

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

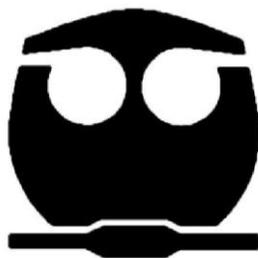
**CRECIMIENTO BACTERIANO EN MUTANTES DE
Arabidopsis thaliana CON ALTERACIÓN EN LA
SÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE LOZANO ROSAS



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: Homero Hernández Montes
VOCAL	Profesora: Marina Gavilanes Ruiz
SECRETARIO	Profesora: Rebecca Elizabeth Franco y Bourland
1er. SUPLENTE	Profesora: José Ignacio Páramo Ramírez
2do. SUPLENTE	Profesora: Laura Carmona Salazar

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica, Conjunto E,
Facultad de Química UNAM.

Asesora Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Sustentante María Guadalupe Lozano Rosas

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Depto. de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

María Guadalupe Lozano Rosas realizó esta tesis de licenciatura gracias a una beca del programa PAPIIT, DGAPA-UNAM (Proyecto IN211409) y a una beca otorgada por CONACYT (Proyecto 101521).

El trabajo de tesis fue financiado por los proyectos IN211409 (PAPIIT, DGAPA-UNAM) y 101521 (CONACYT).

Se agradece la ayuda técnica de la Q.F.B. Ma. del Consuelo Enríquez Arredondo durante la realización de este trabajo de tesis.

“Nunca aceptes la derrota, la debilidad y el desánimo como parte tuya. Tú eres el éxito mismo, porque el éxito no es todo, es lo único”

¡ ¡ G R A C I A S ¡ ¡

Muchas gracias a mis padres por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por su paciencia y su sacrificio continuo para que yo pueda cumplir cada uno de mis sueños.

Muchas gracias a mi hermano por los momentos de diversión durante toda nuestra vida juntos.

Muchas gracias a Gaby, la hermana que la vida me regalo, por todo su apoyo incondicional y su amistad durante tantos años.

Muchas gracias a todos mis AMIGOS por confiar en mí, por los bellos momentos en la Facultad, en cada laboratorio, simplemente gracias por su amistad.

Muchas gracias a Phelo por ser un gran apoyo en mi estancia en el laboratorio, por ser una confidente y amiga entrañable y sobre todo por toda su paciencia y su disposición.

Muchas gracias a mis compañeros del Laboratorio 101; Karlita, Doris, Edgar, Caro, Lupita y recientemente Fer; por su compañía, su ayuda, sus consejos y por hacer aún más divertida la estancia en el Laboratorio.

Muchas gracias a la Dra. Marina por sus consejos, sus críticas constructivas y sobre todo por el apoyo académico brindado en esta hermosa etapa.

Muchas gracias a los sinodales por sus consejos, su apoyo, sus sugerencias para que este trabajo fuera aún mejor.

Muchas gracias a la UNAM por todas las oportunidades brindadas.

*Simplemente gracias a la vida, al creador y a todos ustedes por brindarme su apoyo incondicional estando presentes en la conquista de este escalón para llegar a la cima de mis sueños... **GRACIAS.***

INDICE	Páginas
I. RESUMEN	13
II. INTRODUCCIÓN	15
1. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS CONTRA PATÓGENOS	
1.1 Mecanismos de defensa relacionados a la infección por patógenos	15
1.1.1 Defensa constitutiva	15
1.1.2 Defensa no hospedera	17
1.1.3 Modelo de defensa gen por gen o ETI (<i>inmunidad desencadenada por efectores, IDE</i>)	18
1.2 Muerte celular programada	19
1.3 Respuesta de hipersensibilidad	20
2. MEMBRANA PLASMÁTICA	20
2.1 Composición proteínica	22
2.2 Composición de carbohidratos	22
2.3 Composición lipídica	22
3. COMPUESTOS ESFINGOIDEOS COMO MODULADORES EN PLANTAS	24
3.1 Esfingolípidos	24
3.2 Biosíntesis de <i>novo</i> de esfingolípidos	26

3.3 Fumonisina B1 como inhibidor de la biosíntesis de <i>novo</i> de esfingolípidos	28
3.4 Funciones generales de los esfingolípidos	29
3.5 Funciones de los esfingolípidos en plantas	29
3.6 Relación de las BCL con mecanismos de señalización en la defensa contra patógenos	30
3.6.1 Sistemas de transducción de señales con MAPKs en plantas	30
3.6.1.1 Cascada de cinasas de proteínas activadas por mitógenos	31
III.ANTECEDENTES INMEDIATOS	33
IV.HIPÓTESIS	34
V. OBJETIVOS	34
Generales	
Particulares	
VI.MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Material biológico	
2. Cultivo de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
3. Cultivo de cepas bacterianas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 avrRPM1 (<i>Pst</i> avirulenta) y DC3000 (<i>Pst</i> virulenta)	37

4. Exposición de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea silvestre y mutantes <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atmpk6</i> a FB1	37
5. Exposición de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 avrRPM1 y <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 virulenta	37
6. Determinación del crecimiento bacteriano	39
7. Análisis estadístico de los resultados	41
VII. RESULTADOS	42
1. Efecto del lavado de las plántulas expuestas al patógeno previamente a su homogeneización	42
2. Efecto de la adición de un surfactante en la efectividad de la inoculación bacteriana	43
3. Determinaciones realizadas en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea silvestre	46
3.1 Determinación del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 avrRPM1 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea silvestre. Efecto de la FB1	46
3.2 Determinación del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea silvestre. Efecto de la FB1	49
3.3 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 avrRPM1 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea silvestre	54

3.4 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea silvestre	57
4. Determinaciones realizadas en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atlcb2a-1</i>	59
4.1 Determinación del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 avrRPM1 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atlcb2a-1</i>. Efecto de la FB1	59
4.2 Determinación del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atlcb2a-1</i>. Efecto de la FB1	62
4.3 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 avrRPM1 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atlcb2a-1</i>	68
4.4 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atlcb2a-1</i>	70
5. Determinaciones realizadas en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atmpk6</i>	72
5.1 Determinación del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 avrRPM1 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atmpk6</i>. Efecto de la FB1	72
5.2 Determinación del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atmpk6</i>. Efecto de la FB1	75

5.3 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 avrRPM1 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atmpk6</i>	81
5.4 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>Atmpk6</i>	83
6. Comparación del crecimiento bacteriano de <i>Pst</i> DC3000 avrRPM1 en plántulas de las tres líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en presencia y ausencia de FB1	85
7. Comparación del crecimiento bacteriano de <i>Pst</i> DC3000 en plántulas de las tres líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en presencia y ausencia de FB1	89
8. Comparación del crecimiento bacteriano de <i>Pst</i> DC3000 avrRPM1 y de <i>Pst</i> DC3000 con un inóculo de 1×10^7 UFC/mL en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de las tres líneas en presencia y ausencia de FB1	93
VIII. DISCUSIÓN	97
1. Consideraciones sobre el sistema y el planteamiento de la estrategia experimental	97
2. Evaluación del ensayo de crecimiento bacteriano	101
3. Efecto de la FB1 en el crecimiento bacteriano en <i>Arabidopsis thaliana</i>	102
4. Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 avrRPM1 (<i>Pst</i> avirulenta) y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	105

DC3000 (<i>Pst virulenta</i>) en plántulas de las líneas silvestre, <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atmpk6</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
IX. CONCLUSIONES	109
1. Particulares	109
2. GENERAL	110
X. PERSPECTIVAS	111
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
XII. APÉNDICE	119

I. RESUMEN

Se ha demostrado que en plantas, las bases de cadena larga (BCL) participan en funciones celulares de defensa contra patógenos, favoreciendo la muerte celular programada (MCP) en las células de la región de entrada del patógeno, para así evitar su proliferación. En este trabajo se investigó si la acumulación de BCL pudiera contribuir a la defensa de la planta contra patógenos basada en un mecanismo de inmunidad mediado por el reconocimiento gen por gen.

Con este fin, se evaluó el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1 (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 virulenta (*Pst* virulenta) en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipos silvestre y mutantes, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*. Las líneas mutantes presentaron alterados a los genes *LCB2A* y *MPK6*, respectivamente. El primero codifica a la subunidad LCB2A de la serina palmitoiltransferasa (SPT), primera enzima de la vía de síntesis de *novo* de esfingolípidos. El segundo gen codifica a la proteína MPK6, una MAP cinasa involucrada en vías de transducción de señales por ataque de patógenos y en la vía de la MCP inducida por BCL. Con objeto de elevar los niveles endógenos de BCL, el material biológico se expuso previamente a la toxina fumonisina B1 (FB1) durante 4 ó 12 h, para posteriormente evaluar los cambios fenotípicos y el crecimiento bacteriano desde las 24 hasta las 72 o 120 h pos infección (hpi).

El análisis fenotípico de las plántulas de la línea silvestre tratadas con FB1 indicó la presencia de señales de muerte celular a las 72 h, mismas que se observaron también a las 72 h tras la exposición a las cepas bacterianas *Pst vir* y *Pst avir*. La adición de ambos agentes promovió mayores indicios de muerte en las plántulas a las 72 hpi. En cuanto a la línea *Atlcb2a-1*, se observó una resistencia de la plántula a la toxina al no inducir ésta daños aún a las 120 hpi. En el caso de la *Pst* avirulenta este efecto se mostró a las 72 hpi, y para la *Pst* virulenta este efecto se manifestó a las 120 hpi. La adición de ambos agentes ocasionó rasgos mayores de muerte en las plántulas a 72 hpi. En la línea *Atmpk6* se observó un nulo efecto de la FB1 en la plántula. En el caso de la exposición independiente a los patógenos, avirulento y virulento, la muerte de la plántula se

observó a las 120 hpi. La adición de FB1 y del patógeno, produjo índices de muerte celular más evidentes a las 120 hpi para la *Pst* avirulenta y a las 72 hpi para la *Pst* virulenta.

Con respecto al crecimiento bacteriano, se observó un menor crecimiento del patógeno *in planta* cuando a) se utilizó una concentración de patógeno de 1×10^7 UFC/mL, b) la cepa bacteriana fue la *Pst* DC3000 *avrRPM1*, c) las líneas de *Arabidopsis* fueron la silvestre y la *Atlcb2a-1*. La disminución en el crecimiento bacteriano obtenido en las tres condiciones anteriores fue acentuada por la exposición previa a la FB1 10 μ M, por 4 o 12 h sugiriendo que el aumento de BCL a estos tiempos es suficiente para activar las vías de defensa para contender la infección en las plántulas. En el caso de la línea *Atmpk6*, el crecimiento bacteriano fue mayor con la cepa virulenta que en la avirulenta y no se encontraron diferencias en la proliferación bacteriana cuando hubo un pre-tratamiento con la FB1 por 4 ó 12 h con respecto a los controles. Estos resultados indican que al inducir el aumento de las BCL mediante el uso de la FB1, éstas son capaces de activar la vía de transducción de señales de ataque de patógenos, en particular *Pst* DC3000 *avrRPM1*, y de MCP, siempre y cuando la proteína MPK6 se encuentre presente en el sistema vegetal.

II. INTRODUCCIÓN

1. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS CONTRA PATÓGENOS.

Las plantas evolutivamente han desarrollado una amplia variedad de mecanismos de defensa para poder contrarrestar el ataque de virus, bacterias, protozoarios hongos, nemátodos o insectos [Nájera *et al.*, 2001], por lo que el éxito de que se presente un mecanismo de defensa por parte de la planta es evitando una susceptibilidad de ésta al agente abiótico o biótico.

Los síntomas de enfermedad en la planta son causados por factores no infecciosos (abióticos) como temperatura, humedad, contaminantes, luz, etc. que se encuentren por debajo o por encima de los niveles de tolerancia que la planta presenta o por microorganismos patógenos (bióticos) que causan enfermedad al interrumpir el metabolismo de la célula a través de enzimas, toxinas, reguladores de crecimiento y otras sustancias secretadas por estos agentes.

Las plantas combaten a los patógenos con características estructurales que actúan como barreras físicas que dificultan la entrada del agente extraño y evitan así su expansión en el interior de la planta, o bien, a través de reacciones bioquímicas en las células vegetales que producen sustancias que pueden ser tóxicas para el patógeno, e incluso crear un microambiente adverso para el crecimiento del microorganismo invasor. Según el tipo de célula o tejido infectado, será una determinada función fisiológica de la planta la que se vea alterada. No obstante, el proceso de infección puede ocurrir en todas las especies de plantas [Agrios, 1997].

1.1 Mecanismos de defensa relacionados a la infección por patógenos.

1.1.1 Defensa constitutiva

Los mecanismos de defensa de una planta pueden ser no específicos o específicos; los primeros se manifiestan en una respuesta de la planta ante el patógeno, es decir, una respuesta de no enfermedad para la planta. Esta respuesta se presenta en todas las especies vegetales de forma natural y se llama también inmunidad innata o constitutiva.

El caso de un tipo de defensa específica requiere una interacción más compleja que involucra genes específicos tanto de la planta como del patógeno, por lo que la presencia o ausencia de este tipo de defensa dependerá de los genotipos de las especies que estén interactuando mutuamente [Bonas y Lahaye, 2002].

Ante un ataque por algún patógeno, los mecanismos de defensa innatos son los primeros que actuarán para una protección de la especie vegetal, puesto que éstos consisten en barreras físicas estructurales y moléculas químicas existentes de forma prácticamente permanente en la planta. Si bien las plantas no generan respuestas como la producción de anticuerpos en caso de una infección, pueden excluir o eliminar partes de un tejido afectado por patógenos, mediante mecanismos de defensa constitutivos para detener de inmediato y de forma efectiva la propagación de la infección. Algunas sustancias de protección con las cuales cuenta la planta de forma natural son compuestos fenólicos, terpenoides, triterpenos; además de varias proteínas que actúan como inhibidores de proteinasas y enzimas hidrolíticas del patógeno involucradas en la degradación de la pared celular de la planta hospedera. También están las lectinas, proteínas que se unen específicamente a ciertos azúcares que se encuentran en gran concentración en muchos tipos de semillas, causando lisis e inhibiendo el crecimiento de muchos tipos de hongos [Agrios, 1997].

Las plantas pueden desplegar un modelo de reconocimiento de patógenos a través de receptores con el objeto de identificar a los agentes extraños y así iniciar una respuesta basal de inmunidad; ya que cuando un patógeno ataca una planta, la primera línea de defensa es la que se desencadena por el reconocimiento de moléculas del invasor y que pueden ser proteínas, oligosacáridos o lípidos, los cuales se denominan endógenos si éstos son producidos por la planta misma o exógenos si son excretados por el organismo invasor [Hammond-Kosack y Jones, 1996]. A las moléculas producidas por los agentes invasores se les denomina de forma genérica patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) o bien patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); entre estas moléculas se han identificado algunas como la flagelina, la cual es una proteína presente en los flagelos bacterianos; el factor de elongación Tu, la quitina y el ergosterol, que son componentes de la pared celular de hongos, así como lipopolisacáridos presentes en las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas [Wit, 2007]. Estas moléculas son reconocidas mediante distintos receptores presentes en la superficie de la célula vegetal

que poseen diferentes dominios localizados en distintas partes de la célula: un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular denominado receptor-cinasa [Bittel y Robatzek, 2007].

La inmunidad mediada por estas moléculas que son MAMPs produce una defensa denominada PTI (*Inmunidad Desencadenada por PAMPs, IDP*) [Nicase *et al.*, 2009; Peer *et al.*, 2010], pero la resistencia resultante no es específica para la especie del patógeno que infecta, ya que independientemente de la naturaleza química del agente, los mecanismos de defensa desencadenados por éste son muy similares para todos los agentes químicos del patógeno. Además, aunque el reconocimiento del MAMP o PAMP por el receptor respectivo de la planta es muy específico, los MAMPs o PAMPs están muy conservados en una gran variedad de especies, lo que los hace inespecíficos en el patrón de inmunidad que desatan.

1.1.2 Defensa no hospedera.

En la interacción de las plantas con bacterias fitopatógenas ocurren complejos procesos de señalización, tanto en la planta como en el microorganismo, que determinan que una infección sea exitosa o por el contrario contrarrestada por las defensas de la planta hospedera. El éxito de una infección depende, en gran parte, de que el patógeno sea capaz de inhibir o retardar la activación de las respuestas defensivas de la planta. Se sabe que los patógenos cuentan con un rango limitado de especies de plantas a las cuales pueden causar enfermedad. Sin embargo, con frecuencia plantas de un solo género suelen ser organismos hospederos para un patógeno en particular; por lo que una especie vegetal susceptible a una especie o subespecie de un patógeno se denomina "hospedero" para ese microorganismo en particular. El resto de las plantas se conocen como "plantas no hospederas" y los organismos que las atacan son "patógenos no hospederos".

Por lo cual el fenómeno de resistencia no hospedera se manifiesta cuando el patógeno en cuestión no es capaz de abatir las líneas de defensa innatas de la planta. En este caso, la planta no presenta la enfermedad.

1.1.3 Modelo de defensa gen por gen o ETI (*inmunidad desencadenada por efectores, IDE*)

El modelo denominado *gen por gen* o ETI, postula que la resistencia de una planta a un fitopatógeno ocurre cuando la planta posee un gen de resistencia llamado *R* y el patógeno expresa un gen complementario de avirulencia llamado *Avr*. Es decir, la infección sólo ocurre cuando la planta o el patógeno (o ambos) carecen del alelo del gen *R* o *Avr* respectivamente, por lo que se manifiesta entre una planta resistente y un patógeno avirulento. Lo anterior da como resultado una interacción incompatible, es decir, hay defensa de la planta contra el patógeno. Para ello, la planta reconoce al patógeno de manera muy específica y echa a andar un programa de defensa contra el patógeno en cuestión [Hammond-Kosack y Jones, 1997]. En el caso de la defensa mediada por una interacción gen por gen, los genes están dirigidos recíprocamente, por lo que los individuos participantes no sólo tienen que ser de cierta especie, sino de una cepa de entre todas las que puede haber en una especie. En el caso contrario, cuando la infección progresa, la interacción se denomina compatible y se dice que la planta presenta susceptibilidad.

Muchos genes de resistencia poseen en su secuencia dominios involucrados en señalización, como cierres de leucina (*leucine zippers*), *Toll/Interleukine1/resistance* o dominios de proteínas cinasas. En consecuencia, se cree que las proteínas codificadas por los genes *R* tienen dos tipos de funciones: reconocimiento de la señal derivada del *Avr* y activación de vías de señalización que desencadenan la respuesta defensiva contra el patógeno [Dood *et al.*, 2006]. Por su parte, los productos de muchos genes *Avr* tienen dos efectos contrapuestos. El primero es el de ser blanco directo o indirecto de los genes de resistencia, despertando de esa manera la respuesta defensiva del hospedador. El segundo, es el de interferir con la señalización defensiva del hospedador [Abramovitch *et al.*, 2006]. Las bacterias fitopatógenas residen en el espacio intercelular del hospedador, sin embargo muchos productos de los genes *Avr* conocidos ejercen su efecto, tanto de estimular como de interferir con las respuestas defensivas del hospedador, dentro de las células vegetales.

Muchas proteínas *Avr* y otros compuestos del patógeno son introducidos a través de sistemas de secreción especializados que las transportan a través de las paredes y

membranas celulares bacterianas primero, y del hospedador después [Alfano y Collmer, 2004].

1.2 Muerte celular programada

La muerte celular programada (MCP), se conoce como una secuencia de eventos que conducen a la destrucción de las células de un organismo de una forma organizada y controlada como parte del desarrollo normal o en respuesta a algún estímulo recibido [Reape *et al.*, 2008]. En el caso de organismos vegetales esta respuesta de defensa es crucial para el desarrollo y la sobrevivencia del mismo [Greenberg, 1996] y la efectividad de la MCP se debe a la activación de eventos moleculares regulados de forma constante en la célula; sin embargo a diferencia de los estudios realizados sobre apoptosis en células animales, en la MCP que sucede en plantas la secuencia de eventos moleculares y celulares todavía no está totalmente establecida. Se han reconocido alteraciones morfológicas y bioquímicas durante este proceso y que comprenden desarreglo del citoesqueleto, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) [Gilchrist, 1998; Balk *et al.*, 2003]. Al final de proceso se presentan alteraciones tanto en el tonoplasto como en la membrana plasmática, lo que da como resultado un colapso celular y la liberación de enzimas hidrolíticas vacuolares, lo cual determina una parte importante en la degradación de todos los componentes celulares [Nooden, 2004]. Hay situaciones regulares en el ciclo de vida de la planta que presentan la MCP, como la etapa de senescencia de las células vegetales. Ésta es considerada como un proceso de MCP que involucra vías de señalización coordinadas [Pennell *et al.*, 1997]. Sin embargo, uno de los ejemplos más conocidos de la MCP expresada en plantas, es la que sucede en las respuestas de defensa contra patógenos y en la cual su propósito es restringir el avance del patógeno. Esta respuesta se conoce como respuesta de hipersensibilidad (HR) [Reape *et al.*, 2008].

Por lo tanto, las plantas poseen distintos mecanismos evasores para poder enfrentar el ataque de cualquier agente extraño, si bien, dependiendo de los mecanismos inducidos de inmunidad, será el éxito de la defensa para eliminar al agente exógeno.

1.3 Respuesta de hipersensibilidad

Una de las formas de defensa más efectivas es la respuesta de hipersensibilidad (HR), la cual se define como una muerte programada limitada sólo a una población de células en y alrededor del sitio de entrada del patógeno y que se expresa como una lesión necrótica en el tejido vegetal unas horas después del ataque del patógeno [Hammond-Kosack y Jones, 1996]. Esto puede suceder gracias al reconocimiento específico con base en el modelo de la interacción *gen por gen*, aunque otros mecanismos de defensa en los que esta interacción no sucede, también presentan a la HR, como en el caso de la defensa no-hospedera. Una vez que es realizado el reconocimiento de elementos del patógeno, se desencadena la activación de una cascada de reacciones bioquímicas en las células vegetales atacadas y en las células circundantes, llevando así a la producción de compuestos relacionados con la defensa de la planta. Se sabe que durante la HR se presenta una rápida y transitoria producción de grandes cantidades de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) como el ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [Agrios, 1997; Greenberg, 1997].

La HR presenta características de las formas de muerte celular que suceden en células animales como podrían ser apoptosis y autofagia. Lo anterior indica que la muerte celular programada es un proceso que se ha conservado a lo largo de la evolución de las células animales y vegetales [Mur *et al.*, 2008] y ésto se observa cuando en la HR se llegan a presentar características propias de la apoptosis; es decir se incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática (MP), se presenta un encogimiento de la célula, hay degradación controlada del DNA y hay condensación del citoplasma y núcleo [Morel y Dangl, 1997].

2. MEMBRANA PLASMÁTICA

Los límites de las células están constituidos por membranas biológicas, que son barreras que definen el interior y exterior de la célula y que de acuerdo a su estructura, también ayudan a comunicar el interior y exterior de ésta, ya que poseen sistemas de transporte que permiten tomar del exterior moléculas específicas y desechar compuestos no deseados, lo que proporciona a las membranas biológicas la permeabilidad selectiva indispensable para la supervivencia celular [Stryer *et al.*, 2004].

La MP es una bicapa lipídica muy resistente, que es flexible. La composición química de ésta es variada, pero tiene como componentes principales: proteínas, lípidos y carbohidratos, en un orden decreciente en cuanto al porcentaje ocupado en la membrana.

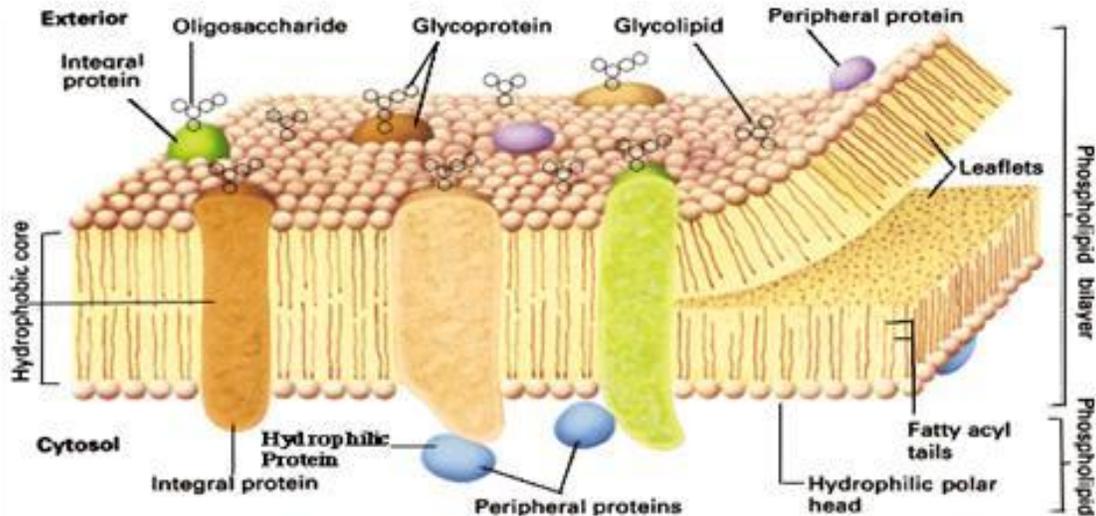


Fig. 1. Modelo de la estructura de la membrana plasmática

Algunos puntos importantes en este modelo son:

- I. Las proteínas de membrana interactúan específicamente con una pequeña proporción de lípidos membranales los cuales pueden ser esenciales para su función.
- II. Las proteínas de membrana pueden difundir lateralmente en la matriz lipídica a menos que queden restringidas por interacciones específicas, mientras que no pueden girar libremente de un lado al otro de la membrana. [Stryer, 2003].
- III. Los constituyentes lipídicos de la membrana se encuentran en forma de bicapa debido a su polaridad anfipática. La bicapa lipídica representa una barrera de permeabilidad y a la vez es también un disolvente para las proteínas integrales de membrana.

2.1 Composición proteínica.

La membrana posee en su interior un gran número de proteínas específicas que facilitan distintas funciones en la célula como son el transporte, la comunicación y la transducción de energía. Las proteínas son polímeros de aminoácidos y veinte de ellos son usados para la formación de todas las proteínas existentes en las células tanto de procariontes y eucariontes, variando el ordenamiento y número de estos aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. Se ha evidenciado la existencia de dos tipos de proteínas que se encuentran asociadas a las membranas: i) proteínas periféricas y ii) proteínas integrales o transmembranales.

Las primeras son aquellas que están unidas a las membranas a través de interacciones débiles, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno, que en su conjunto forman una red de asociaciones estables con la membrana [Stryer *et al.*, 2004]. Por otra parte, las proteínas integrales pueden estar constituidas por cadenas polipeptídicas aisladas o por grandes complejos formados a su vez de subunidades, con componentes adicionales no proteicos, como los son los grupos prostéticos. Y aunque algunas proteínas integrales sólo tienen acceso a un lado de la MP, las proteínas transmembranales tienen la capacidad de atravesar la MP por ambos lados [Raven *et al.*, 1992].

2.2 Composición de carbohidratos.

Los oligosacáridos se sitúan en la superficie externa de las células eucariotas, por lo que contribuyen a la asimetría de la membrana. Alrededor del 5% del peso total de lípidos membranales está en forma de glucolípidos, sin embargo, a pesar de su diversidad en la naturaleza, solamente algunos se encuentran en las glicoproteínas y los glucolípidos de las membranas biológicas en general; entre los principales carbohidratos que están unidos a lípidos están la galactosa, manosa, glucosa, fructosa, glucosamina, galactosamina y el ácido siálico.

2.3 Composición lipídica.

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua que presentan solubilidad elevada en solventes orgánicos. Los lípidos de las membranas tienen una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica. Sin embargo, desde el punto de vista biológico, una de las propiedades

más importantes de los lípidos es su hidrofobicidad, misma que deben a la presencia de ácidos grasos, bases esfingoideas o anillos heterocíclicos dependiendo del tipo de biomolécula lipídica de la que se trate. Los principales lípidos de membranas plasmáticas en plantas y en animales son esteroides, esfingolípidos y glicerolípidos.

Los esteroides son compuestos que contienen un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el C-3. La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5. Los esteroides son sintetizados en el retículo endoplásmico y distribuidos a otros organelos por tráfico vesicular y no vesicular [Max Fiel y Tabas, 2005]. La mayoría de los esteroides se encuentran libres. De éstos, en el caso de plantas los esteroides de mayor proporción son el sitosterol, el campesterol y el estigmasterol [Bohn *et al.*, 2001]. La composición de los esteroides varía de un órgano a otro de la planta.

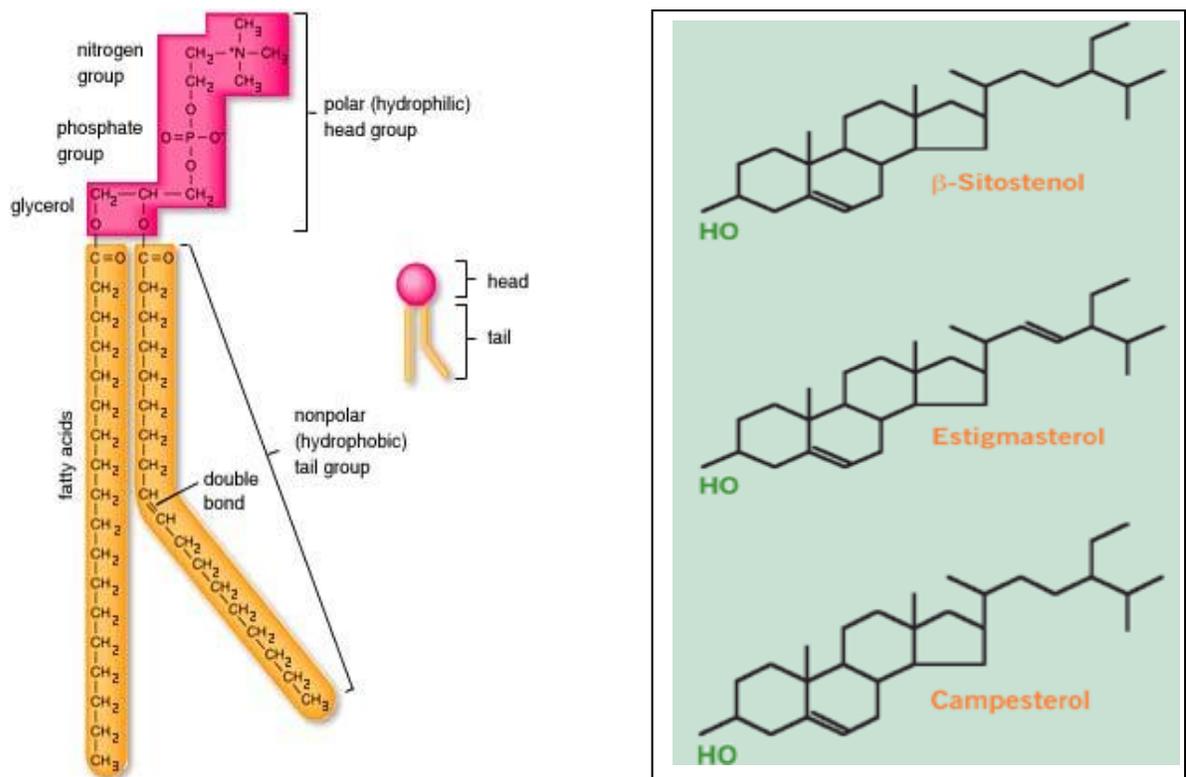


Fig.2. Estructura de glicerolípidos y principales esteroides vegetales

El glucocerebrósido es el principal esfingolípidos en la membrana plasmática de plantas. La fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) son los principales glicerolípidos en membranas plasmáticas y animales [Palacios Bahena, 2008]. En membranas vegetales,

el ácido fosfatídico (PA) es el tercer glicerolípido más abundante seguido por la PC y PE que se encuentran en mayor cantidad [Palacios Bahena, 2008].

Los principales ácidos grasos de las membranas plasmáticas de las plantas y de la mayoría de otros organismos, tienen una longitud de cadena de 16 a 18 átomos de carbono, conteniendo de una a tres insaturaciones [Buchanan *et al.*, 2000]. Los ácidos más abundantes en las membranas vegetales son ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1), ácido linoléico (18:2) y ácido linolénico (18:3) [Burgos y Donaire, 1996]. Pero el grado existente de insaturación de los ácidos grasos en la membrana plasmática es similar en las membranas plasmáticas de animales y plantas [Buchanan *et al.*, 2000].

3. COMPUESTOS ESFINGOIDEOS COMO MODULADORES EN PLANTAS

3.1 Esfingolípidos

Los esfingolípidos son moléculas que contienen dos cadenas largas hidrofóbicas que integran la porción de ceramida y una cabeza polar. Las dos cadenas hidrofóbicas que forman la ceramida pertenecen a una BCL y un ácido graso, unidos por un enlace amida entre el grupo amino de la BCL y el grupo carboxilo del ácido graso. El grupo hidroxilo terminal de la BCL une un grupo polar que puede estar formado por uno o varios residuos de carbohidratos y un grupo fosfato.

Son sintetizados en el retículo endoplásmico (ER) y el aparato de Golgi. En el caso de los mamíferos, los esfingolípidos principalmente presentes son la esfingomielina, mientras que en tejidos vegetales, las glucosilceramidas son los esfingolípidos complejos de mayor proporción en las células [Markham *et al.*, 2006].

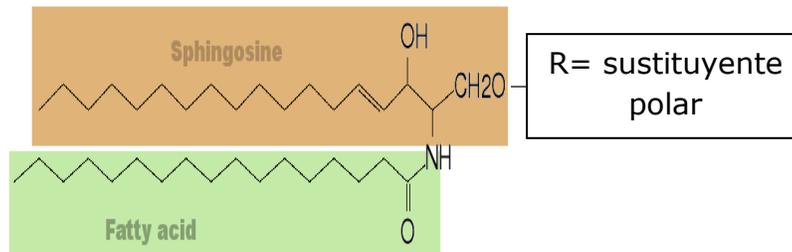


Fig.3. Estructura básica de los esfingolípidos

Los esfingolípidos (Fig. 3) basan su complejidad y diversidad en las numerosas posibilidades estructurales de cada uno de sus tres componentes grupo polar, BCL y ácido graso. Estas biomoléculas son derivadas de la esfingosina (4-esfingenina), y están constituidas por largas cadenas alquílicas que constan desde 14 hasta 22 átomos de carbono, un grupo amino ($^+NH_3$) en el C-2 y dos grupos hidroxilo (OH) en C-1 y C-3. Las BCL pueden llegar a presentar dobles enlaces en los carbonos en posición 4 u 8. Las BCL predominantes en los tejidos vegetales tienen una cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono con diferencias en el número y posición de hidroxilaciones, así como en el número, posición y configuración estereoquímica de los dobles enlaces presentes en estas moléculas (Fig. 4).

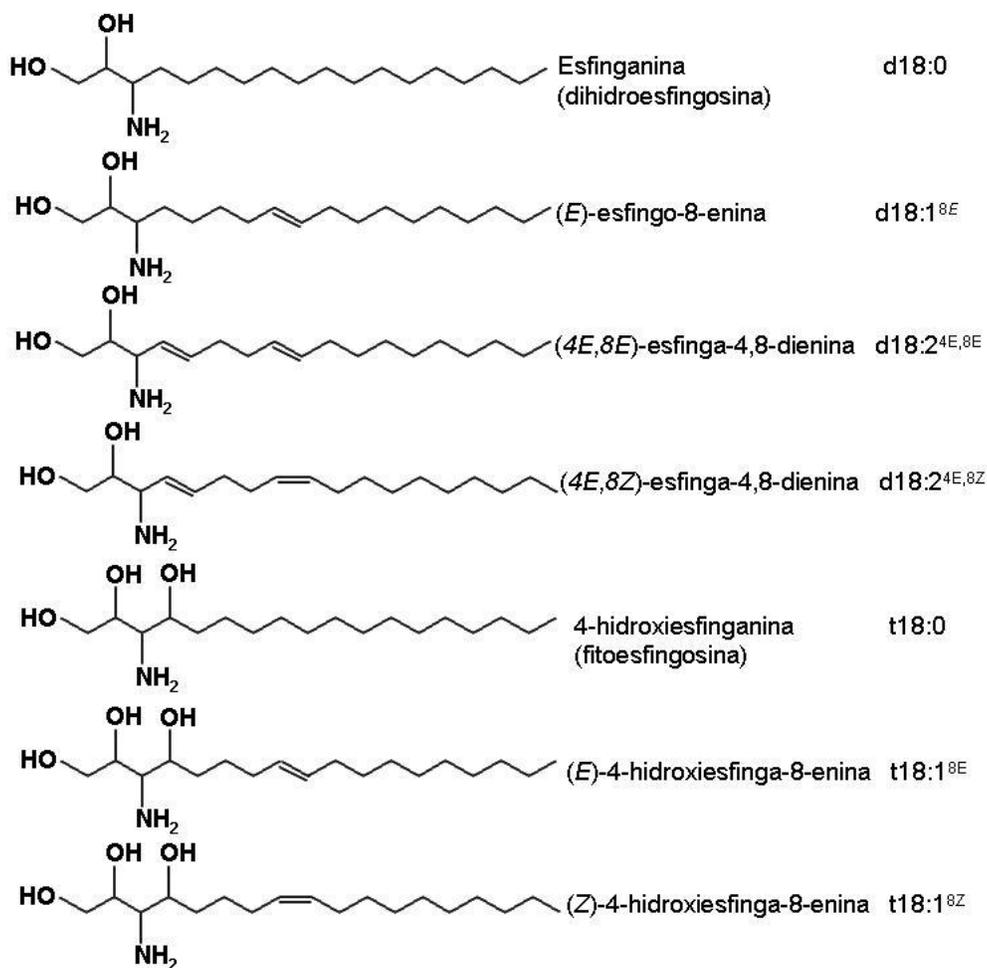


Fig. 4. Estructuras de bases de cadena larga presentes en plantas [Sperling y Heinz, 2003].

Entre las BCL presentes en mayor proporción en plantas están la esfinganina (dihidroesfingosina), 4-hidroxiesfinganina (fitoesfingosina), (8E/Z)-4-hidroxi-8-esfingeninas, (E/Z)-esfing-8-enina, (4E, 8E/Z)-esfinga-4,8-dienina [Lynch y Dunn, 2004]. Aunque otras BCL con diferentes número de carbonos están presentes, se encuentran en menor proporción [Sperling y Heinz, 2003].

3.2 Biosíntesis de *novo* de esfingolípidos

La biosíntesis de los esfingolípidos da inicio en el Retículo Endoplásmico con la condensación de palmitoil-CoA con L-serina para llevar a cabo la producción de 3-cetoesfingosina, reacción catalizada por la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT),

heterodímero formado por las subunidades LCB1 y LCB2. En un segundo paso en la vía, la 3-cetoesfingosina es reducida hasta la formación de esfinganina, mediante la 3-cetoesfinganina reductasa utilizando NADPH [Lynch y Dunn, 2004]. En una reacción subsecuente, la esfingosina puede ser fosforilada mediante la esfinganina cinasa para dar lugar a la formación de esfinganina-1-fosfato. Para la formación de ceramida, el grupo amino de la esfinganina es acilado mediante un enlace amida, catalizado por la enzima esfinganina *N*-aciltransferasa o comúnmente llamada ceramida sintasa. Posteriormente, a las ceramidas se le agregarán enzimáticamente diversos grupos polares para dar paso a la formación de los esfingolípidos complejos, como son glucosilceramida o la glucosilinositolfosforilceramida [Sperling y Heinz, 2003].

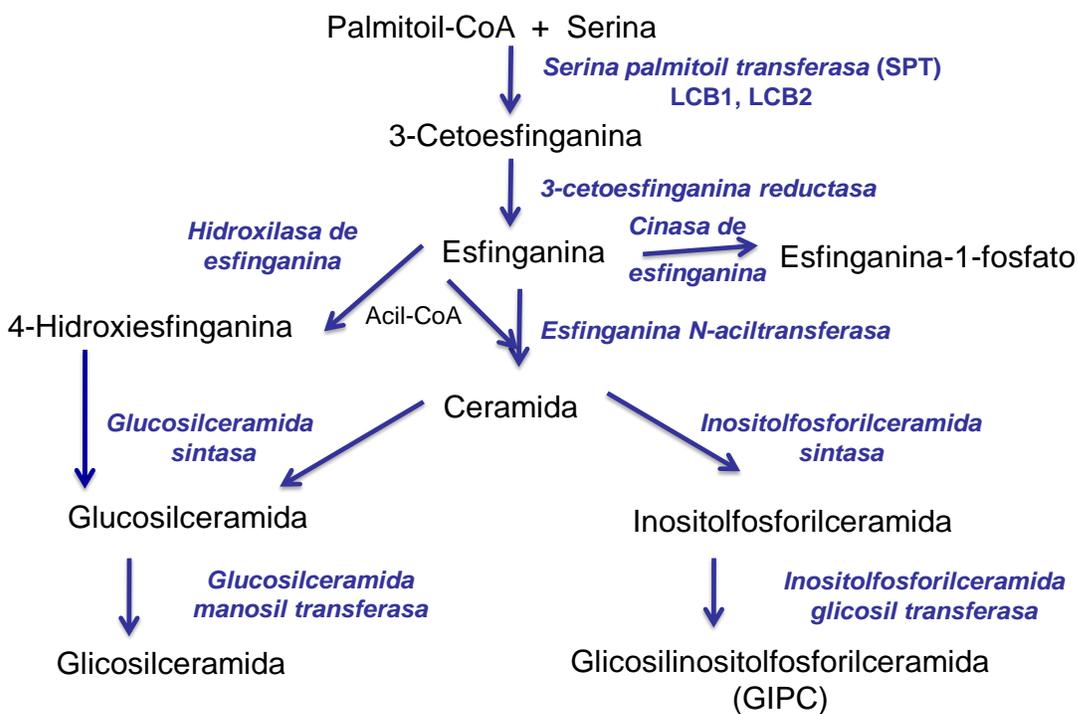


Fig. 5. Biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos en plantas

3.3 Fumonisina B1 como inhibidor de la biosíntesis de *novo* de esfingolípidos

La fumonisina B1 (FB1) es una micotoxina producida por *Fusarium verticillioides*, hongo que contamina frecuentemente diferentes granos de cultivos, entre ellos el maíz; esta toxina es la más potente y predominante de su grupo [Desai *et al.*, 2002]. La FB1 es un aminopentol con dos ácidos tricarbálicos unidos mediante un enlace éster a la cadena hidrocarbonada.

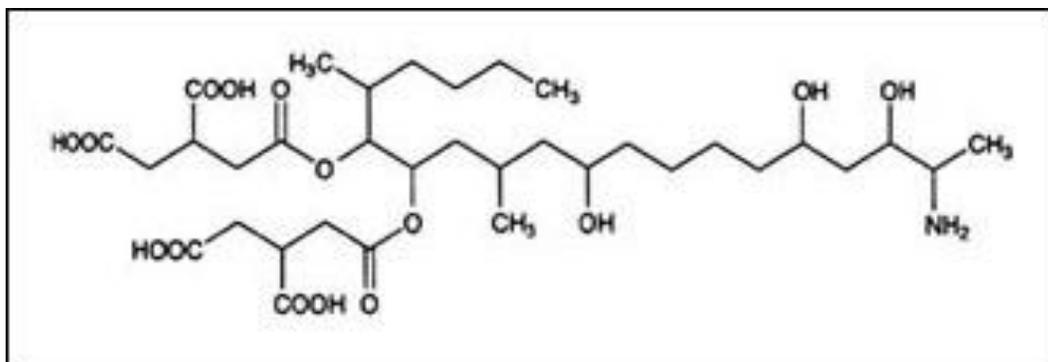


Fig.6.Estructura química de la Fumonisina B1 (FB1)

Esta molécula es un potente inhibidor competitivo de la ceramida sintasa, enzima que cataliza la acilación de esfinganina en la biosíntesis de *novo* de los esfingolípidos (Fig. 4). Por lo tanto, la inhibición de esta enzima tiene como consecuencia una disminución en la síntesis de esfingolípidos complejos y de ceramida, produciéndose concomitantemente una acumulación de BCL [Merrill *et al.*, 1996]. Se sabe que esta inhibición es producida por las similitudes estructurales que presentan las BCL y la micotoxina, puesto que el aminopentol compite con el sustrato, es decir las BCL, por el sitio catalítico de la esfinganina *N*-acil transferasa o ceramida sintasa; al mismo tiempo, los ácidos tricarbálicos interfieren con el enlace del ácido graso-acil CoA [Desai *et al.*, 2002].

En *Arabidopsis thaliana*, la muerte celular inducida por FB1 tiene características en común con la respuesta de defensa tipo HR, incluyendo la presencia localizada de lesiones, producción de ERO, de fitoalexinas y la expresión de genes de defensa que dependen de la señalización por el ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico.

3.4 Funciones generales de los esfingolípidos

Las funciones de los esfingolípidos están bien estudiadas en células animales y en levaduras. Entre las funciones que más destacan son la formación de la estructura membranal, la unión a sitios específicos de microorganismos, toxinas o virus, y la modulación de la actividad de receptores membranales [Lynch y Dunn, 2004]. Además de ser moléculas importantes en la organización de las membranas de células tanto eucariotas como de células vegetales, los esfingolípidos juegan un papel muy importante en distintos procesos celulares, específicamente en células vegetales, como diferenciación, crecimiento, muerte celular programada (MCP) y defensa contra patógenos [Sperling y Heinz, 2003].

3.5 Funciones de los esfingolípidos en plantas

La información sobre las funciones de los esfingolípidos en plantas aún no se ha dilucidado del todo, en oposición a lo avanzado de su conocimiento en células animales, pero se ha establecido que éstos son importantes mediadores celulares, al igual que en animales y hongos [Kawaguchi *et al.*, 2000].

A este respecto se ha encontrado que las BCL desempeñan un papel en la señalización en células vegetales mediando el cierre de estomas, que son poros en la epidermis de las hojas y tallos que son importantes para la absorción del CO₂ durante la fotosíntesis y para la reducción de la pérdida de agua por transpiración. Las células regulan la apertura y cierre de los estomas respondiendo a diversas señales ambientales y químicas como son la intensidad de la luz, temperatura, estado del agua, niveles de CO₂ y señales hormonales [Chen *et al.*, 2009]. Se ha demostrado que la esfingosina 1-fosfato (S1P) promueve el cierre de estomas al inducir un incremento en la concentración citosólica de Ca²⁺, además se sabe que los efectos de la S1P en la célula son reversibles y la presencia del doble enlace $\Delta 4$ es esencial, ya que la S1P no afecta la apertura de estomas. Sin embargo, estos experimentos también demostraron que la disminución de los niveles endógenos de S1P mediante el uso de un inhibidor competitivo de la esfingosina cinasa en animales, como es la *DL*-treodihidroesfingosina (DHS) atenúan el cierre de los estomas inducidos por ácido abscísico (ABA) [Ng *et al.*, 2001].

3.6 Relación de las BCL con mecanismos de señalización en la defensa contra patógenos

Las respuestas tempranas detectadas en células de plantas infectadas por patógenos se dan en la región del apoplasto, y en particular en la membrana plasmática (MP). La MP es el sitio en donde la interacción elicitor-receptor inicia la vía de transducción de señales que lleva a la resistencia de la planta hospedera. Los receptores de MP pueden percibir y responder a diversos estímulos externos. En la mayoría de los casos, este proceso se lleva a cabo mediante la unión de ligandos específicos a receptores membranales [Callow y Gree, 1996]. Entre ellos las más documentadas son la interacción de productos del patógeno con receptores, la activación de canales iónicos y la producción de peróxido de hidrógeno.

Mediante los resultados obtenidos en los últimos años sobre la importancia de los esfingolípidos, se ha podido establecer que éstos son moléculas señalizadoras potenciales en las vías de defensa de las plantas, ejemplo de esto es que en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan una acelerada muerte celular, el fenotipo de estas plántulas proporcionan evidencias adicionales que unen el metabolismo de los esfingolípidos con una respuesta tipo HR, ya que involucran proteínas del metabolismo o el transporte de esfingolípidos [Brodersen *et al.*, 2002].

La transducción de señales está formada por una serie de elementos como receptores, cinasas, generación de segundos mensajeros (como el Ca^{2+} o productos de la degradación de lípidos complejos), así como cambios en la fosforilación de las proteínas mediada por cinasas específicas. Se ha determinado que las cascadas de señalización están involucradas en las respuestas de defensa a patógenos a diferentes niveles, los cuales están determinados por el equilibrio entre la actividad de las proteínas cinasas y proteínas fosfatasas [Sheel, 1998].

3.6.1 Sistemas de transducción de señales con MAPK en plantas

Al igual que en la mayoría de los organismos animales, las plantas incurren en el estado de enfermedad como excepción durante su ciclo de vida, pero en las interacciones planta-patógeno, ambos organismos desarrollan diversos mecanismos de defensa y de ataque, respectivamente y, dependiendo de la intensidad, temporalidad y mecanismos

estratégicos, se establece la enfermedad o la resistencia en el sitio de infección de la planta hospedera y eventualmente, en toda la planta.

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa que les permiten responder de forma rápida y eficaz a los cambios que se presentan en su entorno. Si la inducción de estas respuestas es lo suficientemente intensa y persistente temporalmente, la planta se adapta a las modificaciones de su ambiente. Uno de los mecanismos que la planta emplea con frecuencia para activar la defensa contra muchos tipos de estrés, es la activación de cascadas de MAPK (proteínas activadas por mitógenos), las cual se caracteriza por responder a una gran variedad de estímulos de tipo biótico y abiótico, a hormonas y a procesos de división y desarrollo celular [Ichimura *et al.*, 2002].

3.6.1.1 Cascada de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK).

Las MAPK, son componentes frecuentes en la transducción de señales de células eucarióticas, cuya principal función es transducir los estímulos extracelulares reconocidos por los receptores de la célula a una respuesta celular que involucra gran número de moléculas blanco que en relevo, integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo inicial con la finalidad de permitir a la planta mayor grado de defensa [Ichimura *et al.*, 2002].

Las cascadas de MAP cinasas están integradas por tres elementos consecutivos: MAPKKK (cinasa de la cinasa de la MAPK), MAPKK (cinasa de la MAPK) y MAPK; éste es el orden en el que los componentes se van activando consecutivamente mediante reacciones de fosforilación. Las MAPKKKs no se encuentran asociadas directamente con el receptor membranal, necesitan activarse por componentes intermediarios cuya actividad sí puede depender de él. Estos elementos transductores pueden activarse por cross-talking, ejemplo de ellos son la cinasa de proteína C (PKC) y las proteínas de unión a GTP (proteínas-G) monoméricas y/o heterotriméricas [Saucedo-García., 2007]. Mientras que la fosforilación del sustrato puede efectuarse tanto en el citoplasma como en el núcleo, pues muchos de sus blancos son factores o reguladores transcripcionales [Zhang *et al.*, 2001].

Se ha reportado la activación de algunos componentes de cascadas de MAP cinasas en plantas estimuladas con algunos evocadores fúngicos y bacterianos. Asimismo, se sabe que la muerte celular que se presenta durante la HR inducida tanto por patógenos avirulentos como por evocadores puede ser bloqueada por la inhibición de cinasas, lo que sugiere la participación de estas enzimas en el proceso [Liu *et al.*, 2007].

III. ANTECEDENTES INMEDIATOS

La caracterización de la mutante *Atfbr11-1* de *Arabidopsis thaliana* suministró evidencia directa de que la acumulación de BCL media la muerte celular [Shi *et al.*, 2007]. Puesto que en esta mutante el gen de la subunidad LCB1 de la SPT está modificado con la inserción de un T-DNA, la *Atfbr11-1* es incapaz de incrementar los niveles de BCL después del tratamiento con FB1 y de iniciar la respuesta de muerte celular [Shi *et al.*, 2007]. Adicionalmente, se ha establecido que la FB1 produce una acumulación de BCL [Abbas *et al.*, 1994] y que la FB1 induce a la MCP en la cual participan vías de señalización como la del ácido salicílico, el jasmonato y el etileno [Asai *et al.*, 2000].

Resultados obtenidos en el laboratorio sobre la medición de BCL en plántulas de *Arabidopsis thaliana* líneas silvestre y mutante (*Atlcb2a-1*) después de haber sido expuestas a FB1 10 μ M, indicaron que los niveles mayores de BCL se alcanzaron a las 12 y 72 h post-infección, si bien a las 4 h la línea silvestre ya mostraba un aumento significativo. En particular, las BCL que más se elevaron fueron la esfinganina, la fitoesfingosina y las formas fosforiladas respectivas.

Los antecedentes sugerían abordar la exploración de la posibilidad de que la elevación en los niveles de BCL en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a la FB1 tuvieran un efecto en la inmunidad de las plántulas contra el ataque de patógenos [González-Solís., 2009; Saucedo-García., 2007].

Recientemente, se ha reportado que la MCP que es inducida por BCL es importante en la defensa contra patógenos no hospederos (Takahashi *et al.*, 2009). Por ello, adicionalmente era pertinente estudiar si la forma de muerte celular mediada por el incremento de BCL estaba asociada a la forma de inmunidad que esta mediada por la interacción gen por gen en plantas.

Explorando esas posibilidades, se pretende en este trabajo proporcionar una evidencia más a favor de que los esfingolípidos puedan estar mediando respuestas de defensa en las plantas.

IV. HIPÓTESIS

La acumulación de BCL altera la respuesta de inmunidad en la planta mediada por el reconocimiento gen por gen.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si la acumulación de BCL contribuye a limitar el crecimiento bacteriano de dos cepas de *Pseudomonas syringae* contra las cuales *Arabidopsis thaliana* presenta una respuesta de resistencia y de susceptibilidad independientemente.

Objetivos particulares

- 1) Establecer las condiciones experimentales de exposición de plántulas de *Arabidopsis thaliana* al patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1 (cepa *Pst* Avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Virulenta (cepa *Pst* Virulenta).
- 2) Evaluar el crecimiento bacteriano en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre y mutante, en presencia y ausencia de FB1, para inducir los cambios en los niveles de BCL.
- 3) Evaluar el crecimiento bacteriano en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* de la línea mutante *Atmpk6*, en presencia y ausencia de FB1, para interrumpir la vía de señalización de la MCP por BCL.
- 4) Evaluar los fenotipos de las líneas de *Arabidopsis* expuestas a las condiciones experimentales anteriores.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Plántulas de *Arabidopsis thaliana*, genotipo silvestre (ecotipo Col-0) y dos genotipos mutantes de la línea silvestre (*Atlcb2a-1* y *Atmpk6*), se usaron a una edad de tres semanas. La línea *Atlcb2a-1*, es una línea genéticamente modificada en el gen *LCB2a* el cual ha sufrido una interrupción por la inserción de un transposón [Chen *et al.*, 2006], dejando un gen inactivo que no se transcribe, por lo que en esta línea vegetal, la subunidad LCB2A de la serina palmitoiltransferasa (SPT) no se sintetiza. Sin embargo, en esta línea, hay una forma de SPT aún activa, puesto que las funciones de la subunidad LCB2A son suplidas por la subunidad LCB2B, cuyo gen permanece intacto en el genoma de la planta [Chen *et al.*, 2006]. La línea *Atmpk6*, presenta un silenciamiento del gene *mpk6* que codifica para la proteína MPK6, por lo cual esta línea no expresa esta proteína. La MPK6 es una MAPK involucrada en vías de transducción de señales de ataque de patógenos y de MCP inducida por BCL, si bien es de esperarse que la producción de BCL presente niveles normales en esta línea.

En la Tabla 1 se pueden observar las diferencias existentes entre las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas.

Línea de <i>Arabidopsis</i>	Clasificación	Gen alterado	Características fenotípicas relevantes
WT (Col-0)	Silvestre	Ninguno	Niveles normales de BCL libres (bajos) y de esfingolípidos complejos (altos) Niveles normales de AtMPK6
<i>Atlcb2a-1</i>	Homóciga de la línea de inserción de T-DNA Salk-061472	<i>LCB2A</i>	Niveles normales de BCL libres (bajos) y de esfingolípidos complejos Niveles normales de AtMPK6
<i>Atmpk6</i>	Homóciga de la línea SALK-127507-35.X	<i>MPK6</i>	Niveles normales de BCL y de esfingolípidos complejos Niveles nulos de AtMPK6

Tabla 1. Líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este proyecto, denominación y contenido de esfingolípidos.

Se utilizaron las cepas bacterianas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000 avrRPM1 y la *Pst* DC3000 virulenta) [Golapan y Frederick, 2008].

2. Cultivo de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para efectuar la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*, éstas se colocan en un tubo Eppendorf en una cantidad suficiente, agregándoles 1 mL de NaHClO₄ al 20% (estéril) y 1 µL de Tween 20 (Cf 0.1%), agitando vigorosamente en un agitador eléctrico durante 20 min. Después se centrifugan los tubos anteriores aproximadamente durante 10 seg en una minifuga. Una vez terminado este periodo, se retira el sobrenadante con micropipeta (usando puntas estériles). Posteriormente, se agrega nuevamente 1 mL de NaHClO₄ al 20% (preparado con agua estéril) con una agitación vigorosa en un agitador eléctrico durante 10 min, y se centrifuga aproximadamente durante 10 seg para poder retirar el sobrenadante de la mejor manera. Después, las semillas se enjuagan varias veces (aproximadamente 9 veces), cada vez añadiendo 1 mL de agua estéril y agitando suavemente durante 30 seg en el agitador eléctrico y eliminando el sobrenadante en cada uno de los lavados, hasta eliminar completamente el NaHClO₄ y el Tween. Después del último lavado se agrega agua estéril a las semillas para que queden fácilmente manejables para su siembra posterior.

Una vez desinfectadas, las semillas se siembran sobre mallas de nylon (De 63 µm de apertura de poro, estériles) colocadas en la superficie del medio sólido depositado en cajas Petri desechables estériles (con diámetro de 90 x 15 mm, No. Cat 7718, Proveedor Científico). El medio sólido es Gamborg B-5/Agar/Sacarosa (ver apéndice) preparado en fresco, y que debe haber sido esterilizado. Se vierten de 25 a 30 mL de medio aproximadamente en cada una de las cajas Petri desechables estériles (con diámetro de 90 x 15 mm, No. Cat 7718, Proveedor Científico), y se dejan enfriar completamente (realizar en cámara de flujo laminar). Se mantienen en refrigeración hasta su uso.

Las cajas con las semillas sembradas se cubren con plástico autoadherente y papel aluminio para mantenerlas durante 48 h a 4°C en la oscuridad (rompimiento de la latencia de las semillas). Transcurrido este periodo, se transfieren a la cámara de incubación a 29°C con un fotoperiodo de 16 h de oscuridad/ 8 h de luz.

3. Cultivo de cepas bacterianas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1 (*Pst* avirulenta) y DC3000 (*Pst* virulenta)

Las bacterias de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* se cultivan utilizando medio B de King como medio base, suplementado con antibióticos diferencialmente para la cepa *Pst* DC3000 avrRPM1 (rifampicina Cf 50 mg/mL y tetraciclina Cf 20 mg/mL) y para la cepa *Pst* DC3000 virulenta (rifampicina Cf 50 mg/mL) [Zipfel, 2004](ver apéndice). El rociado de las bacterias a las plántulas se detalla a continuación.

4. Exposición de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre y mutantes *Atlcb2a-1* y *Atmpk6* a FB1

Una vez cultivadas las plántulas de *Arabidopsis* como se mencionó anteriormente y con una edad aproximada de 3 semanas, éstas se transfieren, junto con la malla donde fueron crecidas, a medio Gamborg B-5/agar/sacarosa con FB1 10 µM (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO; disuelta en agua estéril) y a medio sin la toxina como control. La exposición a FB1 se llevó a cabo durante 12 h con fotoperiodo continuo; una vez concluido el tiempo con el tratamiento, se realiza la aspersion de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 virulenta.

5. Exposición de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1 y a *Pseudomonas syringae* DC3000 virulenta

La exposición de las diferentes plántulas de *Arabidopsis thaliana* a *Pst* DC3000 avrRPM1 (avirulenta) y *Pst* DC3000 (virulenta) consta de diferentes fases, las cuales se mencionan a continuación:

a) Fase de sembrado del pre-cultivo de uno fresco en LB más glicerol, por estría.

De la cepa original congelada a -70°C, que está en un tubo Eppendorf en medio de LB/glicerol, se quema primero el asa en la flama del mechero, se enfría en el agar de la caja de Petri que se va a inocular, se abre el tubo del cultivo bajo condiciones de esterilidad con ayuda de un mechero y se toma rápidamente una asada del cultivo congelado (rotando el asa en el tubo del cultivo para arrastrar una cantidad suficiente de

éste). Inmediatamente se cierra el tubo Eppendorf con la cepa congelada y se regresa a las condiciones de temperatura antes mencionada.

La asada tomada de la cepa se esparce por estría (por agotamiento) en la caja de Petri que se desea inocular, tomando en cuenta cada una de las secciones de la caja a estriar para lograr ir diluyendo y extendiendo el cultivo en cada una de estas secciones, con la finalidad de obtener colonias aisladas de las cuales se parte para el siguiente cultivo. Una vez inoculada la caja de Petri respectiva, se cubre con papel aluminio, se invierte y se incuba a 29°C bajo luz continua durante 36-48 h.

b) Fase de resiembra por estría completa de la caja

Una vez que el pre-cultivo anterior ha crecido, se observa si hay homogeneidad en la apariencia de las colonias obtenidas, en cuanto a morfología, color y consistencia; para posteriormente, con el asa previamente quemada y enfriada en el agar, se pican una o dos de las colonias aisladas obtenidas, y con esto se estría completamente toda la superficie del medio fresco; logrando así un cultivo fresco abundante. Nuevamente, se cubre la caja de Petri inoculada con papel aluminio, se invierte y se incuba a 29°C bajo luz continua durante 36-48 h.

c) Preparación del inóculo bacteriano.

Bajo condiciones asépticas, colocar aproximadamente 20 mL de MgCl₂ 10 mM (estéril) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL (estéril) y añadir varias asadas del cultivo bacteriano sembrado anteriormente, agitando suavemente hasta lograr una suspensión homogénea.

Una alícuota de la suspensión de aproximadamente 1 mL se deposita en una celda de plástico, para poder tomar la lectura de absorbancia a una $\lambda=600$ nm; ajustando el cultivo bacteriano hasta alcanzar una lectura de absorbancia de 0.1 UDO que corresponde a una concentración de 1×10^8 UFC/ mL. Esta suspensión se puede diluir con solución de MgCl₂ 10 mM (estéril) si se requiere un inóculo más diluido [Zipfiel, 2004], tomando siempre en cuenta la relación de la absorbancia con la concentración celular.

d) Condiciones de infección

Con la finalidad de permitir que una mayor cantidad de bacterias logren ingresar a los espacios intercelulares de la hoja de la plántula, en un recipiente estéril con atomizador se agrega una solución del detergente Silwet Cf 0.01% [Zipfiel, 2004], adicionada a el inóculo bacteriano (preparado fresco), que será la suspensión con la que se rociará cada una de las cajas con plántulas de *Arabidopsis thaliana* seleccionadas para el experimento (*Wt*, *Atlcb2a-1*, *Atmpk6*).

La aspersión sobre cada una de las cajas con las plántulas se realiza aplicando un número aproximado de 8 a 10 aspersiones que corresponden a aproximadamente 1 mL, manteniendo el atomizador a una distancia aproximada de 15 o 20 cm; de tal forma que todas las plántulas reciban una cantidad similar de la solución asperjada. Las cajas asperjadas se mantienen bajo iluminación continua, en cámaras y a 29 °C mientras dura el experimento.

6. Determinación del crecimiento bacteriano

Una vez expuestas las plántulas de *Arabidopsis thaliana* al patógeno *Pst* DC3000 *avrRPM1* o bien a la cepa *Pst* DC3000 virulenta, se obtienen muestras por triplicado de las plántulas, tomando con un par de pinzas estériles, una porción de plántulas completas con un peso de entre 0.1 y 0.25 g de peso fresco en promedio, las cuales se pesan en pequeñas charolas plásticas muy ligeras numeradas con el número de la muestra.

Después de haber pesado las plántulas y de registrar estos datos en una tabla diseñada para tal efecto, cada una de las muestras se lava por 30 seg en una solución etanólica al 70%. Posteriormente se colocan sobre papel absorbente, para finalmente realizar un segundo lavado en agua estéril durante 30 seg y secar por segunda ocasión [Zipfiel, 2004]. De inmediato las plántulas lavadas se colocan en una bolsa pequeña de plástico, de aproximadamente 10 cm de alto por 8 cm de ancho, procurando colocar las plántulas en una de las esquinas del fondo, en donde se les añaden 400 µL de MgCl₂ 10 mM (estéril) para llevar a cabo la trituración completa de cada una de las muestras independientes de plántulas enteras. Esta fase de homogenización se lleva a cabo presionando alrededor de 26 veces un pistilo de mortero de porcelana sobre la parte exterior de la bolsa que contiene a las plántulas.

Posterior a la maceración del total de las muestras, de cada homogenado resultante se toma una alícuota de 200 μL (con una punta de micropipeta cortada en su punta con tijeras, para que no se tape con las fibras del homogenado), y se añade a un tubo Eppendorf que contiene 800 μL de MgCl_2 10 mM (estéril). Una vez colocada la alícuota, se agita vigorosamente con un vórtex, con la finalidad de homogenizar la muestra. Así queda preparada la primera dilución de la muestra del homogenado. A partir de este tubo se realiza una serie de diluciones sucesivas, tomando alícuotas de 100 μL del tubo anterior para colocarlo en otro nuevo tubo Eppendorf conteniendo 900 μL de MgCl_2 10 mM (estéril), hasta obtener un total de 5 tubos Eppendorf por muestra (equivalentes a las respectivas diluciones 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4). Tras la adición de cada alícuota y antes de tomar del tubo que sigue, se agita vigorosamente cada tubo para homogeneizar perfectamente las suspensiones diluidas.

Una vez terminadas las diluciones, se toman 3 gotas de 5 μL de cada una de las diluciones (incluyendo el homogenado inicial) y se colocan en una caja de Petri desechable estéril, que contenga el medio B de King como base, suplementado con los antibióticos adecuados a la cepa de *Pst* que se inoculó, (este proceso deberá realizarse en condiciones estériles en una campana de flujo laminar para obtener resultados confiables).

Al terminar de colocar todas las gotas respectivas en las cajas de Petri, éstas deben secarse por completo en la campana para después ser cubiertas con papel aluminio, invertirlas e incubarlas a 29°C durante 36-48 h. Después de este periodo, se realiza el conteo de colonias crecidas en cada una de las gotas según sea el crecimiento más conveniente (para mayor facilidad durante el conteo bacteriano, se sugiere tener en constante vigilancia a las cajas, puesto que las colonias pueden crecer muy rápido y alcanzar un tamaño muy grande, y resultar prácticamente imposibles de contar). De cada muestra de plantas se tendría por tanto un conteo por triplicado y en general, se preparan tres muestras de plantas por condición experimental, con objeto de hacer un análisis estadístico de los resultados, mismo que se grafican comparativamente para evaluar los resultados experimentales.

Debe tomarse en cuenta que todas las cajas con plántulas se mantienen en la cámara de incubación a 29°C bajo luz continua durante todos los días que dura el experimento.

7. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante la prueba de *t-Student* y mediante el software Graphpad Prism (*t-Student*) para determinar las posibles diferencias significativas en el crecimiento bacteriano encontrado con cada cepa bacteriana y con el tratamiento con la FB1.

VII. RESULTADOS

1. Efecto del lavado de las plántulas expuestas al patógeno previamente a su homogenización

Con objeto de determinar si la inoculación de la cepa *Pst* DC3000 avrRPM1, lograba prosperar en *Arabidopsis thaliana* y de caracterizar su crecimiento, se infectaron tres líneas distintas: silvestre (Col-0), *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, en las cuales se evaluó la efectividad del lavado realizado inmediatamente antes de la toma de muestra para determinar el crecimiento bacteriano. Las muestras se tomaron a las 48 h pos-infección (Fig. 7). Se mostró que el crecimiento bacteriano a las 48 h aumentó 2 órdenes de magnitud con respecto a las muestras con el inóculo inicial, ya fuera en las plántulas con el tratamiento de lavado como en las controles. El crecimiento bacteriano determinado en las muestras tratadas sin realizar el lavado, tanto en el tiempo inicial como a las 48 h post-infección, fue superior con respecto a las muestras tratadas con el lavado inmediatamente antes de su homogeneización, siendo la diferencia de aproximadamente de 2 órdenes de magnitud (log UFC/tejido) en todas las líneas tratadas.

Lo anterior indicó que al realizar el lavado respectivo en cada muestra se eliminó una cantidad importante de inóculo bacteriano que permanecía en la superficie de la hoja, ya que el lavado sólo es una desinfección superficial que elimina parte importante del inóculo bacteriano asperjado en la superficie de la plántula.

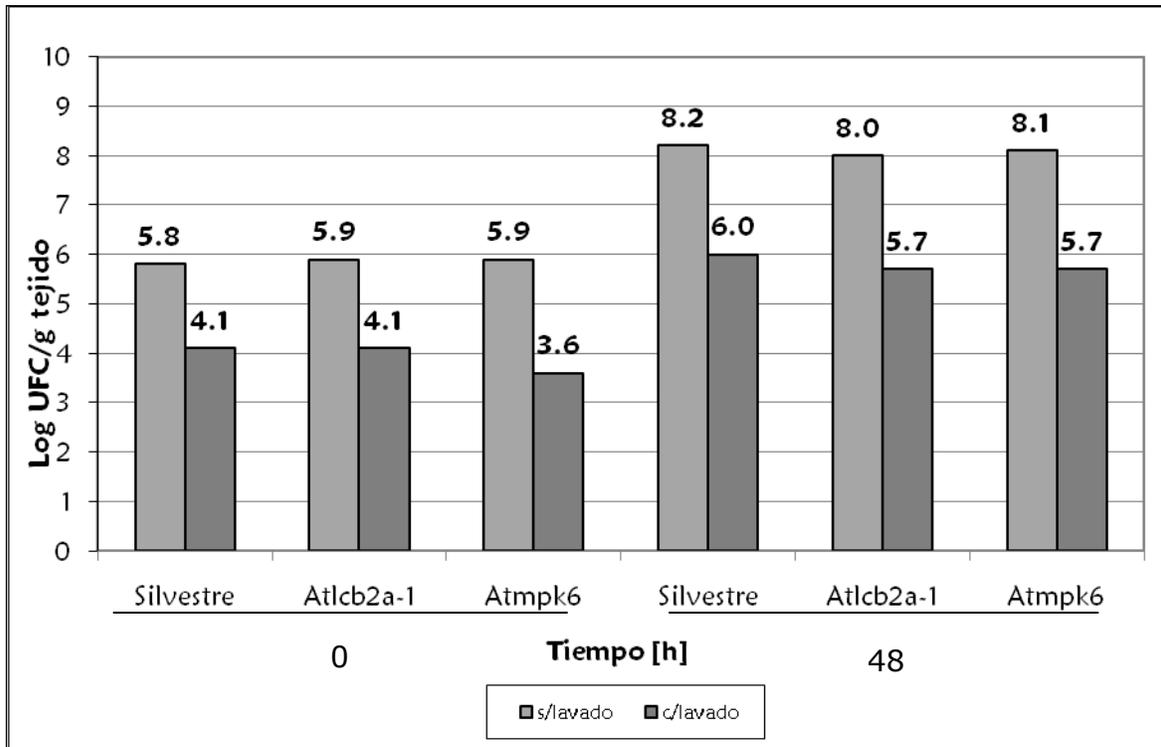


Fig. 7. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en tres genotipos diferentes de *Arabidopsis thaliana* a 48 h pos-infección. Efecto del lavado anterior al homogeneizado de las muestras. Las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6* fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras inmediatamente después de la inoculación bacteriana y después de un periodo de incubación de 48 h, se determinó el crecimiento bacteriano.

2. Efecto de la adición de un surfactante en la efectividad de la inoculación bacteriana.

Se evaluó el efecto de la adición de un surfactante al inóculo bacteriano que se asperjó sobre las plántulas, tomando como ejemplo la línea de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*, determinando el crecimiento de *Pst* DC3000 avrRPM1 a las 0, 12 y 24 h pos-infección. En la Fig. 8 se muestra que en el tiempo inicial del experimento, el tratamiento de lavado removi6 parte del in6culo bacteriano como se haba encontrado anteriormente. Sin embargo, en los tiempos posteriores de muestreo, en especial despu6s de realizar la incubaci6n de las pl6ntulas durante 12 h, se observ6 en la gr6fica que aunque el lavado no se realice, el surfactante adicionado permiti6 una mayor penetraci6n de *Pst* DC3000 avrRPM1 a los espacios intercelulares de los tejidos de las hojas de la pl6ntula, ya que la proliferaci6n bacteriana se llev6 a cabo de una forma m6s eficaz. Al tomar la muestra

después del tiempo de incubación de 24 h, se observó que al realizar el lavado de las muestras el crecimiento de *Pst* DC3000 avrRPM1 con respecto al control disminuyó un orden de magnitud.

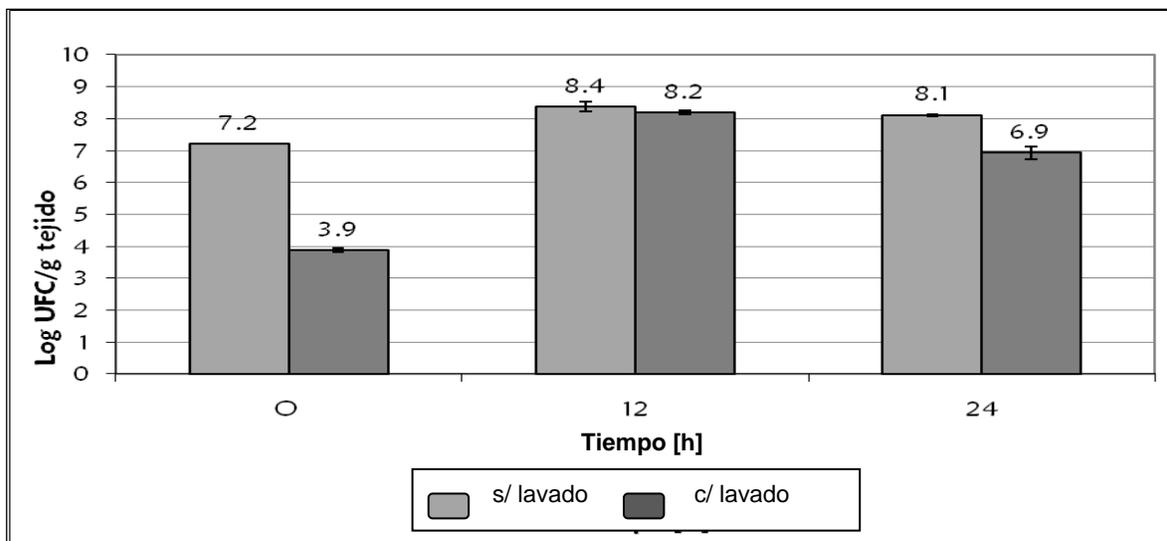


Fig. 8. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1* a 12 y 24 h pos-infección. Efecto de la adición de Silwet 0.01% a la solución asperjada y del lavado de las plántulas antes de ser homogeneizadas. La exposición de estas plántulas se realizó con un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras inmediatamente después de la inoculación bacteriana y después de un periodo de incubación de 12 y 24 h, se determinó el crecimiento bacteriano. n=5, con 15 réplicas individuales.

En el tratamiento de los experimentos posteriores, el lavado fue parte del manejo integral de las muestras, puesto que de acuerdo a los resultados anteriores, éste es necesario para poder discernir entre el crecimiento bacteriano en los espacios intercelulares y el epífito.

Por los objetivos de este trabajo, se llevaron a cabo experimentos que incluyeron tres líneas con genotipos diferentes, dos cepas bacterianas con genotipos diferentes, dos inóculos bacterianos diferentes y dos tiempos diferentes de exposición a FB1. Con la finalidad de resumir las diferentes variables y las combinaciones en las determinaciones experimentales, todas ellas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Diferentes combinaciones de línea vegetal, cepa bacteriana, inóculo bacteriano y tiempo de tratamiento de FB1 utilizadas en este proyecto.

	Concentración de inóculo bacteriano de <i>Pst</i> DC3000 avrRPM1 (UFC/mL)		Concentración inóculo bacteriano de <i>Pst</i> DC3000 (UFC/mL)		Tratamiento con FB1 (h)	
	1×10^7	1×10^8	1×10^7	1×10^8	4	12
WT Col-0	✓				✓	
	✓					✓
		✓				✓
			✓		✓	
			✓			✓
				✓		✓
<i>Atlcb2a-1</i>	✓				✓	
	✓					✓
		✓				✓
			✓		✓	
			✓			✓
				✓		✓
<i>Atmpk6</i>	✓				✓	
	✓					✓
		✓				✓
			✓		✓	
			✓			✓
				✓		✓

3. Determinaciones realizadas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre.

3.1. Determinación del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 avrRPM1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre. Efecto de la FB1.

Se evaluó el efecto de la FB1 en el crecimiento *in planta* de un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 asperjado sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre. A tiempos pos-infección de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 se obtuvieron las muestras vegetales correspondientes. En la Fig. 9 se observó que a tiempo de 0 hpi, el inóculo bacteriano inicial en las muestras fue prácticamente el mismo, tanto para las muestras control (barras gris claro) como para las muestras tratadas con la toxina, FB1 (barras gris oscuro). En los tiempos posteriores de muestreo, el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en los espacios intercelulares de los tejidos de las hojas de la plántula aumentó, rápidamente a las 24 h manteniéndose así hasta las 96 h, para después incrementarse un orden de magnitud a las 120 h. Lo anterior se observó en las condiciones control y en las muestras expuestas a la FB1 sin encontrarse diferencias significativas entre ambos tratamientos.

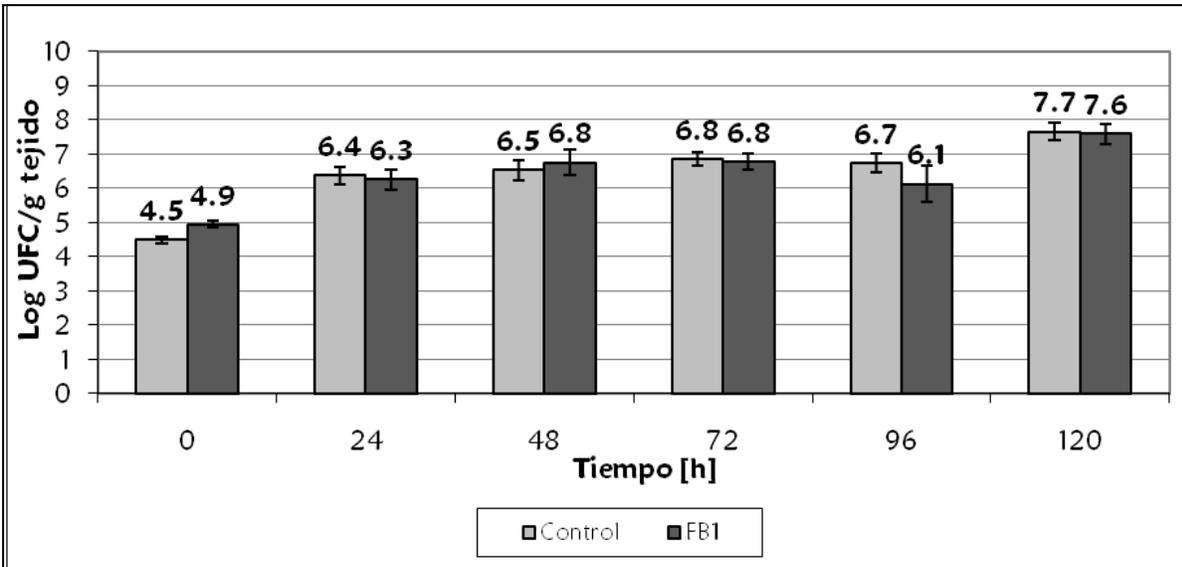


Fig. 9. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre expuesta a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y posteriormente se asperjó un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=13$, con 39 réplicas individuales.

Empleando las mismas horas de exposición a FB1, 12 h, se probó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 que fue asperjado sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre para evaluar el efecto de la toxina con un inóculo menor que el probado con anterioridad (1×10^8 UFC/mL). Se tomaron muestras post-infección a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi. En la Fig. 10 se muestra que el inóculo bacteriano detectado a 0 hpi en todas las plántulas, tanto las tratadas con la toxina, como las controles fue prácticamente igual. Después de 24 hpi, la población bacteriana de *Pst* DC3000 avrRPM1 en las plántulas aumentó en la muestra control, mientras que en las muestras tratadas con FB1, éste fue prácticamente igual al del tiempo de 0 hpi. A las 48 hpi se observó un aumento de 3 órdenes de magnitud en los niveles del crecimiento bacteriano en las muestras del control mientras que en las muestras expuestas a la FB1 el aumento sólo fue de 2 órdenes de magnitud; aún así, el crecimiento bacteriano en las plántulas control superó al obtenido a las muestras de las plántulas con tratadas con FB1. Mientras que a las 72 hpi el crecimiento bacteriano obtenido en las plántulas control aumentó aproximadamente un orden de magnitud en comparación con el tiempo anterior, mientras que para las muestras expuestas a la FB1 el aumentó detectado fue

de 1.1 órdenes de magnitud; manteniendo una carga bacteriana mayor en muestras control que en muestras expuestas previamente a la toxina.

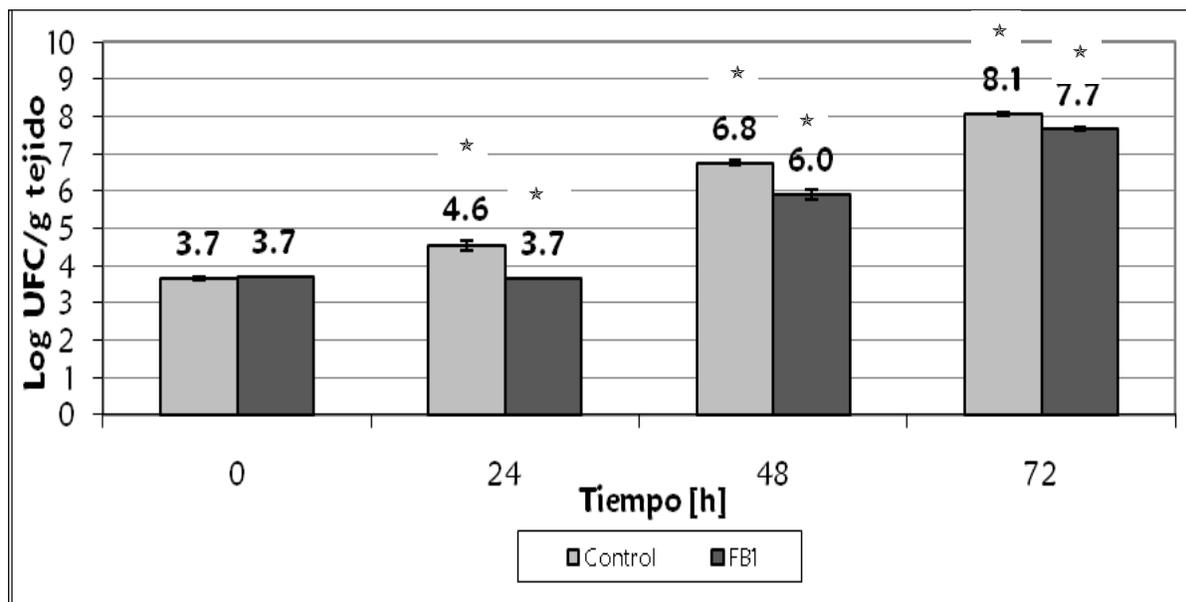


Fig. 10. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre expuesta a la FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h, concluido este lapso de tiempo se asperjó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/ml. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n = 2$, con 6 réplicas individuales. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre la muestra control y la muestra expuesta a FB1 en el mismo tiempo ($p < 0.05$, t-Student y Graphpad Prism).

Para poder confirmar el efecto encontrado por la exposición de FB1 por 12 h, se probó un tiempo menor de tratamiento con la toxina (4 h) utilizando un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 que fue asperjado sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre. Se tomaron muestras post-infección a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi. En la Fig. 11 se muestra que el inóculo bacteriano muestreado a 0 hpi en todas las plántulas, tanto las tratadas con la toxina (barras gris oscuro), como en las controles (barras gris claro) fue esencialmente igual. Después de 24 hpi, la población bacteriana de *Pst* DC3000 avrRPM1 en las plántulas aumentó en la muestra control, como ya se había observado para un inóculo mayor, y aunque hubo un incremento también en las muestras tratadas con FB1, éste fue menor al obtenido en las muestras control. A las 48 hpi se observó una disminución en los niveles del crecimiento bacteriano en ambas muestras tratadas, pero el crecimiento bacteriano en las plántulas control se mantuvo

superior al obtenido a las muestras con tratadas con FB1. Mientras que a las 72 hpi la magnitud del crecimiento bacteriano obtenido en ambas muestras fue indistinguible.

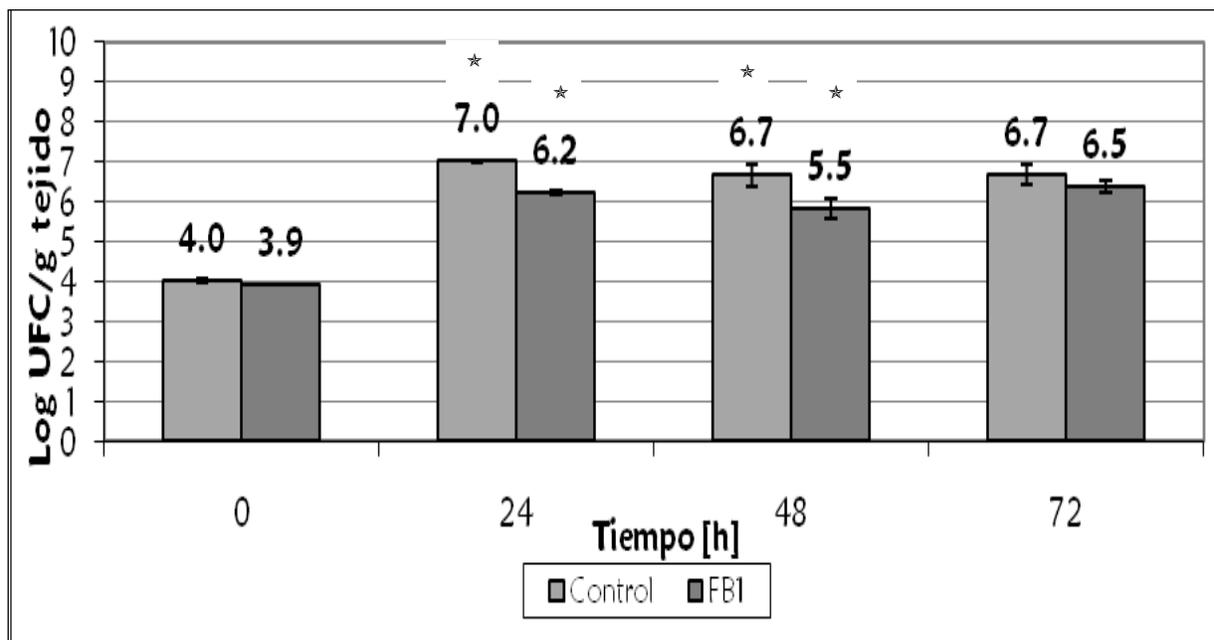


Fig. 11. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre expuesta a la FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 4 h, concluido este lapso de tiempo se asperjó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y error estándar. $n = 3$, con 9 réplicas individuales. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre la muestra control y la muestra expuesta a FB1 en el mismo tiempo ($p < 0.05$, t-Student y Graphpad Prism).

3.2. Determinación del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre. Efecto de la FB1

Para determinar el efecto de FB1 sobre el crecimiento de la cepa virulenta y compararlos con los resultados obtenidos con la cepa avirulenta, se evaluó el efecto de la FB1 con una exposición de 12 h, sobre el crecimiento *in planta* de un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL de *Pst* DC3000 (cepa virulenta). A tiempos pos-infección de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h, se tomaron las muestras correspondientes para cada determinación. En la Fig. 12 se muestra que el inóculo bacteriano inicial en las muestras control y en las tratadas con la FB1 fue prácticamente igual. Posteriormente, el crecimiento bacteriano de

Pst DC3000 aumentó ligeramente hasta las 120 h. Alcanzando niveles de 5.0×10^8 UFC/g tejido. Lo anterior se observó en las condiciones control y en las muestras expuestas a la FB1, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos grupos.

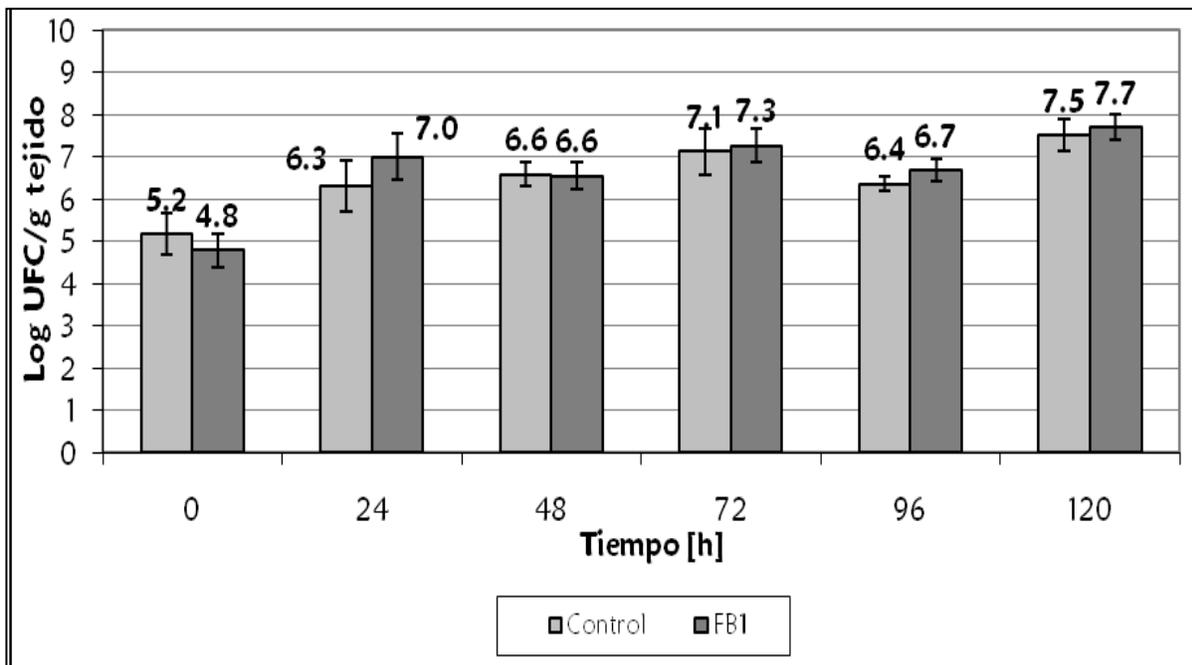


Fig. 12. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h, y luego a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. n=3, con 9 réplicas individuales.

Intentando obtener resultados más claros sobre el efecto de la FB1 en esta cepa, ahora se probó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 que se asperjó sobre las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre, las cuales fueron expuestas por 12 h a la FB1. Se tomaron muestras vegetales a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi, obteniéndose los resultados de la Fig. 13. La carga bacteriana en el tiempo de 0 hpi fue prácticamente la misma, tanto para las muestras control como para las muestras tratadas con la FB1 por 12 h. A las 24 hpi, el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 aumentó 3 órdenes de magnitud para las muestras control y 4 órdenes de magnitud para las muestras tratadas con la FB1. Después de 48 hpi, las diferencias entre los niveles de crecimiento bacteriano reflejaron una menor carga bacteriana en las plántulas control que las muestras tratadas

con la FB1 y para las 72 hpi, el crecimiento bacteriano de la *Pst* DC3000 alcanzó niveles de 4×10^7 UFC/g tejido en ambos casos.

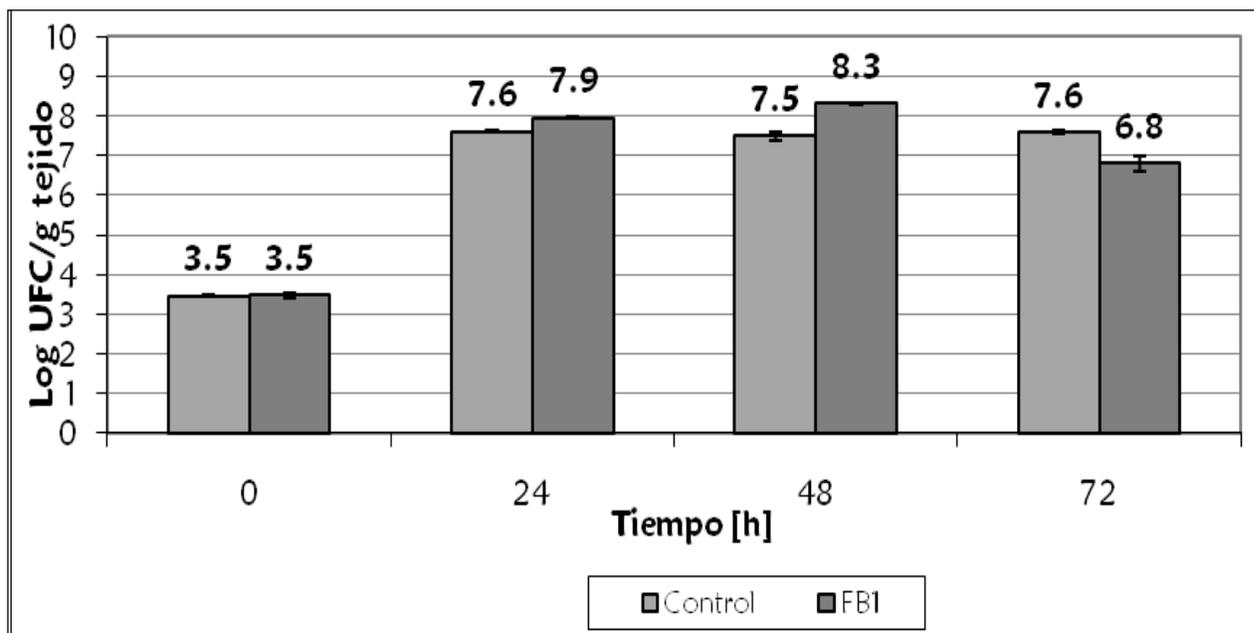


Fig. 13 Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre expuestas a FB1 Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y transcurrido este periodo a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. n=2, con 6 réplicas individuales.

Debido a que el tratamiento por 12 h con la FB1 no fue lo suficientemente claro sobre el efecto de la toxina sobre el crecimiento bacteriano con la cepa virulenta con un inóculo de 1×10^7 UFC/mL, se probó una exposición de 4 h. Se tomaron muestras vegetales a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi, obteniéndose los resultados mostrados en la Fig. 14. Se pudo observar que la población bacteriana en el tiempo de 0 hpi fue esencialmente la misma, tanto para las muestras control como para las muestras tratadas con la FB1 por 4 h. A las 24 hpi, el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 aumentó 4 órdenes de magnitud tanto para las muestras control como para las muestras tratadas con la FB1. Después de 48 hpi, las diferencias entre los niveles de crecimiento bacteriano encontrado en ambas muestras reflejaron una menor cantidad de UFC de *Pst* en las plántulas control y las tratadas con la FB1 pero no se presentaron diferencias significativas entre ellas. Para las 72 hpi, el crecimiento bacteriano de la *Pst* DC3000 alcanzó niveles mayores respecto al crecimiento bacteriano obtenido a tiempos de 24 y 48 hpi en ambos casos.

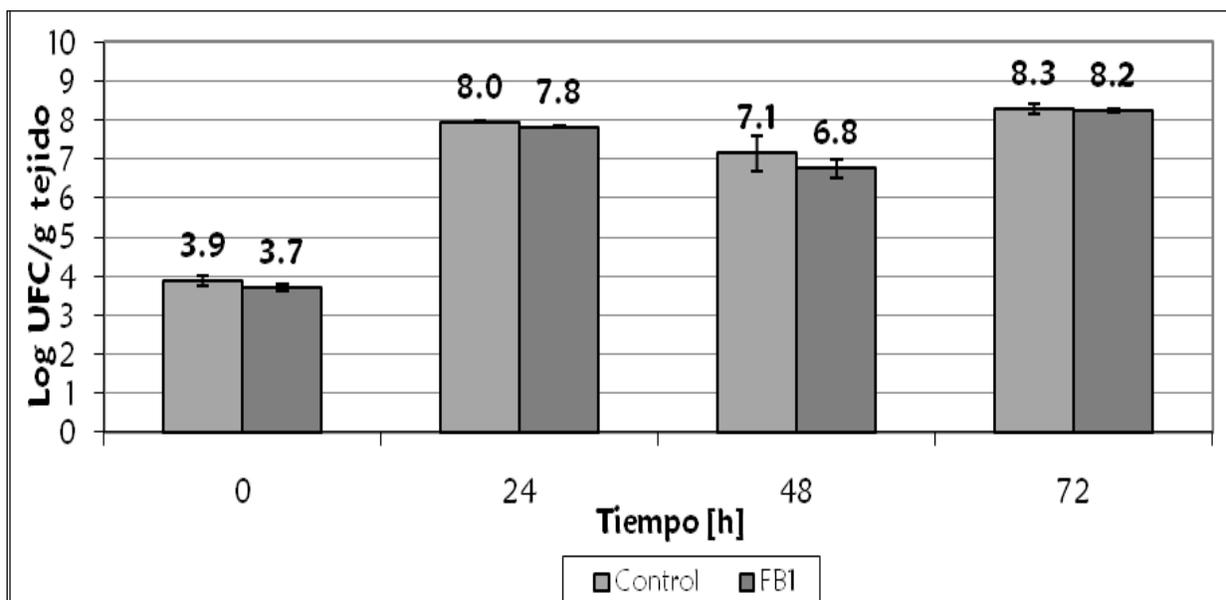


Fig. 14. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 4 h y transcurrido este periodo a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=3$, con 9 réplicas individuales.

Se regraficaron los resultados experimentales obtenidos mostrados en las Figs. 9 y 12 con la finalidad de poder comparar los resultados sobre la población bacteriana obtenidos sólo con el tratamiento control a 0, 48, 72 y 120 hpi, de las dos cepas utilizadas de *Pst* en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre con un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL con una exposición previa a FB1 de 12 h. El inóculo asperjado a las plántulas fue prácticamente el mismo, tanto para las muestras expuestas a *Pst* DC3000 avrRPM1 (barras gris claro) como para las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 virulenta (barras gris oscuro). La cinética de crecimiento bacteriano entre las 0 y las 120 h en ambas cepas aumentó gradualmente. Lo anterior se observó en ambas cepas bacterianas utilizadas sin mostrar diferencias significativas.

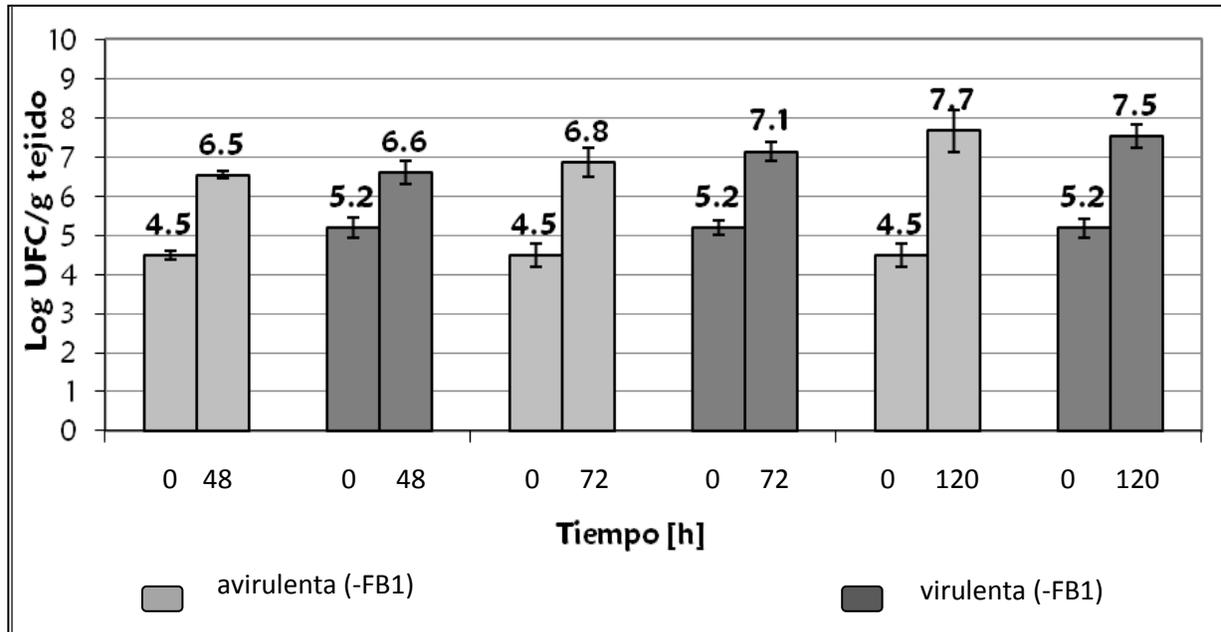


Fig. 15. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre. Las plántulas de tres semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0, 48, 72 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar, $n=13$ para la *Pst* avirulenta y $n=3$ para la *Pst* virulenta. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 9 y 12.

Se regraficaron los datos experimentales obtenidos en las Figs. 9 y 12, y se muestran en la Fig. 16. En ésta se compara el número de UFC de cada *Pst* utilizada en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre obtenidas a partir de un inóculo de 1×10^8 UFC/mL para observar las diferencias del crecimiento de cada cepa bacteriana utilizada sobre la misma línea vegetal. El inóculo total asperjado a las plántulas fue exactamente el mismo, tanto para las muestras expuestas a *Pst* DC3000 avrRPM1 (barras gris claro) como para las muestras expuestas a *Pst* DC3000 virulenta (barras gris oscuro). La población bacteriana de ambas cepas utilizadas desde las 0 y hasta las 120 h aumentó gradualmente, alcanzando una población de 3.9×10^7 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido y 5×10^7 UFC de *Pst* DC3000/g tejido respectivamente sin mostrar diferencias significativas.

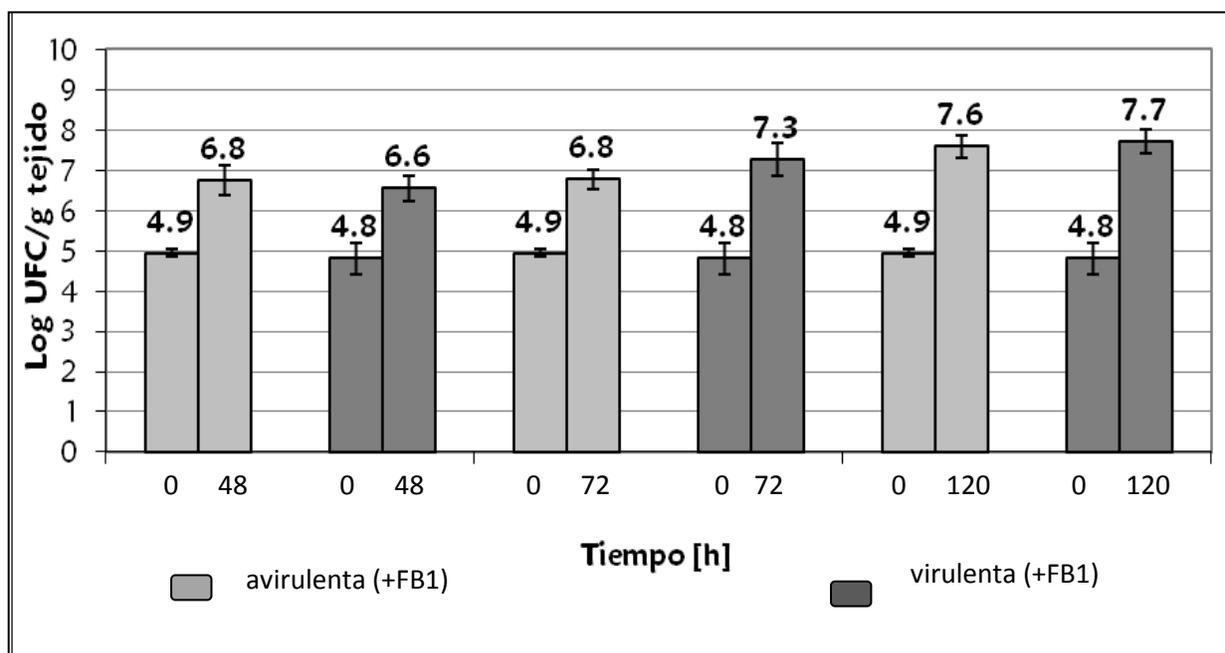


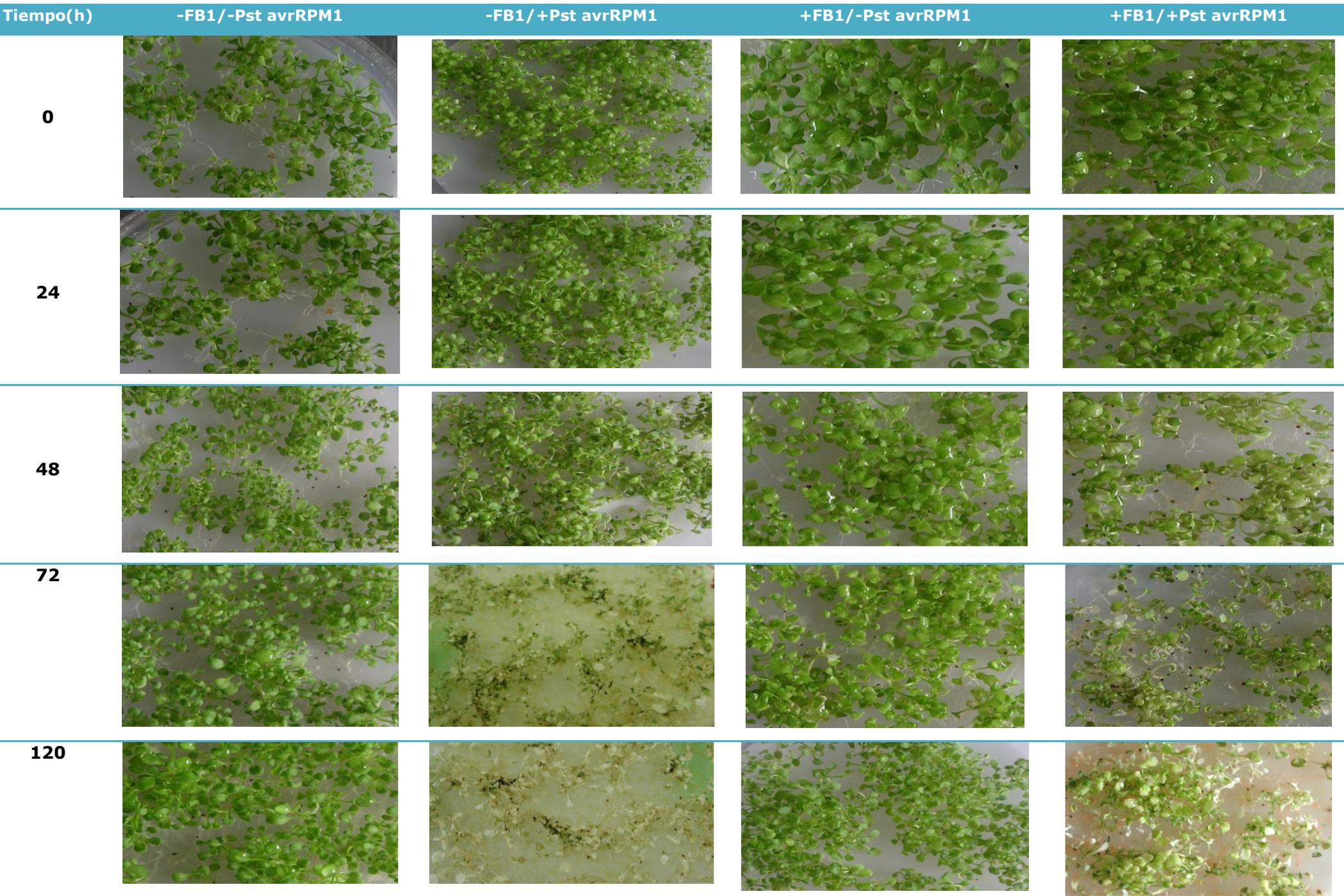
Fig. 16. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre. Las plántulas de tres semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre fueron expuestas a FB1 por 12 h, al cabo del cual se asperjó el inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0, 48, 72 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar, $n=13$ para la *Pst* avirulenta y $n=3$ para la *Pst* virulenta. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 9 y 12.

3.3 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 avrRPM1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre.

El análisis fenotípico de la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana* expuesta a *Pst* avrRPM1 y/o a la FB1 se expone en la Fig 17, observándose que desde las 0 h y hasta las 24 h todas las muestras vegetales mostraron apariencias saludables equivalentes. A tiempo de 48 h, las plántulas expuestas a *Pst* avrRPM1 mostraron una leve apariencia de enfermedad. En el mismo lapso de tiempo las plántulas que se expusieron a FB1 mostraron leves cambios en cuanto al tono de las hojas.

Sin embargo, fue a las 72 h cuando se alcanzó un claro efecto de la FB1 induciendo la muerte en los tejidos de las plántulas de la línea silvestre. En el caso de la *Pst avrRPM1*, el efecto de muerte celular se manifestó a las 72 h haciéndose más evidente a las 120 h. Para la adición de ambos agentes los indicios de muerte celular en las plántulas se manifestó a las 72 h, realizándose a las 120 h.

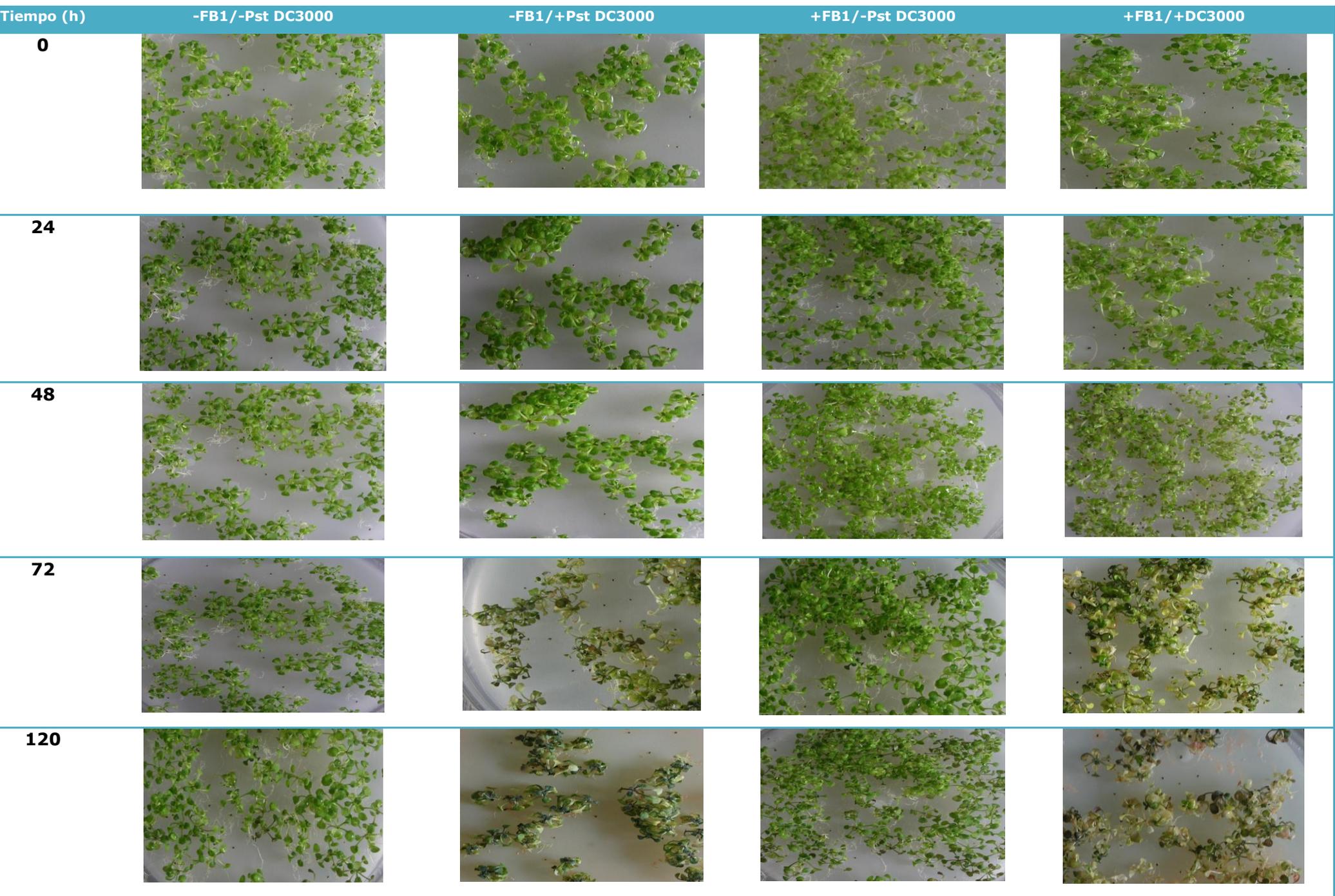
Fig. 17. Efectos fenotípicos de la FB1 y del patógeno *Pst DC3000 avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre. Para cada condición se utilizaron lotes independientes de plántulas de tres semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se muestran los controles, los cuales son plántulas solamente expuestas al medio Gamborg B-5/agar/sacarosa, la segunda columna representa a las plántulas expuestas a FB1 10 μ M en el medio sólido por 12 h, la tercera columna representa la infección de las plántulas expuestas a *Pst DC3000 avrRPM1* 1×10^8 UFC/mL, y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μ M por 12 h y luego expuestas a *Pst DC3000 avrRPM1* 1×10^8 UFC/mL por los tiempos indicados. Las fotografías de registro fenotípico se tomaron a los tiempos señalados para evidenciar los indicios de muerte celular en las plántulas.



3.4 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre.

Para evidenciar las diferencias fenotípicas entre las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre expuestas a la cepa avirulenta, se realizó el análisis fenotípico con plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas con la cepa virulenta; el cual se mostró en la Fig 18. A tiempo de 0 h y hasta las 24 h todas las muestras vegetales se mostraron sanas en los controles y en todos los tratamientos. Esta apariencia continuó hasta las 120 h en las plántulas control. A las 48 h las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 o a la FB1 no mostraron signos de enfermedad. Sin embargo, las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 y a FB1, al tiempo de 48 h mostraron leves indicios de muerte celular. Sin embargo, es a las 72 h cuando se alcanzó un claro efecto de muerte en las plántulas con el tratamiento de la *Pst* DC3000, que se manifestó aún más a las 120 h. En el caso de las plántulas expuestas a la FB1, éstas no manifestaron síntomas de enfermedad incluso a las 120 h. Para la adición de ambos agentes, *Pst* DC3000 y FB1, los indicios de muerte celular en las plántulas se manifestaron a las 72 h, realizándose a las 120 h.

Fig. 18. Efectos fenotípicos de la FB1 y del patógeno *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre. Para cada condición se utilizaron lotes independientes de plántulas de tres semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se muestran los controles, los cuales son plántulas solamente expuestas al medio Gamborg B-5/agar/sacarosa, la segunda columna representa a las plántulas expuestas a FB1 10 μ M en el medio sólido por 12 h, la tercera columna representa la infección de las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 1×10^8 UFC/mL, y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μ M por 12 h y luego expuestas a *Pst* DC3000 1×10^8 UFC/mL por los tiempos indicados. Las fotografías de registro fenotípico se tomaron a los tiempos señalados para evidenciar los indicios de muerte celular en las plántulas



4. Determinaciones realizadas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*

4.1 Determinación del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*. Efecto de la FB1

Uno de los objetivos de esta tesis era determinar si la línea mutante de *Arabidopsis thaliana*, *Atlcb2a-1* en presencia de FB1 era capaz de presentar iguales niveles de inmunidad que la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana* en la misma condición. Por ello, los experimentos que se hicieron para las plántulas silvestres se replicaron en la línea mutante de *Arabidopsis thaliana*, *Atlcb2a-1*. En la Fig 19 se presenta el crecimiento bacteriano *in planta* a partir de un inóculo bacteriano inicial de 1×10^8 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1, realizando muestreos de las muestras vegetales a tiempos de 0, 8, 12, 24, 32, 48, 72, 96 y 120 hpi. Se mostró que el inóculo bacteriano asperjado en todas las muestras fue esencialmente el mismo. Con el objeto de averiguar si se llegaba a presentar algún efecto de la FB1 en tiempos más cortos, se incluyeron los tiempos de 8 y 12 hpi de muestreo. El crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 aumentó gradualmente desde las 8 hpi hasta las 120 hpi, lapso en el que la población bacteriana creció dos órdenes de magnitud.

Lo anterior se observó en las condiciones control y en las muestras expuestas a la FB1, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos tratamientos.

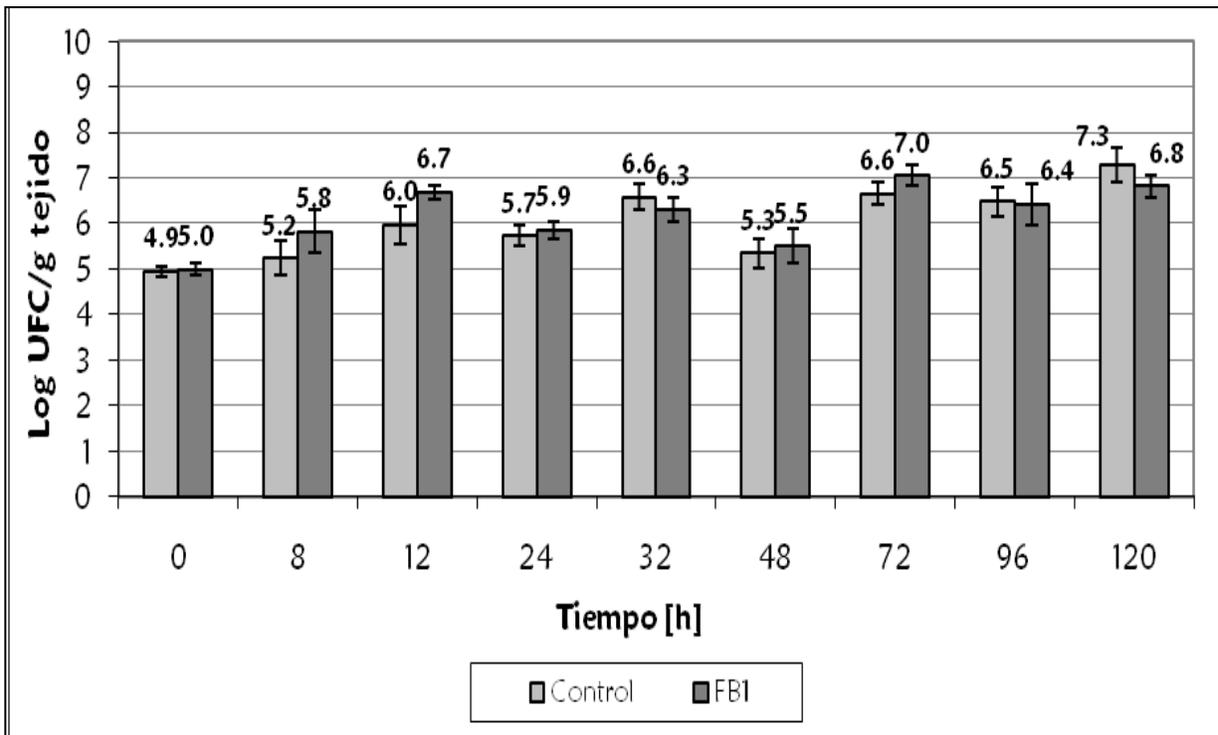


Fig. 19. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y luego a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 8, 12, 24, 32, 48, 72, 96 y 120 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. n=11, con 33 réplicas individuales.

Empleando las mismas horas de exposición a FB1, 12 h, se probó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1, que era menor que el probado con anterioridad, y que fue asperjado sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* para evaluar el efecto de la toxina con un inóculo. Se tomaron muestras post-infección a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi. En la Fig. 20 se muestra que el inóculo bacteriano muestreado a 0 hpi en todas las plántulas, tanto las tratadas con la toxina, como las plántulas controles fue esencialmente el mismo. Después de 24 hpi, la población bacteriana de *Pst* DC3000 avrRPM1 en las plántulas tanto en las muestras control como en las muestras tratadas con FB1, no aumentó en mayor magnitud al obtenido a tiempo de 0 hpi, además no se manifestaron diferencias significativas entre el crecimiento bacteriano en ambos tratamientos a este tiempo en específico. A las 48 hpi se observó un aumento de 3 órdenes de magnitud en los niveles del crecimiento bacteriano en las muestras control mientras que en las muestras expuestas a la FB1 el aumento sólo fue de 2 órdenes de magnitud. A las 72 hpi el crecimiento bacteriano obtenido en ambas muestras fue idéntico al obtenido al tiempo de 48 hpi, obteniéndose una diferencia de un

orden de magnitud en el número de UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido entre las muestras control y las muestras expuestas a la toxina.

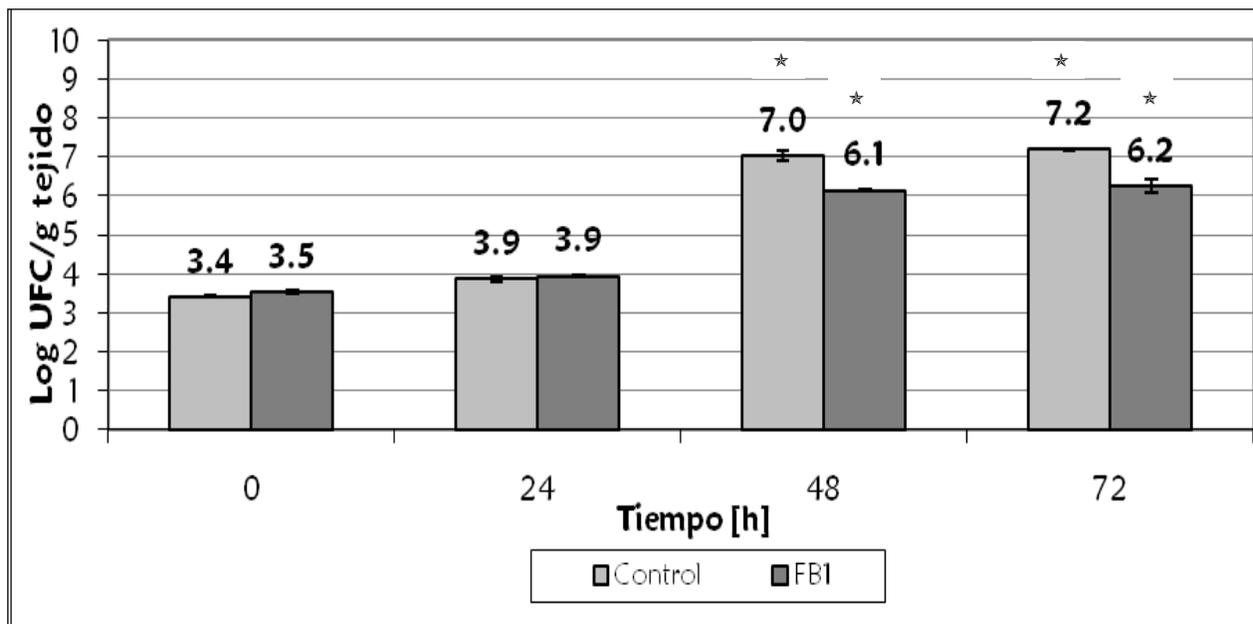


Fig. 20. Crecimiento bacteriano de *Pst* avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1* expuesta a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y luego expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=2$, con 6 réplicas individuales. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre la muestra control y la muestra expuesta a FB1 en el mismo tiempo ($p < 0.05$, t-Student y Graphpad Prism).

De acuerdo a lo que se había encontrado con la línea silvestre, para establecer más claramente el efecto del tratamiento de la FB1 sobre las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*, se utilizó un tiempo de exposición de 4 h en lugar de las 12 h utilizadas con anterioridad. Posterior a la exposición a la toxina, se asperjó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 sobre las plántulas de la línea *Atlcb2a-1*, para finalmente muestrear el crecimiento bacteriano obtenido a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi, el cual se observa en la Fig. 21. Se puede notar que en el tiempo de 0 hpi, el inóculo bacteriano en las plántulas control y en las muestras tratadas con la FB1 por 4 h mostraron el mismo número de UFC de *Pst* DC3000 (1×10^4 UFC/g tejido). A las 24 hpi, el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en las plántulas control aumentó 3 órdenes de magnitud, mientras que para las muestras tratadas con la FB1 sólo se presentó un aumento de 2 órdenes de magnitud. A 48 hpi las bacterias reportadas en las muestras control alcanzaron 5×10^6 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido, mientras que

las muestras expuestas a la FB1 alcanzaron 2.5×10^5 UFC de *Pst* avrRPM1/g tejido. Para las 72 hpi se mantuvo un mayor crecimiento bacteriano en las plántulas control que en las muestras expuestas a la toxina, pero mostrando una diferencia más pequeña entre ellas.

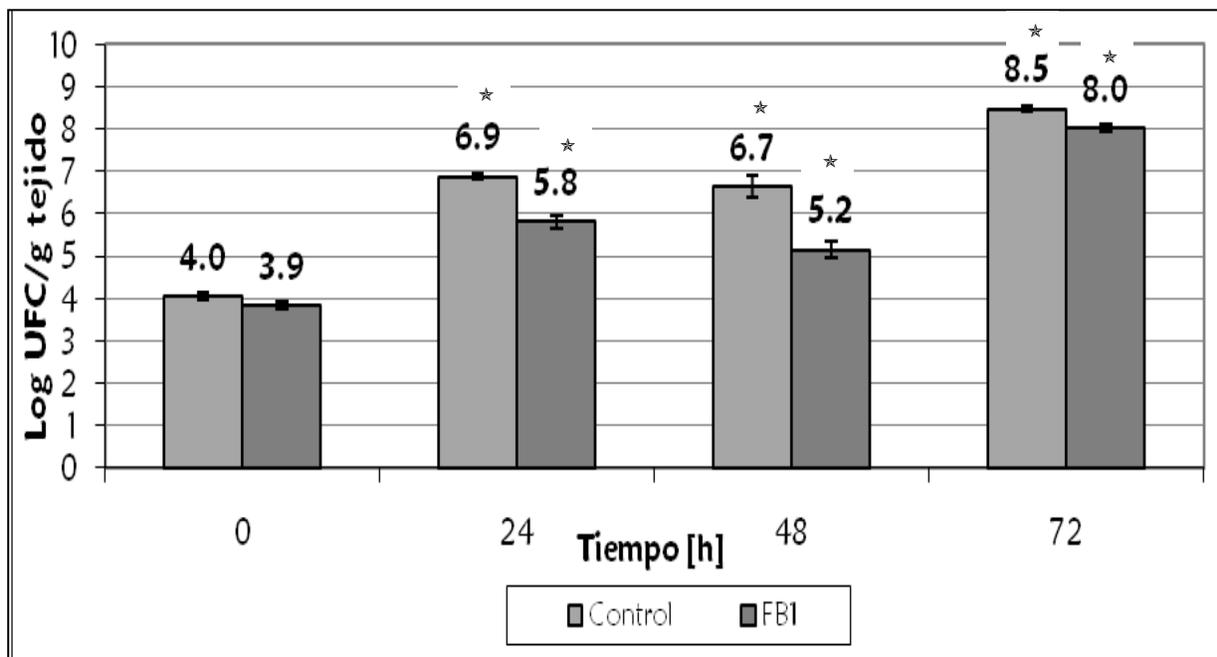


Fig. 21. Crecimiento bacteriano de *Pst* avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1* expuesta a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 4 h y luego expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y la error estándar. $n=3$, con 9 réplicas individuales. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre la muestra control y la muestra expuesta a FB1 en el mismo tiempo ($p < 0.05$, t-Student y Graphpad Prism).

4.2 Determinación del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*. Efecto de la FB1

Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* con la cepa avirulenta, se evaluó el efecto de la FB1 sobre el crecimiento *in planta* de un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL de *Pst* DC3000 (cepa virulenta) que se asperjó sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*. Se tomaron muestras vegetales a tiempos de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hpi. En la Fig. 22 se muestra que el inóculo asperjado en las muestras control y en las muestras tratadas con la FB1 fue esencialmente igual. Desde las 24 hpi y hasta las 120 hpi el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 se incrementó de forma gradual. Lo anterior se observó en las

muestras control y en las muestras expuestas a la FB1, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos tratamientos.

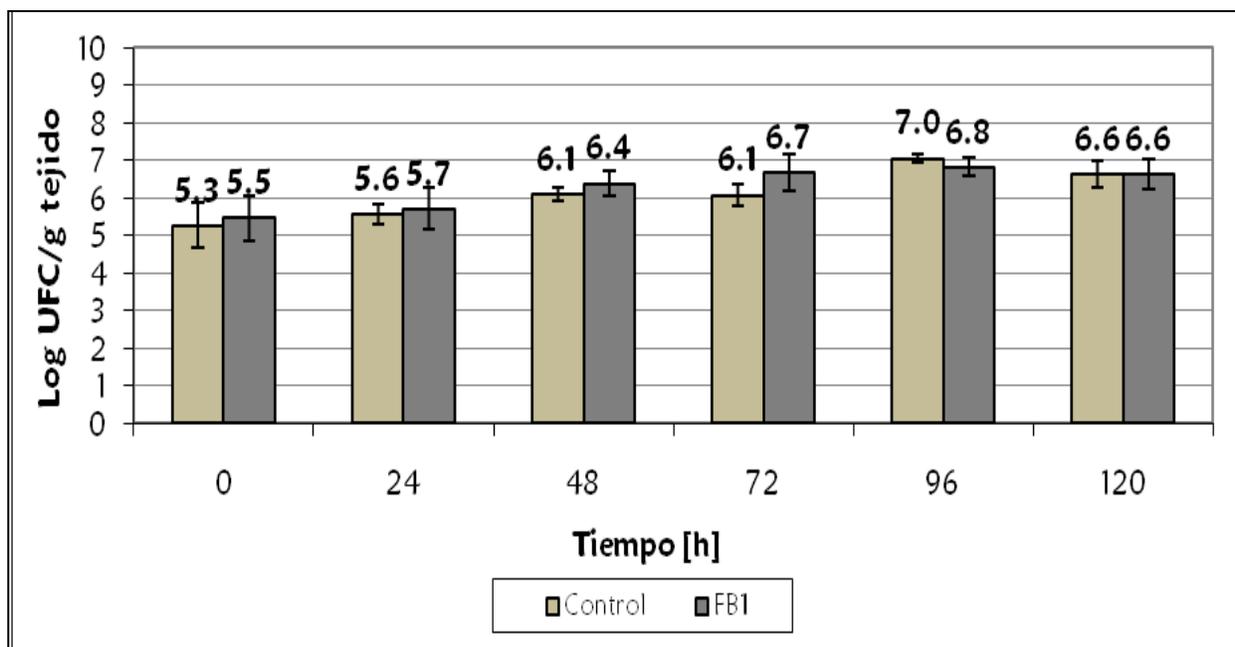


Fig. 22. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y luego expuestas a un inóculo bacteriano 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=2$, con 6 réplicas individuales.

Para obtener resultados más claros sobre el efecto de la FB1 en esta cepa, se probó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 que se asperjó sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre, las cuales fueron expuestas por 12 h a la FB1. Se tomaron muestras vegetales a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi, obteniéndose los resultados de la Fig. 23. La carga bacteriana en el tiempo de 0 hpi fue prácticamente la misma, tanto para las muestras control como para las muestras tratadas con la FB1 por 12 h. A las 24 hpi, el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 aumentó 3.8 órdenes de magnitud aproximadamente para las muestras control y 4 órdenes de magnitud para las muestras tratadas con la FB1. Después de 48 hpi, las diferencias entre los niveles de crecimiento bacteriano reflejaron una menor carga bacteriana en las plántulas control que las muestras tratadas con la FB1. Para las 72 hpi, el crecimiento bacteriano de la *Pst* DC3000 alcanzó niveles aproximadamente de 1.2×10^8 UFC/g tejido en ambos casos.

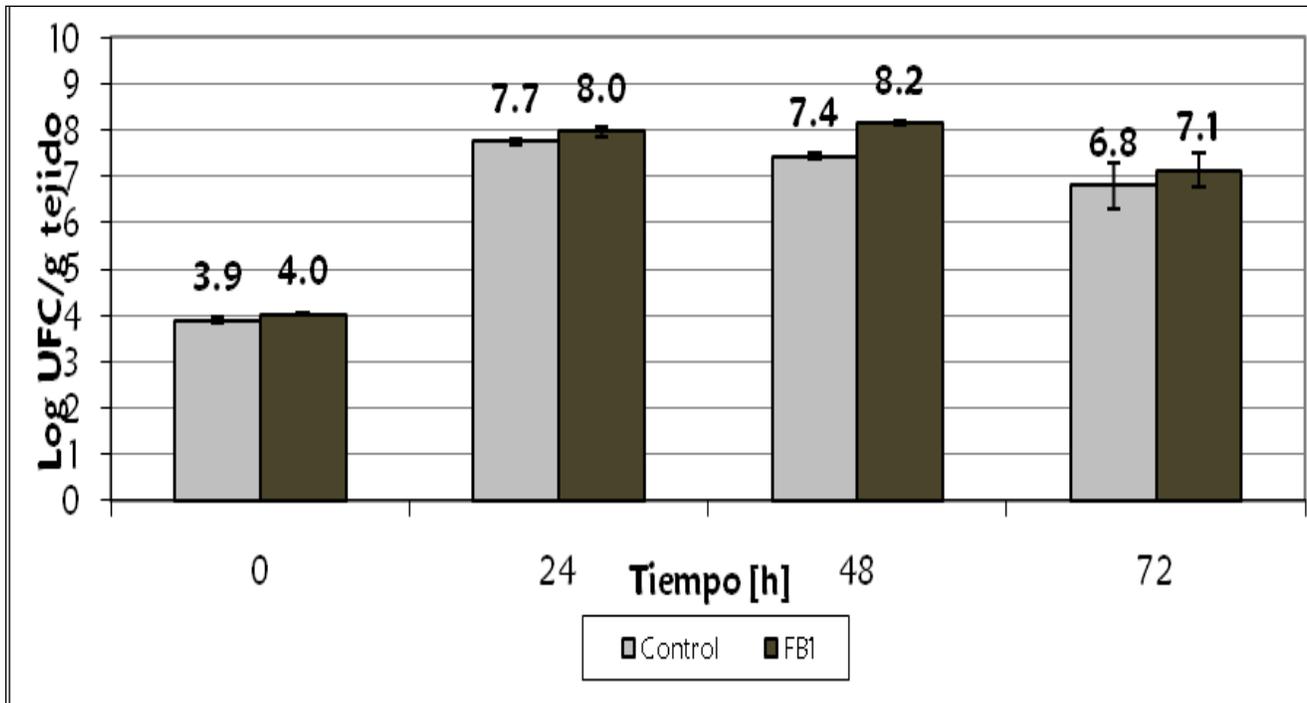


Fig. 23. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y luego expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=2$, con 6 réplicas individuales.

Para encontrar efectos más claros de la FB1 sobre las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* se utilizó un tiempo de exposición a la toxina de 4 h en lugar de las 12 h probadas anteriormente y un inóculo bacteriano 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000. Después de haber asperjado la cepa bacteriana a las plántulas, se tomaron muestras vegetales a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi, obteniéndose los resultados de la Fig. 24. Se puede observar que el inóculo bacteriano asperjado en las muestras fue igual, tanto para las muestras control (barras gris claro) como para las muestras tratadas con la FB1 por 4h (barras gris oscuro). A las 24 hpi, el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 aumentó aproximadamente 4 órdenes de magnitud en ambos casos llegando a obtenerse hasta 6.3×10^7 UFC de *Pst* DC3000/g tejido aproximadamente. Para las 48 y 72 hpi estos niveles de crecimiento se mantuvieron sin mostrar diferencias significativas entre los grupos de estudio.

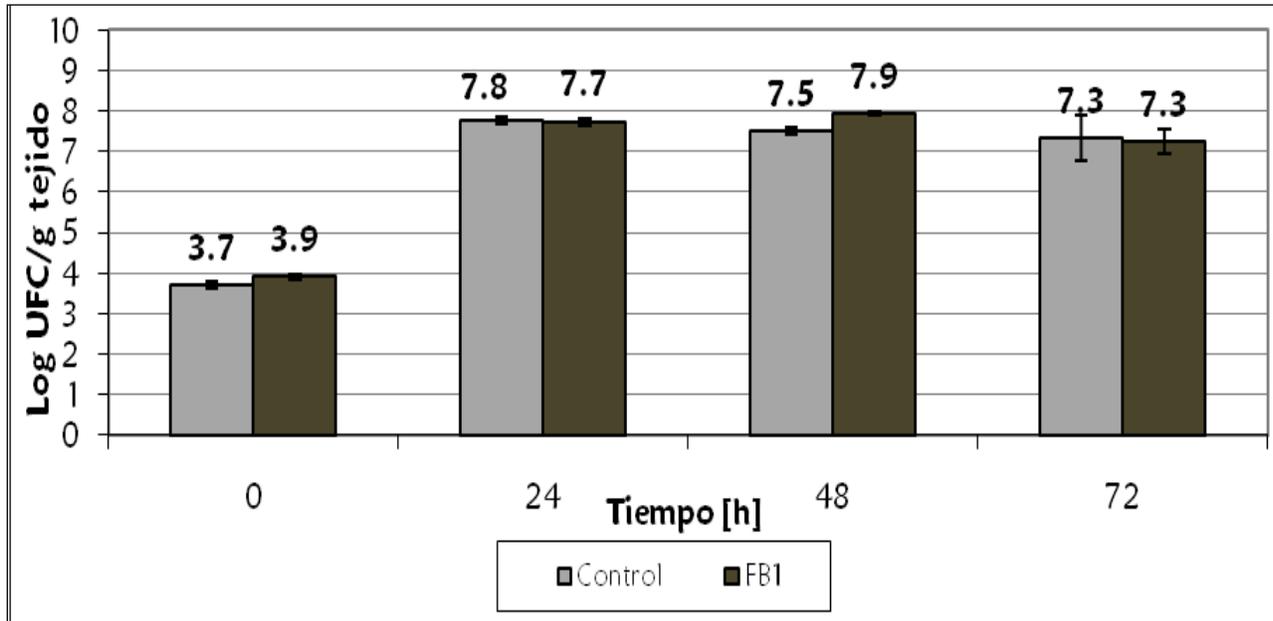


Fig. 24. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 4 h y luego expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y error estándar. $n=2$, con 6 réplicas individuales.

Se regraficaron los resultados experimentales obtenidos en las Figs. 19 y 22 para realizar una comparación entre el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 y *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* mostrado a tiempos de 48, 72 y 120 hpi, los cuales se muestran en la Fig. 25. El inóculo asperjado a las plántulas fue esencialmente igual (1×10^5 UFC/g tejido) lo que se aprecia en los niveles bacterianos determinados en el tiempo cero, tanto para las muestras expuestas a *Pst* avrRPM1 como para las muestras expuestas a *Pst* DC3000 virulenta. El crecimiento bacteriano de ambas cepas, entre las 0 y las 120 h no mostró aumentos considerables manteniendo así la misma tendencia de crecimiento bacteriano hasta obtener 1×10^7 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido y 3.9×10^6 UFC de *Pst* DC3000/g. Sin embargo, el crecimiento entre ambas cepas a lo largo de los tiempos muestreados no presentó diferencias significativas.

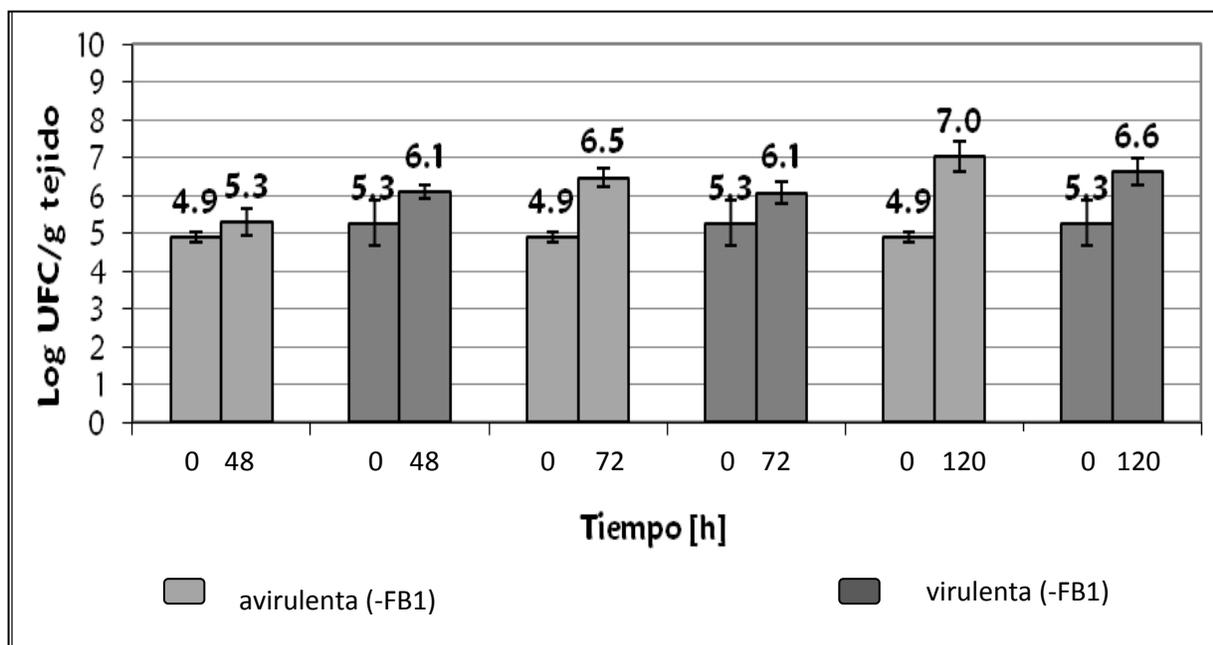


Fig. 25. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1*. Las plántulas de tres semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0, 48, 72 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar, $n=11$ para la *Pst* avirulenta y $n=2$ para la *Pst* virulenta. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 19 y 22.

Para facilitar la comparación de las diferencias entre el crecimiento bacteriano obtenido con plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* expuestas a la *Pst* avrRPM1 y las expuestas a la *Pst* DC3000, se realizó un regráfico con los resultados experimentales mostrados en las Figs. 19 y 22 (Fig. 26), observándose que a tiempo de 0 hpi la población bacteriana muestreada en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* expuestas a la *Pst* avrRPM1 y en plántulas de la misma línea expuestas a *Pst* DC3000 fue prácticamente el mismo. El crecimiento bacteriano obtenido con la *Pst* avrRPM1 mostró que es a las 72 hpi cuando se alcanzó el máximo en la cinética de crecimiento del fitopatógeno, mismo que se mantuvo hasta las 120 hpi. Para la *Pst* DC3000, el crecimiento bacteriano mostró un patrón de crecimiento muy semejante. Los crecimientos obtenidos de las plántulas tratadas con la FB1 siempre fueron superiores a las muestras de las plántulas control al tiempo inicial de muestreo, alcanzando diferencias de uno o dos órdenes de magnitud, dependiendo del tiempo y la cepa.

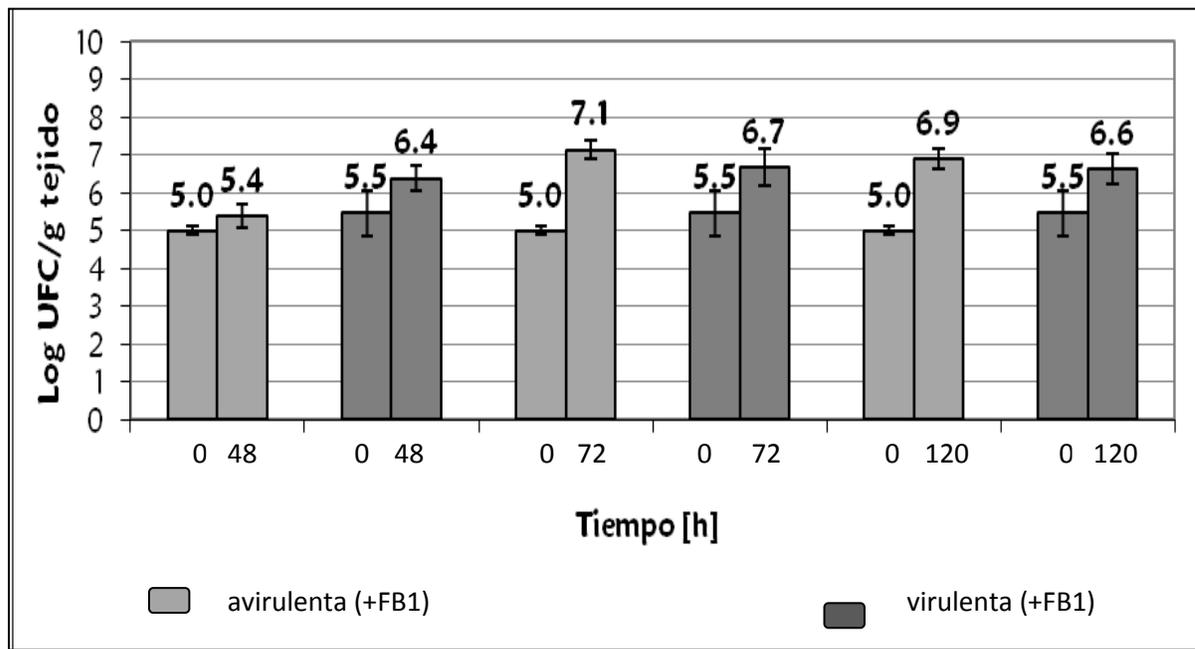
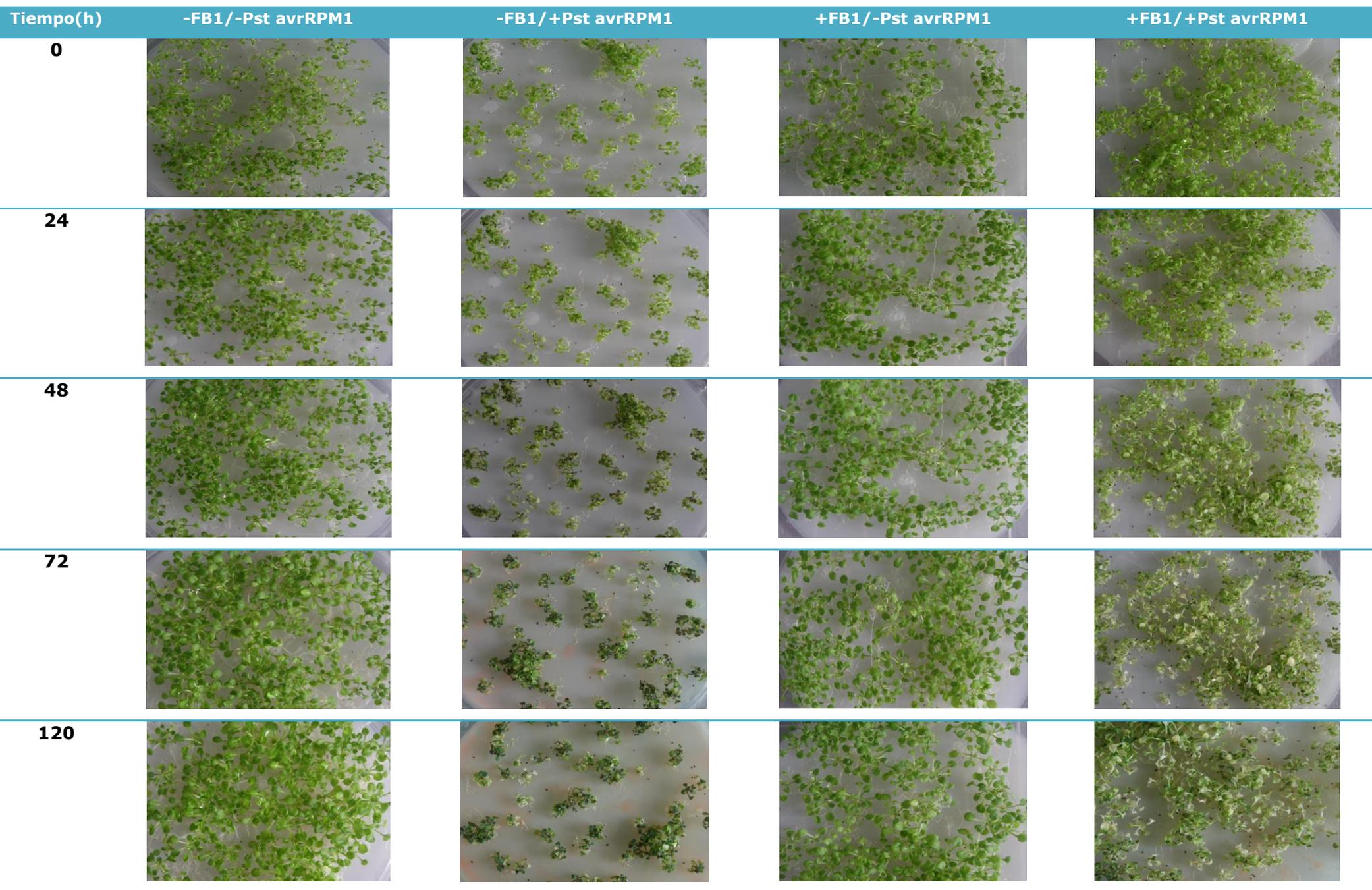


Fig. 26. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea *Atlcb2a-1*. Las plántulas de tres semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* fueron expuestas a FB1 por 12 h, al cabo del cual se asperjó el inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0, 48, 72 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=11$ para la *Pst* avirulenta y $n=2$ para la *Pst* virulenta. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 19 y 22.

4.3 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana Atlcb2a-1*.

El análisis fenotípico realizado a plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* expuestas a *Pst avrRPM1* se muestra en la Fig 27. A tiempos de 0 y 24 h todas las plántulas manifestaron características de buena salud. En el caso de las plántulas expuestas únicamente a la *Pst avrRPM1* se observaron indicios de enfermedad a las 72 h pos-infección, haciéndose aún más evidentes a las 120 hpi. En las plántulas que se expusieron a la FB1 no se manifestaron indicios de muerte de las células vegetales, por lo que se muestra una resistencia de la plántula a la toxina. Pero al agregar ambos componentes, cepa bacteriana y toxina a las plántulas, se produjeron mayores indicios de muerte en las plántulas al tiempo de 48 h, siendo aún mayores a tiempos posteriores.

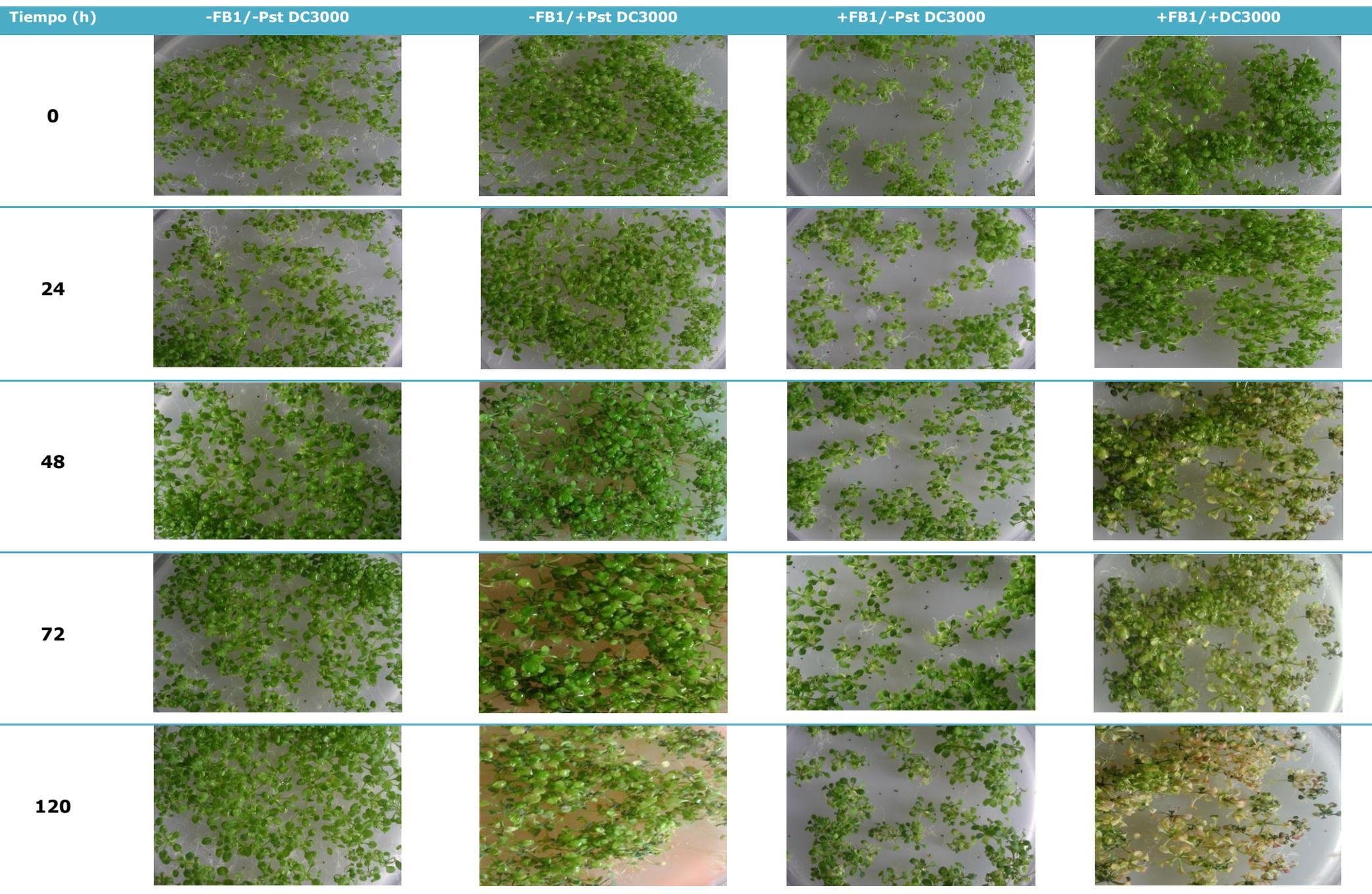
Fig. 27. Efectos fenotípicos de la FB1 y del patógeno *Pst* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*. Para cada condición se utilizaron lotes independientes de plántulas de tres semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se muestran los controles, los cuales son plántulas solamente expuestas al medio Gamborg B-5/agar/sacarosa, la segunda columna representa a las plántulas expuestas a FB1 10 μ M en el medio sólido por 12 h, la tercera columna representa la infección de las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1×10^8 UFC/mL, y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μ M por 12 h y luego expuestas a *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1×10^8 UFC/mL por los tiempos indicados. Las fotografías de registro fenotípico se tomaron a los tiempos señalados para evidenciar los indicios de muerte celular en las plántulas



4.4 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* *Atlcb2a-1*

El análisis fenotípico realizado a plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* expuestas a *Pst* DC3000 se muestra en la Fig 28. En tiempos cortos de 0 y 24 h no existieron síntomas de enfermedad en las plántulas. En el caso de las plántulas expuestas únicamente a la *Pst* DC3000 se observaron indicios de enfermedad a las 120 h pos-infección. En las plántulas que se expusieron a la FB1 no se manifestaron indicios de muerte, evidenciando una resistencia de la plántula a la toxina. Tras la adición de ambos agentes, *Pst* DC3000 y FB1, se manifestaron mayores signos de muerte en las plántulas a partir de las 48 hpi, haciéndose más evidentes a tiempos posteriores.

Fig. 28. Efectos fenotípicos de la FB1 y del patógeno *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*. Para cada condición se utilizaron lotes independientes de plántulas de tres semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se muestran los controles, los cuales son plántulas solamente expuestas al medio Gamborg B-5/agar/sacarosa, la segunda columna representa a las plántulas expuestas a FB1 10 μ M en el medio sólido por 12 h, la tercera columna representa la infección de las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 1×10^8 UFC/mL, y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μ M por 12 h y luego expuestas a *Pst* DC3000 1×10^8 UFC/mL por los tiempos indicados. Las fotografías de registro fenotípico se tomaron a los tiempos señalados para evidenciar los indicios de muerte celular en las plántulas



5. Determinaciones realizadas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6*

5.1 Determinación del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1

La línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana* presenta una inserción de T-DNA en el gen *mpk6* que codifica para la proteína MPK6, la cual es una MAPK involucrada en vías de transducción de señales de ataque de patógenos y de muerte celular programada inducida por BCL. Al utilizar esta plántula mutante de *Arabidopsis thaliana* se hipotetizó que la defensa expuesta ante un fitopatógeno no sería suficiente para contener la infección aún cuando las BCL fueran incrementados de forma exógena. En este caso, el crecimiento bacteriano manifestaría un aumento mayor que en una condición en la que la MPK6 se expresara y las BCL se incrementaran (plántulas con genotipo silvestre expuestas a FB1). Para probar esta hipótesis se asperjó un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* realizando muestreos pos-infección a las 0, 24, 48, 72 y 120 h. En la Fig. 29 se puede observar que las plántulas control (barras gris claro) y las plántulas tratadas con la FB1 (barras gris oscuro) fueron inoculadas con esencialmente el mismo el inóculo bacteriano. Desde las 48 hpi se observó un incremento en la población bacteriana en comparación con los tiempos de 0 y 24 hpi. Pero el crecimiento bacteriano mostrado tanto para las muestras control como para las muestras expuestas a la FB1 no mostró diferencias significativas a tiempos largos como 72 y 120 hpi.

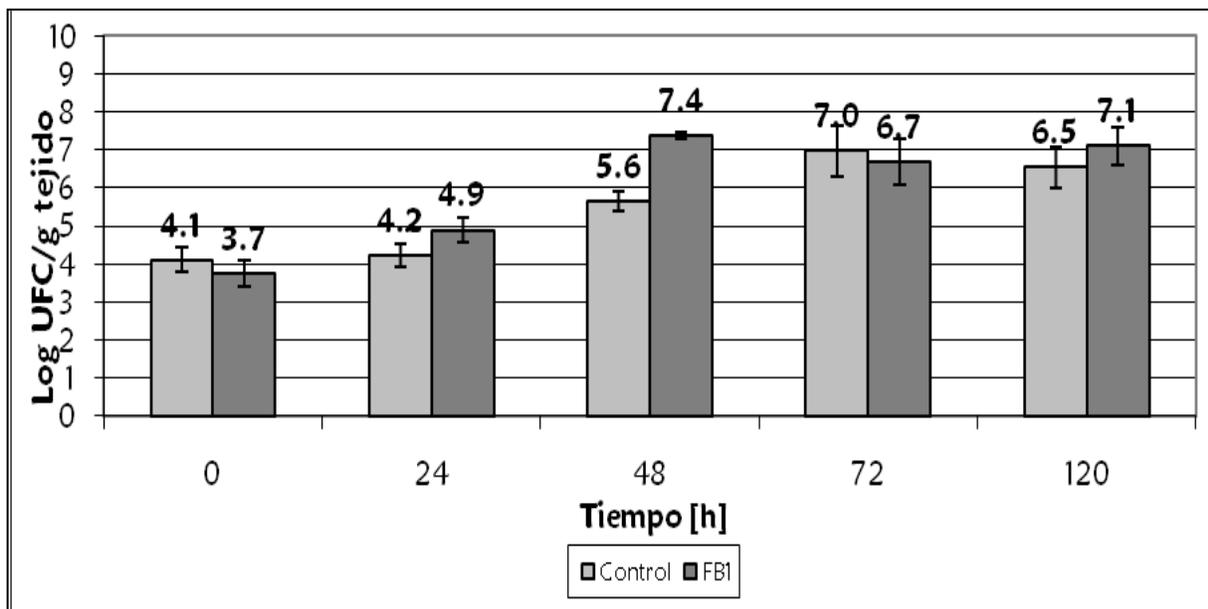


Fig. 29. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atpmk6* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y luego expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 72 y 120 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=6$, con 18 réplicas individuales.

Ya que prácticamente en todos los tiempos no se había encontrado diferencia del crecimiento bacteriano entre las plántulas tratadas con o sin FB1 y desafiadas con un inóculo de 1×10^8 UFC/mL (Fig. 29), se probó ahora un inóculo de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 asperjado sobre las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atpmk6* expuestas a 12 h con la FB1. Se tomaron muestras bacterianas a tiempos de 0, 24, 48 y 72. En la Fig. 30 se muestra que la carga bacteriana depositada en ambas muestras a 0 hpi fue idéntica. Después de 24 hpi el número de UFC de *Pst* avrRPM1 no presentó cambios significativos en ambos tratamientos pero sí registró un incremento de un orden de magnitud en ambos casos. A tiempos de 48 hpi los niveles bacterianos se incrementaron de 1.9×10^4 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido a 3.9×10^7 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido en las muestras control, mientras que en las muestras tratadas con la FB1 el incremento fue de 6.3×10^2 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido. Después de 72 hpi el crecimiento bacteriano para las muestras control no mostró cambios significativos con respecto al tiempo anterior, pero en las muestras tratadas con

la FB1 sí se encontró un aumento de 1.3 órdenes de magnitud. Pero no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio.

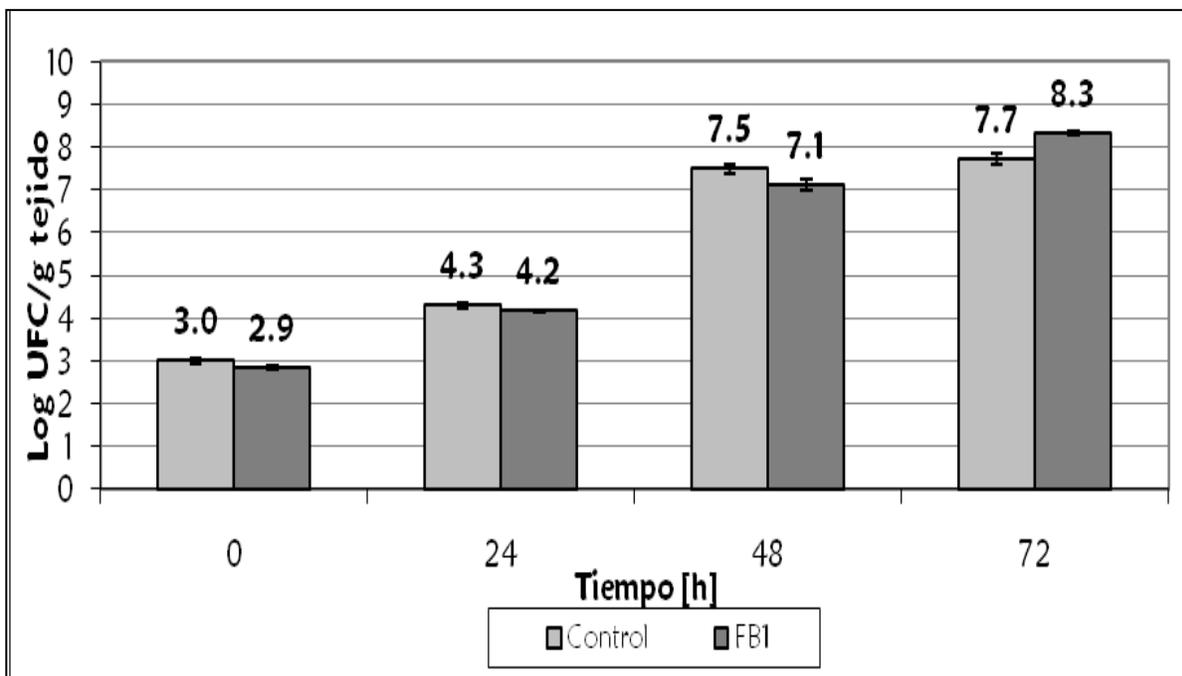


Fig. 30. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atmpk6* expuesta a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y luego expuestas a un inóculo de 1×10^7 . Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y error estándar $n=2$, con 6 réplicas individuales.

Con la finalidad de obtener resultados más claros sobre el efecto del tratamiento con la FB1 en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* de la línea *Atmpk6*, se realizó una exposición de las muestras a la toxina por 4 h para luego asperjarlas con un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1. Posterior a esto, se tomaron muestras bacterianas a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi. En la Fig. 31 se muestra que la población depositada en ambas muestras a 0 hpi fue igual. Después de 24 hpi el número de UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1 desarrollado en las plántulas evidenció cambios significativos en ambos tratamientos. A tiempos de 48 hpi el crecimiento bacteriano aumentó sólo un orden de magnitud sin que se mostraran diferencias significativas entre muestras control y muestras expuestas a FB1 en ningún caso. A las 72 hpi se alcanzaron niveles de hasta

7.9×10^7 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido sin mostrar diferencias significativas entre ambos tratamientos.

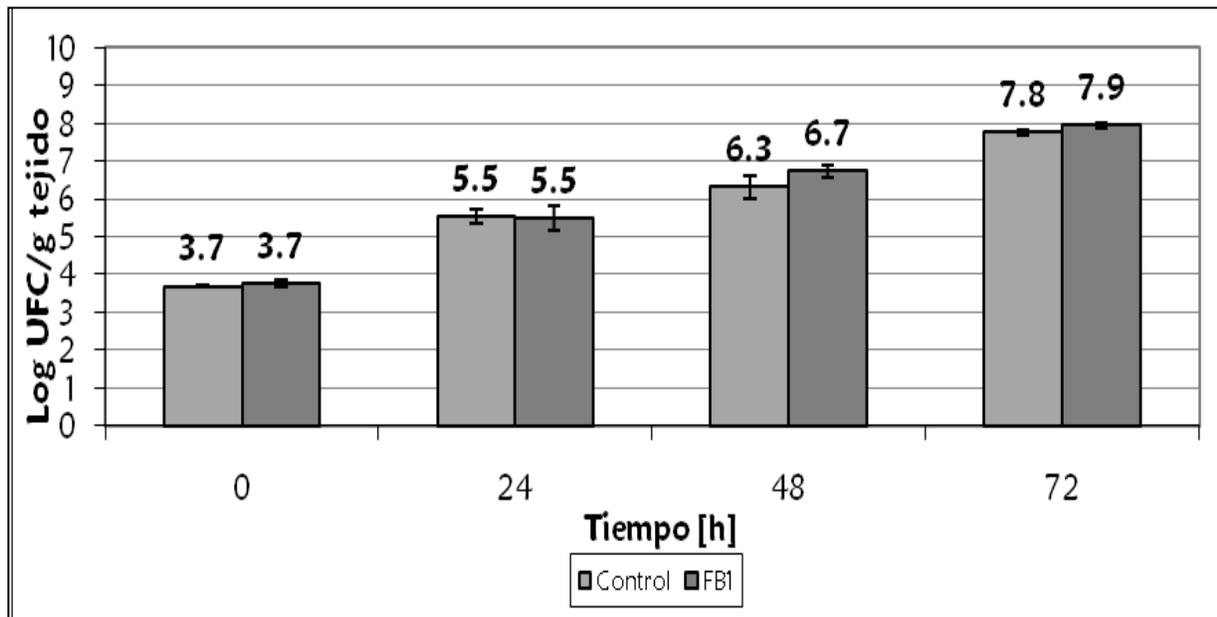


Fig. 31. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atpmk6* expuesta a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 4 h y luego expuestas a un inóculo de 1×10^7 . Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y error estándar. $n=3$, con 9 réplicas individuales.

5.2 Determinación del crecimiento de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atpmk6*

Para comparar los resultados obtenidos anteriormente con la cepa avirulenta de *Pst* se realizaron determinaciones experimentales equivalentes, pero ahora utilizando la cepa virulenta de *Pst*. En la Fig. 32 se observa que la aspersion del inóculo bacteriano realizado tanto para las plántulas control (barras gris claro) como para las plántulas expuestas a la FB1 (barras gris oscuro) fue reproducible al tener la misma carga bacteriana en ambas muestras. A tiempos de 24 hpi se observó un incremento de 1×10^5 UFC de *Pst* DC3000/g tejido hasta 1×10^8 UFC de *Pst* DC3000/g tejido en ambos tratamientos y estos niveles de crecimiento bacteriano se superaron hasta las 120 hpi. De manera excepcional, se observó un descenso en el crecimiento bacteriano para ambos tratamientos a las 96 hpi, ya que no hubo diferencias significativas en los niveles

de crecimiento bacteriano en los otros tiempos en plántulas control o en plántulas expuestas a FB1 por 12 h.

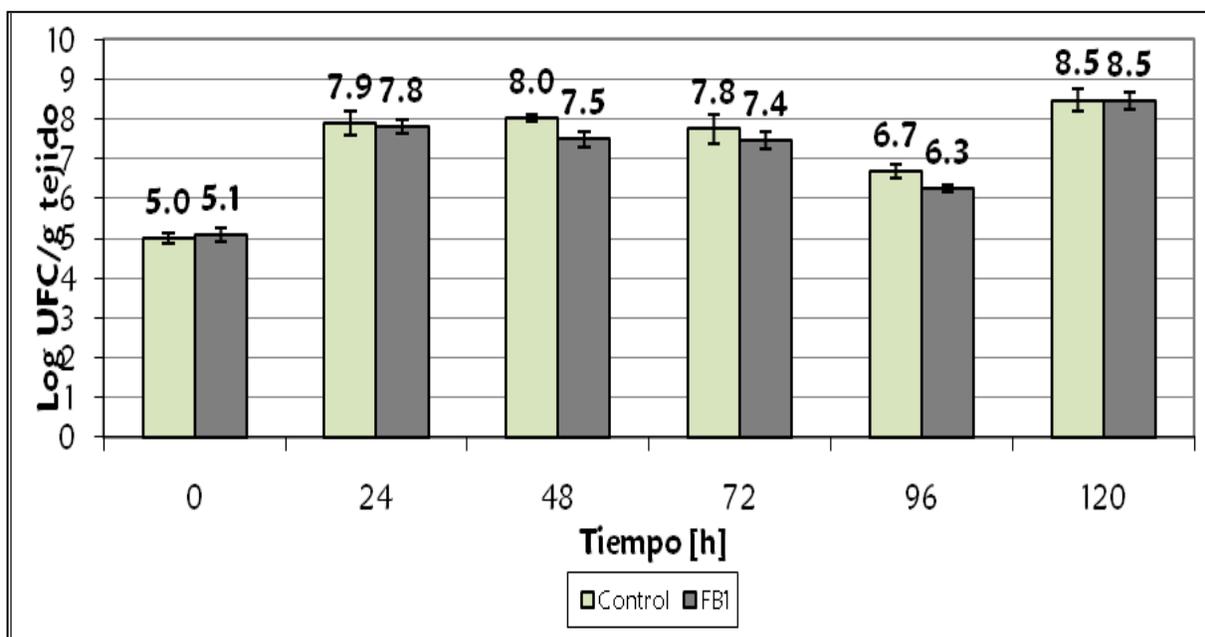


Fig. 32. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atmpk6* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y posteriormente expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=2$, con 6 réplicas individuales.

Para esclarecer efecto de la FB1 en esta cepa, ahora se probó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 que se asperjó sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6*, las cuales fueron expuestas por 12 h a la FB1. Se tomaron muestras vegetales a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi, obteniéndose los resultados de la Fig. 33. La carga bacteriana en el tiempo de 0 hpi fue prácticamente la misma, tanto para las muestras control (barras gris claro) como para las muestras tratadas con la FB1 por 12 h (barras gris oscuro). A las 24 hpi, el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 aumentó 2 órdenes de magnitud aproximadamente tanto para las muestras control como para las muestras tratadas con la FB1. Después de 48 hpi, las diferencias entre los niveles de crecimiento bacteriano reflejaron una menor carga bacteriana en las plántulas control que las muestras tratadas con la FB1, obteniéndose aproximadamente 0.5 órdenes de magnitud de diferencia entre las muestras. Para las 72 hpi, el crecimiento bacteriano de

la *Pst* DC3000 alcanzó niveles aproximadamente de 2.5×10^9 UFC/g tejido en ambos casos.

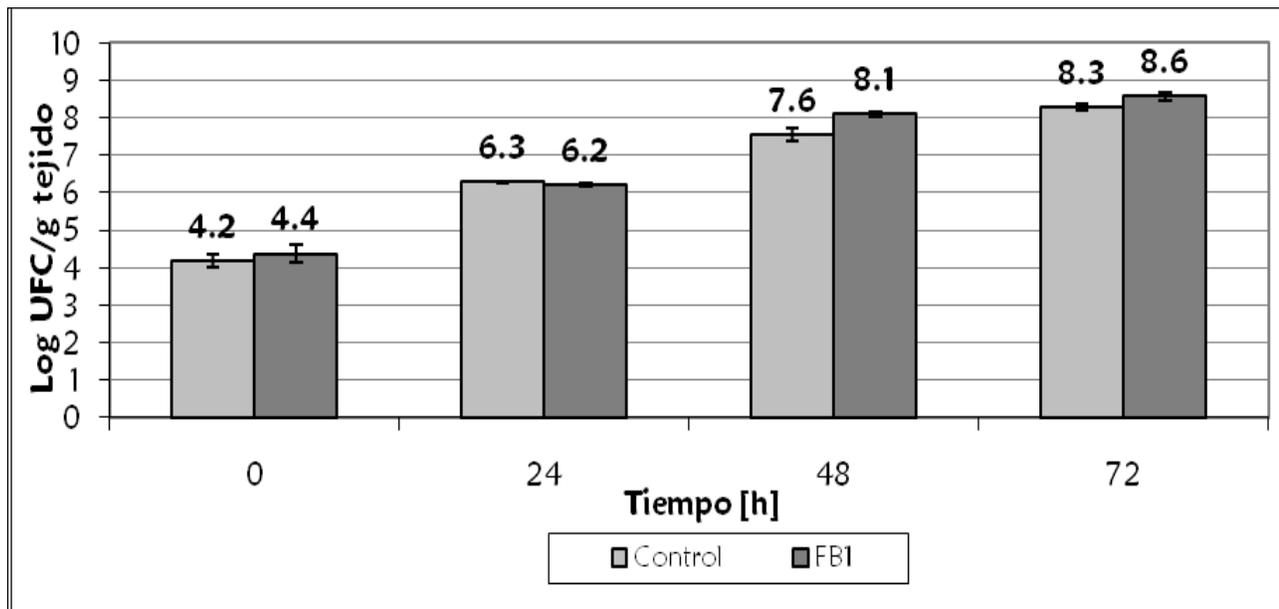


Fig. 33. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atmpk6* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 12 h y posteriormente expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=2$, con 6 réplicas individuales.

Para explorar más el efecto del tratamiento de la FB1 sobre el crecimiento bacteriano de la *Pst* DC3000 sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* se probó un inóculo de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 aunado a una exposición de 4 h a la toxina. Posteriormente se tomaron muestras bacterianas a tiempos de 0, 24, 48 y 72 hpi. En la Fig. 34 se muestra que la población bacteriana en ambas muestras a 0 hpi fue esencialmente idéntica. Después de 24 hpi se presentó un aumento de aproximadamente un orden de magnitud para las muestras de ambos tratamientos. A tiempos de 48 hpi los niveles bacterianos se muestran con valores similares. Después de 72 hpi aunque se reportó un incremento de un orden de magnitud en ambos casos, no se mostraron diferencias significativas en ningún tratamiento.

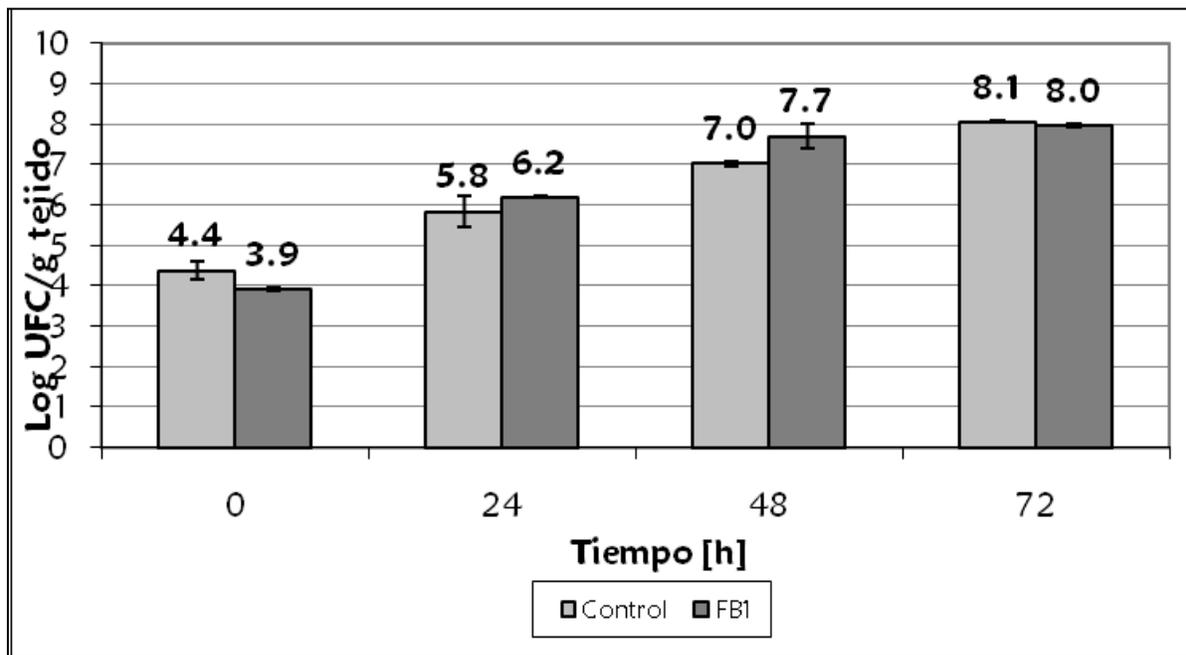


Fig. 34. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en *Arabidopsis thaliana*, línea *Atpmk6* expuestas a FB1. Las plántulas de tres semanas de edad fueron expuestas o no a la FB1 por 4 h y posteriormente expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 hpi para evaluar el crecimiento bacteriano en los tejidos de las plántulas. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=2$, con 6 réplicas individuales.

Para comparar las diferencias entre los crecimientos de *Pst* avrRPM1 y de *Pst* DC3000 reportados en las Figs. 29 y 32 se realizó un regráfico en donde se alinearon los resultados obtenidos sólo con el tratamiento control del crecimiento bacteriano muestreado a 0, 48, 72 y 120 hpi. En la Fig. 35 se presentan los datos que indican que el inóculo asperjado a las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 avrRPM1 (barras gris claro) fue menor en comparación con el utilizado en las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 virulenta (barras gris oscuro). A las 48 hpi, se observó una diferencia de 2 órdenes de magnitud entre el número de UFC de *Pst* desarrollado en las plántulas expuestas a *Pst* avrRPM1 y las expuestas a la *Pst* DC3000. A las 72 hpi el inóculo en ambos casos alcanza niveles de hasta 3×10^7 UFC/g tejido sin mostrar diferencias significativas en ningún caso. Para las 120 hpi el nivel de crecimiento bacteriano se incrementó ligeramente hasta 3×10^8 UFC/g tejido en el caso de la cepa de *Pst* DC3000 virulenta pero los niveles de crecimiento bacteriano se mantienen en el caso de la cepa avirulenta a 120 hpi.

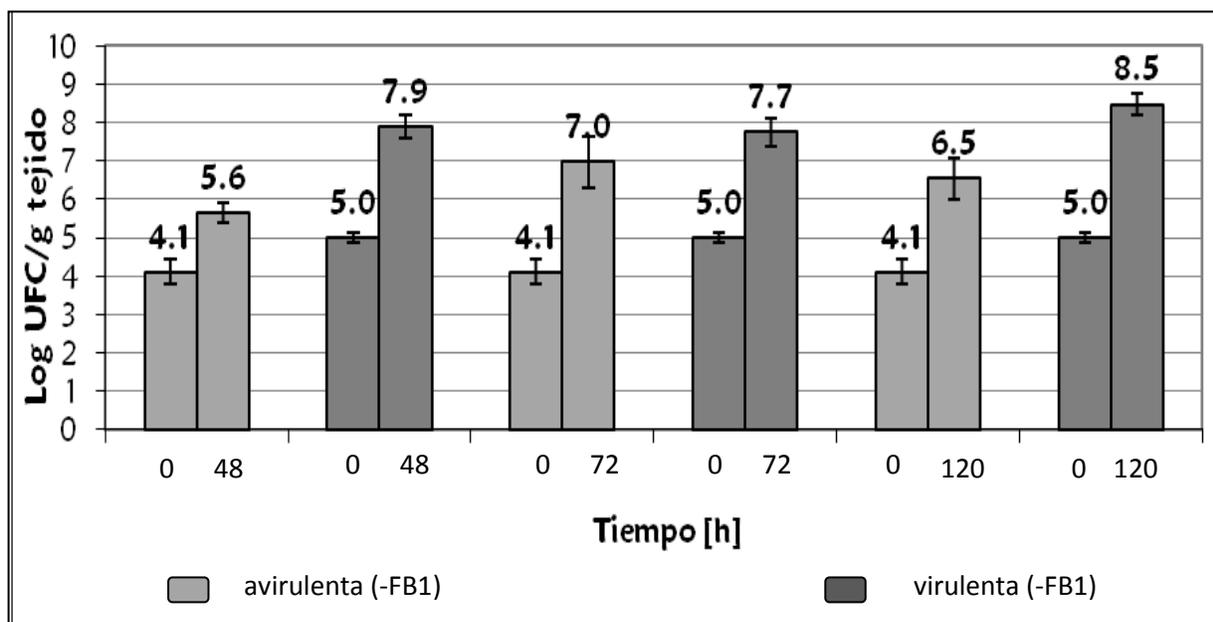


Fig. 35. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea *Atmpk6*. Las plántulas de tres semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0, 48, 72 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=5$ para la *Pst* avirulenta y $n=2$ para la *Pst* virulenta. Resultados experimentales mostrados en las Fig. 29 y 32.

Se realizó un gráfico de los datos obtenidos en las Figs. 29 y 32 para poder mostrar las diferencias en el crecimiento bacteriano encontradas con ambas cepas de *Pst* a tiempos de 0, 48, 72 y 120 hpi, en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* con un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL. El gráfico se muestra en la Fig. 36. El inóculo asperjado a las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 avrRPM1 (barras gris claro) fue de aproximadamente un orden de magnitud menor en comparación con el inóculo al que fueron plántulas de *Pst* DC3000 virulenta (barras gris oscuro). El crecimiento bacteriano obtenido con la *Pst* DC3000 avrRPM1 mostró que es desde las 48 hpi cuando se obtiene un salto de aproximadamente 4 órdenes de magnitud, pero es a las 120 hpi cuando se encuentra el máximo en la cinética de crecimiento del fitopatógeno.

Para la *Pst* DC3000, el crecimiento bacteriano se incrementó 3 órdenes de magnitud en comparación con su control a las 48 hpi, pero este crecimiento no mostró cambios hasta las 120 hpi. Los crecimientos muestreados en las plántulas tratadas con la FB1 siempre fueron superiores a las muestras de las plántulas control al tiempo inicial de muestreo.

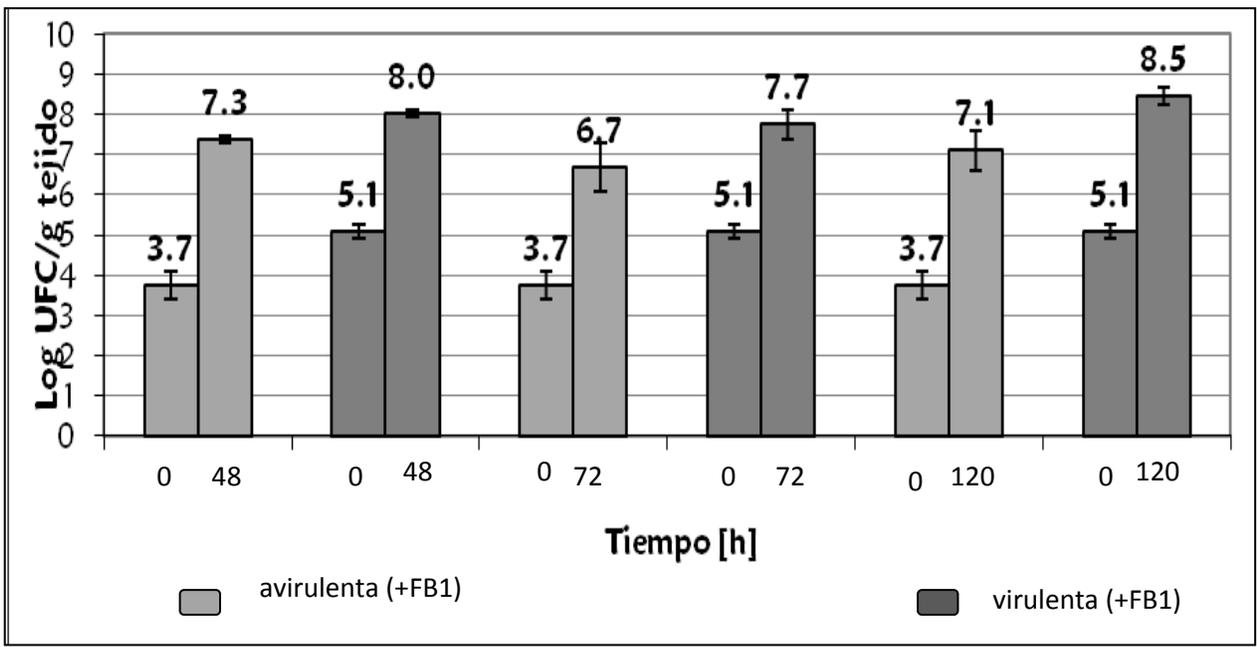
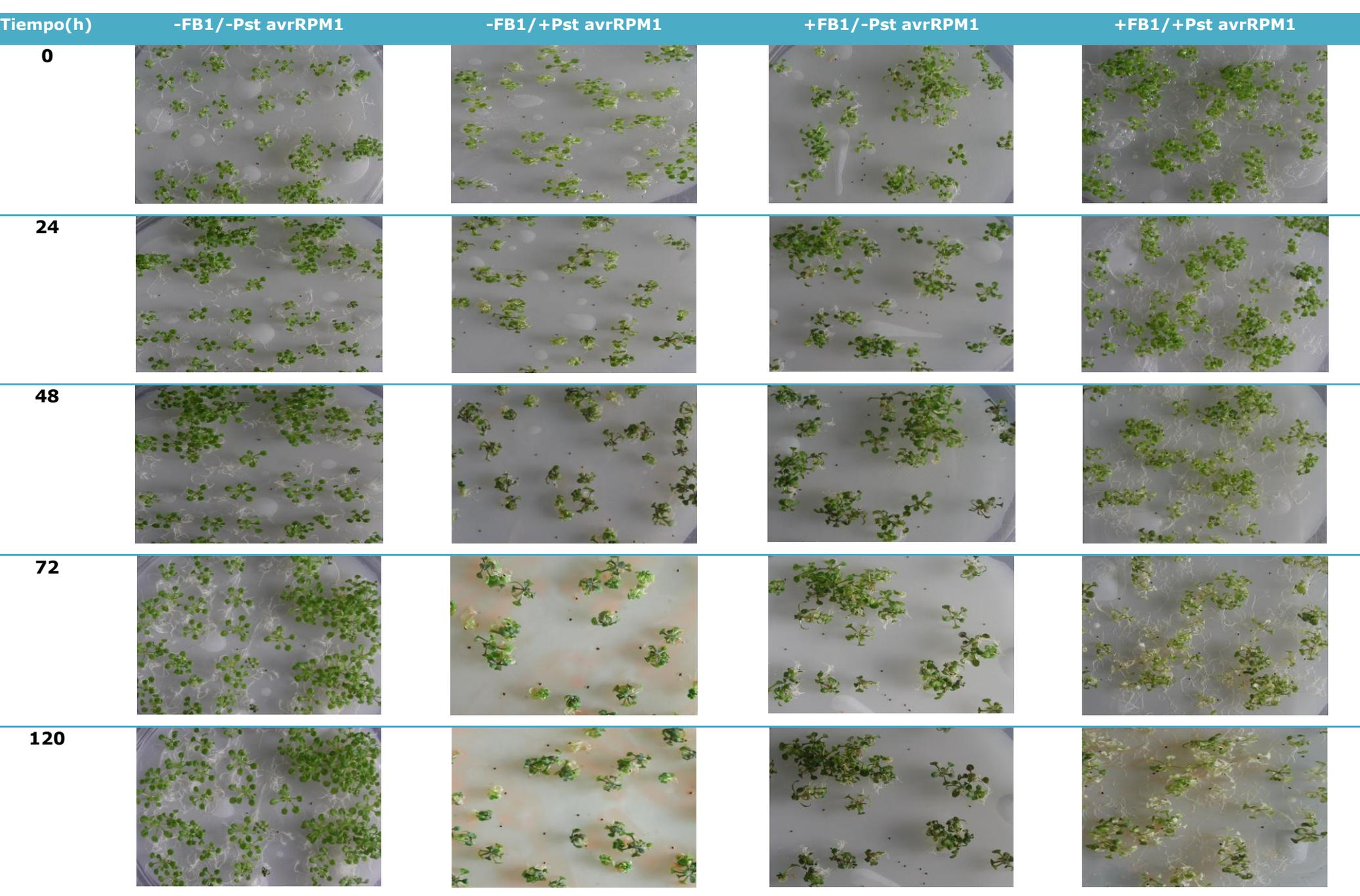


Fig. 36 Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea *Atmpk6*. Las plántulas de tres semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* fueron expuestas a FB1 por 12 h, al cabo del cual se asperjó el inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0, 72 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=5$ para la *Pst* avirulenta y $n=2$ para la *Pst* virulenta. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 29 y 32.

5.3 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6*.

Los resultados del análisis fenotípico de la exposición a las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* a *Pst* DC3000 *avrRPM1* se muestran en la Fig. 37, observándose que a tiempos de 0 y hasta 48 hpi no hubo signos de enfermedad en las plántulas. En el caso de las muestras expuestas únicamente a la *Pst* *avrRPM1*, la muerte de las células vegetales se observó hasta las 72 h post-infección. Se observó que aún a las 120 hpi el efecto de la FB1 no se manifestó en la plántula, pero la adición de la cepa bacteriana y de la FB1 originó mayores indicios de enfermedad que los causados por sólo uno de ellos, mostrándose los efectos desde las 72 hpi.

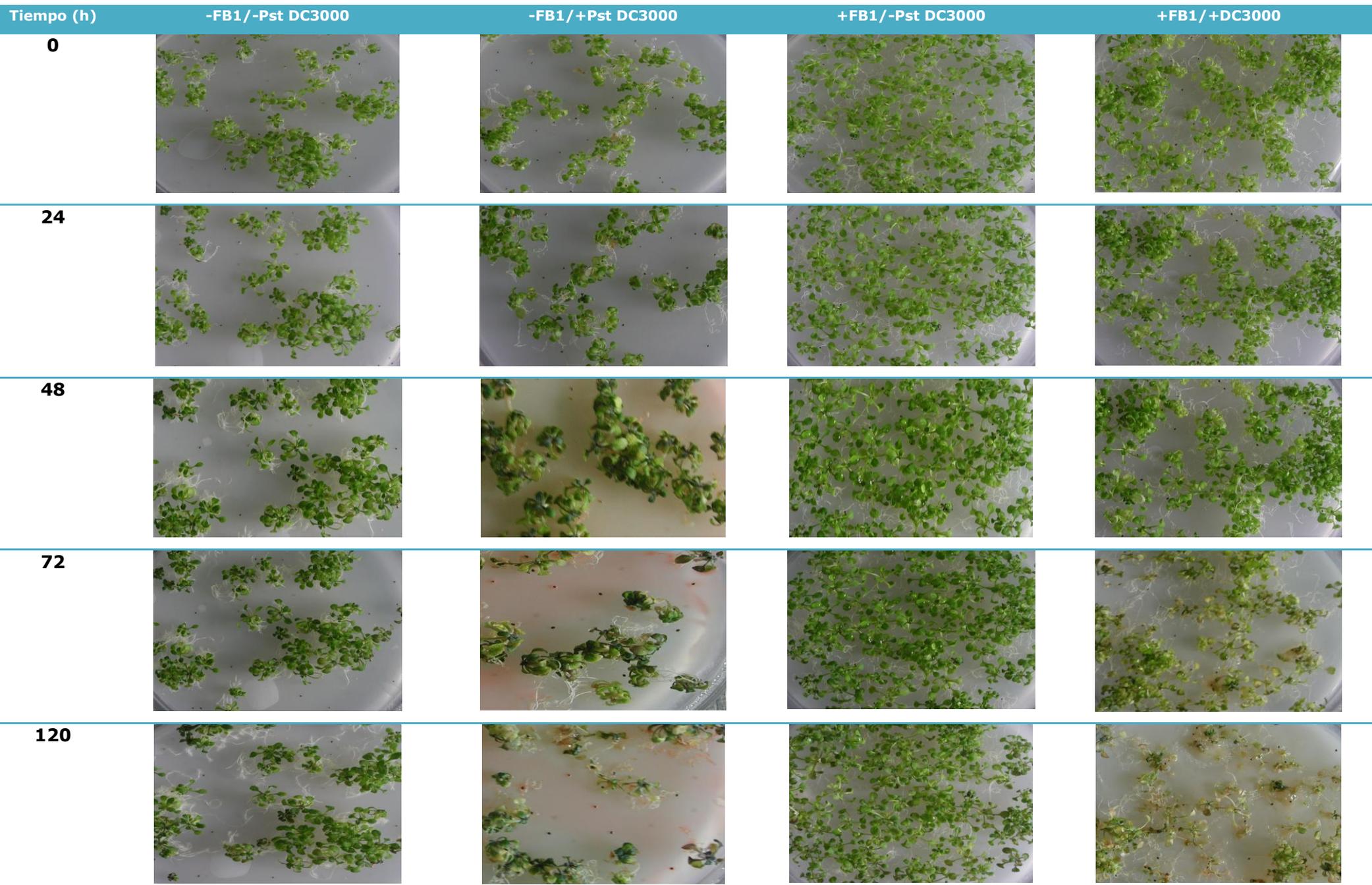
Fig. 37. Efectos fenotípicos de la FB1 y del patógeno *Pst* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6*. Para cada condición se utilizaron lotes independientes de plántulas de tres semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se muestran los controles, los cuales son plántulas solamente expuestas al medio Gamborg B-5/agar/sacarosa, la segunda columna representa a las plántulas expuestas a FB1 10 μ M en el medio sólido por 12 h, la tercera columna representa la infección de las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1×10^8 UFC/mL, y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μ M por 12 h y luego expuestas a *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1×10^8 UFC/mL por los tiempos indicados. Las fotografías de registro fenotípico se tomaron a los tiempos señalados para evidenciar los indicios de muerte celular en las plántulas



5.4 Análisis fenotípico del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6*.

Los resultados del análisis fenotípico de la exposición de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* a *Pst* DC3000 se muestran en la Fig. 38, observándose que a tiempos de 0 y 24 hpi no se muestran signos de enfermedad en las plántulas. En el caso de las muestras expuestas únicamente a la *Pst* DC3000 los indicios de enfermedad en las células vegetales se mostraron desde las 48 hpi, haciéndose más evidentes a tiempos posteriores. Se observó que aún a las 120 hpi, el efecto de la FB1 no se manifestó en la plántula. Pero al agregar tanto la *Pst* DC3000 como la FB1 los índices de enfermedad se hicieron más evidentes mostrándose estos efectos fenotípicos desde las 72 hpi.

Fig. 38. Efectos fenotípicos de la FB1 y del patógeno *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6*. Para cada condición se utilizaron lotes independientes de plántulas de tres semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se muestran los controles, los cuales son plántulas solamente expuestas al medio Gamborg B-5/agar/sacarosa, la segunda columna representa a las plántulas expuestas a FB1 10 μ M en el medio sólido por 12 h, la tercera columna representa la infección de las plántulas expuestas a *Pst* DC3000 1×10^8 UFC/mL, y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μ M por 12 h y luego expuestas a *Pst* DC3000 1×10^8 UFC/mL por los tiempos indicados. Las fotografías de registro fenotípico se tomaron a los tiempos señalados para evidenciar los indicios de muerte celular en las plántulas



6. Comparación del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en plántulas de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* en presencia y ausencia de FB1.

Uno de los objetivos de esta trabajo de tesis es poder determinar la capacidad de inmunidad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* frente a un fitopatógeno avirulento por lo cual se realizó un regráfico de los resultados experimentales mostrados en las Figs. 9, 19 y 29 al tiempo de 72 hpi. En la Fig. 39 se muestra el regráfico en el que el inóculo bacteriano inicial de las muestras de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* líneas silvestre (barras gris claro) y *Atlcb2a-1* (barras gris oscuro) es de 1×10^5 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido, mientras que para las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* (barras café claro) éste fue de cerca de 1.2×10^4 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido. A pesar de estas diferencias en los inóculos iniciales entre las tres líneas, a tiempo de 72 hpi el crecimiento bacteriano alcanzado de *Pst* DC3000 avrRPM1 fue de 1×10^7 UFC/g tejido para los tres casos, sin mostrar diferencias significativas en ninguna línea de *Arabidopsis thaliana* utilizada.

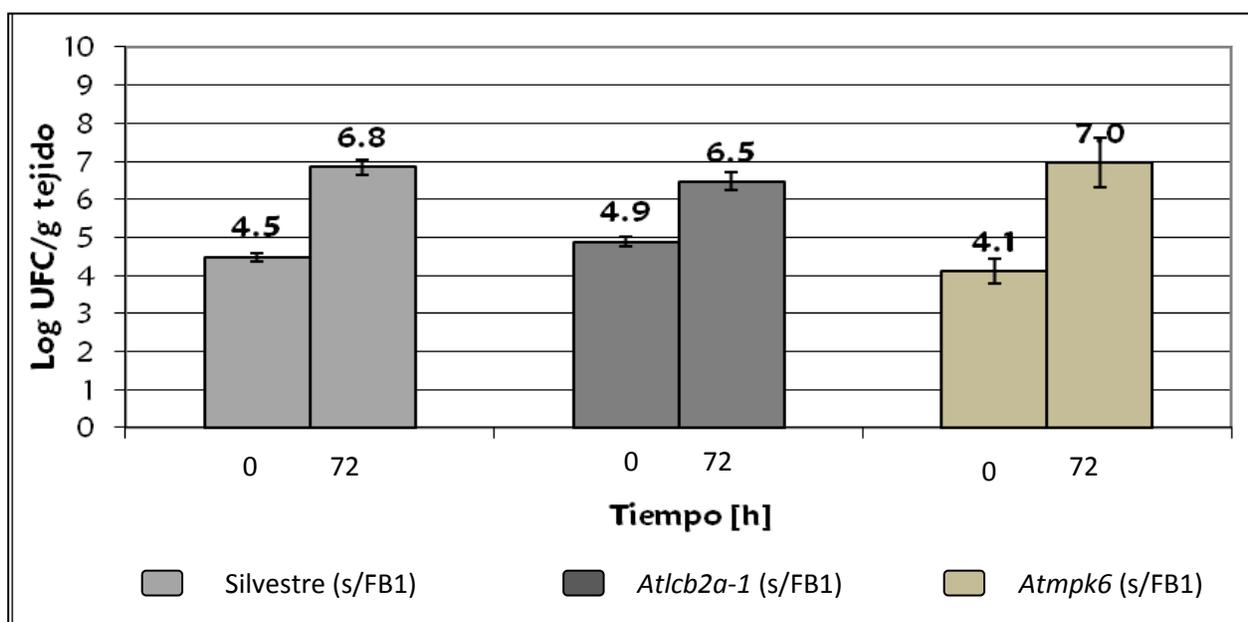


Fig. 39. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 72 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=13$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=11$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=5$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 9, 19 y 29.

Se regraficaron los datos experimentales obtenidos anteriormente mostrados en las Figs. 9, 19 y 29 para poder presentar más fácilmente las diferencias encontradas en el crecimiento bacteriano tanto de la *Pst* DC3000 avrRPM1 como de la *Pst* DC3000 a tiempo de 72 hpi en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de las tres líneas expuestas a FB1 por 12 h. En la Fig. 40 se mostró que el inóculo asperjado tanto a las plántulas silvestres (barras gris claro) como a las de la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* (barras gris oscuro) fue igual pero para las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* (barras gris claro), éste fue un orden de magnitud menor. Al tiempo de 72 hpi, las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a la FB1 muestran niveles idénticos de la población bacteriana para la *Pst* DC3000 avrRPM1 sin encontrarse diferencias significativas entre las líneas utilizadas.

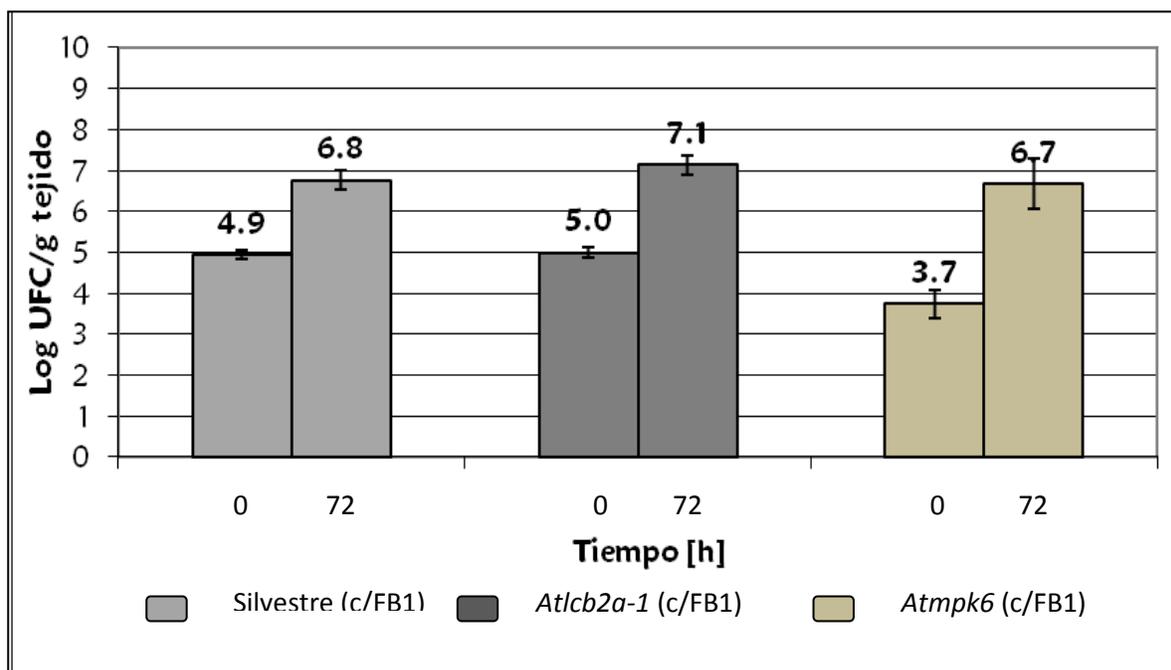


Fig. 40. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a FB1 por 12 h, al cabo del cual se asperjó un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 72 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=13$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=11$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=5$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 9, 19 y 29.

Para encontrar diferencias o semejanzas entre los niveles de crecimiento bacteriano de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas se realizó un regráfico de los resultados experimentales encontrados a las 0 y 120 hpi mostrados en las Figs. 9, 19 y 29. En la Fig. 41 se observó que el inóculo bacteriano de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* líneas silvestre (barras gris claro) y *Atlcb2a-1* (barras gris oscuro) fue esencialmente el mismo, a diferencia del encontrado en plántulas de *Atmpk6* (barras gris claro), el cual es particularmente cerca de un orden de magnitud menor. Al tiempo de 120 hpi, el crecimiento bacteriano encontrado para las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fue cerca de 1×10^7 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido. Sin embargo, en el caso de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas, el incremento fue de cerca de 2 órdenes de magnitud en comparación al tiempo de 0 hpi, sin encontrarse diferencias significativas en ningún caso.

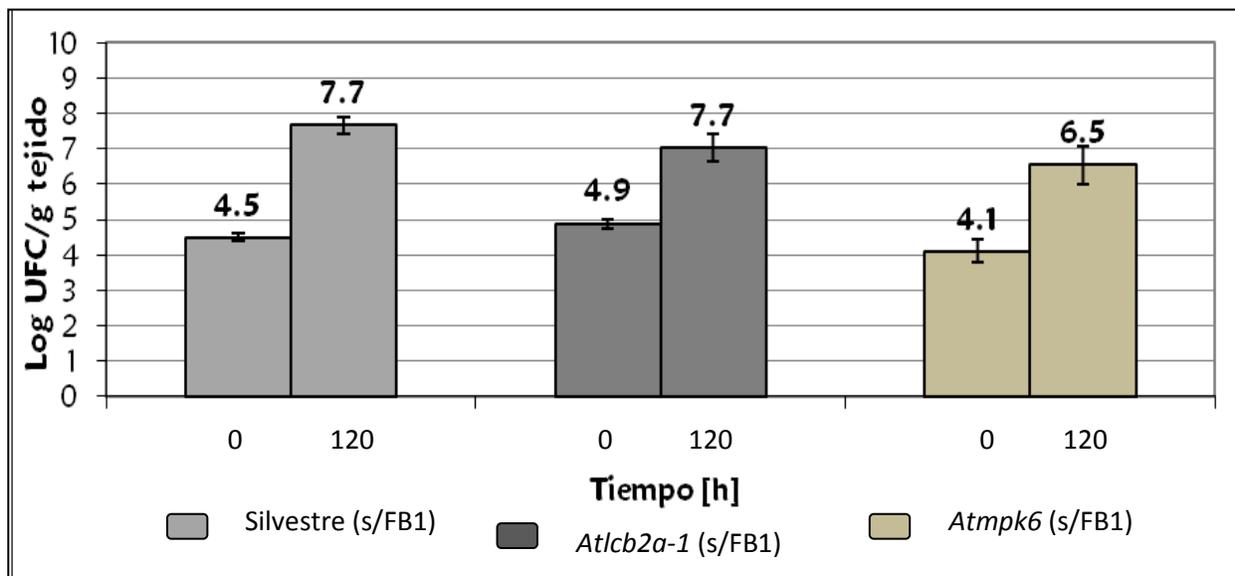


Fig. 41. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=13$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=11$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=5$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 9, 19 y 29.

Evaluando las diferencias encontradas en el crecimiento de la *Pst* DC3000 avrRPM1 en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* se realizó un regráfico de los datos experimentales encontrados, mismos que se muestran en las Figs 9, 19 y 29. En la Fig. 42 (regráfico) se muestra que el inóculo bacteriano depositado en las plántulas de las líneas silvestre (barras gris claro) y *Atlcb2a-1* (barras gris oscuro) de *Arabidopsis thaliana* fue esencialmente el mismo, mientras que para las plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* (barras gris claro) éste fue aproximadamente un orden de magnitud menor. Al tiempo de 120 hpi en las tres líneas utilizadas, las muestras expuestas a la FB1 se observó un crecimiento de aproximadamente 1×10^7 UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1/g tejido. En cuanto al incremento desde el tiempo de 0 hpi para las primeras dos líneas éste fue de 2 órdenes de magnitud, mientras que para la línea *Atmpk6* éste fue de cerca de 3 órdenes de magnitud.

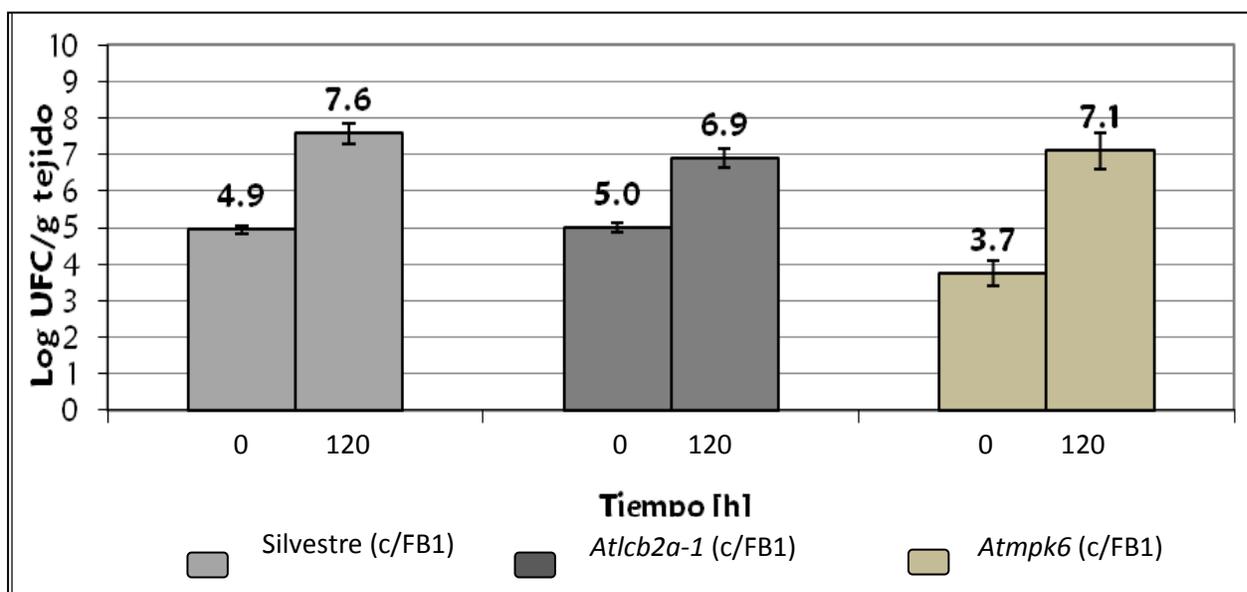


Fig. 42. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a FB1 por 12 h, al cabo del cual se asperjó un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=13$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=11$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=5$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 9, 19 y 29.

7. Comparación del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* en presencia y ausencia de FB1.

Para comparar los resultados de crecimiento bacteriano de la *Pst* DC3000 a las 0 y 72 hpi obtenidos en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* se realizó un regráfico de los datos experimentales mostrados en las Figs. 12, 22 y 32 para evaluar las diferencias existentes, el cual se muestra en la Fig. 43. Al tiempo de 0 hpi se observó que las tres líneas utilizadas recibieron una carga bacteriana idéntica. A tiempo de 72 hpi se observó un incremento de dos órdenes de magnitud en la línea silvestre y la línea *Atmpk6*, el caso contrario se reportó en la línea *Atlcb2a-1* con un crecimiento de sólo 1 orden de magnitud al mismo tiempo muestreado.

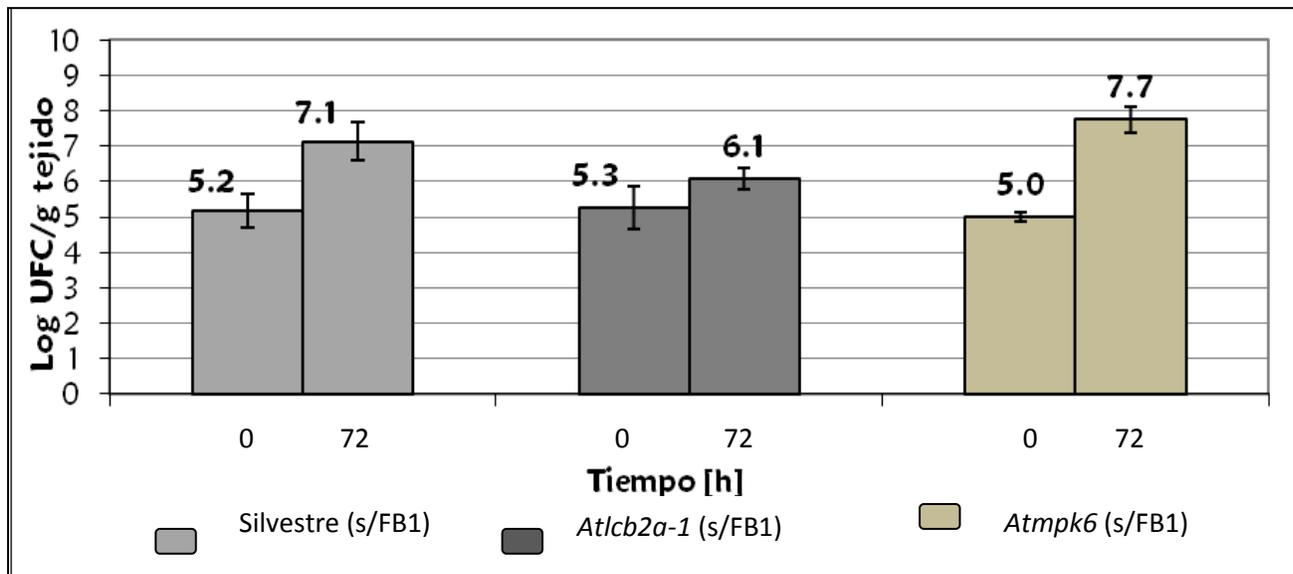


Fig. 43. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 72 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=3$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=2$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=2$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 12, 22 y 32.

Se realizó un regráfico de los resultados experimentales mostrados anteriormente en las Figs, 12, 22 y 32, el cual se muestra en la Fig 44. Éste se realizó para comparar los niveles de crecimiento bacteriano obtenidos a las 0 y 120 hpi en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este proyecto. Se observó que el número de UFC de *Pst* DC3000 desarrollado en las tres líneas utilizadas fue constante. A tiempos de 72 hpi en el caso de la línea silvestre y de la línea *Atmpk6*, el incrementó mostrado fue de 2 órdenes de magnitud aproximadamente, mientras que para la línea *Atlcb2a-1* fue solamente de 1 orden de magnitud. En el tiempo de 72 hpi se observó que se alcanzó un crecimiento mayor para las muestras tratadas con la FB1 en comparación con las muestras control.

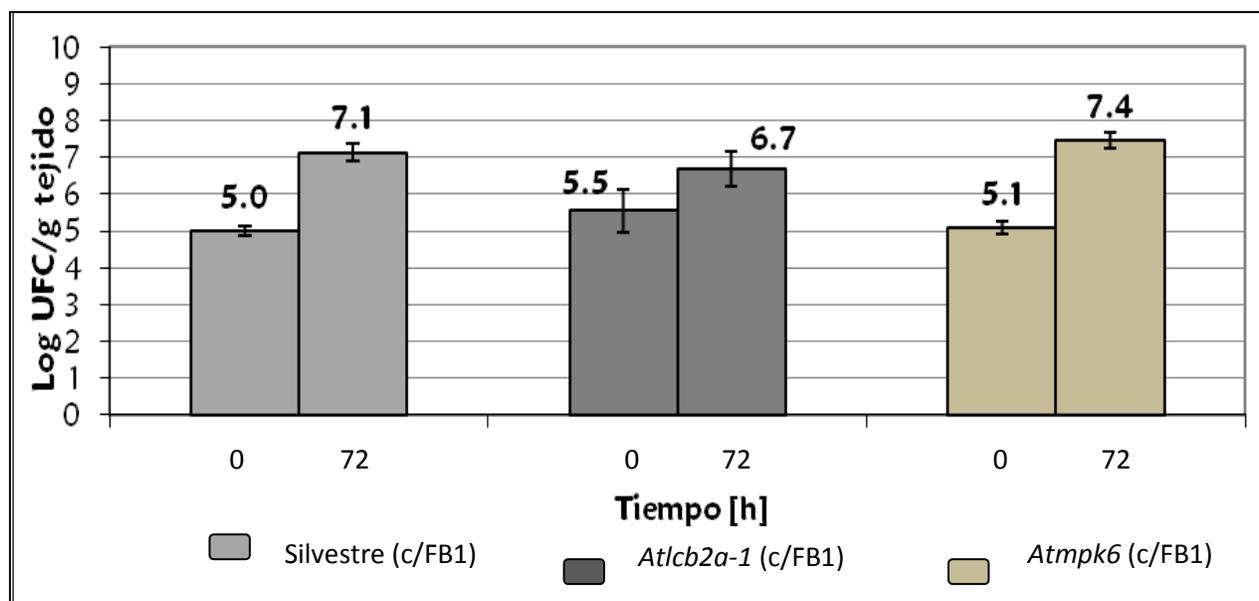


Fig. 44. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a FB1 por 12 h, al cabo del cual fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 72 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=3$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=2$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=2$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 12, 22 y 32.

Con la finalidad de comparar los datos obtenidos en las Figs. 12, 22 y 32 al tiempo de 120 hpi de las muestras control de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas, se realizó un regráfico el cual se muestra en la Fig. 45. A tiempo de 0 hpi el inóculo bacteriano en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* es igual. Después de 120 hpi se observó un incremento en los niveles de la población bacteriana en la línea *Atmpk6* llegando a alcanzar hasta 3.5 ordenes de magnitud más que el tiempo de 0 hpi. Para la línea silvestre éste incremento sólo fue de 2.5 órdenes de magnitud respecto a su muestra control, pero caso contrario en la línea *Atlcb2a-1* el incremento respecto a la muestra control sólo fue de un orden de magnitud, llegando a alcanzar niveles bacterianos solamente de 3×10^8 UFC de *Pst* DC3000 /g tejido.

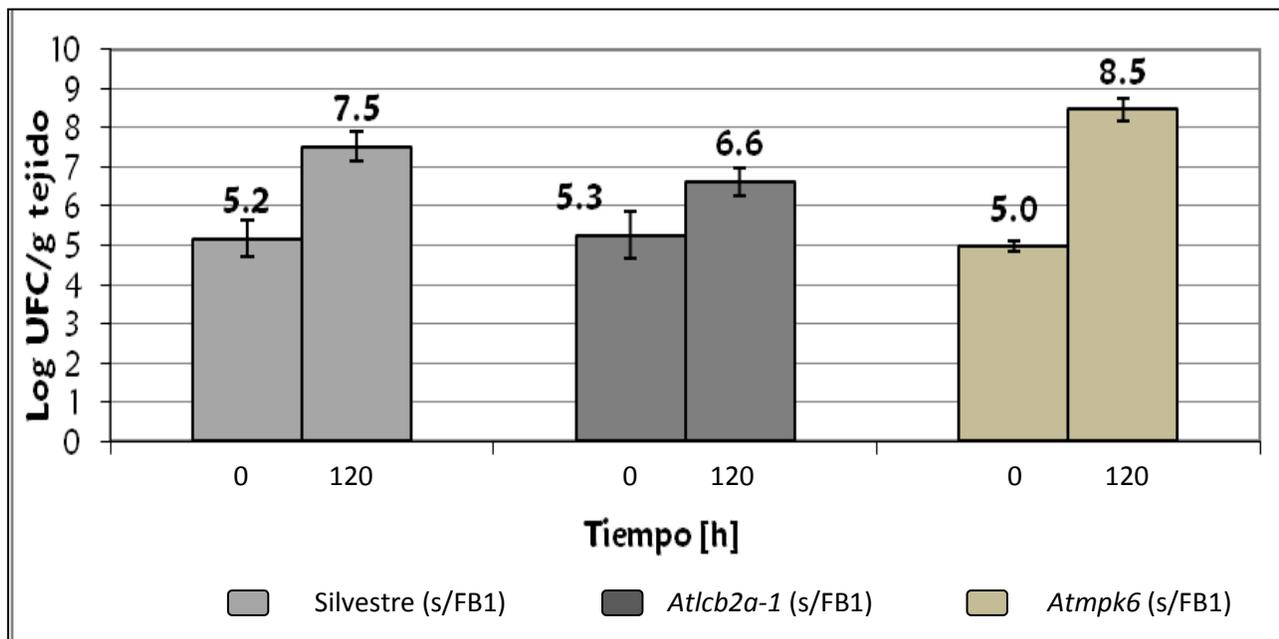


Fig. 45. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=3$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=2$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=2$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 12, 22 y 32.

Realizando un gráfico de los datos obtenidos en las Figs. 12, 22 y 32 se compararon los resultados experimentales del crecimiento bacteriano mostrados a tiempos de 0 y 120 hpi desarrollado en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6* que fueron expuestas por 12 h a FB1. En la Fig. 46. se observó que la carga bacteriana en las tres líneas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* a tiempo de 0 hpi fue idéntica llegando hasta 1×10^5 UFC de *Pst* DC3000 /g tejido. En el caso del tiempo muestreado post-infección de 120 h, se observó que es la línea *Atmpk6* en la cual se obtuvo un incremento de hasta 3.5 órdenes de magnitud en comparación con el tiempo inicial, mientras que en el caso de la línea silvestre se alcanzaron 2 órdenes de magnitud más respecto al tiempo inicial de la plántula muestreada. Respecto a la línea *Atlcb2a-1*, ésta sólo alcanzó un incremento de un orden de magnitud respecto a su control. Sin embargo, en todos los casos se observó un incremento superior de crecimiento bacteriano aún cuando las muestras habían sido tratadas con la FB1.

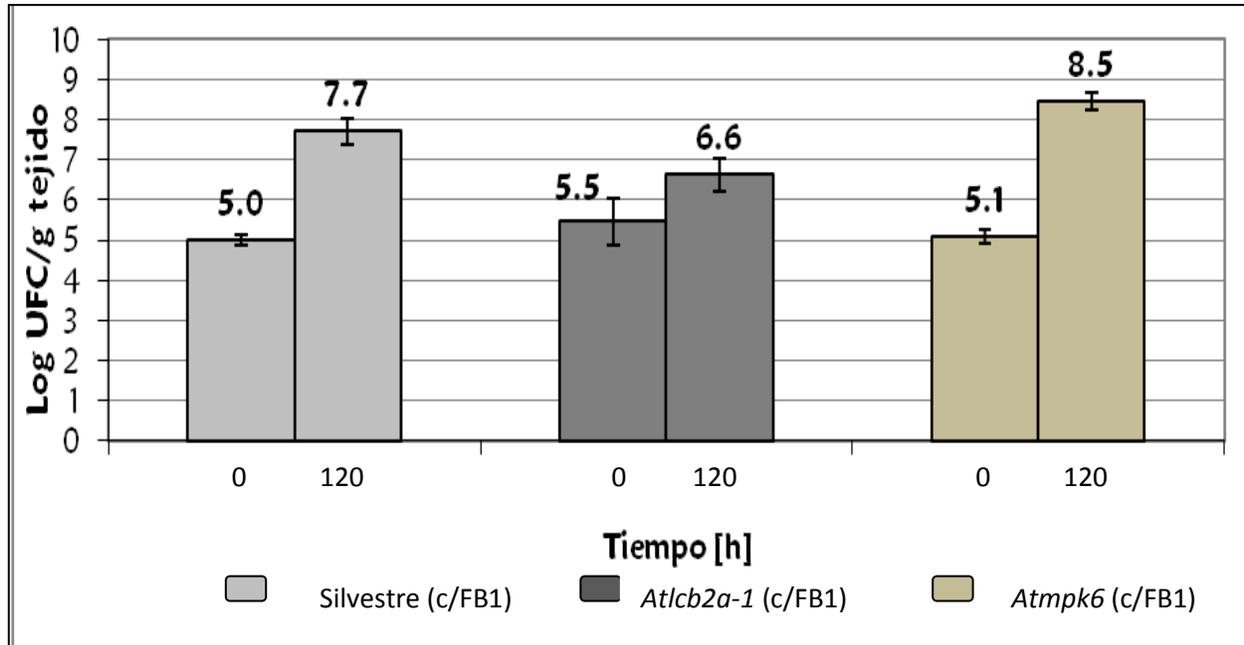


Fig. 46. Crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, respectivamente. Las plántulas de tres semanas de edad de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a FB1 por 12 h, y luego expuestas a un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL en cada caso. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0 y 120 hpi. Se muestran los promedios y el error estándar. $n=3$ para la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*, $n=2$ para la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* y $n=2$ para la línea *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*. Resultados experimentales mostrados en las Figs. 12, 22 y 32.

8. Comparación del crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 avrRPM1 y *Pst* DC3000 con un inóculo de 1×10^7 UFC/mL en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en las tres líneas en presencia y ausencia de FB1.

Con objeto de facilitar el análisis de los resultados obtenidos con el inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* avirulenta o virulenta, todos ellos se organizaron en tres figuras que agrupan los datos de los tres genotipos de *Arabidopsis*: Figura 47 (línea silvestre), Figura 48 (línea *Atlcb2a-1*) y Figura 49 (línea *Atmpk6*).

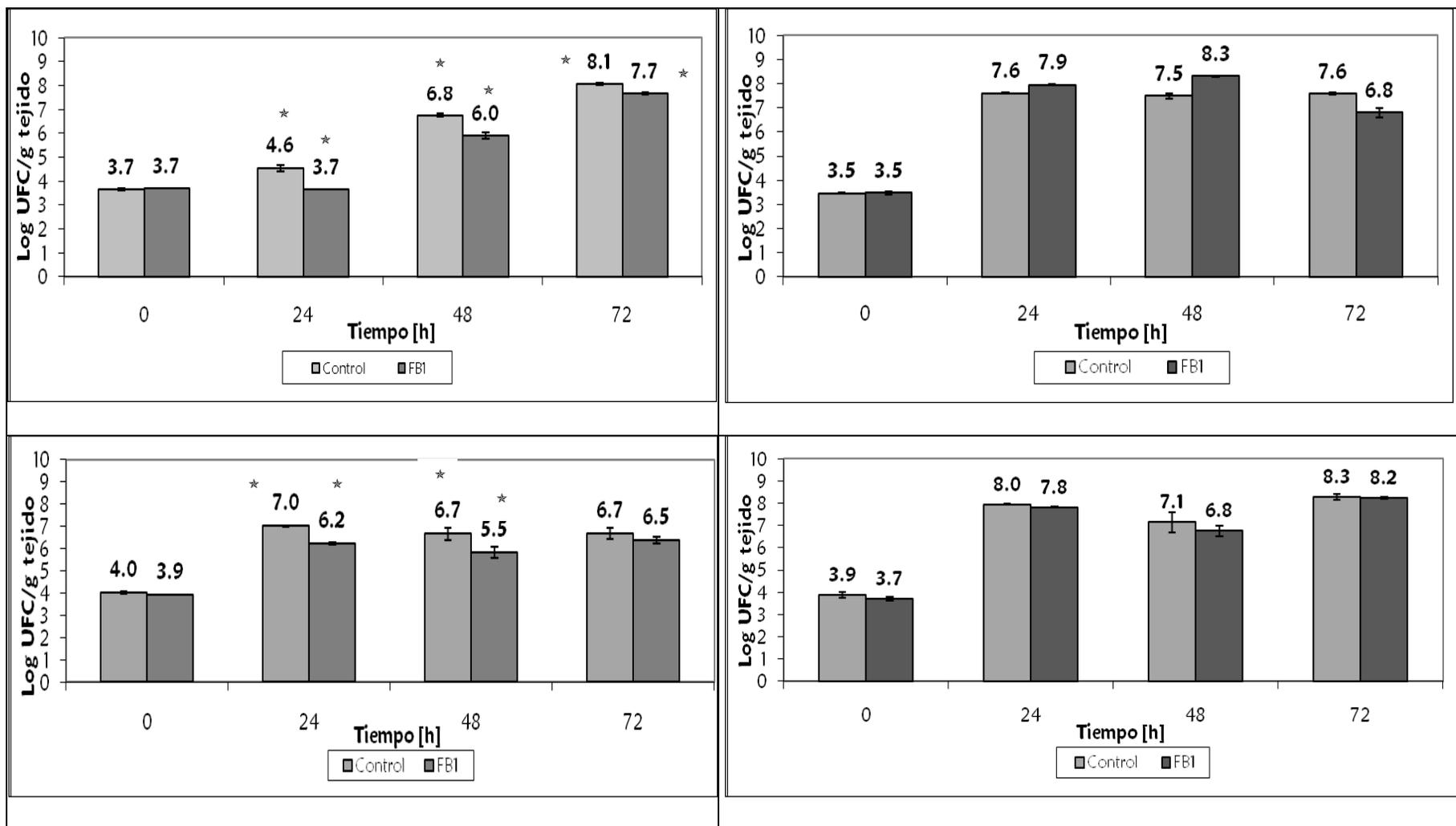


Fig. 47. Compendio de los resultados de crecimiento bacteriano obtenidos utilizando un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 y *Pst* DC30000 con una exposición a 12 y 4 h de FB1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre. Los paneles de la parte superior muestran la exposición de las plántulas a FB1 durante 12 h, los paneles inferiores muestran la exposición de las plántulas a FB1 durante 4 h. Los paneles de la izquierda muestran los resultados obtenidos con *Pst* DC3000 avrRPM1, los paneles de la derecha muestran los resultados obtenidos con la cepa *Pst* DC3000. Los asteriscos indican las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano encontrado en muestras tratadas al mismo tiempo post-infección ($p < 0.05$, t-Student y Graphpad Prism).

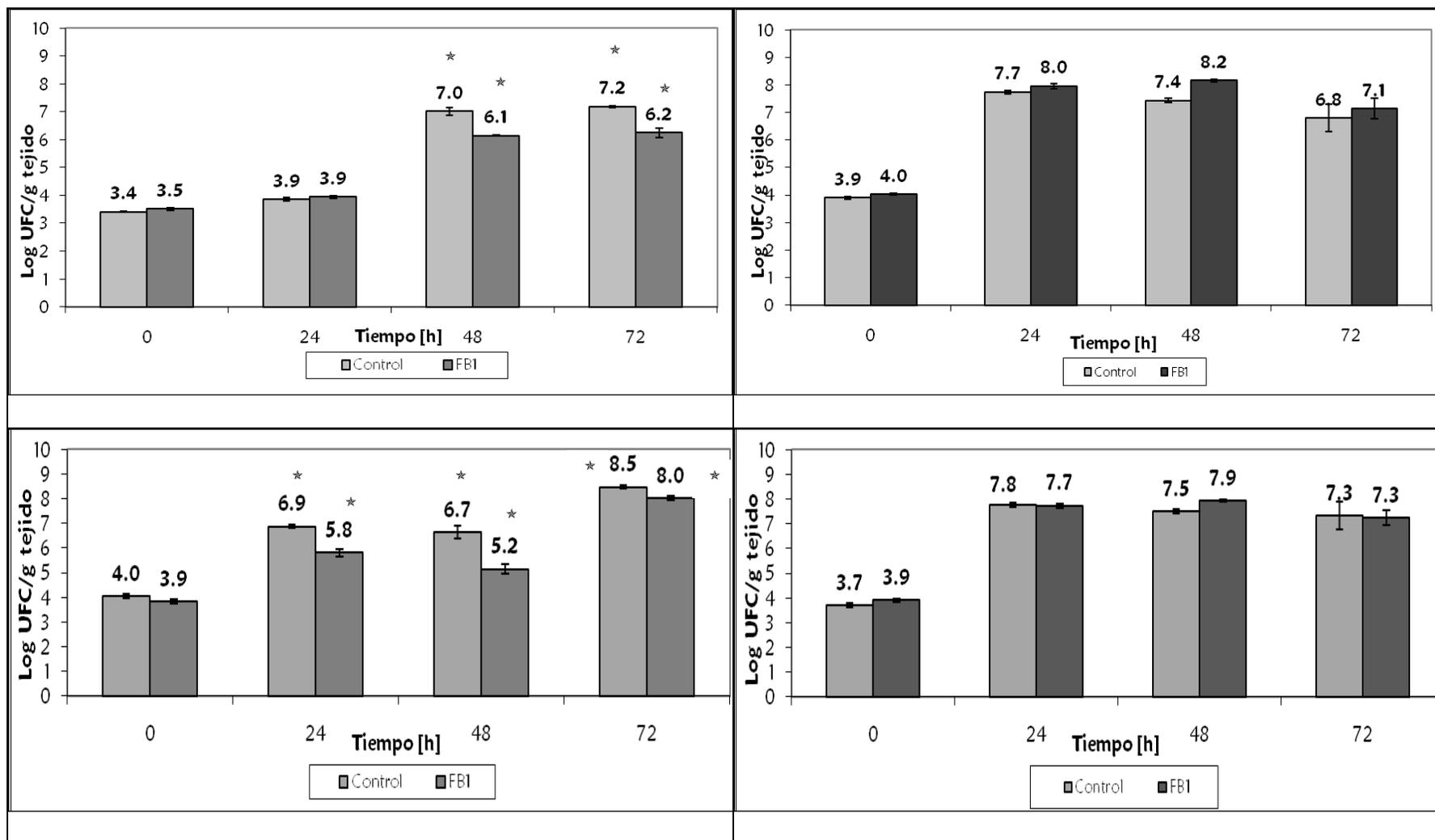


Fig. 48 Compendio de los resultados de crecimientos bacterianos obtenidos utilizando un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 y *Pst* DC3000 con una exposición a 12 y 4 h de FB1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1*. Los paneles de la parte superior muestran la exposición de las plántulas a FB1 durante 12 h, los paneles inferiores muestran la exposición de las plántulas a FB1 durante 4 h. Los paneles de la izquierda muestran los resultados obtenidos con *Pst* DC3000 avrRPM1, los paneles de la derecha muestran los resultados obtenidos con la cepa *Pst* DC3000. Los asteriscos indican las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano encontrado en las muestras tratadas al mismo tiempo post-infección ($p < 0.05$, t-Student y Graphpad Prism).

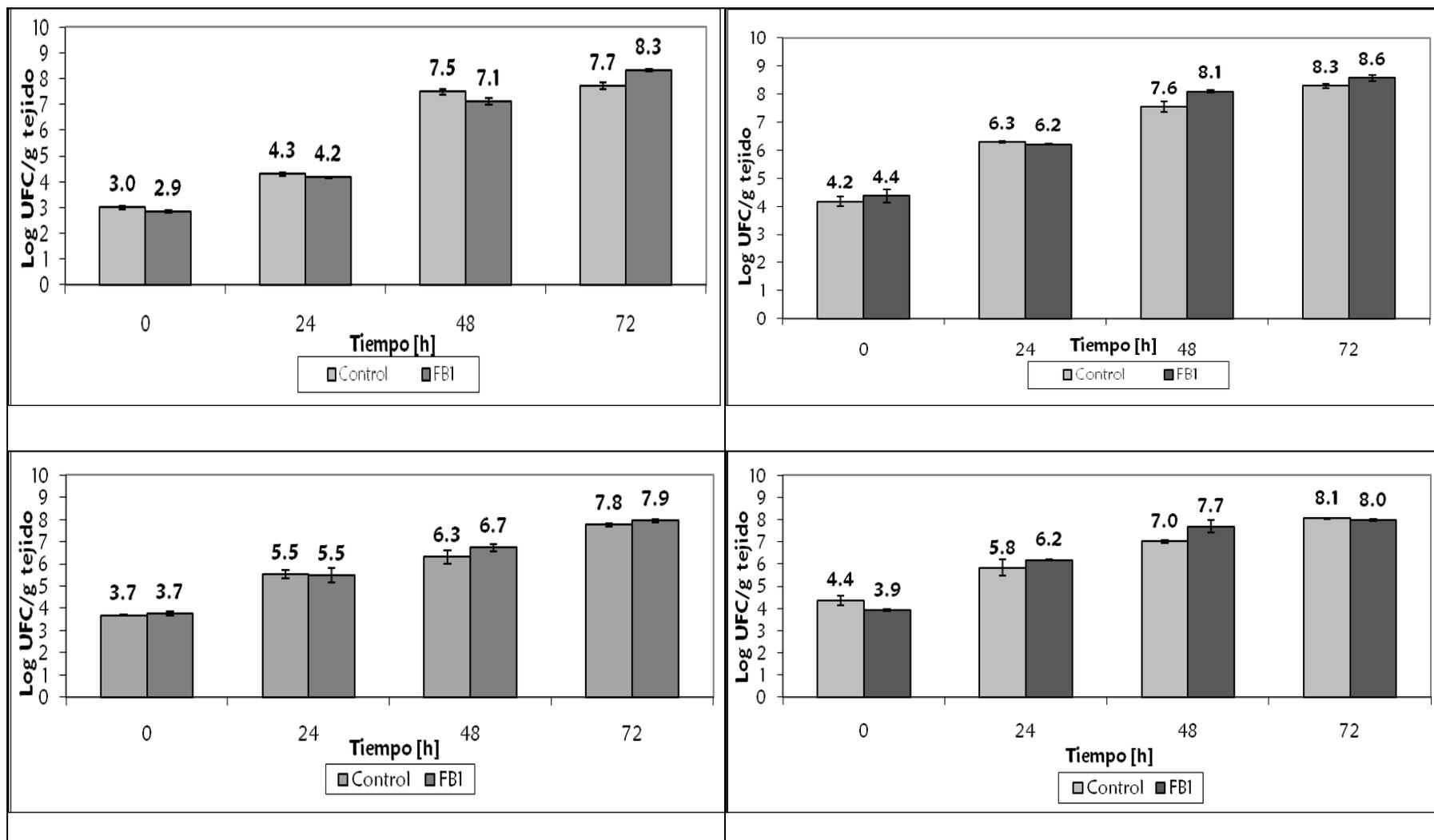


Fig.49. Compendio de los resultados del crecimiento bacteriano obtenidos utilizando un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 y *Pst* DC3000 con una exposición a 12 y 4 h de FB1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6*. Los paneles de la parte superior muestran la exposición de las plántulas a FB1 durante 12 h, los paneles inferiores muestran la exposición de las plántulas a FB1 durante 4 h. Los paneles de la izquierda muestran los resultados obtenidos con *Pst* DC3000 avrRPM1, los paneles de la derecha muestran los resultados obtenidos con la cepa *Pst* DC3000. Los asteriscos indican las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano encontrado en muestras tratadas al mismo tiempo post- infección ($p < 0.05$, t-Student y Graphpad Prism).

VIII. DISCUSIÓN

1. Consideraciones sobre el sistema y el planteamiento de la estrategia experimental.

Varios estudios han demostrado que existe una participación de los esfingolípidos en la transducción de señales y en la regulación del crecimiento celular en plantas [Brodersen *et al.*, 2002; Dagan *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009]. Algunos de éstos, han proporcionado evidencias de la participación de bases esfingoideas libres y ceramidas en la señalización que lleva a la MCP durante las respuestas al estado de enfermedad de la planta [Hannun *et al.*, 1996; Desai *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006]. Dentro de estos trabajos, inicialmente algunos autores habían sugerido que las BCL estaban implicadas en la muerte celular [Assai *et al.*, 2002; Spassieva *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2003]. Experimentación reciente ha confirmado que éste es el caso [Shi *et al.*, 2007] y que esta muerte celular mediada por BCL es una de las formas de MCP implicada en la defensa contra patógenos [Takahashi *et al.*, 2009; Gang *et al.*, 2009; Peer *et al.*, 2010].

En organismos multicelulares, la muerte celular ocurre como necrosis o como MCP, ésta última está genéticamente determinada. La MCP es un proceso activo que involucra vías de señalización que controlan el desmantelamiento de la célula. En plantas la rápida y localizada muerte celular conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR) en las plantas resistentes a los patógenos puede ser activada a través de la interacción específica gen por gen (ETI, *Inmunidad Desencadenada por Efectores; IDE*) [Hammond-Kosak y Jones, 1997; Peer *et al.*, 2010]. Y aunque la aparición de la respuesta tipo HR no es imprescindible, la presencia de ésta no asegura la resistencia de la planta a la infección [Bonas *et al.*, 2002; Gab *et al.*, 2008].

Además de contar con el tipo de defensa ETI, también las plantas poseen una defensa denominada PTI, la cual es un mecanismo propio de las plantas que se inicia a nivel membranal para poder detectar desde el comienzo del contacto con el patógeno a aquellas moléculas altamente conservadas en ellos, llamadas PAMPs. Una de ellas, la flagelina, la cual es una proteína que forma el flagelo de las bacterias, es reconocida por los receptores de la planta para evocar una respuesta de defensa y si ésta llega a ser

eficiente, la infección se controla desde este nivel para así evitar mayor desgaste energético de la planta [Nicase *et al.*, 2009; Peer *et al.*, 2010].

En este trabajo, se estudió la relación entre los esfingolípidos y la respuesta de defensa a patógenos. En particular, BCL o bases esfingoideas que son precursoras metabólicas en la síntesis de esfingolípidos complejos, fueron las especies esfingoideas analizadas. Lo anterior se abordó debido a que en el laboratorio ya se habían hecho las determinaciones de BCL libres en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipos silvestre y *Atlcb2a-1* en presencia y ausencia de FB1 mediante HPLC/ESI-MS/MS. En ellas se encontró que a tiempo de 0 h, es decir en condiciones basales, las plántulas de *Arabidopsis* tanto silvestre como la mutante *Atlcb2a-1* presentaron muy bajos niveles de BCL libres, pero dentro de éstos, las BCL libres que llegan a ser más abundantes son la esfinganina (d18:0) y la fitoesfingosina (t18:0), tanto en sus formas no modificadas como en las formas fosforiladas (d18:0-P y t180-P). Cuando las plántulas se exponen a FB1 por tiempos de 4 y 12 h, los niveles de esfinganina y fitoesfingosina aumentan hasta aproximadamente 45 y 110 nmol/ peso seco, respectivamente, lo cual corresponde a un aumento de 112.5 y 73.3 veces, respectivamente; en el caso de las plántulas genotipo silvestre, mientras que para la mutante *Atlcb2a-1* los niveles alcanzan solo 8 y 30 nmol/ peso seco, respectivamente, lo que corresponde a un aumento de 13.3 y 12 veces respectivamente [González-Solís, 2009; Saucedo-García *et al.*, 2010 enviado]. Estas determinaciones arrojaron información muy importante que permite asociar la cinética de acumulación de las BCL con un posible efecto de señalización hacia la defensa contra patógenos. Como se mencionó anteriormente, esta idea se sustentaba en reportes previos que han involucrado a las BCL con la respuesta tipo HR, que es una forma de MCP que limita el crecimiento de los patógenos en la planta [Morel *et al.*, 1997; Gilchrist *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2003; Noodén *et al.*, 2004; Reape *et al.*, 2008].

Para explorar la relación BCL-defensa contra patógenos, la estrategia fue utilizar un sistema de interacción planta-patógeno en el cual se podía determinar la cinética del crecimiento bacteriano en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas inicialmente a la FB1 para inducir una elevación de los niveles endógenos de las bases esfingoideas. Conociendo ya los niveles que se pueden alcanzar y asumiendo que estas moléculas

participan en la señalización de defensa de las plántulas contra patógenos, se podía ver su efecto en el crecimiento bacteriano.

Además de conocer si un aumento en las BCL mediaba una respuesta de inmunidad, también se quiso explorar qué tipo de inmunidad era en la que las BCL estaban involucradas. Por ello, una vez que las plantas fueron tratadas con la FB1, se desafiaron con el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1 (cepa avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (cepa virulenta). En el caso de la línea silvestre el genotipo de *Arabidopsis* contiene el gen R y ya que el genoma está intacto, los niveles de BCL son normales. Por ello, se esperaba que al inducir un aumento en los niveles de estas especies señalizadoras (las BCL acumuladas tras la adición de la FB1), la respuesta de defensa contra el fitopatógeno avirulento se manifestaría más eficientemente si esta respuesta estaba mediada por el reconocimiento gen por gen (ETI, *Inmunidad desencadenada por efectores; IDE*). Por ello era necesario usar las dos contrapartes del patógeno requeridas para explorar tanto a la interacción no-compatible o de resistencia al patógeno, usando el pv. *tomato* de la cepa bacteriana que contiene el gen de avirulencia y la interacción compatible o de susceptibilidad a la enfermedad, empleando la cepa bacteriana virulenta que carece del gen de avirulencia. En el último caso, la infección bacteriana proliferaría, pues carece de dicho gen de avirulencia que es reconocido por el gen R de la planta hospedera [Dodds *et al.*, 2006; Bittel *et al.*, 2007; Mishina *et al.*, 2007; Gab *et al.*, 2008].

Si las BCL estuvieran involucradas en este mecanismo de inmunidad, una elevación de las BCL endógenas (inducida por la FB1), potenciaría los mecanismos de resistencia y por tanto se expresaría diferencialmente en la respuesta contra la cepa avirulenta y la virulenta.

En la mutante *At/cb2a-1* estos mecanismos de inmunidad operarían de igual forma que en la silvestre y sus contrapartes bacterianas, sólo que en esta línea, si bien los niveles de BCL libres aumentan tras el tratamiento con la FB1, su elevación es comparativamente mucho más baja que la experimentada por las plantas con el genotipo silvestre en la misma condición [González-Solís, 2009; Saucedo-García *et al.*, enviado 2010]. Por eso, el uso de esta mutante es importante al dar información sobre los requerimientos cuantitativos de las BCL para cumplir con su función de moléculas de

señalización. Los menores aumentos de BCL en esta mutante tras su exposición a la FB1 se deben a dos factores: a) El gen *LCB2A* contribuye a la formación mayoritaria de dímeros activos de la SPT, pero en esta mutante tal gen está inactivo (Chen *et al.*, 2006). b) Aparentemente la ceramida sintetasa inhibida por la FB1 es la que reconoce a las BCL di-hidroxiladas como uno de sus sustratos (Saucedo-García *et al.*, enviado 2010]. Asumiendo estas condiciones, se preveía que con la inducción de un discreto aumento de las BCL en la línea *Atlcb2a-1*, éstas plántulas fueran capaces de efectuar la defensa ETI contra el patógeno avirulento, ya que para actuar como segundos mensajeros, las BCL requerirían un aumento pequeño, rápido y controlado. En este caso, el crecimiento bacteriano, expresado como número de UFC de *Pst/g* tejido, disminuiría. En el caso contrario, cuando la planta es desafiada con la cepa virulenta, aún cuando la planta cuente con la defensa PTI, el no contar con la defensa más eficiente, que es la ETI, conllevaría a una situación en la que la infección superaría a las líneas de defensa innatas de la planta, produciéndose una mayor cuenta de UFC de *Pst/g* tejido.

En este trabajo se dispuso de una tercera mutante, la *Atmpk6*. En la mutante *Atmpk6*, los niveles de BCL no se encuentran alterados, pero sí los niveles de la proteína AtMPK6 los cuales son nulos al presentar esta plántula una alteración en el gen *MPK6*. Esta proteína es importante pues está involucrada en vías de transducción de señales de ataque de patógenos y de MCP inducida por BCL [Zhang y Klessig 2001; Ichimura *et al.*, 2002]. Además, en nuestro laboratorio se ha establecido que la MPK6 está corriente abajo de la señalización mediada por BCL que conduce a la MCP (Saucedo-García *et al.*, enviado 2010]. Por lo tanto, aunque se realice la inducción exógena de BCL mediante el uso de la FB1, éstas moléculas no llevarían a cabo su mecanismo de acción por la falta de la proteína que está conformando corriente abajo la misma vía de transducción de señales en la planta, ocasionando que en ésta línea vegetal no se puedan distinguir diferencias entre los crecimientos bacterianos reportados tanto con la cepa avirulenta como con la cepa virulenta, expuestas o no a la FB1. Lo anterior implicaría que las BCL y la MPK6 participan en un proceso de defensa ETI en la que se manifiesta la MCP.

2. Evaluación del ensayo de crecimiento bacteriano.

En los resultados obtenidos, se logró observar que el lavado realizado en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* en todas las líneas de *Arabidopsis*, fue efectivo, ya que contribuyó a minimizar la posibilidad de determinar el crecimiento epífito de las hojas de las plántulas en el conteo bacteriano. La adición del tensoactivo Silwet al 0.01% en la solución bacteriana asperjada, permitió una mejor permeación de los fitopatógenos bacterianos en las hojas de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, inclusive en la condición tratada con el lavado. El crecimiento bacteriano de cada una de las cepas utilizadas no se vio afectado por el tensoactivo agregado durante la inoculación de las plantas, pues al realizar el control respectivo, las bacterias crecieron normalmente. De forma semejante, al realizar el control del crecimiento de cada una de las cepas bacterianas utilizadas bajo la exposición de la FB1, éstas no presentaron alteraciones en su morfología ni en su tiempo de crecimiento. Por otra parte al exponer las plántulas al tensoactivo Silwet 0.01%, éstas no mostraron daños fenotípicos, por lo que este compuesto pareció no afectar de ninguna forma el sistema experimental utilizado [Zipfiel, 2004] (ver apéndice). Estos controles son importantes pues aseguran que los efectos encontrados se pueden adjudicar a la interacción entre la planta y la cepa bacteriana y no a las condiciones técnicas del procedimiento experimental.

Una de las condiciones experimentales más importantes de satisfacer en el sistema experimental que se usó, era verificar que la carga bacteriana depositada de forma inicial fuera lo más parecida posible en todas las plántulas de cada uno de los experimentos realizados. El resultado que se obtuvo fue satisfactorio, ya que en cada uno de los casos el crecimiento bacteriano reportado al tiempo de 0 hpi, tanto para las muestras control como para las muestras tratadas con FB1 fue idéntico en prácticamente todos los experimentos, incluyendo aquellos del mismo conjunto realizados el mismo día o de los realizados en fechas independientes. Lo anterior permitió continuar con la caracterización del crecimiento bacteriano tras la exposición previa de las plántulas a la toxina FB1, ya sea por 4 o 12 h, y en cada una de las cepas bacterianas utilizadas.

De la misma manera, durante el muestreo bacteriano de todas las determinaciones experimentales, desde el tiempo de 0 h hasta las 72 o 120 h, tanto en las realizadas en diferentes fechas como las realizadas conjuntamente el mismo día, se observó una alta reproducibilidad en el proceso de infección y en el proceso de cuantificación bacteriana,

con lo cual se permitió tener certidumbre en la obtención de resultados confiables en el sistema de trabajo implementado, como así lo constataron las pruebas estadísticas aplicadas a los datos obtenidos.

3. Efecto de la FB1 en el crecimiento bacteriano en *Arabidopsis thaliana*.

Cuando se realizó el conteo de UFC/g tejido en plántulas expuestas previamente a FB1 por 12 h utilizando un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL ya sea de *Pst* avirulenta o *Pst* virulenta, el resultado obtenido fue muy interesante, pues la toxina no mostró ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas.

Sin embargo, al reducir el inóculo utilizado a 1×10^7 UFC/mL y realizar la exposición previa de las plántulas a 12 o 4 h de FB1, se logró la obtención de diferencias entre el crecimiento de la cepa avirulenta y de la cepa virulenta.

Para el genotipo silvestre de *Arabidopsis thaliana*, los resultados obtenidos indicaron que el aumento de BCL, inducido por el uso de la FB1, desplegó respuestas moleculares de defensa ante la presencia de un patógeno avirulento; es decir la elevación de BCL fue consistente con la aparición de un tipo de defensa ETI, en la que se observó una menor proliferación de la bacteria a lo largo de los tiempos muestreados. En el caso contrario, la plántula no se pudo defenderse contra la cepa bacteriana virulenta aún cuando las bases esfingoideas libres aumentaron de forma importante, 45 nmol/peso para esfingánina y 110 nmol/peso seco para fitoesfingosina, tras la exposición previa de 12 h a FB1 por parte de la planta. Correspondiendo a estos resultados, se observó que al exponer a las plántulas silvestres de *Arabidopsis* únicamente a 10 μ M de FB1 por 12 h, éstas mostraron clorosis y daños en las hojas a tiempos muy largos. Aparentemente este fenotipo que surge en ausencia del patógeno y presencia de la toxina se debe a dos componentes que involucran a los esfingolípidos. Por un lado, el exceso de BCL acumuladas con el paso del tiempo termina por dañar a las membranas de las células de la planta, y por otro lado, la falta de las ceramidas precursoras de los esfingolípidos complejos formadores importantes de las membranas celulares también puede contribuir al fenotipo de muerte

celular. Al realizar el análisis fenotípico de las plántulas silvestres expuestas primero a FB1 12 h y posteriormente al patógeno correspondiente, ya fuera *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 en un inóculo de 1×10^8 UFC/mL, se observó que en ambos casos el efecto protector de la FB1 se manifestaba hasta antes de las 72 hpi, que fue cuando se apreciaron daños fenotípicos (coloración morada de las regiones verdes seguida de una clorosis que se va generalizando). Este resultado revela que las diferencias fenotípicas correspondientes al establecimiento de la susceptibilidad de la planta se evidencian más claramente que el parámetro de crecimiento bacteriano, el cual en este caso no mostró diferencias entre las cepas.

En el contexto de la muerte celular relacionada con la inmunidad, en el trabajo de Takahashi *et al.* [2009] se demostró que la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos juega un papel importante en la resistencia ante un patógeno no hospedero. Estos autores se enfocaron en la participación de la serina palmitoiltransferasa (SPT) en la MCP de hojas de *Nicotiana benthamiana* expuestas a *Pseudomonas cichorii*. En este caso, se estableció que la sobreexpresión del gen *LCB2*, provocaba la muerte celular. Considerando en nuestro caso que la SPT es una enzima que consiste de dos subunidades: LCB1 y LCB2 [Hanada, 2003], la mutación en el gen *LCB2A* altera la síntesis de esfingolípidos, sin embargo, en la mutante *Atlcb2a-1* aún persiste la actividad de la proteína gracias a la subunidad codificada por el gene *LCB2B*, por lo tanto la vía de defensa alimentada por las BCL producidas cuando se añade FB1, no se ve afectada totalmente. En el presente trabajo, se encontró que al exponer previamente a las plántulas a la FB1 durante 4 h, las cantidades de bases esfingoideas acumuladas eran suficientes para poder desplegar la defensa contra la *Pst* DC3000 avrRPM1, pues el crecimiento bacteriano muestreado bajo la exposición a FB1 fue siempre más pequeño en comparación con la muestra control.

Tras la exposición previa de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2a-1* a FB1 por 12 h, las BCL aumentaron en mayor cantidad que a 4 h permitiendo que la línea de defensa fuera visible aún hasta tiempos largos de 72 hpi con *Pst* DC3000 avrRPM1. Caso contrario, al exponer a las plántulas previamente a 4 o 12 h con FB1 e infectarlas con *Pst* DC3000, la especie vegetal no logró una defensa exitosa pues la carga bacteriana encontrada en ambos tratamientos fue similar. En un trabajo reciente [Peer *et al.*, 2010] se encontró que las BCL, en particular la esfinganina y fitoesfingosina son incrementadas

significativamente a tiempos cortos por *Pst* DC3000 avrRPM1 y por *Pst* DC3000 en plántulas silvestres.

En el caso de la cepa avirulenta, la defensa fue más exitosa en la línea *Atlcb2a-1* al obtenerse menor crecimiento en las muestras con el tratamiento de la FB1. Mientras que, con la cepa virulenta, aunque el efecto del aumento de BCL fuera significativo para inducir una PTI eficiente, es definitorio que la planta no posea las herramientas genéticas específicas (gen R por ejemplo) para combatir una infección de un fitopatógeno virulento. Asociando lo anterior con el análisis fenotípico realizado, se observó que al exponer las plántulas a FB1 y posteriormente a la cepa bacteriana correspondiente, el daño en la especie vegetal se mostró a tiempo de 48 hpi, pero cuando se realizó la exposición por separado, la plántula de *Atlcb2a-1* mostró resistencia a la FB1 mientras que a tiempos de 72 hpi los indicios de muerte celular se manifestaron con la cepa avirulenta, a diferencia de lo obtenido con la cepa virulenta, la cual provocó muerte celular hasta las 120 hpi. Estos datos sugieren que la FB1 acelera la aparición de la MCP con propósitos de limitar la extensión del patógeno. En este sistema de plántulas y con una alta concentración de inóculo, la MCP colapsa las plántulas eventualmente, pero en un sistema natural, este colapso sólo alcanza a las células circundantes al sitio de entrada del patógeno el cual en general tiene una concentración muy baja.

Respecto a la línea *Atmpk6*, se sabe que la activación de MAPKs está relacionada con la promoción de la HR en la interacción incompatible [Zhang *et al.*, 2001; Menke *et al.*, 2004]. En particular, la MPK6 es una MAP cinasa implicada en las respuestas de defensa contra patógenos [Zhang y Klessig, 1997; Romeis *et al.*, 1999]. Resultados encontrados con *Arabidopsis thaliana* línea *Atmpk6* en este trabajo mostraron que aún cuando se realizó la exposición previa a FB1 durante 4 y hasta 12 h, no se observó disminución en la carga bacteriana desarrollada en las muestras respecto a las plántulas control. Dato interesante fue que aunque el inóculo bacteriano fuera de 1×10^7 UFC/mL ya sea de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000 virulenta, no se manifestó respuesta de defensa por parte de plántula en ningún caso mostrando crecimientos bacterianos parecidos en las muestras procesadas. Lo anterior indicó que las especies endógenas de BCL libres o fosforiladas acumuladas tanto por efecto del tratamiento con la FB1 como por efecto de la presencia del patógeno [Peer *et al.*, 2010] no condujeron a la inmunidad de la planta.

Indicando así que la MPK6 transduce el mecanismo de acción de las BCL hacia reacciones de inmunidad en las que se manifiesta la MCP.

Al realizar el análisis fenotípico de la mutante *Atmpk6*, resultó interesante que ésta presentó una muerte celular acelerada al exponer a la plántula a *Pst* DC3000 pues los indicios de muerte se manifestaron a las 48 hpi, en comparación con el genotipo silvestre de *Arabidopsis*. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Menke *et al.* [2004], quienes encontraron en *Arabidopsis* que el silenciamiento del gen que codifica para la MPK6 provocaba un ligero aumento en la susceptibilidad al ataque del patógeno avirulento (*Pst* DC3000 *avrRPM1*) y en mayor grado al patógeno virulento (*Pst* DC3000 *vir*). Estos resultados son consistentes a los encontrados en este trabajo pues tras la exposición únicamente a los patógenos se observó que los indicios de enfermedad se encontraron a las 48 hpi en el caso de la cepa virulenta y hasta 72 hpi para la cepa avirulenta. Sin embargo, cuando se agregó tanto la FB1, como la correspondiente cepa bacteriana, los indicios de enfermedad fueron mostrados a las 72 hpi en ambos casos. lo cual permite sugerir que el tipo de defensa ETI manifestado por la plántula contra la cepa avirulenta es eficaz en un inicio pero no es suficiente para combatir la infección, pues las BCL que participan en el esquema ETI ante el proceso infeccioso, no logran avanzar en la vía de señalización por falta de la proteína AtMPK6. Para la cepa virulenta la susceptibilidad por parte de la plántula es mayor en comparación con la defensa PTI que pudiera establecerse.

4. Diferencias en el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) en plántulas de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atmpk6* de *Arabidopsis thaliana*.

Como sabemos, los esfingolípidos además de formar parte de las membranas celulares, tiene funciones de señalización. En este trabajo se exploró si en las condiciones en que se estaba llevando a cabo la infección de las plántulas existían diferencias en el crecimiento bacteriano obtenido con ambas cepas en cada una de las líneas de *Arabidopsis* utilizadas.

Cuando se realizó la infección de las plántulas con un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 o de *Pst* DC3000, según sea el caso, en las tres líneas utilizadas, la población bacteriana no mostró cambios estadísticamente significativos entre las muestras controles y las muestras tratadas previamente con la FB1 a una concentración final de 10 μ M.

Al utilizar un inóculo de 1×10^7 UFC/mL para efectuar la infección de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* líneas silvestre y *Atlcb2a-1*, los datos mostraron que la respuesta de defensa mediada por la acumulación de bases esfingoideas libres había sido desplegada pues al realizar el muestreo del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo, el número de UFC de *Pst* DC3000 avrRPM1 fue consistentemente menor en el caso de las muestras expuestas a la FB1 en comparación con las muestras sin exponer a la toxina.

Sin embargo, al llevar a cabo la infección de las plántulas con la *Pst* DC3000 a una concentración de 1×10^7 UFC/mL y una exposición previa a 4 o hasta 12 h de FB1, la protección no se manifestó, pues el crecimiento bacteriano fue prácticamente igual para las muestras control y las muestras expuestas a la toxina durante todos los tiempos muestreados. Por lo tanto, cuando las plántulas se enfrentan a un fitopatógeno como lo es la *Pseudomonas syringae* pv *tomato* se manifiestan varios niveles de defensa, al nivel que comienza en la membrana, la planta posee un tipo de defensa celular PTI, la cual establece el primer contacto con el PAMP en cuestión, como la flagelina, esperando que con este nivel de defensa la plántula sobreviva al ataque del patógeno sin consecuencia alguna.

Cuando éste nivel de defensa es sobrepasado por el patógeno, la plántula echa mano de otro tipo de defensa celular denominado ETI, el cual se manifiesta a nivel genético, sólo si el genotipo de la planta y el de la bacteria atacante lo permiten, al hacer contacto los productos de genes de resistencia de la planta (*Rpm1*) con los productos de genes de avirulencia del patógeno (*AvrRPM1*). Si esta interacción es exitosa, se contiene la infección de forma más eficiente [Kim *et al.*, 2008]. En nuestro sistema, este proceso se lleva a cabo al enfrentarse la plántula a la cepa avirulenta, pero parece ser magnificado por la acumulación de BCL. Esta conclusión es consistente con la participación de las BCL en vías de señalización de defensa contra ataque de patógenos.

En la cepa virulenta, la defensa por parte de la planta sólo se expresa a nivel del contacto inicial con la bacteria, pues aunque la planta cuenta con genes de resistencia,

ésta cepa bacteriana no posee genes de avirulencia, con lo cual este nivel de defensa no puede ser aprovechado y por ende la plántula se ve sobrepasada por la infección, manifestándolo en una mayor número de colonias de *Pst* DC3000 desarrolladas aún y cuando en este sistema, las BCL también se encuentren sobre expresadas. Una posibilidad para dilucidar la contribución de las BCL al sistema de inmunidad PTI, sería la de probar un inóculo bajo de *Pst* DC3000, entre 1×10^6 a 1×10^5 UFC/mL, y analizar tiempos mayores de muestreo pos-infección.

En la línea *Atmpk6*, incluso al ser infectada con un inóculo de 1×10^7 UFC/mL de *Pst* DC3000 avrRPM1 o *Pst* DC3000, el número de UFC/g tejido no se observaron diferencias en ningún caso. Como sabemos, esta plántula mutante de *Arabidopsis thaliana* cuenta con niveles nulos de la proteína denominada MPK6, la cual, por las evidencias reportadas aquí, forma parte de la misma vía de señalización en la cual las BCL son de los primeros componentes participantes. Esta vía de señalización de defensa es expresada activamente por la planta cuando se manifiesta un ataque de patógenos, por lo tanto, las evidencias obtenidas referentes al crecimiento bacteriano del fitopatógeno utilizado, tanto cepa avirulenta como virulenta, apoyan la teoría de que las BCL libres en la célula siguen una vía de señalización en la que corriente abajo se encuentra la proteína MPK6. Cuando esta molécula está ausente en el sistema, aunque las bases esfingoideas se encuentren exacerbadas en sus niveles, éstas no pueden generar la respuesta de protección al patógeno al faltar uno de los componentes.

Una interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se expresan en el modelo de la Fig. 50.

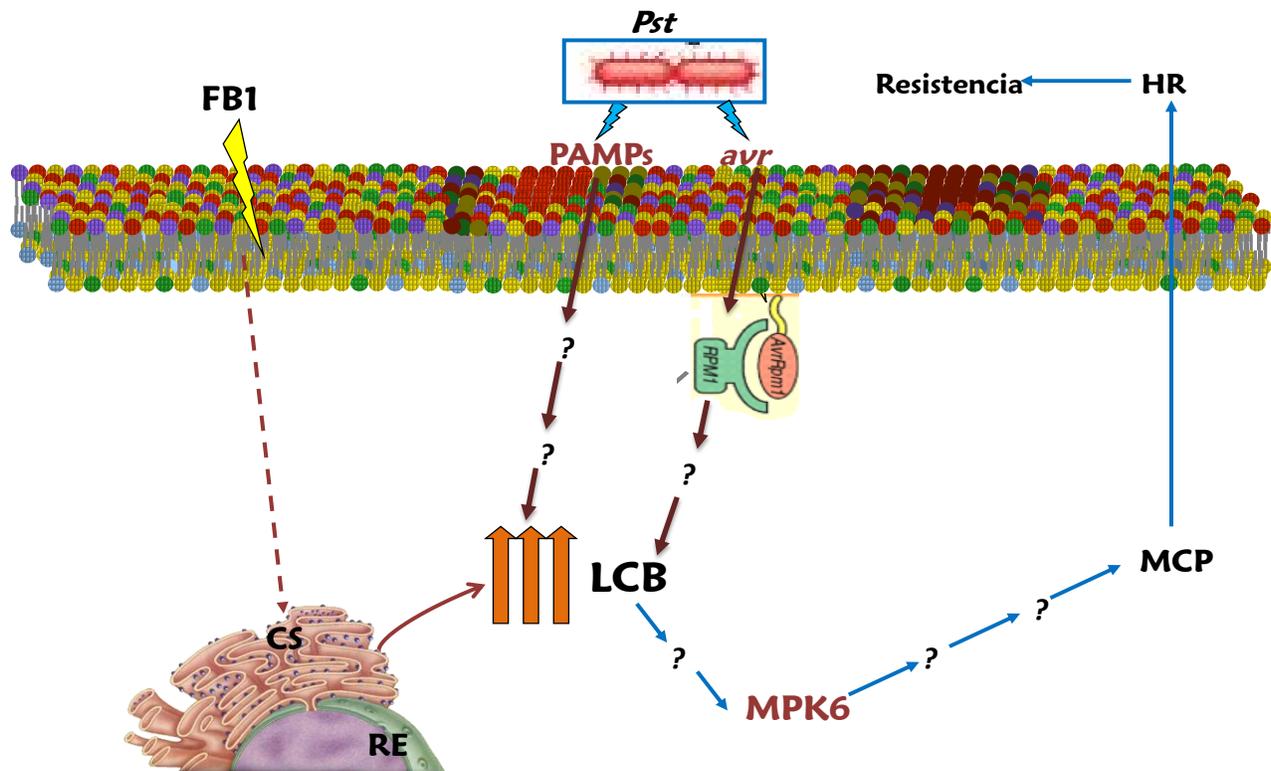


Fig. 50. Modelo de la relación entre la acumulación de BCL y la manifestación de MCP en la respuesta de inmunidad de la planta. Se propone que el aumento de BCL puede inducir MCP de acuerdo a la interacción de componentes del patógeno con la planta. La elevación de BCL es inducido: 1) por la *Pst* DC3000 a través de un mecanismo tipo no hospedero (vía PAMPs), que no prospera en una defensa activa ni es coadyuvada por la FB₁. 2) por la *Pst* DC3000 *avrRPM1* (vía interacción gen por gen o ETI), en un mecanismo que es exitoso como defensa y es reforzado por la FB₁, redundando en una mayor resistencia al patógeno avirulento y 3) y por la FB₁ (por inhibición de la ceramida sintasa) en la que participa la vía de señalización en la cual está implicada la proteína MPK6 que conduce a la MCP que se presenta como HR. (AvrRPM1, producto del gen de avirulencia del patógeno; BCL, bases de cadena larga; CS, ceramida sintasa; FB₁, fumonisina B₁; HR, respuesta de hipersensibilidad; MPK6, MAP cinasa implicada en la respuesta de defensa contra patógenos; MCP, muerte celular programada; PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos; RE, retículo endoplásmico; RPM1, producto del gen de resistencia de la planta).

IX. CONCLUSIONES

1. Particulares

El proceso de lavado de las muestras previo a su homogeneización, fue eficaz en el sistema de trabajo desarrollado y puede ser manejado en todos los tiempos de evaluación del crecimiento para evitar la consideración del crecimiento bacteriano epífita. Sin embargo, la omisión del lavado en el tiempo 0, también puede ser útil para evaluar la cantidad total del inóculo bacteriano inicial asperjado sobre las plántulas.

La adición de Silwet 0.01% en la suspensión bacteriana asperjada, permitió que el inóculo bacteriano tuviera una mejor penetración en los tejidos de la planta, resultando en una infección bacteriana más efectiva para nuestros propósitos.

Las condiciones de ensayo establecidas para las fases de inoculación y de determinación de crecimiento bacteriano *in planta*, proporcionaron resultados muy reproducibles en cuanto a la cantidad de UFC/ mL que se asperjan de forma inicial y a la determinación de la cinética de crecimiento bacteriano durante el desarrollo de la infección *in planta*.

El inóculo de 1×10^7 UFC/mL permitió evidenciar diferencias en cuanto a la capacidad de defensa de las plantas según las condiciones exploradas, mientras que el inóculo de 1×10^8 UFC/mL, no propició la manifestación de estas diferencias.

Al haber evaluado el crecimiento bacteriano de las cepas utilizadas a una concentración de 1×10^7 UFC/mL, se observó que el crecimiento bacteriano manifestado en la cepa *Pst* DC3000 *avrRPM1* fue consistentemente menor en comparación con el reportado con la cepa *Pst* DC3000 en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana*. Estas diferencias se expresaron a tiempos de 24 y 40h pos-infección en la mayoría de los casos.

La cepa bacteriana con la cual se evidenció claramente el efecto de la FB1 en la defensa de la planta contra el fitopatógeno, fue la *Pst* DC3000 *avrRPM1*, pues fue en la cual el crecimiento bacteriano en las plántulas expuestas a la FB1 fue menor que en los controles cuando se usó un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL en las líneas silvestre y *At/cb2a-1*. Este menor crecimiento bacteriano observado evidenció que la línea de defensa ETI de la planta fue realmente eficaz para combatir una infección de esta cepa bacteriana a una concentración de 1×10^7 UFC/mL.

La exposición previa a FB1 10 μ M por 4 o 12 h de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* líneas silvestre y *Atlcb2a-1* permitió observar el efecto protector de la acción de la toxina sobre el crecimiento de la *Pst* DC3000 avrRPM1. Esto indica que las bases esfingoideas libres participaron como señales en las plántulas, favoreciendo la iniciación de las vías de transducción de señales en contra de la proliferación bacteriana. Lo anterior se manifestó por la menor carga bacteriana en las plántulas expuestas previamente a la FB1 en comparación con los controles. El hecho de que el tratamiento con la FB1 haya preservado la inmunidad promovida por la interacción gen *AVRPM*-gen *R* y haya aumentado el grado de protección, sugiere que las bases de cadena larga contribuyen a los mecanismos de defensa promovidos por la interacción gen por gen.

En el caso de la línea *Atmpk6* no se desarrolló una carga bacteriana menor en las plántulas expuestas previamente a la toxina FB1 incluso a 12 h bajo un inóculo de 1×10^7 UFC/mL en comparación con las muestras control, con lo cual se manifestó que la línea de defensa de la plántula necesita contar forzosamente con la MPK6 para poder contender de forma eficaz con la infección del fitopatógeno utilizado (*Pst* DC3000 avrRPM1 y *Pst* DC3000). Esta es una evidencia importante a favor de que las BCL y la MPK6 están en una misma vía de transducción de señales en respuesta al ataque de patógenos.

En el caso de la exposición de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* a la cepa *Pst* DC3000 a un inóculo de 1×10^7 UFC/mL, el proceso de infección se desarrolló más que con la cepa avirulenta, evidenciando que la respuesta de protección de las plántulas a través de solo la defensa tipo PTI no fue suficiente, incluso al haber sido expuestas las plántulas a la FB1 10 μ M por 12 h.

2. General

Se logró evidenciar que la acumulación de BCL libres incide de forma positiva en la inmunidad en la planta mediada por el reconocimiento gen por gen o ETI.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* líneas silvestre y mutantes *Atlcb2a-1* y *Atmpk6*, bajo la infección de un inóculo de entre 1×10^6 a 1×10^5 UFC/mL para evidenciar la inmunidad tipo PTI.

- Evaluar el crecimiento bacteriano en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* silvestre expuestas a flagelina, en presencia y ausencia de FB1, para evidenciar un efecto más específico de los PAMPs

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ✓ Abbas K, Tanaka T, Duke O, Porter K, Wray M, Hodges L, Sessions E, Wang E, Merrill Jr, Riley T, *Fumonisin and AAL toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases*, Plant Physiology 106, 1085-1093, (1994).
- ✓ Abramovitch R, Janjusevic R, Stebbins C y Martin G, *Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2851 – 2856, (2006).
- ✓ Alfano J y Collmer A, *Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense*, Annual Review of Phytopathology 42, 385-414, (2004).
- ✓ Agrios G, N, *Plant Pathology* 4th Edition Academic Press, New York (1997).
- ✓ Assai T, Stone J, Heard J, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel M, *Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate, ethylene and salicylate dependent signaling pathways*, The Plant Cell 12, 1823-1835, (2000).
- ✓ Balk J, Chew S, Leaver C y McCabe P, *The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death*, The Plant Journal 34, 573-583, (2003)
- ✓ Bittel P, Robatzek S, *Microbe-associated molecular patterns (MAMPS) probe plant immunity*, Current Opinion in Plant Biology 10, 335-341, (2007).
- ✓ Bonas U, Lahaye T, *Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition*, Current Opinion Microbiology, 1, 44-50, (2002).
- ✓ Bonh M, Heinz E, Lüthie S, *Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (Zea mays L.) roots*, Archives Biochemistry and Biophysics, 387, 35-40, (2001).
- ✓ Borner G, Sherrier D, Weimar T, Michaelson L, Hawkins N, MacAskill A, Napier J, Beale M, Lilley K, Dupree P, *Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipids rafts*, Plant Physiology 137, 104-116, (2005).

- ✓ Brodersen P, Petersen M, Pike H, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen L, Brown R y Mundy J, *Knockout of Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense*, *Genes and Development* 16, 490–502, (2002).
- ✓ Burgos P y Donaire J, *Phospholipids, free sterols, fluidity, and ATPase activity of plasma membrana-enriched vesicles from sunflower and jojoba roots*, *Plant Physiology and Biochemistry* 34, 315-324, (1996).
- ✓ Callow A y Green R, *The plant plasma membrane in fungal disease*. En: *Membranes: Specialized Functions in Plants*, (Smallwood M, Knox P, Bowles J,eds), Bios Scientific Publisher, Oxford, United Kingdom, Cap 31, 543-562, (1996).
- ✓ Chen M, Cahoon E, Saucedo-García M, Plasencia J y Gavilanes M, *Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis and Function*, En: *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*, (Wada H, Murata N, Govindjee, eds), pp 77-115, (2009).
- ✓ Chen M, Hang G, Dietrich C, Dunn T, Cahoon E, *The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the identification and functional characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase*, *The Plant Cell* 18, 3576-3593, (2006).
- ✓ Coursol S, Le Stunff H, Lynch V, Gilroy S, Assman M, Spiegel S, *Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture*, *Plant Physiology* 137, 724-737, (2005).
- ✓ Desai K, Sulluads M, Allegood J, Wang E, Schmelz E, Hartl M, Humpf H, Liotta D, Peng Q, Merrill A, *Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1585, 188-192, (2002).
- ✓ Dodds P, Lawrence G, Catanzariti A, The T, Wang C, Ayliffe, Kobe B, y Ellis J, *Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 103, 8888–8893, (2006).
- ✓ Gab M, Kim S, Kim W, Mackey D y Lee S, *Responses of Arabidopsis thaliana to challenge by Pseudomonas syringae*, *Molecular Cell* 3, 323-331, (2008).

- ✓ Gang Y, Zhang L, Zhang Z, Doung S, Dong S, Li J, Wang Y, Zheng X, *The LCB2 subunit of the sphingolip biosynthesis enzyme serine palmitoyltransferase can function as an attenuator of the hypersensitive response and Bax-induced cell death*, 181, 127-146, (2009).
- ✓ Golapan S y Ausubel Frederick, *A metasytem of framework model organisms to study emergence of new host- microbe adaptations*, Plos One, 3, 1-7, (2008).
- ✓ Gilchrist D, *Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide*, Annual Review of Phytopathology 36, 393-414, (1998).
- ✓ Greenberg J, *Programmed cell death: A way of life for plants*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 12094-12097, (1996).
- ✓ Greenberg J, Silverman F y Liang H, *Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the Arabidopsis mutant *acd5**, Genetics 156, 341-350, (2000).
- ✓ Hammond-Kosack K, Jones J, *Resistance gene-dependent plant defense responses*, The Plant Cell 8, 1773-17791, (1996).
- ✓ Hammond-Kosack K, Jones J, *Plant Disease Resistance Genes*, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 48, 575-607, (1997).
- ✓ Hanada K, *Serine palmitotransferase, a key enzyme of sphingolipids metabolism*, Biochimica et Biophysica Acta 1632, 16-30, (2003).
- ✓ Hannun Y, *Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress*, Science 274, 1855-1859, (1996).
- ✓ Hannun y Obeid 2002, *The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind*; Journal of Biological Chemistry, 29, 25847-50, (2002).
- ✓ Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B, Morris P, Innes R, Ecker J, Schell D, Klessig D, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker J, *Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature*, Trends in Plant Science 7, 301-308, (2002).
- ✓ Jones J y Dangl J, *The plant immune system*, Nature 444, 323-329, (2006).

- ✓ Kim M, Kim S, Kim W, Mackey D, Lee S, *Responses of Arabidopsis thaliana to challenge by Pseudomonas syringae*, *Molecules and Cells* 25, 323-331, (2008).
- ✓ Liang H, Yao N, Song J, Luo S, Lu H y Greenberg J, *Ceramides modulate programmed cell death in plants*, *Genes and Development* 17, 2636–2641, (2003).
- ✓ Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Grassmann W, Zhang S, *Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade*, *The Plant Journal* 51, 941-954, (2007).
- ✓ Lynch D, Dunn T, *An Introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function*, *New Phytologist* 161, 677-702, (2004).
- ✓ Markham J, Li J, Cahoon E, Jaworski J, *Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves*, *The Journal of Biological Chemistry* 281, 22684-22694, (2006).
- ✓ Maxfiel F, Tabas I, *Role of cholesterol and lipid organization in disease*, *Nature*, 7068, 612-621, (2005).
- ✓ Menke F, van Pelt J, Pieterse C, Klessig D, *Silencing the mitogen activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis*, *The Plant Cell* 16, 897-907, (2004).
- ✓ Mishina T, Zeier J, *Bacterial non-host resistance: interactions of Arabidopsis with non-adapted Pseudomonas syringae strains*, *Plant Physiology* 131, 448-61, (2007).
- ✓ Morel J, Dangl J, *The hypersensitive response and the induction of cell death in plants*, *Cell Death and Differentiation*, 8, 647-8, (1997).
- ✓ Mur L, Laarhoven L, Harren F, Hall M, Smith A, *Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response*, *Plant Physiology* 148, 1537-46, (2008).
- ✓ Najéra Gutiérrez N, Arredondo Enríquez C, Garibay F, Palacios-Bahena S, Gavilanes Ruiz M, *La membrana plasmática y su importancia durante la patogénesis en plantas*, En: *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas*, (Loza H. y Bernal I, eds), Facultad de Química, UNAM. México. (2001).

- ✓ Nicase V, Roux M, Zipfiel C, *Recent advances in PAMP-Triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and rise the alarm*, Plant Physiology 150, 1638-1647, (2009).
- ✓ Ng C, Carr K, McAinsh M, Powell B, Hetherington A, *Drought-induced guard cell signals transduction involves sphingosine-1-phosphate*, Nature 410, 596-599, (2001).
- ✓ Noodén L, *Plant Cell Death Processes*, Academic Press, New York, pp 37-38, (2004).
- ✓ Norberg P, Mansson E, Liljenberg C, *Characterization of glucosylceramide from plasma membranes of plant root cells*, Biochimica et Biophysica Acta 1066, 257-260, (1991).
- ✓ Palacios Bahena S, *Participación de esfingolípidos membranales en respuestas de defensa en plantas*, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, (2008).
- ✓ Peer M, Martin S, Martin M, Frank W, *Pseudomonas syringae infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in Arabidopsis thaliana*, Federation of European Biochemical Societies Letters 10, (2010).
- ✓ Pennell R, Lamb C, *Programmed cell death in plants*, The Plant Cell 9, 1157-1168 (1997).
- ✓ Reape T, Molony M, McCabe P, *Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes*, Journal of Experimental Botany 59, 435-444, (2008).
- ✓ Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig D, Hirt H, Jones J, *Rapid Avr9- and Cf-9-Dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses*, The Plant Cell 11, 273-287, (1999).
- ✓ Ryu B, *Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants*, Trends in Plant Science 9, 229-234, (2004).
- ✓ Saucedo-García M, Cruz-García F, Guevara-García A, González-Solís A, Dietrich Ch, Vázquez-Santana S, Markham J, Lozano-Rosas G, Cahoon E, Gavilanes-Ruiz M, *MPK6, Dihydrosphingosine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase*

are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by Fumonisin B1 in *Arabidopsis*, Enviado a publicación.

- ✓ Shah J, *Lipids, lipases and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance*, Annual Review of Phytopathology, 43, 8.1-8.32, (2005).
- ✓ Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun Y, Zuo J, *Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in Arabidopsis*, Cell Research 17, 1030-1040, (2007).
- ✓ Spassieva S, Markham J, Hille J, *The plant disease resistance gene Asc-1 prevent disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death*, The Plant Journal 32, 561-572, (2002).
- ✓ Sperling P, Heinz E, *Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions*, Biochimica et Biophysica Acta, 1632, 1-15, (2003).
- ✓ Stryer L, Berg J, Tymoczko J, *Bioquímica* 5ª Edición, Ed. Reverté. Barcelona. 2004, pág 512-515.
- ✓ Takahashi Y, Berberich T, Kanzani H, Matsumura H, Saitoh H, Kusano T, Terauchi R, *Serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in non-host resistance*, Molecular Plant-Microbe Interactions 22, 31-39, (2009).
- ✓ Vera-Estrella R, Barkla B, Higgins V y Blumwald E, *Plant defense response to fungal pathogens*, Plant Physiology, 104, 209-215, (1994).
- ✓ Wang E, Norred W, Bacon C, Riley R, Merrill A, *Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins*, The Journal of Biological Chemistry, 266, 14486-14490, (1991).
- ✓ Wang X, *Lipid signaling*, Current Opinion in Biotechnology, 7, 329-336, (2004).
- ✓ Weber H, *Fatty acid-derived signals in plants*, Trends in Plant Science, 7, 217-224, (2002).
- ✓ Wit P, *How plants recognize pathogens and defend themselves*, Cellular and Molecular Life Sciences, 64, 2726-2732, (2007).
- ✓ Zhang S y Klessig D, *MAPK cascades in plant defense signaling*, Trends in Plant Science, 6, 520-526, (2001).

- ✓ Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley E, Jones J, Felix G & Boller T, *Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception*, Nature, 428, 764-767, (2004).

XII. APÉNDICE

1. Preparación del medio de Gamborg B-5/agar/sacarosa para la germinación y el cultivo de *Arabidopsis thaliana*.

Reactivos	Concentración Final	Preparación de 1 L
Medio de Gamborg B-5 (No. Cat G5893, Sigma Aldrich Química S.A de C.V)	3.2 g /L	3.2 g
Agar (Select Agar, No Cat 30391-023, Invitrogen)	1%	10 g
Sacarosa	1%	10

2. Preparación de medios de cultivo para crecer *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1 y DC3000 virulenta.

Medio B de King (para preparar 100 mL)

- ✓ Proteasa peptona 1.0 g
- ✓ K₂HPO₄ 0.15 g
- ✓ Glicerol 1.2 mL
- ✓ Agar 1.5 g

Para el cultivo de *Pst* DC3000 virulenta. A 100 mL de medio B de King agregar:

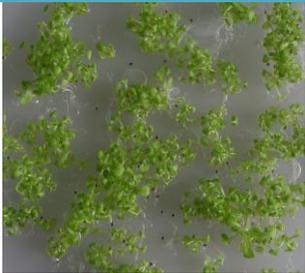
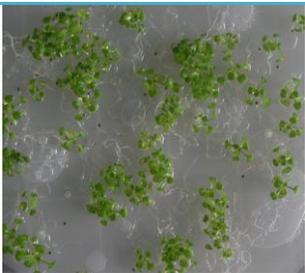
- ✓ Rifampicina (Cf 50 µg/mL) 100 µL (disuelto en DMSO)
- ✓ MgCl₂ (1 M) 1 mL

Para el cultivo de *Pst* DC3000 avrRPM1. A 100 mL de medio B de King agregar:

- ✓ Rifampicina (Cf 50 µg/mL) 100 µL (disuelto en DMSO)
- ✓ Tetraciclina (Cf 20 µg/mL) 100 µL (disuelta en H₂O dd estéril)
- ✓ MgCl₂ (1 M) 1 mL

Se vierten de 25 a 30 mL de medio aproximadamente en cada una de las cajas Petri desechables estériles y se dejan enfriar completamente (realizar en cámara de flujo laminar). Se mantienen en refrigeración hasta su uso.

3. Controles realizados para la optimización de las condiciones experimentales en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana*.

Determinación	Línea vegetal/cepa bacteriana	Observaciones
Silwet 0.01% asperjado sobre plántulas de las tres líneas de <i>Arabidopsis</i>		Línea silvestre, el tensoactivo no provoca daños fenotípicamente visibles a las plántulas
		Línea <i>At/cb2a-1</i> , la exposición al tensoactivo no provoca indicios de muerte celular
		Línea <i>Atmpk6</i> , no manifestó daños fenotípicos al ser expuesta al tensoactivo
Cepas bacterianas inoculadas en medio selectivo adicionado con Silwet 0.01%		Cepa avirulenta, la adición del tensoactivo en el medio sólido no manifestó alteraciones morfológicas en las colonias bacterianas.

		<p>Cepa virulenta, no se observaron alteraciones morfológicas en las colonias bacterianas</p>
<p>Cepas bacterianas inoculadas en medio selectivo adicionado con FB1 10 μM</p>		<p>Cepa <i>Pst</i> avirulenta, no manifestó alteraciones morfológicas al ser crecida en el medio suplementado con la toxina</p>
		<p>Cepa <i>Pst</i> virulenta, no manifestó alteraciones morfológicas al ser crecida en el medio suplementado con la toxina</p>

Tabla 3. Controles elaborados para la optimización de las condiciones experimentales en el sistema de trabajo implementado.