormición de semillas y germinación, el desarrollo de pelos radicales y la respuesta de la planta a estreses bióticos y abióticos entre otros (revisado en Gotor et al., 2019; Díaz-Rueda et al., 2023).

En *Arabidopsis*, la enzima CAS-C1, de localización mitocondrial, es la más abundante de las isoformas de  $\beta$ -CAS, siendo la encargada de llevar a cabo la mayoría de esta actividad en las raíces y las hojas (García et al., 2010). Se ha caracterizado la línea mutante SALK\_022479, un mutante *knock-out* de inserción de T-DNA en el gen *CAS-C1*. El mutante *cas-cl* posee un 23% de la actividad  $\beta$ -CAS presente en las plantas silvestres y acumula un 62% más de HCN. En estas plantas también se ha detectado un aumento en la vía de la oxidasa alternativa (AOX), una segunda ruta de transporte de electrones alternativa al citocromo c que es resistente al cianuro. El análisis fenotípico del mutante muestra que no hay cambio aparente en el desarrollo y crecimiento de la parte aérea de la planta, aunque se observa un defecto en la elongación de los pelos radicales (García et al., 2010; Romero et al., 2014). Se ha demostrado que la actividad CAS-C1 en las raíces es esencial para mantener unos niveles bajos de cianuro necesarios para que este proceso ocurra de forma normal (García et al., 2010). Esta actividad participa en las primeras etapas de la elongación del pelo radical, y el

papel del cianuro en este proceso es independiente de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Arenas-Alfonseca et al., 2018).

La acumulación de cianuro debido a la mutación en *CAS-C1* da lugar a una respuesta inmune diferencial que depende del tipo de patógeno con el que interacciona la planta, lo que indica que el cianuro puede actuar sobre el sistema inmunitario de la planta (García et al., 2010, 2013)(García et al., 2014). Concretamente se ha observado que el mutante *cas-c1* presenta una mayor susceptibilidad al hongo necrotrofico *Botrytis cinerea* y una mayor tolerancia a los patógenos biotróficos como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y virus de la remolacha (*beet curly top virus*, BCTV) (García et al., 2013). Se ha demostrado que esta respuesta depende de la presencia del SA y que el HCN puede sustituir funcionalmente a la NADPH oxidasa (Arenas-Alfonseca et al., 2021).

#### **1.4. Modificación postraducciona mediada por cianuro: S-cianilación**

El mecanismo de acción del HCN como molécula señal es aún desconocido, aunque se han propuesto diferentes teorías. Algunos gasotransmisores incluyen como modo de acción modificaciones postraduccionales de proteínas en los grupos -SH de las cisteínas, como es el caso del H<sub>2</sub>S o el NO, que producen persulfuración y nitrosilación respectivamente. El HCN es capaz de atacar puentes disulfuro formados entre dos cisteínas que forman parte de proteínas por una sustitución nucleofílica en un átomo de azufre de este enlace para formar el derivado de tiocianato correspondiente (Proteína-S-C≡N), dando lugar a una modificación postraducciona, la S-cianilación. Esta modificación no se había descrito en ningún organismo, pero recientemente se ha demostrado que ocurre naturalmente en plantas (García et al., 2019). Así, el cianuro puede reaccionar con proteínas que contienen cisteína a un pH celular neutro o ligeramente alcalino para modificar los residuos de las proteínas, lo que afecta a sus propiedades, tales como el plegamiento, la conformación, la distribución subcelular o la estabilidad, y, por tanto, altera su actividad biológica. La existencia de esta modificación postraducciona mediada por cianuro en plantas podría explicar algunas de sus funciones como molécula señalizadora (Díaz-Rueda et al., 2023; García et al., 2019; Gotor et al., 2019).

La presencia de S-cianilación se ha descrito para un conjunto de proteínas en *A. thaliana*, tanto en plantas silvestres como en mutantes *cas-c1*. Se han detectado 163 proteínas diferentes susceptibles a la S-cianilación, de las cuales gran parte están involucradas en las rutas de

glicólisis, ciclo de Calvin y ciclo de la S-adenosil metionina junto a la metilación de DNA (García et al., 2019).

Cabe destacar que algunas enzimas del ciclo de la S-adenosil metionina (SAM) pueden sufrir S-cianilación en presencia de cianuro (García et al., 2019), lo que puede afectar a la regulación y la señalización de la metilación de histonas y DNA, ya que la SAM es el donador universal de metilación. La metilación del DNA y de histonas son marcas epigenéticas conservadas de gran importancia para la planta que intervienen en la adaptación al estrés y que contribuyen al estado de *priming* (González y Vera, 2019), un estado inmunitario de la planta que se abordará con mayor profundidad más adelante.

## **2. Respuesta inmune de plantas**

Las plantas terrestres se enfrentan continuamente al ataque de numerosos patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y oomicetos. Estos perjudican a la planta privándola de nutrientes, disrumpiendo procesos fisiológicos, frenando su crecimiento y generando daño en los tejidos (Zhou y Zhang, 2020). Como son organismos sésiles, son incapaces de desplazarse para evitar una infección, por lo que han desarrollado mecanismos extremadamente eficientes que tienen como objetivo impedir la entrada de patógenos, detectarlos y responder a ellos (Díaz-Rueda et al., 2023).

Los sistemas de defensa de la planta pueden ser constitutivos o inducibles. La planta está protegida frente a los patógenos en primer lugar principalmente por dos barreras físicas preformadas, que son la pared celular, una capa rígida que rodea la membrana plasmática de las células, y la cutícula, una capa de ceras, polisacáridos y lípidos que recubre la epidermis aérea. Las barreras físicas se encargan de impedir la penetración de los patógenos en las células, aunque estos pueden degradarlas o aprovechar distintas aperturas naturales de la planta, tales como los estomas o posibles heridas. Además, las plantas liberan metabolitos secundarios antimicrobianos tales como fitoalexinas, glucosinolatos, fitoanticipinas o defensinas (Bigeard et al., 2015; Zhang et al., 2018).

Los escasos patógenos exitosos que logran superar las defensas preformadas de la planta deben enfrentarse a su sistema inmune, que consta de sofisticados mecanismos de reconocimiento de patógenos para desencadenar una respuesta y combatir la infección. (Bigeard et al., 2015).

La planta reconoce una serie de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) gracias a receptores localizados en la superficie celular, desencadenando una primera respuesta

inmune que le proporciona a las plantas una resistencia basal a la mayoría de patógenos, lo que se conoce como respuesta inducida por PAMPs (PTI). Esta también se puede inducir por patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), productos de la degradación de tejido vegetal resultantes de la acción de los patógenos (Bigeard et al., 2015; Ding et al., 2022; Miller et al., 2017). Algunos patógenos han desarrollado a lo largo de la evolución proteínas efectoras que son secretadas y, tras su translocación al interior de la célula vegetal, son capaces de suprimir la PTI favoreciendo la infección. En respuesta, algunas plantas producen una serie de receptores citoplasmáticos (proteínas R) capaces de reconocer los efectores de los patógenos de forma específica, lo que activa una segunda línea de defensa dentro de las respuestas inducibles denominada respuesta inducida por efector (ETI). La ETI está comúnmente acompañada por una respuesta hipersensible (HR), que consiste en una muerte celular rápida alrededor del punto de infección que limita la diseminación del patógeno a otras partes de la planta (Ding et al., 2022; Miller et al., 2017; Zhang et al., 2018). La activación de la PTI y la ETI desencadena la producción de moléculas señalizadoras involucradas en la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR), una respuesta de resistencia de amplio espectro que ocurre en toda la planta de modo que esta se encuentra preparada para futuras infecciones durante un tiempo, que puede durar de semanas a meses (Gao et al., 2021; Zhang et al., 2018). Cabe destacar también que las fitohormonas etileno (ET), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) intervienen en la respuesta de las plantas a patógenos (Bari y Jones, 2009).

Durante la respuesta inmune de la planta se activa una gran variedad de rutas de señalización que forman una compleja red que involucra cambios en la expresión de una serie de genes relacionados con la defensa. Entre las vías de señalización activadas se incluyen un aumento de la concentración de calcio en la célula, la producción de ROS y la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) entre otras (Zhou y Zhang, 2020).

## **2.1. Priming**

El *priming* constituye un estado en el que la planta puede desplegar mecanismos de defensa más rápida y robustamente tras una infección de un patógeno, con un coste mínimo para la fisiología de las plantas ya que esta respuesta defensiva solo se inicia si es necesario (González y Vera, 2019).

Distintos estímulos provenientes de patógenos, microbios beneficiosos, artrópodos, productos químicos y señales abióticas pueden desencadenar el establecimiento del estado de *priming* en

una planta, ya que actúan como señales de alarma. Durante el periodo que abarca desde la percepción de este estímulo inicial hasta la exposición a un estrés al que la planta va a responder tiene lugar un gran número de cambios a nivel fisiológico, transcripcional, metabólico y epigenético que pueden ocurrir en cuestión de segundos u horas, siendo transitorios o manteniéndose a lo largo de la vida de la planta e incluso transmitiéndose a las generaciones posteriores (Luna et al., 2012; Rasmann et al., 2012; Slaughter et al., 2012). Según el estímulo que provoca que se establezca el *priming* se pueden dar unos cambios u otros. En conjunto, todos los cambios que se dan preparan a la planta para poder desarrollar una respuesta mejorada cuando se enfrente a un ataque futuro (Mauch-Mani et al., 2017; Zhang et al., 2018). De este modo, tras un ataque por un patógeno, las plantas que se encuentran en estado de *priming* activan los mecanismos de defensa de una manera más rápida, robusta y duradera que las otras plantas. Además, presentan una capacidad de percepción de los atacantes mejorada, siendo capaces de responder ante niveles bajos del estímulo (Conrath et al., 2015; Mauch-Mani et al., 2017). Así, este tipo de memoria inmunológica en las plantas les proporciona una ventaja biológica.

Entre los cambios que se producen en las plantas en estado de *priming*, bien tras su establecimiento o una vez que se enfrentan a la invasión de un patógeno, encontramos un aumento en los niveles de calcio intracelular, generación de ROS potenciada, niveles elevados de receptores de PAMPs, mayor acumulación de las MAPK 3 y 6, expresión aumentada de factores de transcripción (WRKYs, MYC2), ciertas modificaciones de histonas y metilación del ADN (Beckers et al., 2009; Conrath et al., 2015; Mauch-Mani et al., 2017; Pastor et al., 2013). El estudio de estos marcadores moleculares puede servir para determinar si una planta está en estado de *priming*, lo que será el objetivo de este trabajo. Concretamente nos centraremos en dos marcadores asociados al *priming*: las deposiciones de callosa y la activación de las MAPK 3 y 6.

### **2.1.1. Deposiciones de callosa**

La callosa es un homopolisacárido lineal de alto peso molecular formado por residuos de glucosa unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,3 con algunas ramificaciones  $\beta$ -1,6 presente en las paredes celulares de todas las plantas superiores, que se sintetiza por un grupo de enzimas denominadas callosa sintasas y se degradada por  $\beta$ -1,3-glucanasas. La acumulación de la callosa es dinámica y responde a los estados de desarrollo vegetal así como a factores ambientales (Chen y Kim, 2009; Iswanto et al., 2021).

La callosa desempeña papeles importantes en una variedad de procesos biológicos, como el crecimiento y desarrollo de la planta. También participa en la respuesta a estreses tanto bióticos como abióticos (Chen y Kim, 2009; Wang et al., 2021). Si nos centramos en la defensa vegetal, la callosa desempeña un doble papel:

- La mayoría de células vegetales se conectan entre sí por plasmodesmos, dando lugar al simplasto, un espacio continuo formado por el citoplasma de las distintas células. Estas estructuras son dinámicas, y las deposiciones de callosa alteran la continuidad del simplasto, de manera que pueden regular el tráfico de nutrientes y moléculas señalizadoras (Chen y Kim, 2009; Iswanto et al., 2021). Ante un ataque por patógenos tiene lugar una rápida deposición de callosa en los plasmodesmos, de manera que se puede inhibir el movimiento de efectores de los patógenos que suprimen la respuesta inmune de la planta (Li et al., 2021).
- Como ya se ha mencionado con anterioridad, una de las primeras líneas de defensa de las plantas frente al ataque por patógenos es la pared celular. Ante la presencia de PAMPs o DAMPs, los sitios de interacción con los patógenos de la pared celular se ven activamente reforzados por la formación de la papila, una estructura compleja que se forma entre la membrana plasmática y la pared celular por la deposición de distintos polímeros, siendo la callosa su componente principal (Wang et al., 2021). Estos engrosamientos actúan como una barrera física para ralentizar la invasión del tejido por parte de los patógenos y de este modo ganar tiempo para la inducción de respuestas defensivas adicionales que requieren de la activación y expresión de genes (Voigt, 2014).

La intensidad y el momento en el que ocurren las deposiciones de callosa inducidas por patógenos se ven influenciados por señales ambientales. Por esta razón, las plantas que se encuentran en estado de *priming* ven potenciada esta respuesta, presentando un aumento en las deposiciones de callosa que forman las papilas o produciéndose de forma más temprana tras un ataque (Wang et al., 2021).

### **2.1.2. Ruta de las MAP quinasas 3 y 6**

Las MAPKs son un tipo de Ser/Thr kinasas que funcionan aguas abajo de sensores o receptores y transmiten los estímulos extracelulares a través de una serie de reacciones dando lugar a respuestas intracelulares junto a una amplificación de la señal transducida (Beckers et al., 2009; Ding et al., 2022).

Las cascadas de MAPKs están presentes en todos los eucariotas y en ellas intervienen 3 tipos de kinasas jerárquicamente ordenadas: la MAPK es activada por una doble fosforilación que es llevada a cabo por una MAPKK (MAPK kinasa), que a su vez se activa por una MAPKKK (MAPKK kinasa) (Beckers et al., 2009; Galletti et al., 2011). La MAPK puede permanecer en el citosol activando otras proteínas o entrar en el núcleo para regular la expresión de ciertos genes a través de la fosforilación de factores de transcripción (Ding et al., 2022). En *A. thaliana* encontramos 20 MAPKs, 10 MAPKKs y aproximadamente 80 MAPKKKs (Tena et al., 2011).

En las plantas, las rutas de las MAPKs juegan papeles esenciales en procesos como el crecimiento vegetal y el desarrollo, la respuesta a estímulos ambientales y, especialmente, al ataque de patógenos (Liu et al., 2021). En un ataque, tras el reconocimiento de PAMPs, DAMPs o proteínas efectoras de patógenos, se desencadenan respuestas de defensa tempranas, siendo la activación de las MAPKs una de ellas. En *A. thaliana*, las tres MAPKs implicadas en la defensa contra patógenos son MAPK3, MAPK4 y MAPK6, siendo las MAPK3 y MAPK6 parcialmente redundantes (Galletti et al., 2011). Es interesante destacar que el *priming* está asociado a la acumulación de las formas inactivas de MAPK3 y MAPK6, que se activan de una forma más intensa tras un estrés, respondiendo más rápida y eficientemente al mismo (Beckers et al., 2009; Conrath et al., 2015).

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar el efecto del HCN en el fenómeno de *priming* durante la respuesta de defensa contra patógenos.

Para ello se utilizarán las plantas mutantes *cas-c1*, que acumulan HCN debido a la mutación en la principal enzima de detoxificación de este compuesto, y se analizarán los siguientes marcadores asociados al *priming*:

- Depositiones de callosa en la pared celular.
- Activación de las MAP quinasas MAPK 3 y 6.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Material biológico

### 1.1. Plantas

#### 1.1.1. Líneas

Para este TFG se han utilizado plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0) procedentes del European Arabidopsis Stock Center (NASC, University of Nottingham, UK) como línea silvestre o *wild type* (WT).

También se han utilizado mutantes de inserción de T-DNA en el gen *CAS-C1* (AT3G61440), a los que nos referiremos como mutantes *cas-c1*, concretamente la línea SALK\_022479 procedente de la colección SALK (Salk Institute Genome Analysis Laboratory).

#### 1.1.2. Esterilización de semillas

Para la siembra en placa las semillas de *A. thaliana* fueron previamente esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% (v/v) y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,5% (p/v) con la que se incubaron durante 5 minutos, tras lo que se realizaron lavados sucesivos (5-7 lavados) de las semillas con agua miliQ destilada para eliminar los restos de la solución esterilizadora. Este proceso de esterilización se realizó para semillas de genotipo silvestre (*wild type*, WT) y de genotipo mutante *cas-c1* en tubos Eppendorf de 1.5 mL en campana de flujo laminar horizontal. Para sincronizar la germinación de las semillas, se estratificaron tras su esterilización durante 48 h a 4°C.

#### 1.1.3. Condiciones de crecimiento en placas de Petri

Las semillas esterilizadas se cultivaron *in vitro* en placas de Petri con medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) a pH 5.6-5.8 suplementado con sacarosa al 1% (p/v). Las plantas crecieron en un fitotrón (Aralab) en condiciones de día largo (fotoperiodo 16 h de luz y 8 h de oscuridad) a una temperatura de 22°C y una intensidad lumínica de 120-140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cuando fue necesario, las plantas se trasplantaron a sustrato vegetal.

#### 1.1.4. Condiciones de crecimiento en tierra

Las plantas se cultivaron en sustrato vegetal para su crecimiento en cámaras de cultivo (Aralab) en condiciones de día corto (fotoperiodo 16 h de luz y 8 h de oscuridad) manteniendo constantes la temperatura (20°C en luz, 18°C en oscuridad), la humedad relativa

(70%) y la intensidad lumínica (120-140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Fueron regadas con agua o con abono líquido según el crecimiento del cultivo.

## **1.2. Bacterias**

### **1.2.1. Cepas y condiciones de cultivo**

Para la infección de plantas se utilizó la cepa bacteriana *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) y esta misma cepa portando un plásmido que contiene el gen de avirulencia *avrRpm1* (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*, *Pst* DC3000 *avrRpm1*) (Grant et al., 1995).

Las cepas bacterianas se cultivaron 24 horas a 30°C en placas con medio LB-agar, que contiene triptona (10 g l<sup>-1</sup>), extracto de levadura (5 g l<sup>-1</sup>), NaCl (10 g l<sup>-1</sup>) y agar (15 g l<sup>-1</sup>), suplementado con rifampicina a una concentración de 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para *Pst* DC3000, y en el caso de *Pst* DC3000 *avrRpm1* además contiene kanamicina a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

### **1.2.1. Infección vegetal por infiltración**

Plantas silvestres y mutantes *cas-cl* crecidas durante distintos tiempos en condiciones de día corto fueron infectadas por infiltración con las cepas bacterianas *Pst* DC3000 y *Pst* DC3000 *avrRpm1*. Para ello se recogieron las bacterias en MgCl<sub>2</sub> 10 mM rascando la placa del cultivo y se ajustó su concentración de modo que la solución de bacterias tuviera una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0.005 para *Pst* DC3000 y de 0.01 para *Pst* DC3000 *AvrRpm1*. Para la infiltración se utilizó una jeringa de 1 ml sin aguja, introduciendo la solución bacteriana a través del envés de la hoja. Previamente se pulverizó agua sobre las hojas para que se abran los estomas. Como control (*mock*) se infiltraron las hojas con MgCl<sub>2</sub> 10 mM estéril.

## **2. Análisis de las muestras**

### **2.1. Genotipado**

Para comprobar que las plantas que estamos utilizando son mutantes para el gen *CAS-Cl* estudiamos su expresión tanto en plantas mutantes *cas-cl* como plantas silvestres WT. Para ello se realizó una extracción del RNA total de ambos tipos de muestras y posteriormente una retrotranscripción para obtener el cDNA correspondiente. A partir de este cDNA se llevó a cabo una amplificación mediante PCR del gen de la ubiquitina 10 (*UBQ10*), un gen de expresión constitutiva que se utilizó como control positivo, y del gen *CAS-Cl*. Los resultados de la PCR se observaron gracias a la realización de una electroforesis en gel de agarosa.

### 2.1.1. Extracción del RNA

Se extrajo el RNA total a partir de 100 mg de tejido de muestras *cas-cl* y WT mediante el uso del RNeasy Plan MiniKit (Qiagen). Para ello las plantas congeladas en nitrógeno líquido fueron pulverizadas con bolas en un molino mezclador MM 400 de Retsch y se siguieron las instrucciones del kit. El RNA obtenido se congeló a -80°C.

### 2.1.2. Cuantificación del RNA

Para la cuantificación del RNA se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop, que estima la concentración de una microgota de muestra a partir de la absorbancia a 260 nm. También permite conocer el grado de pureza del RNA mediante la determinación de la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), que deberá ser mayor a 2 para soluciones de alta pureza, y por el cociente entre las absorbancias a 260 y 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ), que deberá estar en torno a 2-2.2.

### 2.1.3. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción del RNA extraído anteriormente a cDNA se siguió el protocolo del kit comercial QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen), utilizando el volumen necesario para tener 1 µg de RNA. Los cDNA obtenidos se almacenaron a -20°C.

### 2.1.4. PCR

Se amplificó mediante PCR un fragmento del gen *UBQ10*, que utilizamos como control, y del gen *CAS-Cl* utilizando como DNA molde el cDNA que hemos obtenido a partir de la retrotranscripción del RNA de las muestras de plantas silvestres y mutantes *cas-cl*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando la *Taq* DNA Polymerase con el tampón Standard *Taq* Buffer (New England BioLabs). Para cada muestra se prepararon 2 reacciones, una para amplificar el gen *UBQ10* y otra para el gen *CAS-Cl*. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 1**. Para la reacción se añadieron, además del DNA molde y los oligos correspondientes, el buffer, la *Taq* polimerasa y los dNTPs.

El programa utilizado en la reacción consta de un primer paso de 30 segundos a 95°C para desnaturalizar el DNA molde seguido de 35 ciclos sucesivos que incluyen un paso de 30 segundos a 95°C de desnaturalización, un paso de 30 segundos a 60°C para la hibridación de los cebadores con el molde y un último paso de 1 minuto a 68°C de extensión. Finalmente, las

muestras se mantuvieron 5 minutos a 68°C para asegurar la extensión de todas las moléculas amplificadas. El producto de la reacción se almacenó a -20°C.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')
UBIQUITINA 10	UBQ-F1	GATCTTTGCCGGAAAACAATTGGAGGATGG
	UBQ-R1	CGACTTGTTCATTAGAAAGAAAGAGATAACA
CAS-C1	C1-F2	TGATGGGAATTGGCAGTGGAGGCAC
	C1-R2	AATTGCTTGCCACGGTGTTAGCTCCC

**Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR.**

### 2.1.5. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos génicos amplificados mediante PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% (p/v) en TBE 0.5x teñido con bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel utilizando un tampón de carga con glicerol al 15% (p/v) y azul de bromofenol al 0.25% (p/v). Para poder estimar los pesos moleculares de los fragmentos se cargó el marcador de peso molecular HyperLadder 1Kb (Bioline). La electroforesis se realizó a una tensión constante de 100 V. El resultado fue visualizado en un transiluminador de luz UV.

### 2.2. Tinción de deposiciones de callosa

Para visualizar las deposiciones de callosa se llevó a cabo una tinción en hojas de plantas silvestres y mutantes infectadas y sin infectar crecidas 45-75 días en tierra. Las hojas fueron recolectadas y desteñidas en etanol absoluto durante al menos 24 h en agitación, cambiando el etanol, hasta que los tejidos estuvieron transparentes. Una vez desteñidas se lavaron con tampón fosfato 50 mM pH 9 y se tiñeron con una solución de azul de anilina (*Aniline blue*) al 0.01% (p/v) en tampón fosfato 50 mM pH 9 durante media hora en vacío y oscuridad para posteriormente incubar en agitación 1 hora y media en oscuridad. Las muestras se lavaron con tampón fosfato 50 mM pH 9 y se mantuvieron en glicerol 50% (v/v).

La visualización de las deposiciones de callosa se llevó a cabo en un microscopio de epifluorescencia Leica DM6000 con filtro UV (DAPI-LP, excitación 660/40 nm, emisión por encima de 425 nm) utilizando un objetivo 10x. El contraste en las imágenes se ajustó para obtener una separación óptima entre la señal de la callosa y la señal de fondo.

El número y la intensidad de las deposiciones de callosa en las distintas condiciones se cuantificaron a partir de varias imágenes (n=6) utilizando ImageJ. Para la comparación estadística se llevó a cabo un test ANOVA de un factor seguido de un test de Tukey de comparaciones múltiples (\*\*\*, P < 0.0005; \*\*, P < 0.005; \*, P < 0.05) utilizando la versión 9.5 de GraphPad Prism para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com).

### **2.3. Western blot**

Con el fin de detectar la forma fosforilada de las proteínas MAPK 3 y 6 se llevó a cabo un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo anti-fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (*Cell Signaling Technology*) sobre muestras de plantas silvestres WT y mutantes *cas-c1* cultivadas durante diferentes tiempos. Para ello se extrajeron las proteínas totales de las muestras, que se separaron según su peso molecular mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Dicha membrana se incubó secuencialmente con las soluciones de bloqueo, de anticuerpo primario anti-fosfo-p44/42 MAPK y de anticuerpo secundario para posteriormente visualizar la señal por quimioluminiscencia.

#### **2.3.1. Extracción de proteínas y cuantificación**

La proteína total se extrajo de 100 mg de tejido congelado de hoja de las distintas plantas, triturado en presencia de nitrógeno líquido, utilizando un tampón de extracción de composición 25 mM Tris-HCl pH 7.8, 75 mM NaCl, 15 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-glicerofosfato, 15 mM PNPP, 1 mM DTT, 1mM NaF, 0.5 mM PMSF, 1% cocktail inhibidor de proteasas (ThermoFisher scientific), 0.1% Tween-20. El polvo de tejido se resuspendió en el tampón, se homogeneizó y se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima a 4°C para obtener el sobrenadante con las proteínas.

La cantidad de proteína total presente en cada muestra se midió por colorimetría según el método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **2.3.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes**

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes empleando geles de poliacrilamida al 10% (p/v) a un voltaje constante de 150 V. Las muestras cargadas en el gel se ajustaron para contener 30 μg de proteína total y se les añadió tampón de carga previamente a su incubación durante 5 minutos a 90 °C.

Las soluciones utilizadas fueron tampón de carga (SDS 4% (p/v), sacarosa 20% (p/v), 60 mM Tris-HCl pH 6.8, azul de bromofenol 0.01% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v)) y tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1 % (p/v)).

### **2.3.3. Transferencia a la membrana e incubación con anticuerpos**

Se realizó una transferencia semi-húmeda de las proteínas previamente separadas a una membrana de nitrocelulosa. Tras la transferencia, se llevó a cabo una tinción con Ponceau S para la detección de proteínas en la membrana, pudiendo comprobar si se había cargado la misma cantidad de proteína total en cada muestra. La membrana se incubó en una solución de bloqueo (BSA 5% (p/v), PBS 1x con Tween al 0.1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario anti-fosfo-p44/42 MAPK (dilución 1:1000, BSA 3% (p/v), PBS-T 0.1%) durante toda la noche a 4°C en agitación, tras lo que se lavó la membrana 4 veces durante 5 minutos con PBS-T 0.1%. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, dilución 1:5000, BSA 3% (p/v), PBS-T 0.1%) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y se repitieron los lavados.

Para el control de carga de la membrana, además de la tinción con Ponceau, esta se incubó con el anticuerpo primario anti-HSP70 (Agrisera) (dilución 1:5000, BSA 3% (p/v), PBS-T 0.1%) durante toda la noche a 4°C en agitación para posteriormente realizar los lavados e incubar la membrana con el anticuerpo secundario como se describe en el párrafo anterior.

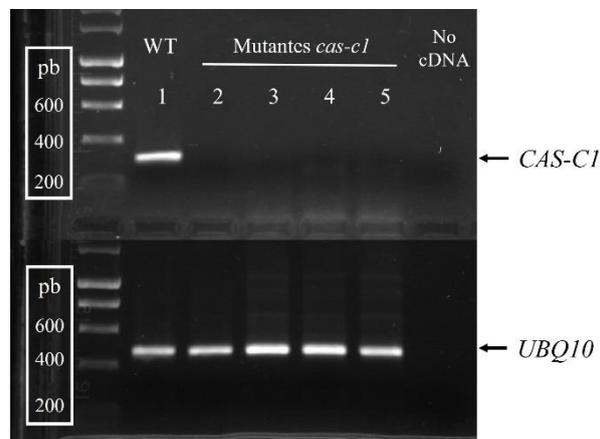
### **2.3.4. Revelado**

La membrana se reveló con el reactivo de detección ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Amersham), el cual permite que tenga lugar una reacción quimioluminiscente aprovechando la actividad de la peroxidasa de rábano (HRP) que se encuentra conjugada con el anticuerpo secundario, para su visualización con el Amersham Imager 680.

## RESULTADOS

### 1. Análisis de la expresión del gen *CAS-C1* en plantas mutantes

Con el fin de comprobar que la línea mutante *cas-c1* carecía de la enzima CAS-C1, se analizó la expresión de este gen. Para ello se extrajo el ARN de plantas silvestres y mutantes, a partir del cual se obtuvo el cDNA para amplificar mediante PCR fragmentos génicos correspondientes a los genes *UBQ10*, de expresión constitutiva, y *CAS-C1*. Los resultados de este análisis se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa, lo que nos permitió identificar la presencia o ausencia de bandas correspondientes a cada gen en las plantas mutantes y silvestres, haciendo posible el genotipado de las distintas líneas.



**Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de PCR en plantas silvestres y mutantes.** En la parte superior vemos el resultado de la amplificación por PCR de un fragmento del gen *CAS-C1*, mientras que en la parte inferior se muestra el correspondiente al gen *UBQ10*. A la izquierda del gel se observan las bandas correspondientes al marcador de peso molecular, indicando los pares de bases (pb) de las bandas de interés. El carril 1 se corresponde a una muestra WT mientras que en los carriles 2-4 se han utilizado muestras de plantas mutantes *cas-c1*. El ultimo carril es un control negativo de la PCR sin cDNA.

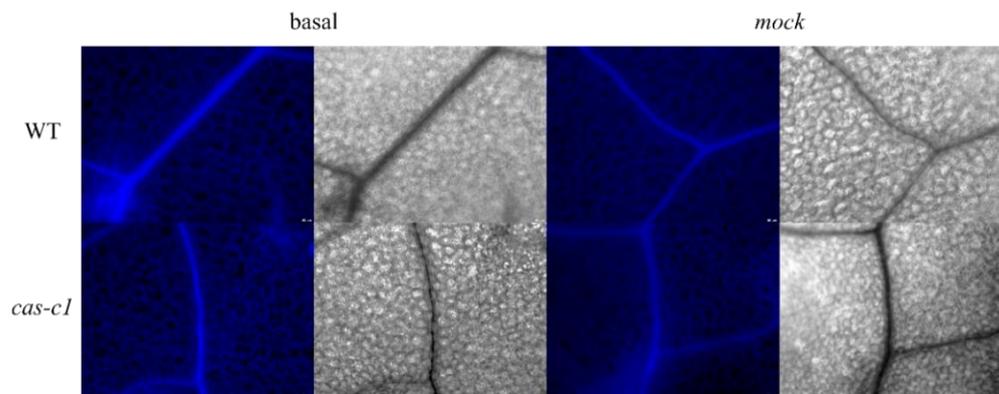
Si atendemos a la región inferior de la **Figura 3**, donde se ha cargado el resultado de la PCR de cada muestra utilizando cebadores para el gen de la ubiquitina 10, podemos observar que todas las muestras presentan una banda a la misma altura que se corresponde con un tamaño de alrededor de 484 pb, correspondiente a la amplificación de una región del cDNA de este gen, sean plantas de la línea WT o *cas-c1*. Sin embargo, cuando los cebadores utilizados en la PCR corresponden al gen *CAS-C1* no se obtiene amplificación en todas las muestras. Esto lo podemos observar en la región superior de la **Figura 3**, donde hay una banda en la línea silvestre de un tamaño de alrededor de 306 pb, lo que concuerda con el tamaño esperado. En el caso de las líneas mutantes no observamos ninguna banda para este gen.

Así, mediante este experimento podemos confirmar que la línea mutante carece de expresión del gen *CAS-Cl*, siendo una línea *knock-out* para este gen, mientras que la línea silvestre sí lo expresa.

## 2. Tinción de las deposiciones de callosa en las paredes celulares

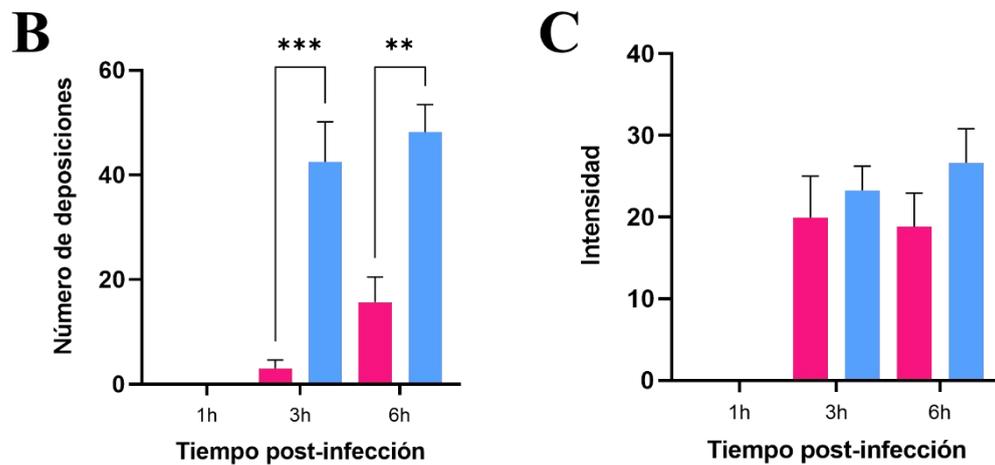
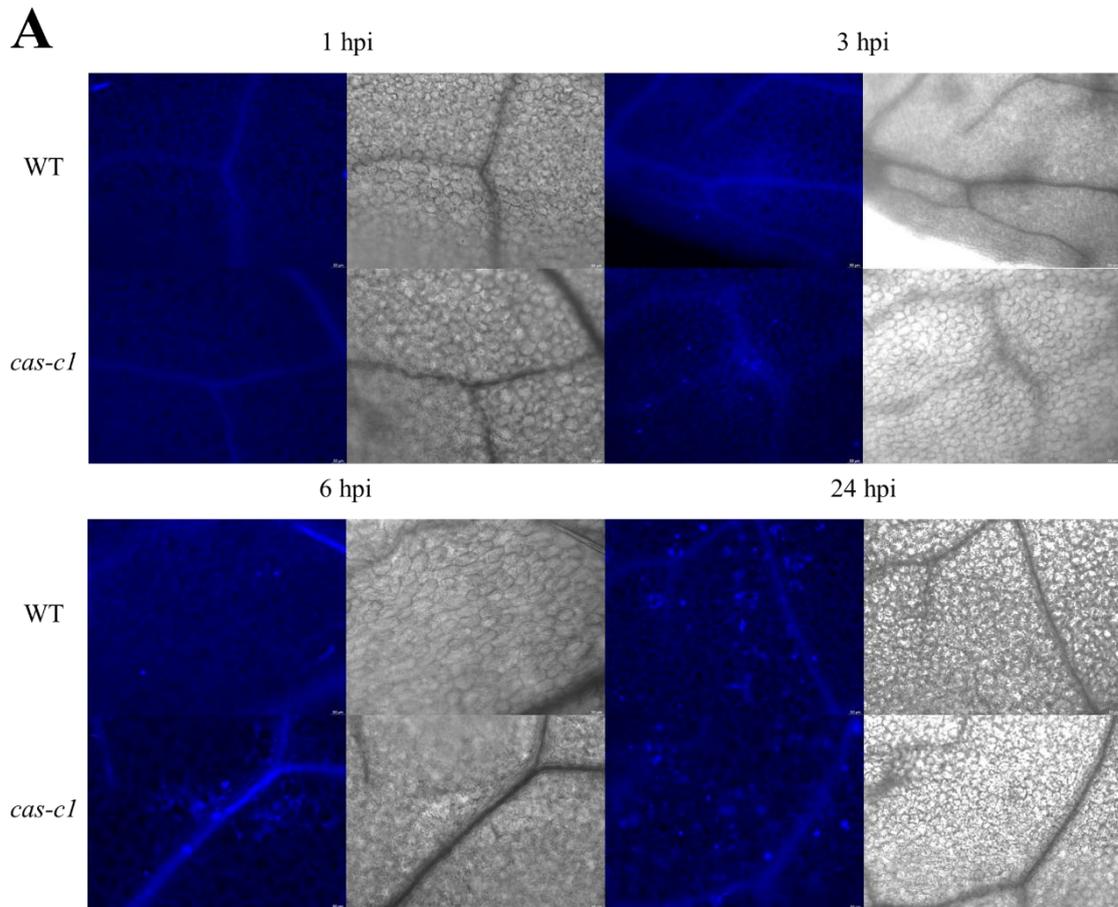
Uno de los marcadores que se pueden estudiar para determinar si las plantas mutantes *cas-cl* se encuentran en estado de *priming* es la presencia de deposiciones de callosa en las paredes celulares, que pueden ocurrir de manera más temprana e intensa que en la línea silvestre. Estas deposiciones se estudiaron en plantas cultivadas en día corto durante 45-75 días, tras la infección mediante infiltración con *Pst* DC3000 y *Pst* DC3000 *avrRpm1*, utilizando como control las plantas infiltradas con  $MgCl_2$  10 mM (*mock*) y plantas en estado basal (sin infiltrar).

Las muestras infectadas recogidas a 1 h, 3 h y 6 h post-infección (hpi), al igual que las muestras no infiltradas y las *mock* se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía óptica después de lavarlas con el mismo tampón. Además, se cuantificó el número y la intensidad de las deposiciones de callosa en cada muestra.



**Figura 4. Deposiciones de callosa en condiciones basales y *mock*.** Imágenes de microscopía de fluorescencia (filtro UV DAPI-LP, excitación 660/40 nm, emisión > 425 nm) y de microscopía óptica de hojas recogidas de plantas silvestres y mutantes *cas-cl* en condiciones basales y *mock*.

Como se observa en la **Figura 4**, las hojas provenientes de las plantas en condiciones basales, al igual que las *mock*, no presentan ningún tipo de deposición de callosa, por lo que en las imágenes de fluorescencia podemos observar únicamente fluorescencia de fondo en el tejido además de los vasos y los tricomas con mayor intensidad. En las imágenes del microscopio óptico diferenciamos las células de la epidermis o del mesófilo, que presentan los cloroplastos en los márgenes, según si estamos visualizando el haz o el envés de la hoja.



**Figura 5. Depositiones de callosa en respuesta a la infección por *Pst* DC3000.** A). Se muestra una imagen de microscopía de fluorescencia y de microscopía óptica representativa de hojas de la línea WT y de la línea *cas-cl* recogidas a 1, 3, 6 y 24 hpi. B) y C). Comparación entre el número de deposiciones a las distintas hpi en las dos líneas y entre las intensidades, respectivamente. El valor representado se corresponde la media del valor obtenido en 6 imágenes distintas, correspondientes a hojas diferentes de distintas repeticiones del experimento. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA y un test de Tukey (\*\*\*,  $P < 0.0005$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*,  $P < 0.05$ ).



Si atendemos a las muestras correspondientes a las plantas que han sido infiltradas con *Pst* DC3000, sí se observan deposiciones de callosa (**Figura 5A**). Aunque a 1 hpi, tanto en el caso del WT como del mutante *cas-c1*, no hay ninguna, obteniéndose una imagen similar que en el caso de las plantas en condiciones basales y *mock*, a las 3 hpi, 6 hpi y 24 hpi ya se han formado las papilas. La comparación entre el número de deposiciones de callosa en las distintas condiciones se muestra en la **Figura 5B**. A las 3 hpi observamos en la línea WT un número reducido de deposiciones de callosa, mientras que en la línea mutante *cas-c1* las deposiciones son significativamente más abundantes (\*\*\*,  $P < 0.0005$ ). A las 6 hpi el número de deposiciones por imagen aumenta en ambas líneas; sin embargo, la diferencia entre la línea WT y la *cas-c1* sigue siendo notable, con una significancia de  $P < 0.005$ . Por otro lado, si comparamos las deposiciones en el mutante *cas-c1* a las 3 hpi con respecto a las 6 hpi, no se aprecian diferencias significativas. En el caso de las 24 h podemos observar un elevado número de deposiciones de callosa independientemente de la línea vegetal que estudiemos, sin diferencias entre ellas.

Por otro lado, podemos analizar la evolución de las deposiciones de callosa en respuesta a la infección por *Pst* DC3000 *avrRpm1* (**Figura 5**). A 1 hpi, al igual que en el caso de las muestras infectadas con *Pst* DC3000, las hojas no muestran deposiciones de callosa. Las hojas que han sido recogidas a las 3 hpi, 6 hpi y 24 hpi sí presentan estas deposiciones. A las 3 hpi la línea WT presenta un bajo número de deposiciones de callosa, mientras que en la línea *cas-c1* encontramos una mayor cantidad. Esta diferencia es estadísticamente significativa (\*,  $P < 0.05$ ), tal y como se representa en la **Figura 5B**. En el caso de las 6 hpi ambas líneas vegetales presentan un alto número de deposiciones, que es igual al de las deposiciones a 3 hpi en *cas-c1*. Si observamos las imágenes a las 24 hpi podemos ver cómo los dos tipos de plantas presentan una gran abundancia de deposiciones de callosa, siendo este nivel de deposiciones más llamativo que en el caso de las hojas infectadas con *Pst* DC3000; sin embargo, debido al bajo número de imágenes del que disponemos para esta condición, no ha sido posible realizar un análisis estadístico de las diferencias entre las muestras infectadas con las distintas cepas a las 24 h.

Al visualizar de forma global la hoja completa al microscopio se puede apreciar cómo en el caso de la infección con *Pst* DC3000 *avrRpm1* las deposiciones de callosa ocurren a lo largo de toda la hoja en las muestras a 3 hpi y 6 hpi, mientras que en las hojas infectadas con *Pst* DC3000 está más localizada alrededor del punto de infección. Sin embargo, a las 24 hpi

las muestras infectadas con ambas cepas bacterianas presentan papilas a lo largo de toda la hoja.

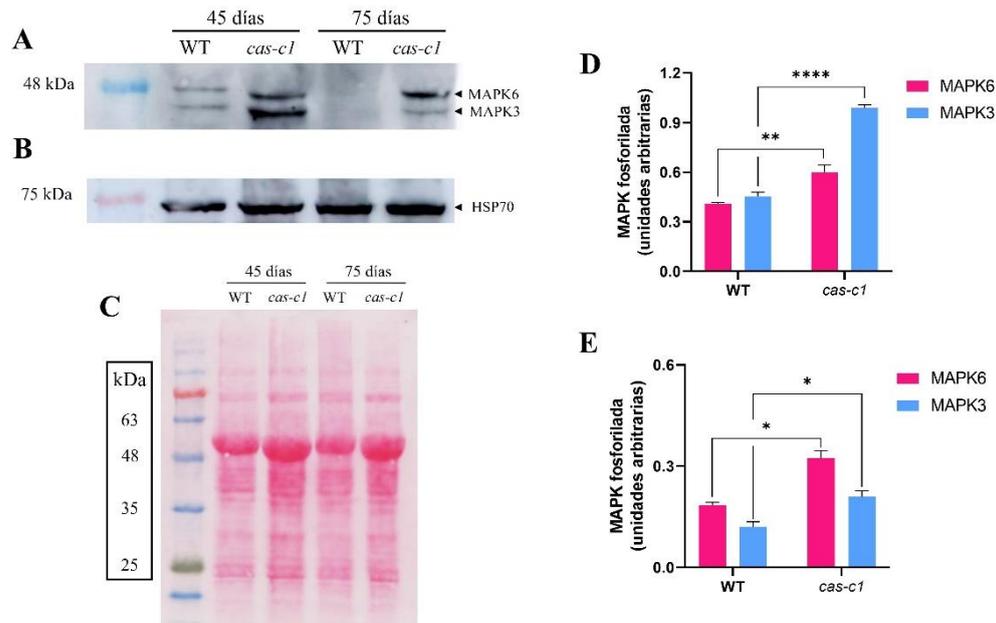
Observando las imágenes de microscopía óptica de la infección con ambas cepas bacterianas (**Figura 5A y 6A**), podemos ver cómo el tejido se va desordenado progresivamente debido a la muerte de las células. Esto ocurre de forma más temprana en el caso de la infección con *Pst* DC3000 *avrRpm1*, donde comienza ligeramente a partir de las 3 hpi y va en aumento hasta observarse un tejido completamente desordenado en el caso de las 24 hpi, en contraposición con las hojas infectadas con *Pst* DC3000, en las que se observa sólo a las 24 hpi y de una forma menos intensa.

En las **Figuras 5C y 6C** se representan las diferencias entre las intensidades medias de las deposiciones de callosa a cada hpi estudiada para las líneas WT y *cas-c1* infectadas con *Pst* DC3000 y *Pst* DC3000 *avrRpm1* respectivamente. En ninguno de los casos vemos diferencias significativas entre las intensidades de las deposiciones, ni entre las dos líneas ni entre los distintos tiempos post-infección.

### **3. Estudios de la activación por fosforilación de MAPK 3 y 6**

En el estado de *priming* se ven implicadas las MAPK3 y MAPK6, que se activan en mayor medida que en plantas que no se encuentran en este estado. Es por ello que hemos analizado la cantidad de estas dos kinasas en estado activo en plantas mutantes *cas-c1* y silvestres en condiciones basales. Este estudio se llevó a cabo mediante un *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-fosfo-p44/42 MAPK, que es capaz de detectar las formas fosforiladas de las MAPK3 y MAPK6.

Como se observa en la **figura 7A**, tras el revelado de la membrana se obtuvieron dos bandas correspondientes a las proteínas MAPK6 y MAPK3, que presentan un peso molecular de 45 y 43 kDa respectivamente, tanto en las muestras de plantas crecidas 45 días como en las que se cultivaron durante 75 días. A simple vista podemos detectar que la intensidad de las bandas en el mutante *cas-c1* es notablemente mayor que en el WT; sin embargo, si nos fijamos en el resultado de la tinción con Ponceau S de la membrana (**Figura 7C**) podemos apreciar que la carga de proteína total no ha sido la misma en todas las muestras, siendo menor en los dos silvestres. Por ello se llevó a cabo un control de carga detectando con otro anticuerpo la proteína HSP70, una proteína de 74 kDa que se expresa constitutivamente. El resultado de la incubación y el revelado con el anticuerpo específico frente a HSP70 se muestra en la **figura 7B**.



**Figura 7. Inmunodetección de las MAPK 3 y 6 fosforiladas.** Se realizó un *Western blot* con muestras de hojas silvestres y mutantes *cas-c1* de plantas crecidas durante 45 días y 75 días, que se separaron mediante una electroforesis en gel de acrilamida al 10%. **A).** Las MAPK fosforiladas se detectaron con un anticuerpo anti-fosfo-MAPK. Se observan las bandas correspondientes a las proteínas fosforiladas MAPK6 y MAPK3. **B).** Resultado de la detección de la proteína HSP70 en la membrana. **C).** Mediante una tinción con Ponceau S de la membrana se puede detectar la cantidad total de proteína cargada por cada muestra. **D, E).** Las bandas obtenidas en el gel se cuantificaron con el software Image Lab (BioRad), normalizando frente a la cantidad de HSP70 total. Se representan los resultados obtenidos para las plantas crecidas a 45 y 75 días respectivamente como la media de tres mediciones  $\pm$  SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA y un test de Tukey (\*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*,  $P < 0.05$ ).

A partir de las bandas correspondientes a las MAPK y las de la HSP70 se llevó a cabo una cuantificación, normalizando los valores obtenidos para las MAPK frente al control de carga. El resultado de esta cuantificación para las plantas crecidas 45 días y 75 días se muestra en los gráficos de las **Figuras 7D** y **7E**, respectivamente. Como podemos observar, la MAPK6 activa es significativamente mayor en las plantas *cas-c1* que en las WT, tanto para las plantas de 45 días (\*\*,  $P < 0.005$ ) como las de 75 días (\*,  $P < 0.05$ ). Lo mismo ocurre en el caso de la MAPK3 fosforilada, con una significancia de  $P < 0.0001$  y  $P < 0.05$  respectivamente.

## DISCUSIÓN

Para el estudio de la implicación del cianuro en la defensa vegetal, y concretamente en el *priming* en respuesta a patógenos, se han empleado plantas *knock-out* para el gen *CAS-C1* que

presenta mayores niveles de HCN endógeno sin que esto afecte a su viabilidad (García et al., 2010). El HCN, como ya se ha descrito, actúa como una molécula señalizadora regulando una serie de procesos cuando se encuentra a concentraciones no tóxicas (Siegieñ y Bogatek, 2006). En trabajos anteriores se ha demostrado cómo el mutante *cas-c1* presenta una mayor resistencia a ciertos patógenos (García et al., 2013); sin embargo, la posibilidad de que esta resistencia sea debido a que las plantas se encuentran en un estado de *priming* no se había abordado previamente.

Para poder desarrollar la actividad experimental con la línea mutante *cas-c1* es importante comprobar su genotipo. La visualización de la amplificación del cDNA utilizando cebadores específicos para el gen *CAS-C1* dio lugar a una banda intensa en el caso del WT, mientras que en el mutante no había señal. Los cDNAs de ambas líneas se encontraban en buen estado, lo que se verificó con la amplificación del gen de la ubiquitina, un gen de expresión constitutiva. Esto demuestra que los mutantes *cas-c1* son *knock-out* para el gen que codifica la  $\beta$ -cianoalanina sintasa CAS-C1.

El *priming* es un estado de las plantas en el cual pueden activar mecanismos de defensa de forma más rápida y robusta tras iniciarse una infección por patógenos con un coste mínimo para la planta, ya que sus defensas no se encuentran previamente inducidas (Zhang et al., 2018). Este estado se puede inducir por compuestos químicos naturales o artificiales (BABA, ácido azaleico, BTH, algunas hormonas, etc.), además de por moléculas de los propios patógenos (lipopolisacáridos, flg22, quitina, etc.) o estímulos abióticos (luz ultravioleta, estrés por metales pesados, estimulación mecánica, etc.) (Hönig et al., 2023; Mauch-Mani et al., 2017; Ton y Mauch-Mani, 2004).

Las plantas experimentan múltiples cambios a nivel molecular cuando se encuentran en estado de *priming*, tanto una vez que reciben el estímulo que lo desencadena como al enfrentarse a un patógeno (Mauch-Mani et al., 2017). Entre todos estos marcadores de *priming*, en este trabajo hemos analizado la presencia de deposiciones de callosa y la activación de la MAPK6 y MAPK3.

Las plantas mutantes *cas-c1* responden a la infección por *P. syringae* induciendo la formación de deposiciones de callosa entre la membrana plasmática y la pared celular de forma más temprana y potente que las plantas silvestres. Esto ocurre tanto en el caso de una respuesta inducida por PAMPs (PTI), que se da en el caso de la infección con *Pst* DC3000, como para una respuesta inducida por efector (ETI), desencadenada por la bacteria *Pst* DC3000 *AvrRpm1* debido a que esta posee un plásmido con el efector de avirulencia *AvrRpm1*, que es

reconocido por la planta dando lugar a esta respuesta inmune más intensa que la anterior (Xin y Yang He, 2013). La distinta respuesta de la planta ante estas dos cepas bacterianas también se evidencia en ambas líneas vegetales por la afectación del tejido, que es mucho mayor en el caso de *Pst* DC3000 *AvrRpm1*, ya que la ETI da lugar a una respuesta hipersensible que provoca la muerte celular alrededor del punto de infección de manera temprana para impedir la diseminación del patógeno.

En cuanto a las MAPK6 y MAPK3, hemos observado que en condiciones basales el mutante *cas-c1* presenta mayores concentraciones de la forma fosforilada, y por tanto funcionalmente activa, de estas proteínas con respecto al WT. Sería interesante estudiar en un futuro la cinética que sigue la activación de estas proteínas a lo largo del tiempo tras una infección por *P. syringae*, estudiando a distintos tiempos tras la infección la cantidad de las formas fosforiladas, a partir de lo cual podríamos estimar si la respuesta a un ataque es más rápida o más potente en estas plantas mutantes que suponemos que se encuentran en estado de *priming*. La forma inactiva de estas dos kinasas se acumula en mayor medida en el caso de *priming* (Beckers et al., 2009), por lo que podría estudiarse la relación entre las formas inactivas o no fosforiladas y las formas fosforiladas o activas tanto en condiciones basales como durante la infección.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la línea mutante *cas-c1* se encuentra en un estado de *priming* inducido por la mayor concentración de HCN que estas presentan.

El mecanismo por el cual el HCN da lugar a una tolerancia a la infección por ciertos patógenos se ha estudiado previamente (Arenas-Alfonseca et al., 2021). El HCN en las plantas *cas-c1* no induce resistencia debido a que ejerza un efecto tóxico sobre los patógenos, sino que actúa como señalizador activando de manera muy eficiente la resistencia inducida por SA ante el ataque de patógenos, aunque el contenido de esta hormona es menor en los mutantes *cas-c1* en condiciones basales. Podría resultar de interés estudiar las concentraciones de esta hormona en la planta infectada por *Pst*, patógeno frente al cual esta línea vegetal presenta resistencia. Se ha demostrado que la respuesta de defensa de las plantas *cas-c1* es independiente de la acción de NPR1 en el núcleo y de la ubiquitinación de proteínas. Además, la mutación *cas-c1* mimetiza funcionalmente a la NADPH oxidasa, principal productor de ROS en los primeros estadios de una infección por patógenos, independientemente de la producción de anión superóxido.

Podemos suponer que la razón por la que se activan estos mecanismos de resistencia es el estado de *priming* en el que se encuentra el mutante *cas-c1*. La inducción del *priming* por

parte del HCN puede deberse a la modificación posttraduccional que este ejerce sobre las proteínas, la S-cianilación, pudiendo alterar su actividad (García et al., 2019). Múltiples proteínas involucradas en la respuesta de plantas a patógenos sufren S-cianilación en diferentes tejidos vegetales. Entre ellas encontramos varias enzimas del ciclo de la S-adenosil-metionina (SAM), y principalmente la ATMS1 (metionina sintasa 1), involucrada en la regulación de la metilación del DNA relacionada con el *priming* inmunológico. Concretamente, la hipometilación del DNA se relaciona con una mejor resistencia a patógenos (Arenas-Alfonseca et al., 2021; González y Vera, 2019). Resultados experimentales preliminares obtenidos en el laboratorio muestran diferencias en el patrón de metilación del DNA en los mutantes *cas-c1*, lo que puede deberse a la S-cianilación de las proteínas involucradas en la metilación, provocando el establecimiento del *priming* en estas plantas.

Futuros estudios podrían ayudar a determinar de una manera más certera si el mutante *cas-c1* se encuentra en estado de *priming*, lo que ampliaría el conocimiento sobre la señalización mediada por HCN y sus implicaciones en la fisiología vegetal.

## CONCLUSIONES

- En las plantas mutantes *cas-c1* se induce la formación de deposiciones de callosa como respuesta a la infección por *Pst* DC3000 y *Pst* DC3000 *AvrRpm1* de forma más intensa y rápida que en las plantas silvestres.
- La acumulación de MAPK6 y MAPK3 fosforiladas, y por tanto en su forma activa, es mayor en los mutantes *cas-c1* que en las plantas WT en condiciones basales.
- El mutante *cas-c1* presenta características del estado de *priming*.

## BIBLIOGRAFÍA

Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., y Marion-Poll, A. (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00063>

Arenas-Alfonseca, L., Gotor, C., Romero, L. C., y García, I. (2018). SS-Cyanoalanine Synthase Action in Root Hair Elongation is Exerted at Early Steps of the Root Hair Elongation Pathway and is Independent of Direct Cyanide Inactivation of NADPH Oxidase. *Plant and Cell Physiology*, 59(5), 1072-1083. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy047>

Arenas-Alfonseca, L., Gotor, C., Romero, L. C., y García, I. (2021). Mutation in Arabidopsis  $\beta$ -cyanoalanine synthase overcomes NADPH oxidase action in response to pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 72(12), 4535-4547. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab137>

- ATSDR. (1997). *Toxicological profile for cyanide*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Bari, R., y Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473-488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., y Conrath, U. (2009). Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(3), 944-953. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062158>
- Bigeard, J., Colcombet, J., y Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), 521-539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Bleecker, A. B., y Kende, H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 1-18. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>
- Blom, D., Fabbri, C., Eberl, L., y Weisskopf, L. (2011). Volatile-Mediated Killing of *Arabidopsis thaliana* by Bacteria Is Mainly Due to Hydrogen Cyanide. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1000-1008. <https://doi.org/10.1128/AEM.01968-10>
- Boter, M., y Diaz, I. (2023). Cyanogenesis, a Plant Defence Strategy against Herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms24086982>
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., y Glawischnig, E. (2009). The Multifunctional Enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) Converts Cysteine-Indole-3-Acetonitrile to Camalexin in the Indole-3-Acetonitrile Metabolic Network of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(6), 1830-1845. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066670>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brattsten, L. B., Samuelian, J. H., Long, K. Y., Kincaid, S. A., y Evans, C. K. (1983). Cyanide as a feeding stimulant for the southern army worm, *Spodoptera eridania*. *Ecological Entomology*, 8(2), 125-132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1983.tb00490.x>
- Chen, X.-Y., y Kim, J.-Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(6), 489-492.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., y Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Cooper, C. E., y Brown, G. C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: Chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 533-539. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9166-6>
- Díaz-Rueda, P., Morales de los Ríos, L., Romero, L. C., y García, I. (2023). Old poisons, new signaling molecules: The case of HCN. *Journal of Experimental Botany*, erad317. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad317>
- Ding, L. N., Li, Y. T., Wu, Y. Z., Li, T., Geng, R., Cao, J., Zhang, W., y Tan, X. L. (2022). Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232416200>
- Donato, D. B., Nichols, O., Possingham, H., Moore, M., Ricci, P. F., y Noller, B. N. (2007). A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife. *Environment International*, 33(7), 974-984. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.04.007>
- Galletti, R., Ferrari, S., y De Lorenzo, G. (2011). *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 Play Different Roles in Basal and Oligogalacturonide- or Flagellin-Induced Resistance against *Botrytis cinerea*[W]. *Plant Physiology*, 157(2), 804-814. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174003>
- Gao, H., Guo, M., Song, J., Ma, Y., y Xu, Z. (2021). Signals in systemic acquired resistance of plants against microbial pathogens. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3747-3759. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06344-7>
- García, I., Arenas-Alfonseca, L., Moreno, I., Gotor, C., y Romero, L. C. (2019). HCN Regulates Cellular Processes through Posttranslational Modification of Proteins by S-cyanylation1. *Plant Physiology*, 179(1), 107-123. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01083>

- García, I., Castellano, J. M., Vioque, B., Solano, R., Gotor, C., y Romero, L. C. (2010). Mitochondrial  $\beta$ -Cyanoalanine Synthase Is Essential for Root Hair Formation in *Arabidopsis thaliana*[W]. *The Plant Cell*, 22(10), 3268-3279. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076828>
- García, I., Gotor, C., y Romero, L. C. (2014). Beyond toxicity: A regulatory role for mitochondrial cyanide. *Plant Signaling & Behavior*, 9, e27612. <https://doi.org/10.4161/psb.27612>
- García, I., Rosas, T., Bejarano, E. R., Gotor, C., y Romero, L. C. (2013). Transient Transcriptional Regulation of the CYS-C1 Gene and Cyanide Accumulation upon Pathogen Infection in the Plant Immune Response1[C][W]. *Plant Physiology*, 162(4), 2015-2027. <https://doi.org/10.1104/pp.113.219436>
- González, B., y Vera, P. (2019). Folate Metabolism Interferes with Plant Immunity through 1C Methionine Synthase-Directed Genome-wide DNA Methylation Enhancement. *Molecular Plant*, 12(9), 1227-1242. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.04.013>
- Gotor, C., García, I., Aroca, Á., Laureano-Marín, A. M., Arenas-Alfonseca, L., Jurado-Flores, A., Moreno, I., y Romero, L. C. (2019). Signaling by hydrogen sulfide and cyanide through post-translational modification. *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4251-4265. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz225>
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W., y Dangl, J. L. (1995). Structure of the *Arabidopsis* RPM1 Gene Enabling Dual Specificity Disease Resistance. *Science*, 269(5225), 843-846. <https://doi.org/10.1126/science.7638602>
- Grossmann, K. (2003). Mediation of Herbicide Effects by Hormone Interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(1), 109-122. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0020-0>
- Hönig, M., Roeber, V. M., Schmülling, T., y Cortleven, A. (2023). Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1146577. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1146577>
- Iswanto, A. B. B., Vu, M. H., Pike, S., Lee, J., Kang, H., Son, G. H., Kim, J., y Kim, S. H. (2021). Pathogen effectors: What do they do at plasmodesmata? *Molecular Plant Pathology*, 23(6), 795-804. <https://doi.org/10.1111/mpp.13142>
- Jaszczak, E., Polkowska, Ż., Narkowicz, S., y Namieśnik, J. (2017). Cyanides in the environment—Analysis—Problems and challenges. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(19), 15929-15948. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9081-7>
- Knowles, C. J. (1976). Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews*, 40(3), 652-680.
- Li, Z., Variz, H., Chen, Y., Liu, S.-L., y Aung, K. (2021). Plasmodesmata-Dependent Intercellular Movement of Bacterial Effectors. *Frontiers in Plant Science*, 12, 640277. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640277>
- Liu, T., Cao, L., Cheng, Y., Ji, J., Wei, Y., Wang, C., y Duan, K. (2021). MKK4/5-MPK3/6 Cascade Regulates Agrobacterium-Mediated Transformation by Modulating Plant Immunity in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 731690. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.731690>
- Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., y Ton, J. (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 158(2), 844-853. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187468>
- Machingura, M., Salomon, E., Jez, J. M., y Ebbs, S. D. (2016). The  $\beta$ -cyanoalanine synthase pathway: Beyond cyanide detoxification. *Plant, Cell & Environment*, 39(10), 2329-2341. <https://doi.org/10.1111/pce.12755>
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., y Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Miller, y Conn. (1980). Metabolism of Hydrogen Cyanide by Higher Plants 1. *Plant Physiology*, 65(6), 1199-1202. <https://doi.org/10.1104/pp.65.6.1199>
- Miller, R. N. G., Costa Alves, G. S., y Van Sluys, M.-A. (2017). Plant immunity: Unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany*, 119(5), 681-687. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw284>
- Moseler, A., Dhalleine, T., Rouhier, N., y Couturier, J. (2021). *Arabidopsis thaliana* 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases interact with and are protected by reducing systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100429. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100429>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X>

- Nagahara, N., Ito, T., y Minami, M. (1999). Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: Molecular properties and mode of detoxification. *Histology and Histopathology*, 14(4), 1277-1286. <https://doi.org/10.14670/HH-14.1277>
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., y Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.013>
- Piotrowski, M., y Volmer, J. J. (2006). Cyanide Metabolism in Higher Plants: Cyanoalanine Hydratase is a NIT4 Homolog. *Plant Molecular Biology*, 61(1), 111-122. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-6217-9>
- Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C. L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J. Y., Agrawal, A. A., Felton, G. W., y Jander, G. (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiology*, 158(2), 854-863. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187831>
- Romero, L. C., Aroca, M. Á., Laureano-Marín, A. M., Moreno, I., García, I., y Gotor, C. (2014). Cysteine and Cysteine-Related Signaling Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 7(2), 264-276. <https://doi.org/10.1093/mp/sst168>
- Siegień, I., y Bogatek, R. (2006). Cyanide action in plants—From toxic to regulatory. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28(5), 483-497. <https://doi.org/10.1007/BF02706632>
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., y Mauch-Mani, B. (2012). Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology*, 158(2), 835-843. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191593>
- Smith, J., y Arteca, R. N. (2000). Molecular control of ethylene production by cyanide in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 109(2), 180-187. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100210.x>
- Souren, A. W. M. G. (2000). Living with cyanide. En *Geochem News* (Vol. 105, pp. 16-26).
- Tena, G., Boudsocq, M., y Sheen, J. (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), 519-529. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.006>
- Ton, J., y Mauch-Mani, B. (2004).  $\beta$ -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal*, 38(1), 119-130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02028.x>
- Voigt, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*, 5, 168. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00168>
- Wang, Li, H., y Ecker, J. R. (2002). Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, 14(suppl\_1), S131-S151. <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>
- Wang, Li, X., Fan, B., Zhu, C., y Chen, Z. (2021). Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2393. <https://doi.org/10.3390/ijms22052393>
- Xin, X.-F., y Yang He, S. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Yip, W.-K., y Yang, S. F. (1988). Cyanide Metabolism in Relation to Ethylene Production in Plant Tissues 1. *Plant Physiology*, 88(2), 473-476.
- Yu, X.-Z. (2015). Uptake, assimilation and toxicity of cyanogenic compounds in plants: Facts and fiction. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(2), 763-774. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0571-6>
- Zhang, W., Zhao, F., Jiang, L., Chen, C., Wu, L., y Liu, Z. (2018). Different Pathogen Defense Strategies in *Arabidopsis*: More than Pathogen Recognition. *Cells*, 7(12), 252. <https://doi.org/10.3390/cells7120252>
- Zhou, J.-M., y Zhang, Y. (2020). Plant Immunity: Danger Perception and Signaling. *Cell*, 181(5), 978-989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.028>
- Zidenga, T., Siritunga, D., y Sayre, R. T. (2017). Cyanogen Metabolism in Cassava Roots: Impact on Protein Synthesis and Root Development. *Frontiers in Plant Science*, 8, 220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00220>
- Zuhra, K., y Szabo, C. (2022). The two faces of cyanide: An environmental toxin and a potential novel mammalian gasotransmitter. *The Febs Journal*, 289(9), 2481-2515. <https://doi.org/10.1111/febs.16135>

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a Irene, que me ha ayudado a lo largo de estos años a entrar en contacto con el mundo de la ciencia y me ha guiado en mi aprendizaje; gracias a ella soy capaz de desenvolverme en un laboratorio.

A mis padres y mi hermano, que me han acompañado en toda la carrera, estudiándosela conmigo aunque ni entendieran lo que les estaba contando. Gracias por creer en mi cuando yo no lo hacía. A Pablo, por estar siempre a mi lado, en los momentos buenos y en los malos.

Gracias a Alicia, que me ha ayudado con las fotos del microscopio, tanto a hacerlas como a analizarlas.

Agradecer también a Pablo, Inma y al resto de mis compañeros del L105, que me han resuelto mis innumerables preguntas a lo largo de estos meses. A los vecinos del L106, especialmente a Isa, Gloria y Fernando, además de al resto de compis del desayuno, que me han acogido todas las mañanas.

A mis amigos de clase y del labo, Pablo y Rafa. También le doy las gracias a Emilio por su ayuda con las MAP kinasas y a su laboratorio, el L101, por entretenerme en mis múltiples visitas a ver a Rafa y enseñarme a hacer la estadística.

A todas las demás personas que me han prestado su ayuda o su apoyo y cariño a lo largo de este año y se han interesado por cómo iba con mi TFG, José, mis niños de La Línea, María y otras muchas personas que seguro que se me olvidan, gracias.

Sin todos vosotros esto no habría sido posible.