



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Pseudomonassyringae* DC3000 cepa avirulenta y virulenta  
inducen cambios diferenciales en la poza de  
carbohidratos de hojas de jitomate.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ADRIANA MARTÍNEZ JUÁREZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA., SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR: DRA., BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
DRA., ROCÍO CRUZ ORTEGA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2013



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Pseudomonassyringae* DC3000 cepa avirulenta y virulenta  
inducen cambios diferenciales en la poza de  
carbohidratos de hojas de jitomate.**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ADRIANA MARTÍNEZ JUÁREZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA., SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR: DRA., BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
DRA., ROCÍO CRUZ ORTEGA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2013**



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/499/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de abril de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del (la) alumno (a) MARTÍNEZ JUÁREZ ADRIANA con número de cuenta 301220899 con la tesis titulada "Pseudomonas syringae DC3000 cepa avirulenta y virulenta inducen cambios diferenciales en la poza de carbohidratos de hojas de jitomate", realizada bajo la dirección del (la) DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO:

Presidente: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN  
Vocal: DRA. KARINA BOEGE PARÉ  
Secretario: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN  
Suplente: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de septiembre de 2013.

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/ipp



## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, por constituir una sólida etapa de conocimientos y experiencia teórico – prácticas en mi formación profesional.

Agradezco al CONACyT por el otorgamiento de la beca para la realización de mis estudios de posgrado (CVU 288797. Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica, UNAM, por el financiamiento del proyecto PAIP 4290-12.

Se agradece al comité tutorial por sus comentarios y aportaciones al trabajo: Dra. Berenice García Ponce de León y Dra. María del Rocío Cruz Ortega. Ambas investigadoras del Instituto de Ecología, UNAM.

También al departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por brindarme las instalaciones y equipos necesarios para la realización de los experimentos, durante mi formación como maestra en ciencias.

Se agradece especialmente a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, miembro investigadora de este departamento, por aceptarme en su laboratorio como su estudiante, brindándome todo el apoyo tanto académico, técnico y personal durante toda mi formación como maestra en ciencias.

Se agradece a la Dra. Alicia Gamboa del Buen del Instituto de Ecología y a Dra. Grace Armijo Godoy del laboratorio de Biología Molecular Vegetal- P. Universidad Católica de Chile, por la instrucción de la técnica de infiltración en plantas de *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae*.

Se agradece al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra por proporcionarnos las dos cepas de *Pseudomonas syringae* DC3000 cepa avirulenta y virulenta. Investigador del Departamento de Bioquímica.

Se agradece el apoyo técnico de la Q. Laurel Elideé Fabila Ibarra en el mantenimiento de las condiciones de invernadero para el crecimiento de las plantas de jitomate libres de plagas.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Un agradecimiento muy especial para la Dra. Sobeida por su paciencia, dedicación y sobre todo por su valiosa amistad.

A la Dra. Berenice García Ponce de León y Dra. María del Rocío Cruz Ortega, porque sus opiniones y evaluaciones en cada tutorial me ayudaron a mejorar académicamente.

A la Dra. Alicia Gamboa de Buen, Dra. Karina Boege Paré, Dra. Berenice García Ponce de León, a la Dra. Sonia Vázquez Santana y a la Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro. Por la revisión del escrito y sus valiosas aportaciones para mejorarlo.

A mis compañeros de laboratorio por valiosa amistad y apoyo, que hacen divertidas las horas de trabajo. Rocío Mariel, Paulina Aguilera, Viridiana Zurita, Viridiana Luna, Susana, Roberto, Fernando, José Antonio y Juan Manuel.



**Δεδικαδα α:**

*Α μισ Παδρες πορ δαρμε λα πιδα, συ αμορ, τιεμπο ψ απογο, λες δεβο τοδο λο θυε σοψ, γραχιασ. Μαμ( μυχια σ γραχιασ πορ τυ απογο σιεμπρε, ερεσ μι μεφορ αμιγα. Παπ( ερεσ ελ μεφορ ψ σιεμπρε νοσ ηασ δαδο τοδο δε τι . Λοσ αμο. Α μισ **ηερμανοσ** πορ σερ μισ χ(μπλιχεσ εν λα πιδα ψ πορ σερ ταν διπερτιδοσ, λοσ θυιερο. Α μι αβ υελιτα Ενεδινα πορ σερ υνα μυφερ ταν εσπεχιαλ, ιντελιγεντε ψ φυερτε, σιεμπρε βρινδ(νδομε λο μεφορ δε τι. Α μισ πριμασ **Δανα, Δαφνε, Μιχηελλε, Λιλι, Λαυρα, Πιλαρ ψ Ανιτα**, πορθυε χρεχιμοσ φυντασ ψ ηαν χομπαρτιδ ο χονμιο τοδο λο θυε ηα πασαδο εν μι πιδα. Α μι τ(α **Χηελι ΤΘΜ**. Α Παμ πορ αψυδαρμε χυανδο πιερδο χοσα σ πορ δεσπισταδα φαφαφαφα. Α μισ σοβρινοσ (**Εμιλιανο**) ψ σοβρινασ (**Μονζε, Σοφι, Αλινε ψ Μαριανα**), πορ δ αρμε συ αφεχτο ψ αμισταδ. Εν μεμορια δε μι αβυελο Ροβερτο, πορ τυ παλορ, σαβιδυρ(α ψ αλεγρ(α αντε χυαλ θυιερ χιρχυνστανχια δε λα πιδα. Δε Επιδι(ι(ν πορ τυ ιντελιγενχια ψ τερνυρα, τρατανδο δε ινχυλχαρ λο μεφο ρ δε τι εν τυσ ηιφοσ ψ νιετοσ. Δε Λυχιανα πορ τυσ χονσεφοσ ψ πλ(τιχασ ταν αμενασ θυε φορφορον υνα παρτε ιμφορταντε δε μι περσοναλιδαδ. Α μι φαμιλια πορ χομπαρτιρ σιεμπρε λοσ βυενοσ ψ μαλοσ μομεντοσ δε λα πι δα: Τ(ο Αλε, Τ(α Ψαζ, Τ(α Λετψ, Τ(ο Πεδρο, Παθυιτο, Πετερ, Ξνγελ, Τ(ο Μιγυελ, Τ(α Χλαυδια, Δανιελ, Τ(ο (σοβρινο) Θοργε, Τ(α Ελενα, Θοργε, Συσψ, Λυχιανα, Λετψ, Λετψ (παλομιτα), Μελι, Αλεξ, Ελενιτα, Φανψ, Μαυρ ιχιο, Μαρυ, Αβισηαι, Φ(τιμα, Βενφαμιν, Πατψ, Θοσελιν, Βενφιτα, Τ(ο Ρα(λ, Τ(α Χελιδα, Ομαρ, Τ(α Λυπιτα, Τ (ο Ανγελ, Ανγελ, Πιλαρ, Ανγελ ε<sup>ο</sup>, Σαντιαγο, ©σχαρ, Τανι, ©σχαριν Ιπανοπιχη, Τ(ο Μαριο, Τ(α Μαρτηα, Μ αριο, Θενψ, Αδρι(ν (θιχσ), Εδυαρδ, Τ(α Ροσι, Τ(ο Παχο, Παχο, Ψαζ, Ηυγο, Λυισ, Τ(ο Μεμο ψ Τ(α Λυπιτα (μισ νινοσ), Μεμο, Ροχ(ο, Μαρχο, Φανψ, Σεργιο, Τ(ο Μανυελ, Τ(α Ηιλδα, Ισραελ, Καρεν, Γαβψ, Τ(ο Βετο, Τ(α Αδ ελα ψ φαμιλια, Βισαβυελα.*

**Dedicada a:**

*A mis Padres por darme la vida, su amor, tiempo y apoyo, les debo todo lo que soy, gracias. Mamá muchas gracias por tu apoyo siempre, eres mi mejor amiga. Papá eres el mejor y siempre nos has dado todo de ti. Los amo. A mis **hermanos** por ser mis cómplices en la vida y por ser tan divertidos, los quiero. A mi abuelita Enequina por ser una mujer tan especial, inteligente y fuerte, siempre brindándome lo mejor de ti. A mis primas **Dana, Dafne, Michelle, Lili, Laura, Pilar y Anita**, porque crecimos juntas y han compartido conmigo todo lo que ha pasado en mi vida. A mi tía **Cheli TQM**. A Pam por ayudarme cuando pierdo cosas por despistada jajajaja. A mis sobrinos (**Emiliano**) y sobrinas (**Monze, Sofi, Aline y Mariana**), por darme su afecto y amistad. En memoria de mi abuelo Roberto, por tu valor, sabiduría y alegría ante cualquier circunstancia de la vida. De Epiridión por tu inteligencia y ternura, tratando de inculcar lo mejor de ti en tus hijos y nietos. De Luciana por tus consejos y pláticas tan amenas que forjaron una parte importante de mi personalidad. A mi familia por compartir siempre los buenos y malos momentos de la vida: Tío Ale, Tía Yaz, Tía Lety, Tío Pedro, Paquito, Peter, Ángel, Tío Miguel, Tía Claudia, Daniel, Tío (sobrino) Jorge, Tía Elena, Jorge, Susy, Luciana, Lety, Lety (palomita), Meli, Alex, Elenita, Fany, Mauricio, Maru, Abishai, Fátima, Benjamin, Paty, Joselín, Benjita, Tío Raúl, Tía Celida, Omar, Tía Lupita, Tío Angel, Angel, Pilar, Angel e<sup>o</sup>, Santiago, Óscar, Tania, Óscarin Ivanovich, Tío Mario, Tía Martha, Mario, Jeny, Adrián (Jics), Eduard, Tía Rosi, Tío Paco, Paco, Yaz, Hugo, Luis, Tío Memo y Tía Lupita (mis niños), Memo, Rocío, Marco, Fany, Sergio, Tío Manuel, Tía Hilda, Israel, Karen, Gabby, Tío Beto, Tía Adela y familia, Bisabuela.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hipótesis</b>	<b>2</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>2</b>
<b>3. Antecedentes</b>	<b>4</b>
3.1 Patogénesis y las bacterias fitopatógenas	4
3.1.1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>	5
3.1.1.1 de <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> virulenta y avirulenta	7
3.2 Proceso de infección de <i>Pseudomonas syringae</i>	11
3.3 Mecanismos de defensas de la planta	12
3.3.1 Efectos de la infección en el tejido sistémico	15
3.4 Alteraciones en el contenido y en el metabolismo de carbohidratos de las plantas durante la interacción planta-patógeno	20
3.4.1 La invertasa y su papel en la patogénesis	23
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>27</b>
4.1 Material biológico	27
4.2 Obtención del inóculo bacteriano	27
4.3 Infiltración de las plantas	27
4.4 Medición de viabilidad de las células de la hoja mediante la tinción con azul tripano	28
4.5 Extracción del fluido del apoplasto	28
4.6 Extracción y cuantificación de carbohidratos solubles: glucosa, fructuosa y sacarosa	29
4.7 Análisis estadístico	31
<b>5. Resultados</b>	<b>32</b>
5.1 Cultivo selectivo de <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 pv <i>tomato</i> virulenta y avirulenta	32
5.2 Optimización de la técnica de infiltración de las hojas de jitomate para observar los síntomas de la enfermedad	33
5.3 La viabilidad celular en las hojas infiltradas con los dos distintos tipos de cepas de <i>P. syringae</i>	35
5.4 Cambios en los contenidos de carbohidratos solubles en hojas de jitomate infectadas con <i>P. syringae</i> virulenta y avirulenta	37
<b>6. Discusión</b>	<b>44</b>
6.1 El curso de la infección de las hojas de jitomate es temporalmente diferente dependiendo de la cepa de <i>P. syringae</i> que se infiltre	44

---

6.2 Únicamente la cepa avirulenta de <i>P. syringae</i> aumentó los contenidos de hexosas en las hojas infiltradas de jitomate a tiempos cortos de la infección .....	46
6.3 La cepa virulenta de <i>P. syringae</i> aumentó los contenidos de hexosas en las hojas sistémicas de jitomate a tiempos cortos de la infección .....	51
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>54</b>
<b>8. Perspectivas .....</b>	<b>54</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>55</b>
9.1 Clasificación taxonómica de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	55
9.2 Soluciones .....	56
9.3 Efecto de la infiltración de las hojas de frijol con <i>P. syringae</i> .....	57
9.4 Efecto del punto de infiltración en los contenidos de carbohidratos .....	59
9.5 Tablas de análisis de varianza de ANOVA con Medidas Repetidas para los datos de carbohidratos .....	64
<b>10. Literatura citada .....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Enfermedad en plantas y las bacterias causantes.....	4
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del T3SS de una bacteria patógena de plantas.....	6
<b>Figura 3.</b> Los dos distintos tipos de interacción entre una planta y el patógeno de <i>Pseudomonas syringae</i> .....	10
<b>Figura 4.</b> Se muestran los tipos de inmunidad en plantas .....	16
<b>Figura 5.</b> Eventos moleculares de la defensa sistémica.....	17
<b>Figura 6.</b> Proceso de obtención de fluido apoplástico .....	29
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de las dos cepas de <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> en medio selectivo.....	32
<b>Figura 8.</b> Desarrollo de la infección de en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> infiltradas con $1 \times 10^6$ UFC .....	34
<b>Figura 9.</b> Viabilidad celular en el tejido foliar durante las 24h de infección de <i>Solanum lycopersicum</i> infiltradas con $1 \times 10^6$ UFC de <i>P. syringae</i> .....	36
<b>Figura 10.</b> Carbohidratos en el extracto total de la hoja infiltrada .....	38
<b>Figura 11.</b> Carbohidratos en el extracto total de la hoja sistémica.....	39
<b>Figura 12.</b> Carbohidratos solubles en el apoplasto de la hoja infiltrada .....	41
<b>Figura 13.</b> Carbohidratos solubles en el apoplasto de la hoja sistémica. ....	42
<b>Figura 14.</b> Aumento del contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en el tejido infectado por <i>P. syringae</i> cepa avirulenta y su posible relación con la defensa de la planta. ....	49
<b>Figura 15.</b> Flujo de carbohidratos en la interacción compatible .....	53
<b>Figura 16.</b> Desarrollo de la infección por <i>Pseudomonas syringae</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> infiltradas con $1 \times 10^6$ UFC .....	58
<b>Figura 17.</b> Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en la hoja tratada .....	60
<b>Figura 18.</b> Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en la hoja sistémica .....	61
<b>Figura 19.</b> Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en el apoplasto de la hoja tratada .....	62

**Figura 20.** Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en el apoplasto de la hoja sistémica ..... 63

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Contribución de proteínas de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* a la enfermedad en plantas. .... 8

**Tabla 2.** Resumen de los cambios detectados en los contenidos de carbohidratos por la infiltración de la tercera hoja de plantas de jitomate con las cepas de *P. syringae*. .... 47

**Tabla 3.** Análisis de varianza de cantidad de Sacarosa en extractos y apoplastos del tejido infiltrado ..... 64

**Tabla 4.** Análisis de varianza para la cantidad de Glucosa en extractos y apoplastos del tejido infiltrado. .... 65

**Tabla 5.** Análisis de varianza para la cantidad de Glucosa en extractos y apoplastos del tejido infiltrado. .... 66

**Tabla 6.** Análisis de varianza de cantidad de sacarosa en extractos y apoplastos del tratamiento herida. .... 67

**Tabla 7.** Análisis de varianza de cantidad de glucosa en extractos y apoplastos del tratamiento de punto de infiltración. .... 68

**Tabla 8.** Análisis de varianza de cantidad de fructosa en extractos y apoplastos del tratamiento de punto de infiltración. .... 69

**Resumen:**

Las plantas están constantemente sujetas a factores de estrés como el estrés biótico. La interacción planta-patógeno es específica, compleja y dinámica, conduciendo a la enfermedad (interacción compatible) o a la resistencia (interacción incompatible). En ambos casos, las plantas responden con la activación de los mecanismos de defensa, modificando su metabolismo para prevenir la proliferación del patógeno y su esparcimiento hacia los tejidos vecinos. El tipo y nivel de algunos metabolitos cambia, como es el caso de los carbohidratos, que son fuente de energía y de esqueletos carbonados, pero también son moléculas señal, que pueden afectar o participar en la expresión de diversos genes como los de la defensa de la planta contra patógenos. En el presente trabajo se determinó el efecto en los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa en hojas sistémicas o infiltradas de dos cepas de *Pseudomonas syringae* pv DC3000, una que produce enfermedad y otra que no; cepa virulenta y avirulenta respectivamente. En la interacción compatible se incrementaron los contenidos de sacarosa y fructosa a las 8 h, los de glucosa a las 24 h en los extractos del tejido infiltrado y los de glucosa y fructosa a las 8 h en el extracto del tejido sistémico. En el fluido apoplástico del tejido infiltrado la sacarosa se incrementó a las 4 h, opuesto al apoplasto del tejido sistémico ya que la sacarosa se redujo a las 4 y 24 h. Los contenidos de hexosas no cambiaron en los apoplastos. Probablemente la cepa virulenta evade la respuesta de defensa de la planta al incrementar la demanda de nutrientes de los tejidos sistémicos. En contraste la interacción incompatible, los contenidos de glucosa y sacarosa se incrementan a tiempos cortos 4 y 8 h en el extracto del tejido infiltrado, respectivamente, mientras que en el fluido apoplástico se redujo la sacarosa las 4 h, mientras que la fructosa se incrementa. En el tejido sistémico se incrementó la sacarosa del extracto total a las 24 h, mientras que en los apoplastos disminuyó a las 4 y 8 h. Probablemente la cepa avirulenta es reconocida por las defensas de la planta, quién aumenta su tasa de síntesis de carbohidratos para mantener su metabolismo, o utiliza la señal de aumento de glucosa para inducir su defensa, reduciendo la colonización del patógeno. Resulta interesante que la hoja que no

fue infiltrada, la hoja sistémica, modifique su contenido de carbohidratos de manera similar al tejido que fue infiltrado y sugiere que es una señal específica que las plantas pueden detectar para detener el crecimiento de un hospedero al facilitar o suspender el aporte de carbohidratos no solo de la hoja infectada sino de toda la planta.

**Abstract:**

Plants are constantly under stress such as biotic stress. The plant-pathogen interaction is specific, complex and dynamic; often result in disease (compatible interaction) or resistance (incompatible interaction). In both cases, plants activate defense mechanisms by altering their metabolism to prevent the pathogen propagation and spread on the neighboring tissues. The type and level of some metabolites change such as carbohydrates, which are source of energy and carbon skeletons, but also signaling molecules, that can affect or participate in the expression of various genes and contribute to plant defense against pathogens. In this study we determined the effect on sucrose, glucose and fructose levels in systemic or infiltrated leaves with two strains of *Pseudomonas syringae* pv DC3000 one producing disease and one not; virulent and avirulent respectively. In the compatible interaction the content of sucrose and fructose increased at 8 h, but glucose increased at 24 h in the extract of the infiltrated tissue. Only fructose increased at 8 h in the extract of the systemic tissue. On the apoplastic fluid of the infiltrated tissue sucrose increased at 4 h, the opposite occur on the apoplastic systemic tissue in which low sucrose content was detected at 4 and 24 h but the hexoses remain unchanged. Probably the virulent strain is able to evade the defense response of the plant increasing the demand for nutrients on the systemic tissues. In contrast, in the incompatible interaction, the contents of glucose and sucrose increased at early times, 4 and 8 h in the extract of infiltrated tissue, respectively. But in the apoplastic infiltrated tissue sucrose decreased at 4 h, opposite to fructose which arise at 4 h. The extract of systemic tissue shows a increase of sucrose at 24 h, but in the apoplastic fluid reduces at 4 and 8 h. Suggesting that the avirulent strain is recognized by plant defenses, who increased

their rate of synthesis of carbohydrates to keep its metabolism, or use the glucose as a signal to induce the defense against the pathogen, reducing the colonization. Interestingly, the not infiltrated leaves, the systemic, modify its content of soluble carbohydrate similarly to the infiltrated tissue, suggesting that plants detect specifically the pathogen growth, diverting the carbohydrates not only in the infected tissue for avoid the colonization continue.

## Abreviaturas

**Avr:** *P. syringae* DC3000 pv tomato avirulenta

**CW-INV:** Invertasa de pared extracelular (del inglés cell wall invertase)

**EPS:** Exopolisacáridos

**ETI:** Inmunidad disparada por efectores (del inglés Effector-triggered immunity).

**Fru:** Fructosa

**G6PI:** Glucosa-6-fosfato isomerasa

**Glc:** Glucosa

**GTS:** Glutation-S-transferasa.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno.

**INV-A:** Invertasa apoplástica (del inglés apoplasmic cytosolic)

**INV-C:** Invertasa citosólica (del inglés cytosolic invertase)

**INV-V:** Invertasa vacuolar (del inglés vacuolar invertase)

**JA:** ácido jasmónico

**Me-JA:** metil- jasmónico

**Me-SA:** metil salicílico

**MPC:** Muerte celular programada.

**NADPH:** Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato.

**NB-LRR:** Receptor con repeticiones ricas en leucina de enlace nuclear (Receiver leucine rich repeat nuclear binding)



**NO:** óxido nítrico

**PAMP:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

**PRR:** Receptores de reconocimiento de PAMPs (PAMPs recognition receptors).

***P. syringae:*** *Pseudomonas syringae* DC3000 pv *tomato*

**PTI:** Inmunidad disparada por PAMPs (del Immunity triggered by PAMPs).

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SA:** ácido salicílico

**Suc:** Sacarosa

**SUSY:** sacarosa sintasa

**T3Es:** Efectores del Tipo 3 (del inglés Type 3 Effectors).

**T3SS:** Sistema de Secreción del Tipo 3 (del inglés Secretion System Type 3).

**Vir:** *P. syringae* DC3000 pv *tomato virulenta*

## 1. Introducción

El jitomate es una de las hortalizas más populares de todo el mundo desde el punto de vista agrícola y está expuesta a una gran variedad de enfermedades de las cuales la más estudiada es la ocasionada por *Pseudomonas syringae* (Pedley *et. al.*, 2003). El estudio de la patogénesis en jitomate puede contribuir a establecer métodos eficaces para el control de las plagas (Arie *et. al.*, 2007) y las Solanáceas especialmente el jitomate (*Solanum lycopersicum*; ver anexo 1 para descripción de la planta), proporcionan un excelente sistema modelo para investigar la interacción planta-patógeno.

Adicionalmente, conociendo el papel como molécula señal de los carbohidratos para regular la expresión de genes en procesos fisiológicos (Pego *et. al.*, 2000; Smeekens *et. al.*, 2000; Koch *et. al.*, 2004; Roitsch *et. al.*, 2004), se hace importante determinar si durante procesos patológicos también tienen un papel en la defensa.

En este trabajo se estudió la modificación de la poza de sacarosa, fructosa y glucosa en hojas tanto infiltradas como sistémicas, durante la infección con dos distintas cepas de bacterias fitopatógenas de *P. syringae DC3000 pv tomato*. La cepa virulenta es capaz de desarrollar la enfermedad en la planta y la cepa avirulenta induce la respuesta hipersensible. Por lo que se predijo que la poza de hexosas se modificaría en contenido y temporalidad de manera diferente durante el proceso de defensa.

De manera adicional se examinó la relación entre los tejidos infiltrados y sistémicos, que podría ayudar a entender si los carbohidratos juegan un papel relevante como evocador o moléculas señal durante la interacción planta – patógeno.

## 1.1 Hipótesis

En este estudio se considero que la infección en las hojas de una planta de jitomate con dos distintas cepas de *Pseudomonas syringae pv tomato* (virulenta y avirulenta), puede inducir un cambio diferencial en el flujo de carbono, tanto en el tejido local como en el sistémico.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Determinar los cambios en el contenido de carbohidratos solubles en hojas locales y sistémicas de plantas de jitomate, durante la infección con las cepas virulenta y avirulenta de *P. syringae pv tomato*.

### 2.2 Objetivos particulares

- (1) Establecer las condiciones de infección de plantas de jitomate con las cepas virulenta y avirulenta de *P. syringae*.
- (2) Detectar la muerte celular en las hojas mediante la tinción de azul tripano.
- (3) Determinar si la infección de las dos cepas de *P. syringae* tiene un efecto diferencial en la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa de las hojas de jitomate mediante:
  - (A) Extracción de carbohidratos totales de hojas infiltradas y sistémicas y determinación de carbohidratos solubles.
  - (B) Extracción de fluido apoplástico de hojas infiltradas y sistémicas y determinación de carbohidratos solubles.

**(C)** Cuantificación de los carbohidratos mediante la reacción de ELISA, que se describirá en la sección de material y métodos.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Patogénesis y las bacterias fitopatógenas.

La **patogénesis** es la secuencia de procesos en el desarrollo de una enfermedad que describe la interacción entre un patógeno con su huésped (Fox *et. al.*, 2010). Algunos organismos patógenos que interactúan con las plantas son: bacterias, hongos y virus (Abramovitch *et. al.*, 2004).

Estos organismos se propagan por medio del viento, lluvia, insectos o prácticas de cultivos, los cuales ingresan a la planta a través de una herida, o bien, por medio de aperturas naturales tales como: las lenticelas, los hiátodos y los estomas (Abramovitch *et. al.*, 2004). Una vez que han ingresado a la planta huésped, los patógenos pueden ocupar el espacio intercelular o apoplasto de varios tejidos, como el del xilema. Otros patógenos se introducen en el citoplasma (Abramovitch *et. al.*, 2004; Ryan *et. al.*, 2011). Finalmente en la planta se pueden observar síntomas tales como: manchas negras, puntos, marchitamiento, agallas y chancros (Figura 1) (Abramovitch *et. al.*, 2004). También pueden ocasionar la muerte celular en las hojas, raíces, tallos, flores, frutos y tubérculos. Estos síntomas afectan el rendimiento y la calidad de los cultivos ocasionando graves problemas económicos y sociales (Abramovitch *et. al.*, 2004).



**Figura 1. Enfermedad en plantas y las bacterias causantes.** A y B. Síntomas clásicos provocados por la infección con *Pseudomonas syringae* *pv.* *tomato*, en hojas y frutos de *Solanum lycopersicum* (Kang *et. al.*, 2002). C Fotografía de microscopía electrónica, muestra la morfología de *Pseudomonas syringae* *pv.* *tomato* (Larsen *et. al.*, 2009).

La mayoría de los fitopatógenos bacterianos son bacterias gram negativas y filogenéticamente se encuentran dentro del phyla *Proteobacteria*. Este tipo de bacterias cuentan con una pared celular formada de lipopolisácaridos y su morfología es muy variable, desde bacilos hasta cocos simples (Figura 1C) (Kerstens *et. al.*, 2006).

Dentro de este phyla hay cinco clases:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . La mayoría de los géneros importantes que contienen fitopatógenos se encuentran en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Siendo los de mayor interés *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Pantoea* (Kerstens *et. al.*, 2006).

El género de *Pseudomonas* constituye uno de los más diversos y más estudiados, debido a que sus integrantes presentan una gran versatilidad metabólica y fisiológica, lo que les permite la colonización de diversos hábitats terrestres y acuáticos (Palleroni *et. al.*, 1993; Spiers *et. al.*, 2000; Silby *et. al.*, 2011). Son de gran interés debido a su importancia como productores de enfermedades en plantas y humanos, además de su cada vez mayor potencial en aplicaciones biotecnológicas (Silby *et. al.*, 2011). Este proyecto centró su estudio en el papel de *Pseudomonas syringae* como organismo fitopatógeno.

### **3.1.1 *Pseudomonas syringae* pv *tomato*.**

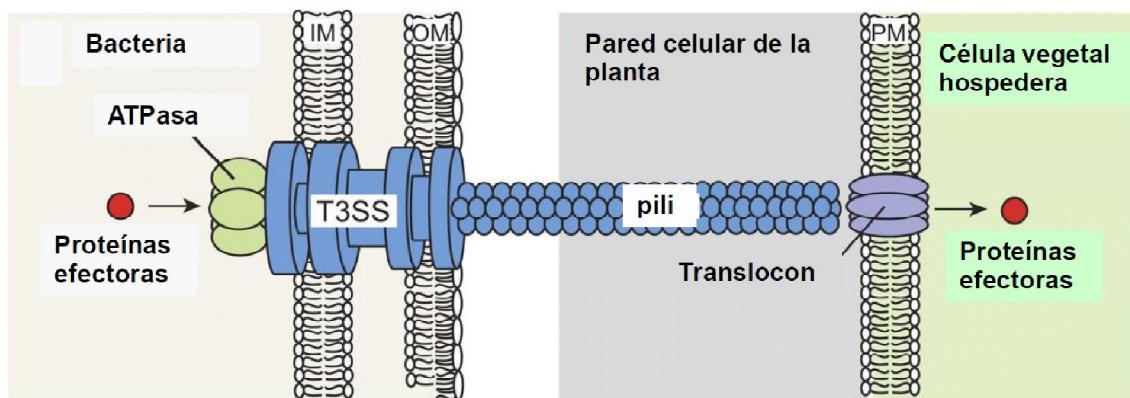
La especie de *Pseudomonas syringae* pertenece a la clase de  $\gamma$ -proteobacteria y cuenta con más de 50 cepas patovares<sup>1</sup> (Kerstens *et. al.*, 2006), dentro de las cuales *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, es la especie de patógeno más utilizada en la investigación de la interacción planta-patógeno (Morris *et. al.*, 2008; Silby *et. al.*, 2011), debido a la facilidad con la que puede ser manipulada

---

<sup>1</sup> Patovar es un grupo subespecie de *P. syringae* que se define por su especificidad de huésped; aunque algunos patovares son polifiléticos y algunas cepas son virulentas sobre diferentes huéspedes como *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 que infecta jitomate y *Arabidopsis thaliana*.

experimentalmente y porque infecta a una gran variedad de plantas dentro de las cuales se encuentran hortalizas de importancia agrícola (Morris *et. al.*, 2008).

Esta bacteria coloniza y se multiplica en los espacios intercelulares de las hojas y de otros tejidos aéreos, utilizando los nutrientes de las células vivas del hospedero (Figura 1A y 1B) (Mitchell *et. al.*, 1983; Hirano *et. al.*, 2000).



**Figura 2. Representación esquemática del T3SS de una bacteria patógena de plantas.** Tomado y adaptado de Büttner y He, 2009.

El genoma completo de *P. syringae* es de 6,5 Megabases y está formado por un cromosoma circular y dos plásmidos, que en conjunto codifican 5763 marcos de lectura abiertos. Se han identificado 298 genes de virulencia, dentro de los cuales se incluyen varios grupos de genes que codifican para 31 proteínas confirmadas y 19 proteínas que se prevé están involucradas en el sistema de secreción tipo 3 (T3SS por sus siglas en inglés) (Buell *et. al.*, 2003). El T3SS es un complejo multiprotéico que semeja a una estructura de jeringa con un canal presumiblemente de 2.8 nm de diámetro, estructura que se encuentra embebida en las dos membranas de la bacteria y que continúa hacia el exterior atravesando la pared celular vegetal para interactuar con la membrana celular del huésped (Figura 2). A través del T3SS la bacteria transporta proteínas desde su citoplasma

hacia el citoplasma de la célula vegetal haciendo más eficiente la invasión (Büttner *et. al.*, 2009).

*Pseudomonas* también posee un amplio repertorio de transportadores para la adquisición de nutrientes, especialmente de azúcares. Además cuenta con genes implicados en el anclaje a la superficie de las células de la planta y más del 12% de sus genes están involucrados en la regulación genética, transducción de señales y transcripción, lo cual refleja la necesidad de una rápida adaptación a los diversos ambientes encontrados durante el crecimiento epifítico y la patogénesis (Rico *et. al.*, 2011).

La habilidad de *P. syringae* para entrar y proliferar dentro de la planta depende de su capacidad de sintetizar toxinas, manipular la señalización de hormonas y de suprimir la respuesta de defensa basal de la misma. En estos procesos el T3SS juega un papel fundamental, ya que introduce en la célula huésped los efectores del tipo 3 (T3Es) que son las proteínas encargadas de suprimir los procesos mencionados anteriormente (Abramovitch *et. al.*, 2004; Rico *et. al.*, 2008; Rico *et. al.*, 2011).

### **3.1.1.1 Cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* virulenta y avirulenta.**

Las cepas de *P. syringae* DC3000 pv. *tomato* pueden ser virulentas y avirulentas (Abramovitch, 2004). Las virulentas son aquellas que poseen todos los efectores del T3SS y que ayudan a establecer la infección. En la Tabla 1 se enlistan algunas de las proteínas identificadas como parte del T3SS; como las que forman parte del pilli o las que contribuyen a la translocación y/o secreción de efectores. Las proteínas descritas son 57 familias agrupadas por función, destacan las que tienen influencia sobre proteínas del huésped, con capacidad de fosforilar o defosforilar modificando la señalización en la defensa, esto reduce la capacidad de la planta para responder a la infección (Büttner *et. al.*, 2009; Lindeberg *et. al.*, 2012). Una planta que interacciona con esta cepa desarrolla síntomas de enfermedad como:



manchas necróticas, decoloración, marchitez y por último la muerte. Los síntomas se presentan gradualmente conforme este patógeno invade todos los tejidos de la planta (Figura 3 A).

**Tabla 1.** Contribución de proteínas de *Pseudomonas syringae pv tomato* a la enfermedad en plantas. Tomada de Büttner y He, 2009.

Tipo	Nombre <sup>a</sup>	Localización <sup>b</sup>	Función
Proteína del pili	HrpA	S	Esencial para la enfermedad y T3S
Proteína del Translocón	HrpK1	S+T	Contribuye a la enfermedad y es una proteína efectora de la translocación
Proteínas Control	HopAK1	S+T	HrpZ1, HrpW, y HopAK1 contribuyen a la translocación de proteínas efectoras y la enfermedad
	HrpW1	S+T	Harpina, dominio C-terminal de la pectatoliasa
	HrpZ1	S+T	Harpina, dominio C-terminal de la pectatoliasa
			Harpina, forma canales de iónicos
	HrpH	T	HrpH, HopP1 y HopAJ1 se predice que son transglicosilasas líticas y contribuyen a la translocación de proteínas efectoras y la enfermedad
	HopP1	T	
	HopAJ1	NT	
	HrpJ	S+T	Requeridas para la enfermedad, contribuyen a T3S
	HrpP	T	Proteína que se predice T3S4, esencial para la enfermedad

<sup>a</sup>**Hrp** del inglés hypersensitive response protein; nombre que se le da a los componentes del sistema de secreción tipo 3 de *P. syringae*.

**Hop** del inglés hrp outer protein; nombre genérico que reciben las proteínas efectoras del sistema de secreción tipo 3 de *P. syringae*.

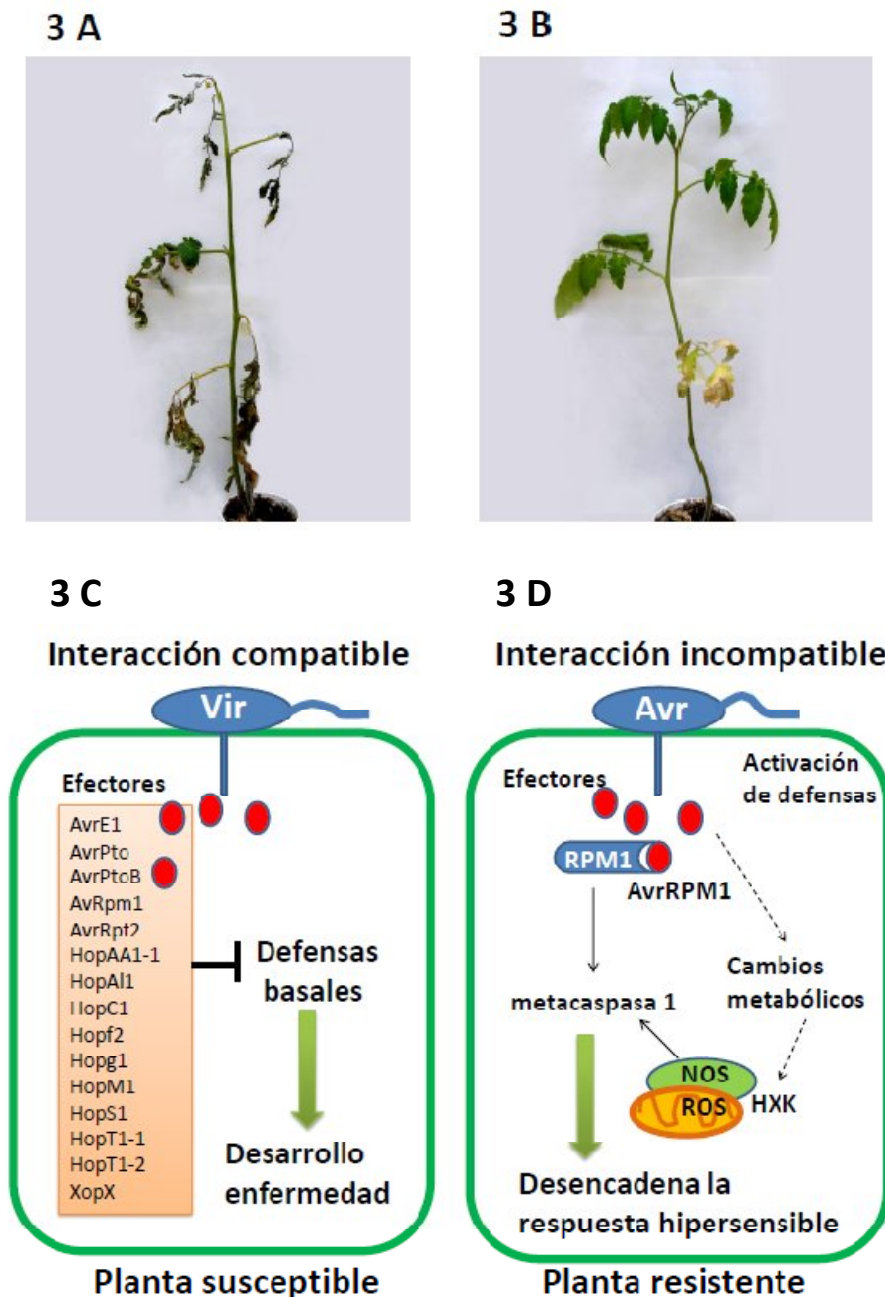
<sup>b</sup>Localización: **NT**, no translocada; **S**, secretada; **T**, translocada.

Las cepas avirulentas son las que poseen los genes “*Avr*” (genes de avirulencia), los cuales tienen su contraparte o receptor en el huésped. El reconocimiento de los productos del patógeno y del huésped lleva a la resistencia a la infección (Abramovitch *et. al.*, 2004). Lo anterior se caracteriza por la restricción del crecimiento del patógeno en la zona afectada, dando inicio a la respuesta hipersensible donde la hoja o tejido infectado se observan cloróticas, se deshidratan, mueren y caen sin afectar el crecimiento de la planta (Figura 3 B).

Molecularmente lo explica la hipótesis del gen por gen que surgió en los años 40 del estudio de la interacción del lino y la roya (*Melampsoralini*) (Flor, 1971). Esta hipótesis propone que cada inductor específico presente en el patógeno, que condiciona la patogenicidad, tiene un gen correspondiente que produce una reacción de defensa en la planta. En el patógeno las proteínas son codificadas por los genes *Avr* (del inglés “**A**virulence **r**eaction”) que son capaces de inducir las repuestas de defensa en plantas que posean los correspondientes genes **R** de resistencia. De esta forma, el reconocimiento tiene lugar cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes **R** y los correspondientes productos de los genes *Avr* del patógeno (Figura 3 D). Esta interacción da origen a una cascada de señalización que finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Flor, 1971).

Por ejemplo, el jitomate cuenta con los genes de avirulencia *Pto* y *Prf* que codifican a proteínas que reconocen a *AvrPto* y *AvrPrf* de *P. syringae pv tomato* (Kim *et. al.*, 2002; Pedley *et. al.*, 2003; Oh *et. al.*, 2011). Los diferentes genes de resistencia a patógenos pueden encontrarse en especies relacionadas y reconocer el mismo efector bacteriano. *Rpg1-b* del frijol y *RPM1* de *Arabidopsis*, reconocen a la proteína *AvrB* de *P. syringae*. Lo anterior sugiere que las plantas parecen utilizar los eventos genéticos evolutivos, tales como modificaciones en la secuencia de genes e intercambio de exones, para producir nuevos elementos de defensa eficientes contra patógenos (Ashfield *et. al.*, 2004, Dodds *et. al.*, 2006).

*P. syringae* puede establecer dos tipos de interacciones con un huésped, una relación **compatible** que se refiere a una interacción entre una cepa virulenta y una planta susceptible y que lleva a la planta a desarrollar la enfermedad. La otra interacción es una relación **incompatible** que se establece cuando el huésped es resistente y el patógeno es del tipo avirulento (Figura 3) (Huang *et. al.*, 2005; Hwang *et. al.*, 2005; Mansfield *et. al.*, 2009).



**Figura 3.** Los dos distintos tipos de interacción entre una planta y el patógeno de *Pseudomonas syringae*. **A.** Planta de jitomate infectada con *P. syringae* cepa virulenta, muestra los síntomas de la enfermedad. **B** Planta de jitomate infectada con *P. syringae* cepa avirulenta, muestra que solo la hoja infectada muere. **C.** Molecularmente la interacción de *P. syringae* cepa virulenta no es reconocida por la planta, ya que sus efectores inhiben la defensa basal y enferman a la planta. **D.** En la interacción de una cepa avirulenta de *P. syringae* con la planta, los efectores de la bacteria son reconocidos por la planta desencadenando la respuesta hipersensible.

La interacción de las plantas y sus patógenos les ha permitido a las primeras desarrollar herramientas moleculares para defenderse “carrera armamentista”, que evidentemente es producto de la coevolución (Ashfield *et. al.*, 2004; Friedman *et. al.*, 2007). Ante la presencia de una interacción compatible y que lleva a la enfermedad de la planta, *P. syringae* regula de manera negativa la respuesta de defensa de la planta, a través de una o varias proteínas efectoras (Kloek *et. al.*, 2001; Abramovitch *et. al.*, 2003; Espinosa *et. al.*, 2003; Abramovitch *et. al.*, 2004).

Por su parte en una interacción incompatible la cepa *P. syringae* avirulenta es reconocida por su huésped y se lleva a cabo la inmunidad tipo ETI en la planta, la cual se detallará más adelante. En ésta se encuentra involucrado un receptor del tipo NBS-LRR que reconoce factores de avirulencia, que desencadena la necrosis de la zona afectada (Oh *et. al.*, 2011).

Existen evidencias de que los efectores de *P. syringae* afectan de manera negativa el sistema inmune de la planta, confiriéndole la capacidad de ser exitoso al producir la enfermedad, dependiendo de si el huésped tiene o no a las proteínas que lo reconozcan y desaten el sistema de defensa, de tal manera que sí hay alguna mutación en el gen R en la planta, la bacteria podría producir la enfermedad, eventos de mutación que seguramente han ocurrido y que explica porque tanto las plantas como las bacterias presentan más de una proteína para afectar o reconocer al “enemigo” (Friedman *et. al.*, 2007; Lindeberg *et. al.*, 2012) (Figura 3).

### **3.2 Proceso de infección de *Pseudomonas syringae*.**

El ingreso de *P. syringae* a la planta es a través de aperturas naturales o heridas. Las bacterias son quimioatraídas al interior vegetal al percibir los nutrientes del fluido apoplástico (Rico *et. al.*, 2008). En la planta, los receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) interaccionan con la flagelina o con los lipopolisacáridos bacterianos, lo cual provoca el cierre de

estomas como un intento de la planta por detener la invasión. Sin embargo, alrededor de las 3 h se vuelven a abrir los estomas. Este evento se ha relacionado con el aumento en la secreción hacia el apoplasto de la proteína coronatina, un efector de virulencia de *P. syringae*, el cual contrarresta el cierre estomatal y permite el ingreso de más bacterias (Kloek *et. al.*, 2001; Schulze-Lefert *et. al.*, 2006). *P. syringae* secreta enzimas que hidrolizan la pared celular cuando se acidifica el pH del fluido del apoplasto. La presencia de glucosa, fructosa, sacarosa y/o manitol induce la expresión de las proteínas que conforman al T3SS (Rico *et. al.*, 2008; Rico *et. al.*, 2011). Permitiendo que el T3SS perfora a célula vegetal e inyecta otros efectores de virulencia que inhiben las defensas basales de la planta. Entonces, las bacterias pasan la primera barrera física de defensa de la planta, la pared celular (Rico *et. al.*, 2011).

### 3.3 Mecanismos de defensa de las plantas.

Las plantas han desarrollado un sistema de defensa muy elaborado, **la inmunidad innata**, que exhibe características similares a la inmunidad innata en mamíferos. Se basa principalmente en el reconocimiento de PAMPs o patrones moleculares altamente conservados asociados a patógenos, los cuales son ligandos de receptores específicos de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRS) (Zipfel *et. al.*, 2008).

Se han definido dos grandes ramas de inmunidad en las plantas. La primera ha sido ampliamente estudiada y se le denomina la **inmunidad PTI** y generalmente se refiere como defensa basal. Ésta es inducida por la percepción de distintos PAMPs, a través de PRRs o receptores parecidos a cinasas (RLK), quienes tienen una porción expuesta al exterior celular rica en leucina (LRR, involucrado en la percepción de PAMPs) y un dominio intracelular involucrado en la señalización (Figura 4) (Zipfel *et. al.*, 2008; Postel *et. al.*, 2009). La cascada de señalización incluye la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la activación de la transcripción, cambios en los compuestos iónicos, producción de

especies reactivas de oxígeno (ROS), la deposición de calosa para engrosar y/o reforzar la pared celular y el cierre de los estomas, entre otros procesos (Figura 4) (Pitzschke *et. al.*, 2009 ; O'Brien *et. al.*, 2012).

Muchos de los genes **R** codifican para proteínas cinasa con un dominio serina/treonina. La cinasa *Pto* que interacciona con el factor de avirulencia *AvrPto*, fosforila proteínas río abajo que activan factores de transcripción con cajas GCC, involucradas en la transcripción de genes de defensa (Kim *et. al.*, 2002). Por otro lado, las MAPK como SIPK (MAPK inducible con ácido salicílico) y la WIPK (MAPK inducible con herida), se activan ante la infección con el virus del mosaico de tabaco (Pitzschke *et. al.*, 2009 ).

Los patógenos tienen la capacidad de modificar los flujos iónicos. Evocadores de hongos promueven flujos de  $Ca^{2+}/K^{+}$  y  $Cl^{-}$ , a través de la membrana plasmática minutos después de la infección. Los evocadores *Avr5* y *Avr9* inducen un rápido incremento del flujo de  $Ca^{2+}$  en células de jitomate en suspensión (Zeidler *et al.*, 2004; Helliwell, E. *et. al.* 2009).

La rápida producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ocurre inmediatamente después de la activación de receptores y de los flujos de calcio. Ésta rápida producción de ROS es transitoria y promueve la fluctuación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del radical hidroxilo ( $OH_2^{\bullet}$ ) (Bolwell *et. al.*, 2009). Al igual que  $H_2O_2$ , el óxido nítrico (NO) se produce durante la respuesta HR e induce genes de defensa como la enzima fenil-amonio liasa (PAL) y PR1 (Wendehenne *et. al.*, 2004; Helliwell, E. *et. al.* 2009).

El tratamiento de células de *Arabidopsis* con lipopolisacáridos, promueve la producción de NO e induce la expresión de varios genes relacionados con defensa y estrés como la enzima GST (glutación S transferasa) y el citocromo P450. La mutante de *atnos* que no produce NO tiene un incremento en la

sensibilidad para *P. syringae* (Zeidler *et. al.*, 2004; Helliwell, E. *et. al.* 2009) confirmando su participación en la defensa.

El segundo tipo de inmunidad es **la respuesta ETI**, que es una respuesta PTI acelerada e intensa. Esta respuesta se activa por las proteínas de resistencia, dentro de las cuales destacan los receptores del tipo NB-LRRs, quienes poseen un dominio NB de enlace nuclear involucrado en activación y oligomerización y un dominio rico en leucinas (LRR). Dentro de esta clase de receptores se encuentra RPM1 (Figura 4) (Ponciano *et. al.*, 2003; Oh *et. al.*, 2011).

Generalmente en este tipo de inmunidad se induce una respuesta de muerte celular programada o respuesta hipersensible (HR) en la zona de infección, que se traduce en lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección (Coll *et. al.*, 2011).

Además la HR está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina en la pared celular de las células vegetales, además de la producción y acumulación de altas cantidades de PR. Las PR son un grupo diverso de proteínas con funciones diversas como  $\beta$ -1,3 glucanasas, quitinasas, osmotinas, endoproteasas, entre otras, las cuales atacan al patógeno (Edreva *et. al.*, 2005). Estas proteínas se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR, en la que se profundizará en el siguiente tema.

A su vez la reacción HR parece ocurrir como un programa suicida activo y organizado y no como consecuencia de un colapso celular pasivo producido por el ataque del patógeno o por toxinas derivadas de éste. Por lo que se conduce a *muerte celular programada* (MCP). LA MCP está mediada por una explosión oxidativa, que libera agentes altamente oxidantes como el superóxido y el  $H_2O_2$ . (Coll *et. al.*, 2011).

### 3.3.1 Efectos de la infección en el tejido sistémico.

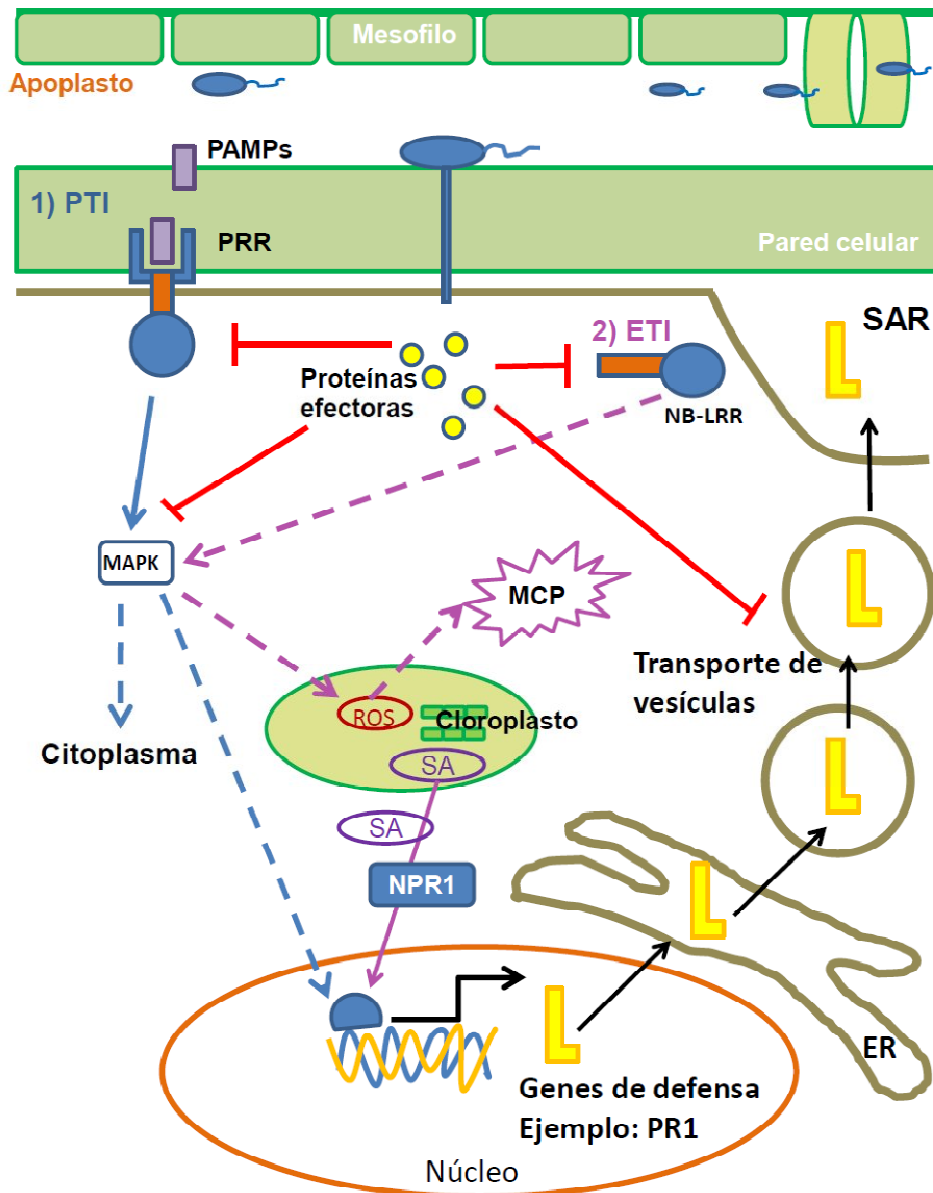
Una vez que un tejido infectado genera una respuesta de defensa local, el siguiente paso es alertar al tejido no infectado o tejido sistémico sobre la presencia y ataque de un patógeno. A partir de ahora nos referiremos al tejido no infectado como **tejido sistémico**.

La Respuesta Sistémica Adquirida puede ser definida como una forma de resistencia inducida que requiere de varios días para su desarrollo, va acompañada de la expresión y acumulación sistémica de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), siendo efectiva contra organismos biotrófos y hemibiotrófos; la hormona que participa regulando este proceso es el ácido salicílico o SA (Hammerschmidt *et. al.*, 2009).

La expresión constitutiva de genes relacionados con la SAR tiene un efecto perjudicial en plantas de *Arabidopsis*, además de producirles un fenotipo de crecimiento de hoja enano, inhibe la señalización por jasmonato haciendo a las plantas más susceptibles al ataque de insectos y patógenos necrotróficos (Hammerschmidt *et. al.*, 2009).

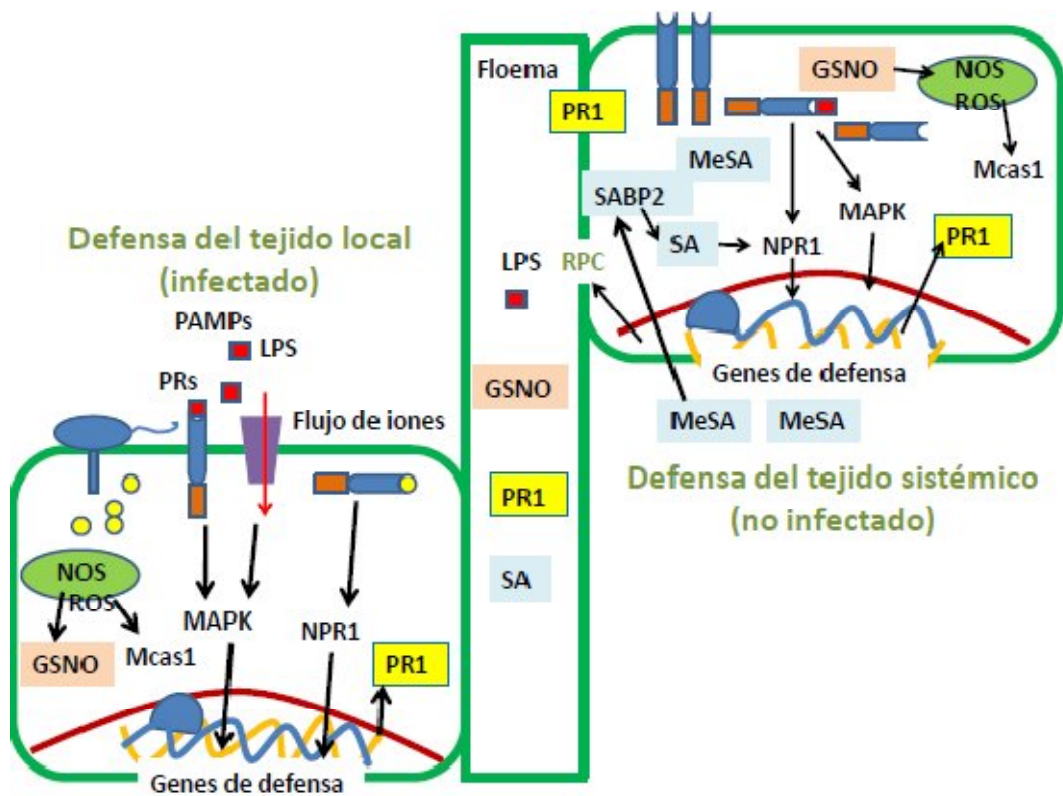
El SA puede transportarse de hojas infectadas a hojas no infectadas y es detectado en el fluido del floema. Además se ha observado que plantas deficientes en SA o que sobre expresan enzimas que lo degradan (salicilato hidroxilasas), exhiben una pobre producción de PR reduciendo la resistencia local y sistémica (Hammerschmidt *et. al.*, 2009). El ácido metil-salicílico (MeSA) es el precursor directo de la hormona SA, molécula volátil que puede ser detectada por plantas vecinas, generando resistencia a posibles ataques por patógenos (Figura 5) (Shulaev *et. al.*, 1997; Park *et. al.*, 2007). Aunque hay evidencias de que el MeSA no es indispensable para SAR en *Arabidopsis* y que el SA puede ser sintetizado *de novo*, vía isocorismato, en la hojas distantes al punto de infección (Attaran *et. al.*, 2009).





**Figura 4. Se muestran los tipos de inmunidad en plantas. 1) Inmunidad PTI** mediada por receptores transmembranales (PRR) que señalizan río abajo a las MAPK activando genes de defensa. **2) Inmunidad ETI** mediada por receptores intracelulares, como RPM1 (NBS-LRR), señalizan río abajo a las MAPK y al factor de transcripción NPR1, induciendo la expresión de PR1. Durante la inmunidad de plantas también se incrementa la producción de SA, quién regula positivamente la vía de NPR1, para la producción de PRs, las cuales son endocitadas al exterior de la célula para la activación de la defensa sistémica (SAR), así como para defender sus alrededores en el espacio apoplástico. La activación de enzimas que producen especies reactivas como ROS y NO vía RPM1, señaliza hacia las metacaspasa-1, y desencadenan la respuesta hipersensible o muerte celular programada (MCP). Las proteínas efectoras del T3SS pueden inhibir ambos tipos de respuesta de defensa en la planta.

La proteína NPR1 (por sus siglas en inglés, Non expressor of PR genes 1) que funciona río abajo del SA regula la SAR. Esta proteína se transloca del citoplasma al núcleo e interactúa con el factor de transcripción TGA, para regular la expresión de PR (Pieterse *et. al.*, 1998; Mou *et. al.*, 2003; Hammerschmidt *et. al.*, 2009). Otros factores de transcripción que regulan la expresión de PR son los WRKY. La sobreexpresión de WRKY70 en *Arabidopsis* resulta en la expresión constitutiva de genes PR's e incrementa la resistencia a enfermedades (Li *et. al.*, 2004).



**Figura 5. Eventos moleculares de la defensa sistémica.** Después de que se desarrolla la defensa local, existen elementos que alertarán a los tejidos sistémicos ante un ataque, los cuales viajan a través del floema tales como: la hormona SA, el NO acoplado a la GST (glutatión transferasa) (GSNO), las PR's, PAMPs como los LPS (lipopolisacáridos bacterianos), etc. SAPBP2 es una proteína que interactúa con el elemento volátil de MeSA convirtiéndolo en SA. El MeSA al ser volátil es percibido por el tejido sistémico. En el tejido sistémico se incrementa la expresión de receptores para la defensa de la planta. RPC reforzamiento de la pared celular.

Se ha demostrado que algunas proteínas suprimen la SAR al interactuar con NPR1 *in vivo*. NIMIN se une a elementos de respuesta a SA en el promotor de PR1. NRR (regulador negativo de resistencia), al sobre expresarse resulta en la supresión de la resistencia a *P. syringae* avirulenta (Chern *et. al.*, 2005; Weigel *et. al.*, 2005). Otra proteína, SNI1 (supresor de NPR1) reprime la transcripción de genes PRs a través de la modificación de histonas (Mosher *et. al.*, 2006; Helliwell, E. *et. al.* 2009).

ROS y NO también juegan un papel importante en la activación de la defensa sistémica. Se ha observado que tratamientos con inhibidores de la producción de NO en plantas de tabaco, ocasiona que no se presente la respuesta sistémica (Figura 5) (Arasimowicz *et. al.*, 2007). NO inducido ante una infección puede reaccionar con grupos tiol de varias proteínas, formando nitrotioles los cuales actúan como moléculas señal. El NO reacciona con el antioxidante glutatión (GSH) el cual se convierte en nitroglutatión S (GSNO) y se transporta vía floema. Los niveles de GSNO en los tejidos locales y sistémicos en la SAR, se han asociado con la respuesta de resistencia a *P. syringae*. El GSNO se descompone por la S-nitrosoglutatión reductasa, la cual ayuda en la acumulación del NO en el tejido sistémico (Arasimowicz *et. al.*, 2007). Otros blancos importantes del NO durante la defensa en plantas son: los canales de K<sup>+</sup> y las metacaspasas, éstas últimas involucradas en el desarrollo de la muerte celular durante la respuesta hipersensible (Figura 5) (Bolwell *et. al.*, 2009).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no solamente se encuentra involucrado en la respuesta de resistencia local, también funciona como una señal secundaria en la SAR. De 1 a 2 h después del estallido oxidativo, las plantas de *Arabidopsis* que son resistentes a *P. syringae* desarrollan “microestallidos”, en los cuales los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementan en zonas discretas dentro de las células de las hojas no infectadas, respuesta denominada “micro-HR” en la SAR (Alvarez *et. al.*, 1998).

El bloqueo de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por yoduro de difenileno, un inhibidor de la NADPH oxidasa, suprime “la micro HR” y la SAR. Algunos estudios han mostrado que la SAR ocurre mediante la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en tejidos distantes de la planta la cual resulta en la inducción de genes relacionados con la defensa (Alvarez *et. al.*, 1998).

Además de los elementos mencionados anteriormente, las plantas poseen pequeños péptidos que señalizan en la defensa sistémica. Uno de ellos es la sistemina que actúa en contra de herbívoros y patógenos. Otro es el péptido A23 molécula de 23 aminoácidos llamado AtPep1, que sirve como una señal endógena en *Arabidopsis* durante la activación de la respuesta de defensa (Huffaker *et. al.*, 2007).

Otras proteínas importantes para transmitir la señal al tejido sistémico son las MAPK, por ejemplo la MAPK 7 (AtMKK7) de *Arabidopsis* es un regulador positivo de la resistencia local y sistémica (Zhang *et. al.*, 2007). La sobre expresión de AtMKK7 resulta en niveles elevados de SA e incrementa la expresión constitutiva de genes PR durante la infección por patógenos. La supresión de AtMKK7 con RNA de interferencia, compromete ambos tipos de defensa la local y la SAR. Interesantemente la expresión ectópica de AtMKK7 en el tejido local, induce la expresión de PR y la resistencia a enfermedades en el tejido sistémico indicando su papel en la generación de la señal móvil de SA (Zhang *et. al.*, 2007; Helliwell, E. *et. al.* 2009).

Además AtMPK3 y AtMPK6 también son requeridas en la preparación de la defensa del tejido sistémico (Beckers *et. al.*, 2009). Pero también las MAPK pueden actuar como reguladores negativos de la SAR. La mutante *mapk4* en *Arabidopsis*, exhibe elevados niveles de SA, expresión constitutiva de genes PR e incrementa la defensa sistémica para una cepa virulenta de *P. syringae*, así como para el omiceto *Peronospora parasítica* (Petersen *et. al.*, 2000).

Por lo tanto existen varios elementos que alertan al tejido sistémico durante el ataque de un patógeno, los cuales van desde: hormonas, moléculas reactivas, péptidos pequeños, cascadas de cinasas y receptores, esto hace que sea un proceso muy eficiente e incrementa las posibilidades de supervivencia de la planta. Sin embargo, la interacción planta-patógeno no sólo altera las defensas locales y sistémicas en plantas, sino también a una serie de procesos fisiológicos importantes en el mantenimiento de su metabolismo (Biemelt *et. al.*, 2006; Hammerschmidt *et. al.*, 2009).

### **3.4 Alteraciones en el contenido y en el metabolismo de carbohidratos de las plantas durante la interacción planta-patógeno.**

En la interacción compatible entre plantas de tabaco infectadas con *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*, se observó que se inhibe la actividad fotosintética del huésped (Kocal *et. al.*, 2008). De manera similar, esta actividad se inhibe durante la interacción incompatible entre tabaco y *Phytophthora nicotianae* (Scharte *et. al.*, 2005).

En *Arabidopsis* la fotosíntesis se redujo cuando se infectó con dos cepas distintas de *P. syringae*, efecto notorio después de las 48 h en la cepa virulenta y a las 3 h post infección cuando se usó la cepa avirulenta (Bonfig *et. al.*, 2006). La temporalidad de la reducción podría indicar que el metabolismo está realizando ajustes distintos dependiendo de la cepa.

Las implicaciones de la reducción en la tasa fotosintética son varias para la planta, una de ellas es que el tejido infectado necesitará un aporte de carbohidratos, de los tejidos vecinos para cubrir su metabolismo primario y también desarrollar la defensa. Así la hoja fotosintética infectada que habitualmente es un tejido fuente de nutrimentos, cambia su metabolismo para ser un tejido demandante de carbono como lo son las flores, frutos, raíces entre otros (Roitsch *et. al.*, 2003). La permanencia del patógeno en los espacios intercelulares de la célula vegetal,

también lleva a la reducción de la poza de nutrientes disponible para la planta (Roitsch *et. al.*, 2003).

El cambio en la disponibilidad de nutrientes puede percibirse como una señal para modificar la expresión de genes. Algunos carbohidratos como la glucosa también tienen una participación como moléculas señal para regular diferentes procesos fisiológicos como la germinación, el desarrollo de la plántula, la raíz, el tallo, la fotosíntesis, el metabolismo del carbono, del nitrógeno, la floración y la senescencia (Smeekens *et. al.*, 2000; Roitsch *et. al.*, 2004; Rolland *et. al.*, 2006). No es claro como los carbohidratos, su metabolismo y las respuesta de defensa se encuentran reguladas durante la interacción planta-patógeno (Biemelt *et. al.*, 2006).

Existe evidencia que durante la interacción planta-patógeno no solo ocurren cambios en el metabolismo secundario, sino profundas modificaciones en el metabolismo primario. Lo anterior ha sido observado en el estudio metabolómico que se realizó en células en suspensión de la planta *Opium poppy*, a las cuales se les infectó con el micelio del hongo *Botritis cinerea* (Zulak *et. al.*, 2008). Las concentraciones de glucosa, sacarosa y fructosa disminuyeron conforme aumentaba el tiempo de la exposición al inductor, mientras que aparecían en mayor concentración los intermediarios glucolíticos y del ciclo de Krebs, lo que sugiere que la respiración se encuentra incrementada, tal vez para proveer de energía para la biosíntesis de los intermediarios o productos del metabolismo secundario. Interesantemente, los autores encontraron un aumento en la concentración de la eritrosa-4-fosfato y poca cantidad del siguiente metabolito de la vía, la ribulosa-5-fosfato, así como de la enzima ribulosa-1,5-fosfato. Lo anterior indica que la fijación de CO<sub>2</sub> se encuentra afectada y que se está desviando la eritrosa-4-fosfato posiblemente a la vía del shikimato (Zulak *et. al.*, 2008). Lo anterior sugiere una regulación coordinada entre el metabolismo del carbono, la fotosíntesis y el proceso de defensa.

En favor de lo anterior se ha encontrado que el ácido jasmónico, hormona que aumenta en la planta en respuesta al ataque por herbívoros o patógenos necrótrofos, reprime la expresión de la RbcL (la subunidad grande de la rubisco) a nivel traduccional (Creelman *et. al.*, 1997). Berger y colaboradores en 2007 encontraron que la capacidad fotosintética medida como la fluorescencia de la clorofila a, disminuye localmente en la hoja infectada 24 h después de la infección de *Arabidopsis* con *P. syringae* y que el tratamiento con el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA por sus siglas en inglés), un precursor biosintético del ácido jasmónico, también disminuye la fluorescencia de la clorofila a niveles similares como lo hace *P. syringae*. De manera interesante, la cepa avirulenta de *P. syringae* reduce la fluorescencia de la clorofila antes que la cepa virulenta, lo que llevó a los autores a sugerir que los cambios en la clorofila pueden ser utilizados para monitorear el inicio de la infección y eventualmente a discriminar entre diferentes tipos de estrés abióticos y diferentes patógenos. Propuesta interesante que tendría una implicación biotecnológica a favor del control de plagas en cultivos de importancia agronómica (Berger *et. al.*, 2007).

Finalmente un estudio que confirma la importancia de la represión de la fotosíntesis y su papel en la defensa, fue el que realizaron Bilgin y colaboradores en el 2010. Analizaron los datos de la expresión de genes (transcriptomas) de 22 diferentes formas de daño biótico en 8 plantas diferentes, específicamente de los genes fotosintéticos para determinar alguna reorientación del metabolismo hacia la defensa, buscando la regulación positiva de los genes involucrados en la señalización de la defensa y/o en las enzimas que apagan las ROS. Encontraron que se reducía la expresión de los genes que codifican para las proteínas en los centros de reacción fotosintética I y II, así como la ATP sintasa y los elementos del complejo cosechador de luz. Además, se encontró reducción en genes que codifican para algunas enzimas del ciclo de Calvin como la subunidad pequeña de la rubisco, la rubisco activasa, fosforibulosa cinasa y la sedoheptulosa 1,7 bifosfatasa (Bilgin *et. al.*, 2010).

En cuanto a los genes encendidos para la defensa variaron dependiendo del tipo de patógeno o elicitor utilizado, pero se hizo evidente que ante la infección con un patógeno hay un cambio dramático y diferencial en un gran número de genes relacionados con la defensa. Por ejemplo, en el caso de *Arabidopsis* infectada con *Agrobacterium tumefaciens* se indujo fuertemente la síntesis de ácido salicílico y su señalización (genes ICS1, EDS1, PAD4, NPR1 y PR-1), suprimió los genes de la señalización y síntesis de ácido jasmónico, la hormona antagonista del salicílico (AOS, CYP74A, aleno oxido sintasa, AOC, aleno oxido ciclase, COI1 y JMT). Una importante consideración es que la reducción en la expresión de estos genes no necesariamente se traduce en una pérdida o reducción en la función, no obstante la anterior reducción de los genes fotosintéticos por un ataque biótico y el cambio en la expresión de genes de defensa, lleva preguntarse si ésta es una respuesta adaptativa y cómo se regula (Bilgin *et. al.*, 2010).

#### **3.4.1 La invertasa y su papel en la patogénesis**

La disminución en la transcripción de genes fotosintéticos no solo ocurre durante la interacción de la planta con un patógeno, sino también se encuentra en otros tipos de estrés ambiental, como la salinidad, la sequía, las bajas temperaturas (Saibo *et. al.*, 2009). Es posible que existan elementos comunes en la región del promotor de los genes fotosintéticos y los genes involucrados en el metabolismo de azúcares y en los de la detoxificación de ROS, lo que podría llevar a una respuesta transcripcional al estrés abiótico altamente coordinada (Rolland *et. al.*, 2006).

Lo anterior apunta a que podrían encontrarse elementos comunes que modifican el metabolismo primario y secundario para responder al ataque. Uno de éstos podría ser el cambio en la poza de carbohidratos, que como se mencionó anteriormente no solo son recursos energéticos y de esqueletos carbonados sino también una señal que puede modificar la expresión de genes (Scharte *et. al.*,



2005; Bonfing *et. al.*, 2006). En este sentido se tienen evidencias de que ante el ataque por patógenos la actividad de las invertasas cambia (Roitsch *et. al.*, 2003).

Las invertasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de la sacarosa produciendo, glucosa y fructosa. Las invertasas son un conjunto de isoenzimas, con distintos pH óptimos, puntos isoeléctricos y localización subcelular (pared celular, vacuolar y citoplasmática) (Roitsch *et. al.*, 2004). Su expresión y actividad se modifica cuando las plantas están expuestas a una gran variedad de estímulos y a últimas fechas ha sido estudiada durante la interacción planta-patógeno (Roitsch *et. al.*, 2003).

El análisis de numerosos sistemas ha llevado a la hipótesis de que el carbono es movilizado en la planta a través de la actividad de las enzimas que lo usan, la invertasa y la sacarosa sintasa (enzima citoplásmica que produce UDP-glucosa y fructosa) (Hammond, 2008). De acuerdo a esta hipótesis la hidrólisis de sacarosa en los apoplastos o intracelular, supone una disminución en su concentración y por tanto una solicitud o demanda de más sacarosa a las células (Koch *et. al.*, 2004; Roitsch *et. al.*, 2004; Hammond *et. al.*, 2008).

En vista de que las invertasas tienen una actividad mayor que la sacarosa sintasa y que adicionalmente se encuentran en diferentes compartimentos subcelulares se ha asociado su actividad a la iniciación y expansión de tejidos demanda (tejidos no fotosintéticos) (Hammond *et. al.*, 2008).

Coincidentemente con el aumento en la actividad de las invertasas, se ha observado una elevada expresión de los transportadores de hexosas en algunos sistemas vegetales, lo que supone la entrada del carbono de las hexosas al interior celular (Sherson *et. al.*, 2003). Se ha planteado que la maduración y almacenamiento de un tejido demandante es facilitado por cambios en relación del “estado de glucosa celular” mediado por la hidrólisis de la sacarosa y el transporte de sus productos (Roitsch *et. al.*, 2003; Koch *et. al.*, 2004).

La regulación de la invertasa a nivel transcripcional se produce durante el crecimiento y el desarrollo, como consecuencia de un cambio en la poza de hexosas en los tejidos de las plantas y por diversos estímulos ambientales (Sherson *et. al.*, 2003).

Relacionado con la defensa se ha observado que durante la interacción *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, se incrementó la actividad de la invertasa de pared celular de planta (Herbers *et. al.*, 2000; Hayes *et. al.*, 2010). Ocurre lo mismo durante el ataque con otros patógenos como los hongos y virus. Lo que planteó la pregunta de qué si el patógeno de manera específica aumenta la actividad de la misma.

Bielment y colaboradores demostraron que durante la infección temprana (hasta las 24 h) no hay cambio en el contenido de hexosas de la hoja ni en la transcripción de la invertasa de pared celular, pero después de las 48 h de la infección con *Xanthomonas campestris* hay un aumento discreto en la transcripción y actividad de la invertasa de la pared celular tanto de jitomate y chile, que coincide con un aumento pronunciado en la cantidad de hexosas en las hojas. Sin embargo, de manera inesperada encontraron que una cepa de bacteria con una mutación en el sistema T3SS produjo un aumento mayor en la actividad de invertasa de la planta a las 48 h, 3 veces más que la cepa silvestre, simultáneamente los niveles de hexosas disminuyen drásticamente (Biemelt *et. al.*, 2006).

Lo anterior indica que hay un efecto dual de la bacteria, a tiempos cortos uno o más efectores de la bacteria reducen la actividad de la invertasa retardando la señalización por hexosas y permitiendo que la bacteria colonice, y a tiempos posteriores el aumento en la actividad de las invertasas lleva a aumentar la disponibilidad de hexosas en los apoplastos para la nutrición de la bacteria (Kocal *et. al.*, 2008).

Tres efectores de la bacteria XopB, XopJ y AvrRxv suprimen la actividad inicial de la invertasa, así como la liberación posterior de esta supresión. Los dos últimos fueron identificados como parte de una familia que se propone actúan como proteasas modificadoras de ubiquitina (SUMO por small ubiquitin-like modifier), encontrando que en las cepas de *Xanthomas* hay otros tres efectores proteicos que caen dentro de esta familia (AvrXv4, AvrBsT, XopD) (Biemelt *et. al.*, 2006).

Lo anterior indica que el patógeno presenta herramientas moleculares para manipular la actividad de enzimas implicadas en la defensa.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Material biológico.

Se utilizaron plantas de jitomate variedad Río Grande de 5 a 8 semanas de edad y plantas de frijol variedad canario con 3 semanas de edad, crecidas en SunShineMix4 a una temperatura de  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  bajo condiciones de invernadero.

### 4.2 Obtención del inóculo bacteriano.

Se emplearon dos cepas de *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato* la virulenta y la avirulenta (AvrRpm1). Ambas cepas fueron crecidas a  $28^\circ\text{C}$  durante dos días en medio King B sólido adicionado con  $5\ \mu\text{g/mL}$  rifampicina, cuando se crecía a la cepa virulenta y  $5\ \mu\text{g/mL}$  rifampicina más  $3\ \mu\text{g/mL}$  tetraciclina para la cepa avirulenta (Anexo 2). Posteriormente se tomó una azada de  $2\ \text{cm}^2$  del cultivo en placa y se resuspendió en 20 mL de  $10\ \text{mM MgCl}_2$ , para obtener una densidad óptica a  $600\ \text{nm}$  de 0.15 que es equivalente a  $2 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC), la cual se diluyó para obtener la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC en  $100\ \mu\text{L}$  utilizada para infiltrar a la hoja.

### 4.3 Infiltración de las plantas.

Dos días antes de iniciar la infiltración se eligieron y marcaron las plantas a utilizar. Posteriormente, se infiltraron por el envés en la tercera hoja con el inóculo bacteriano mencionado arriba, utilizando una jeringa para insulina. La infiltración se llevó a cabo con la menor cantidad de aplicaciones posibles y secando el exceso de líquido de la hoja. Se utilizaron tres tipos de lotes control el primero corresponde a un lote de plantas que no fueron infiltradas. El segundo lote se hizo presión en las hojas con la jeringa pero no se inyectó líquido y en el tercer lote las hojas fueron infiltradas únicamente con una solución de  $10\ \text{mM MgCl}_2$  estéril. Los tres lotes de plantas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de crecimiento

mencionadas anteriormente. Se corroboró que los síntomas de la enfermedad producida por las dos cepas de *P. syringae* fueran los esperados, por lo que se infiltraron hojas de frijol con ambas cepas, los resultados fueron positivos (Anexo 3). Se procedió a realizar todos los experimentos infiltrando hojas de planta de jitomate.

A continuación se realizó la cuantificación de las concentraciones de carbohidratos en la hoja infiltrada, la hoja sistémica y del fluido apoplástico obtenido de las mismas hojas. Las muestras se tomaron a las 0, 4, 8, 16 y 24 h post infiltración. En cada ensayo se tomó la hoja infiltrada (tercera hoja) y la sistémica (cuarta hoja) de una misma planta por cada punto del curso temporal. Se realizaron en total 5 experimentos.

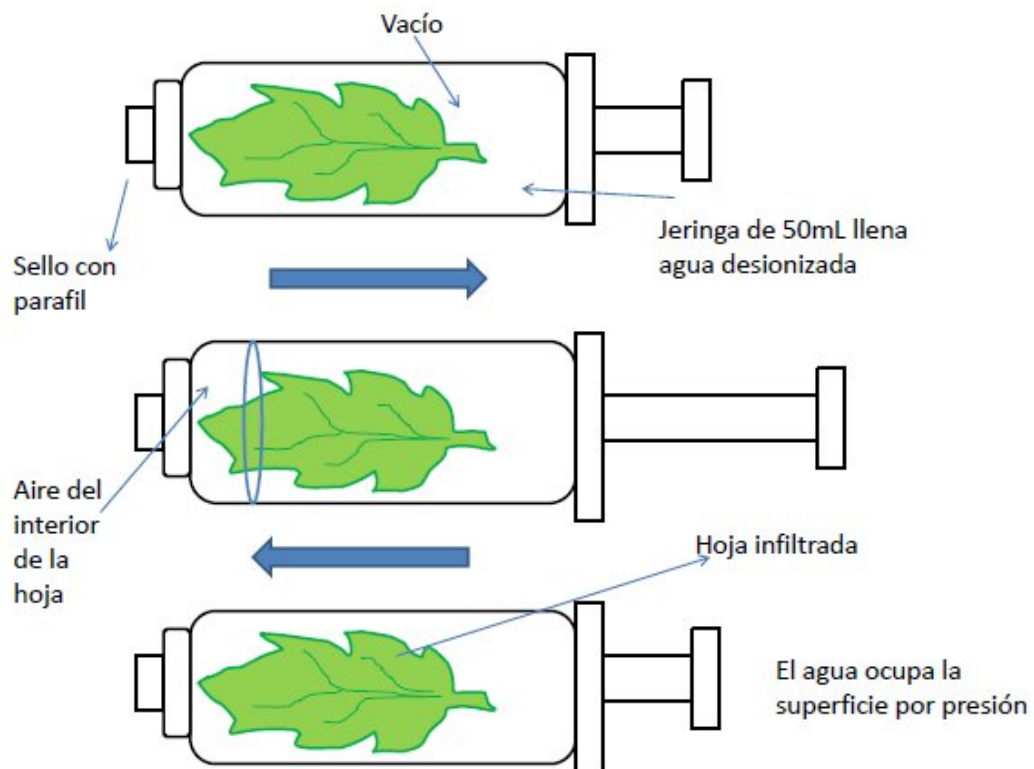
#### **4.4 Viabilidad de las células de la hoja mediante la tinción con azul tripano.**

Se tomaron folíolos infiltrados con las dos cepas (tercera hoja) para cada tiempo y una hoja control inoculada con 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Se sumergieron en una solución de lactofenol (Anexo 2) adicionada con 250 µg/mL del colorante azul de tripano y se hirvieron por 3 minutos. A continuación se retiró la solución y se agregó lactofenol sin el colorante. Se dejaron en agitación por 16h a temperatura ambiente. Finalmente, se montaron las muestras en un portaobjetos con glicerol al 50% para observarlas en el microscopio óptico a aumentos de 10X y 40X.

#### **4.5 Extracción del fluido del apoplasto.**

De las hojas infiltradas y sistémicas se tomó un folíolo por cada punto del curso temporal y de los controles se realizó en total 2 experimentos. Para extraer el fluido del espacio apoplástico se empleó la técnica de infiltración al vacío. Para ello se cortó un folíolo de la hoja, se pesó y se humedeció en agua desionizada, se secó nuevamente y a continuación se introdujo en una jeringa de 30 mL, la cual contenía 5 mL de agua y la punta de la misma se selló perfectamente con

parafilm. Después, se aplicaron ciclos de presión y de vacío (Figura 6). Finalmente, se sacó el foliolo, se secó con una sanita, se enrolló y se introdujo dentro de una punta de micropipeta de 5 mL, colocando a su vez en su extremo final un tubo de microfuga de 1.5 mL. Por último, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para coleccionar el extracto del apoplasto y se almacenó a -80 °C hasta su uso. La cuantificación de los carbohidratos se realizó bajo el siguiente protocolo:



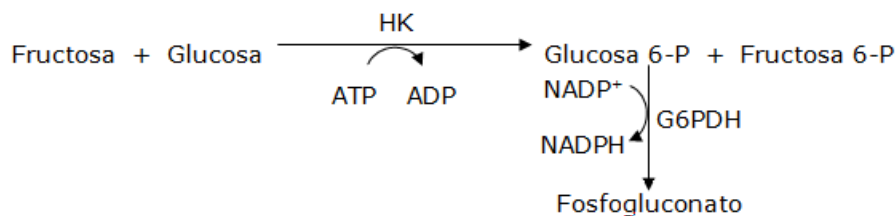
**Figura 6. Proceso de obtención de fluido apoplástico.** Se muestra la forma en que se aplicaron los ciclos de presión y de vacío sobre el foliolo de jitomate.

#### 4.6 Extracción y cuantificación de carbohidratos solubles: glucosa, fructuosa y sacarosa.

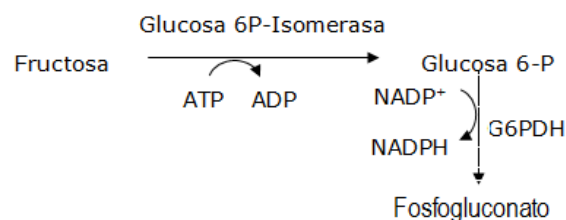
**Extracción de carbohidratos totales del foliolo.** Se tomó una hoja de jitomate y se molió en N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. La extracción etanólica se

realizó en 100 mg de tejido según el procedimiento de la referencia (Sánchez-Linares *et. al.*, 2012).

**Cuantificación de glucosa, fructuosa y sacarosa** se llevó a cabo a través de un método enzimático acoplado a la producción de NADPH, según se describe en (Martínez-Marcelo *et. al.*, 2008). Para ello se utilizó el reactivo de ensayo de glucosa, el que incluye a las enzimas hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para conducir a la formación del NADPH. El método se realizó en microplacas tipo ELISA, monitoreando la absorbencia a 340 nm el fundamento se describe mediante las siguientes reacciones:



La glucosa en el extracto se leyó primero después de que había ocurrido la formación de NADPH y posteriormente, a estos mismos tubos de reacción se les adicionó la enzima fosfoglucosa-isomerasa y ocurre un incremento en la absorbencia debido a la siguiente reacción.



Para la determinación de sacarosa primero se colocó la muestra en presencia de la invertasa (SIGMA cat. 1-9253) lo que llevó a la producción de las dos hexosas, las que se determinaron mediante las reacciones ya indicadas anteriormente.

#### **4.7 Análisis estadístico**

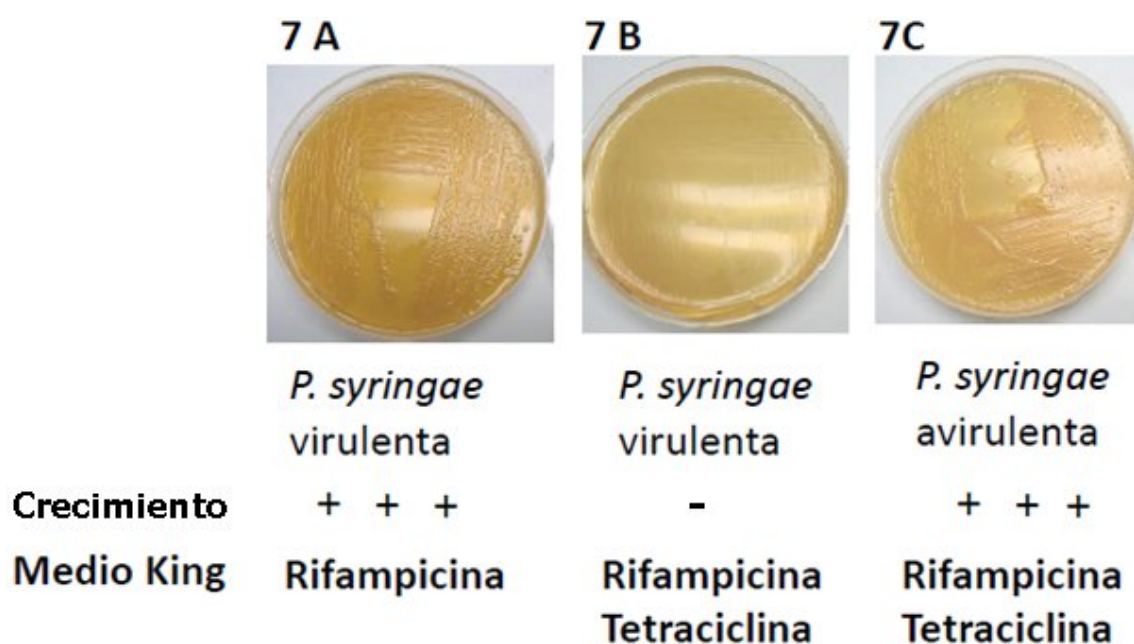
Para el análisis de los datos se utilizó el programa de PRISMA 6, mediante el cual se realizó un análisis de ANOVA de medidas repetidas de dos vías seguido de un análisis de Dunnett para la comparación entre tratamientos y el control con  $\text{MgCl}_2$  durante el curso temporal. Se empleó una  $\alpha=0.05$  y se consideró que los datos eran significativamente diferentes con un valor de  $P<0.0001$ . Las tablas del análisis de varianza se muestran en la sección de anexos.



## 5. Resultados

### 5.1 Cultivo selectivo de *Pseudomonas syringae* DC300 pv. tomato, virulenta y avirulenta.

Para confirmar que las cepas utilizadas en la infiltración de las plantas de jitomate, crecían específicamente en el medio con el antibiótico al que son resistentes, se realizó la siembra de *P. syringae* virulenta y avirulenta.



**Figura 7. Crecimiento de las dos cepas de *P. syringae* pv. tomato en medio selectivo.** En el panel **A** se muestra la cepa virulenta sembrada en medio King complementado con rifampicina. En el panel **B** la cepa virulenta sembrada en medio King complementado con rifampicina más tetraciclina. En el panel **C** la cepa avirulenta sembrada en medio King complementado con rifampicina más tetraciclina. Imagen representativa de 4 experimentos independientes.

Como se esperaba la cepa virulenta creció en el medio King complementado con rifampicina (Figura 7 A) y no en el medio adicionado de rifampicina y tetraciclina

(Figura 7 B), contrario a la cepa virulenta que si crece en presencia de ambos antibióticos (Figura 7 C).

Así mismo se hizo crecer a la cepa avirulenta en medio King complementado con rifamicina, ya que también presentó resistencia a este antibiótico (resultado no mostrado).

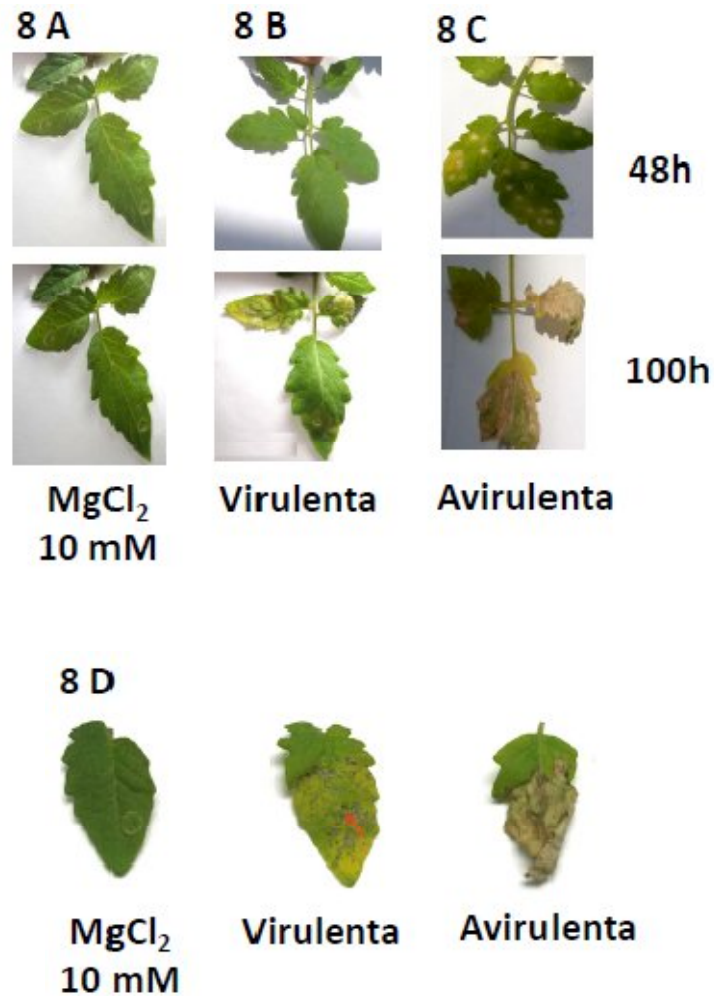
Por lo tanto, se estableció que las dos distintas cepas que se utilizarían en este estudio crecían mostrando el fenotipo de resistencia a antibióticos esperado y que se encontraban libres de contaminación.

## **5.2 Optimización de la técnica de infiltración de las hojas de jitomate para observar los síntomas de la enfermedad.**

Para estandarizar las UFC que se utilizaron en los distintos experimentos, se infiltraron plantas de frijol (ver Anexo 3) y de jitomate con dos distintas concentraciones  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^6$  UFC tanto de la cepa virulenta y avirulenta de *P. syringae*. La que resultó más adecuada para observar los síntomas de la infección fue  $1 \times 10^6$  UFC. Como control, se inoculó otra planta con 10 mM  $MgCl_2$  y se realizó un seguimiento de las plantas hasta que presentaran los síntomas clásicos de enfermedad y de respuesta hipersensible.

En el jitomate los síntomas de enfermedad ocasionados por la cepa virulenta, fueron visibles hasta las 100 h post-infiltración (Figura 8 B), donde se aprecian a simple vista los putos necróticos y marchitez. En ese tiempo, las plantas de jitomate infiltradas con la cepa avirulenta, estaban secas y muertas (Figura 8 C), sin embargo los primeros síntomas de la respuesta hipersensible ocurrieron a las 48 h post-infiltración. Por último, el control permaneció sin cambios (Figura 8 A).

En conclusión, la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC permite observar los efectos característicos de las dos cepas de *P. syringae* en jitomate, por lo que se decidió utilizar esta concentración para infiltrar a las plantas en los siguientes experimentos.



**Figura 8. Desarrollo de la infección de en plantas de *Solanum lycopersicum* infiltradas con  $1 \times 10^6$  UFC. A.** Foliolos infiltrados con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. **B.** Foliolo infiltrado con la cepa virulenta y **C.** Foliolo infiltrado con la cepa avirulenta. Se realizó el seguimiento 100 h post-infiltración y se muestran sólo 48 y 100 hpi. **D.** Acercamiento de foliolos con los síntomas respectivos de cada cepa. Las fotografías son representativas de 4 experimentos.

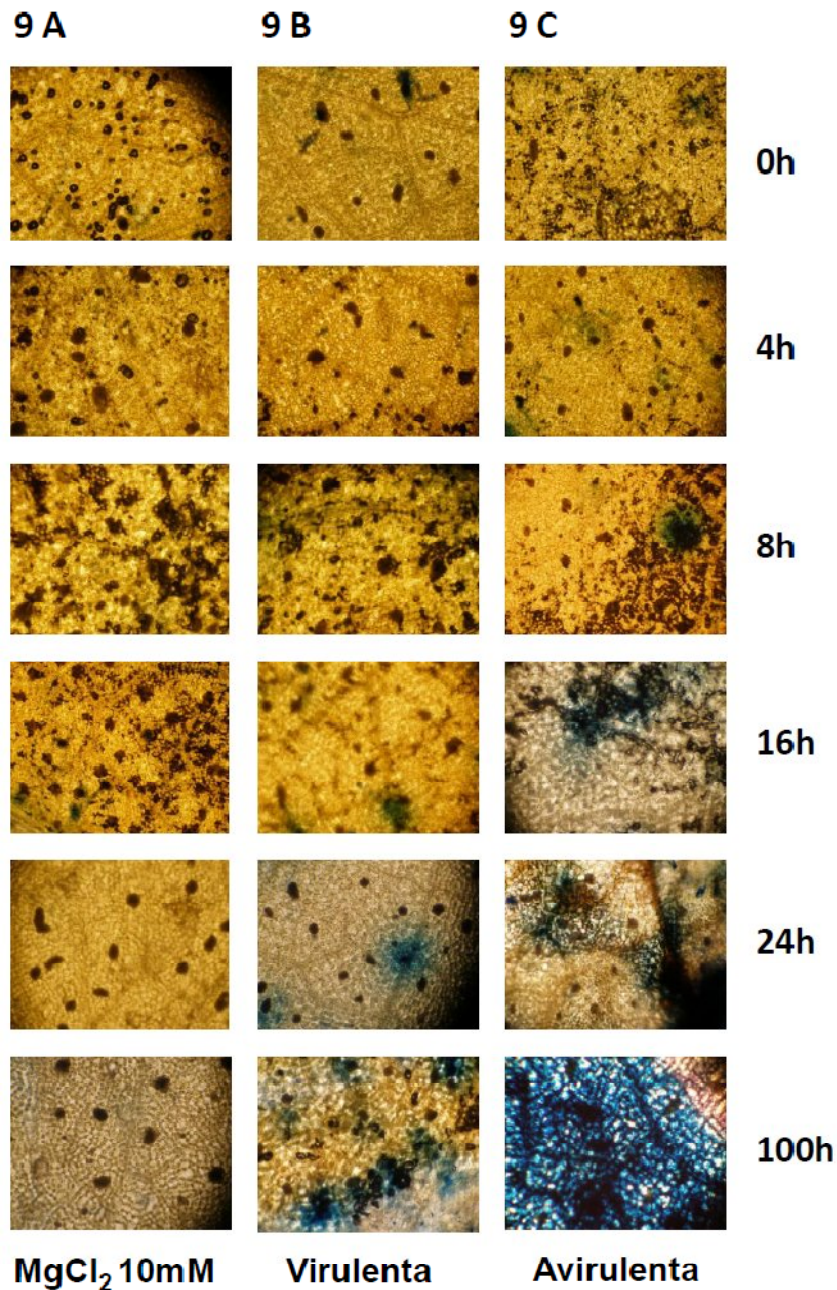
### **5.3 La viabilidad celular en las hojas infiltradas con los distintos tipos de cepas de *P. syringae*.**

Con la finalidad de comprobar la muerte de las células de la hoja y determinar el tiempo en el cual las células permanecían vivas durante la infección con las dos cepas de *P. syringae*, esto último para garantizar que los efectos moleculares reportados en este estudio se deban a los cambios que está sufriendo el tejido vivo, se realizó un curso temporal de detección de la viabilidad celular a los tiempos de 0, 4, 8, 16, 24 y 100 h.

En la Figura 9 A se muestra el tejido foliar de las plantas control de jitomate. El  $MgCl_2$  (solución en la que se resuspendían las cepas) no ocasionó cambios en la viabilidad celular; no se observan zonas del tejido teñidas con azul de tripano. En el panel 9 B se muestra el tejido foliar de hojas infiltradas con la cepa virulenta, a partir de las 24 h se observaron teñidas algunas zonas pequeñas del tejido. La presencia de un mayor número de células muertas se obtuvo hasta las 100 h post-infiltración, comprobando que la mayor parte del tejido está muerto (Figura 8 B).

Se ha descrito que la muerte celular ocasionada por la cepa virulenta fue gradual, probablemente se debe a que el patógeno está tomando los nutrientes que produce la célula vegetal para realizar sus funciones vitales (Abramovitch *et. al.*, 2004).

En la Figura 9 C, se observa el tejido foliar infiltrado con la cepa avirulenta, en el que hubo a las 4 h zonas discretas del tejido teñidas con el colorante y que van aumentando al transcurrir el tiempo de infección. La hoja muere rápidamente cuando es infiltrada con la cepa avirulenta de *P. syringae*, lo cual se ha relacionado con la HR durante el desarrollo de la inmunidad del tipo ETI (Mur *et. al.*, 2008; Reape *et. al.*, 2010).



**Figura 9. Viabilidad celular en el tejido foliar durante las 24h de infección de *Solanum lycopersicum* infiltradas con  $1 \times 10^6$  UFC de *P. syringae*.** De arriba hacia abajo curva temporal de tinción con el colorante azul de bromofenol. **A.** Tejido foliar infiltrado con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, no presenta muerte celular. **B.** Tejido foliar infiltrado con la cepa virulenta. **C.** Tejido foliar infiltrado con la cepa avirulenta. Se realizó el seguimiento de 0 a 24 h y se muestran las 100 h, ya que es el tiempo en el cual se observaron a simple vista los síntomas en las plantas infiltradas. Las fotografías fueron tomadas usando el objetivo 10X y son representativas de 3 experimentos.

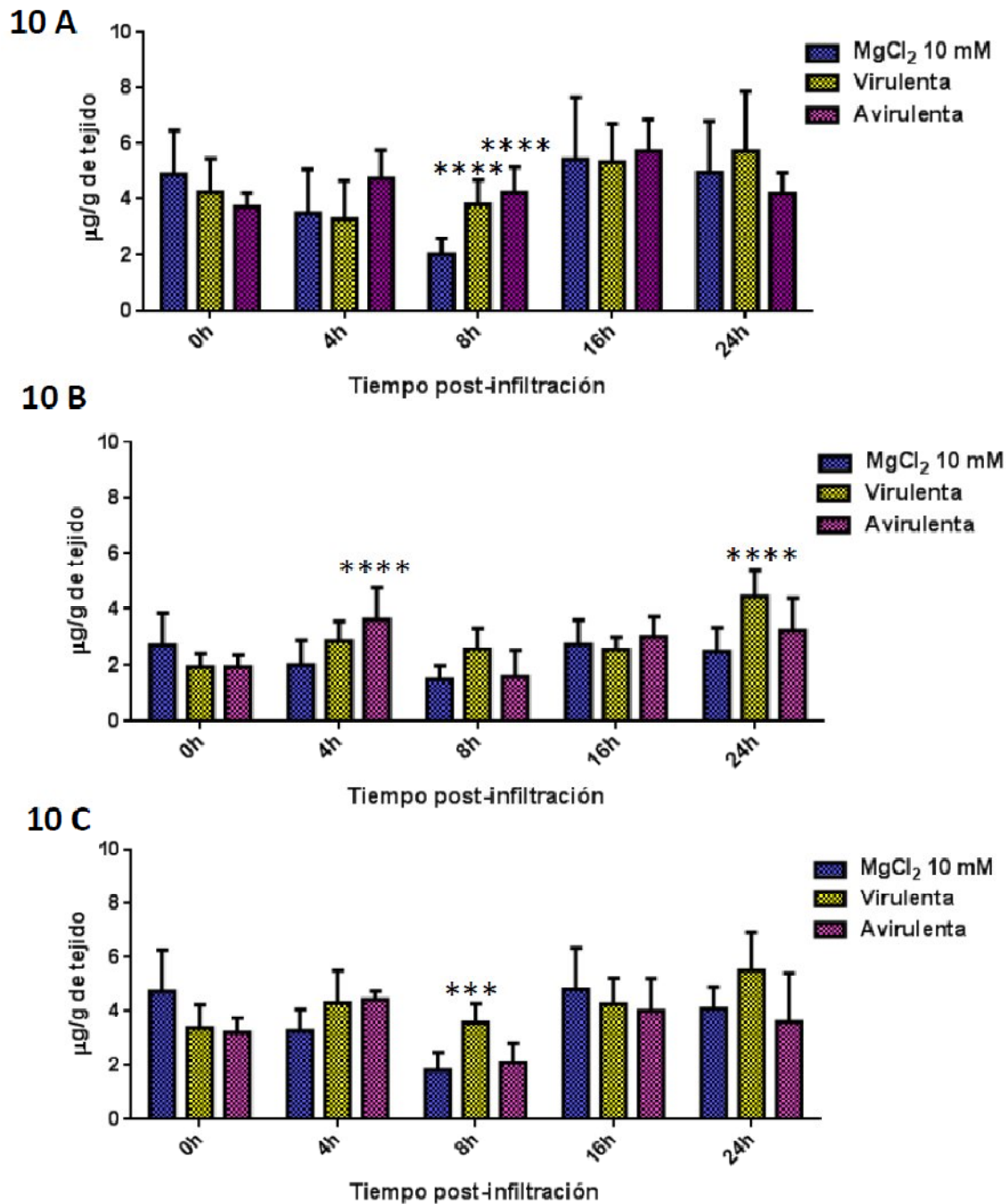
#### **5.4 Cambios en los carbohidratos solubles en hojas de jitomate infectadas con *P. syringae* virulenta y avirulenta.**

En las plantas, los carbohidratos se han reconocido no solo como fuente de esqueletos carbonados y energía sino también como moléculas señal. La señalización por carbohidratos se ha sugerido que contribuye a la respuesta de defensa de la planta ante la invasión de microorganismos (Ponciano *et. al.*, 2003, Bolouri-Moghaddam *et al.* 2012). Debido a que los eventos de señalización celular suelen presentarse a tiempos cortos, se decidió cuantificar la cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa durante las primeras 24 h de infección, tomando como control los niveles de los carbohidratos en las hojas infiltradas con una solución 10 mM MgCl<sub>2</sub>, aunque hay que mencionar que se hicieron otros controles como la hoja sin herida y la hoja solo presionando con la jeringa, estos resultados se encuentran en el anexo 4. Los niveles de carbohidratos se midieron en los extractos etanólicos (carbohidratos totales) de las hojas o en el apoplasto. Los resultados fueron analizados con una ANOVA de dos factores de medidas repetidas seguido del método de Dunnett. El resumen de los valores significativos se encuentra en el anexo 5.

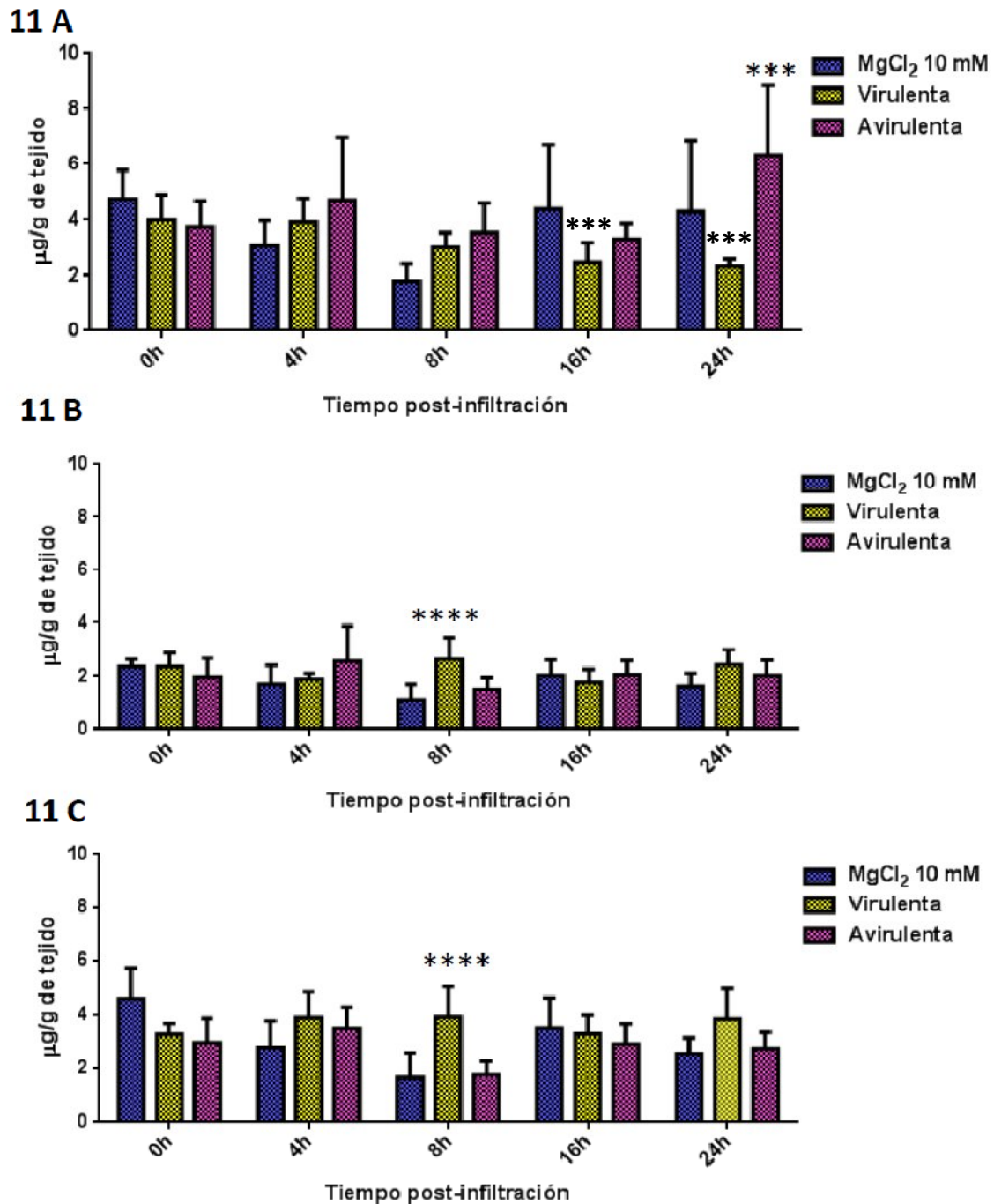
Al comparar el contenido de sacarosa de los extractos de hojas infiltradas con bacteria aumentó a las 8 h independiente del tipo de cepa infiltrada ( $P < 0.0001^{****}$ ) (Figura 10 A).

El contenido de glucosa total aumento a las 24 h en la hoja infiltrada con la cepa virulenta ( $P < 0.0001^{****}$ ); mientras que al infiltrar con la cepa avirulenta se detectó el incremento de glucosa a las 4 h ( $P < 0.0001^{****}$ ) (Figura 10 B).

Por otra parte, el contenido de fructosa total en las hojas infiltradas se incrementó a las 8 h ( $P < 0.0001^{***}$ ) al infiltrar con la cepa virulenta y mientras que la cepa avirulenta no produjo un cambio significativo en fructosa (Figura 10 C).



**Figura 10. Carbohidratos en el extracto total de la hoja infiltrada.** La hoja control fue infiltrada con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las plantas tratadas con la cepa virulenta y avirulenta fueron infiltradas en la tercera hoja (infiltrada). Los extractos etanólicos de hojas se utilizaron para cuantificar los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** sacarosa, **B** glucosa y **C** fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos factores seguido de una prueba de Dunnett.



**Figura 11. Carbohidratos en el extracto total de la hoja sistémica.** La hoja sistémica fue la cuarta hoja, los tratamientos de infiltración con 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (control) y con la cepa virulenta y avirulenta se realizaron en la 3er hoja (infiltrada). Los extractos etanólicos de las hojas sistémicas se utilizaron para cuantificar los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** sacarosa. **B** glucosa y **C** fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos factores seguido de una prueba de Dunnett.



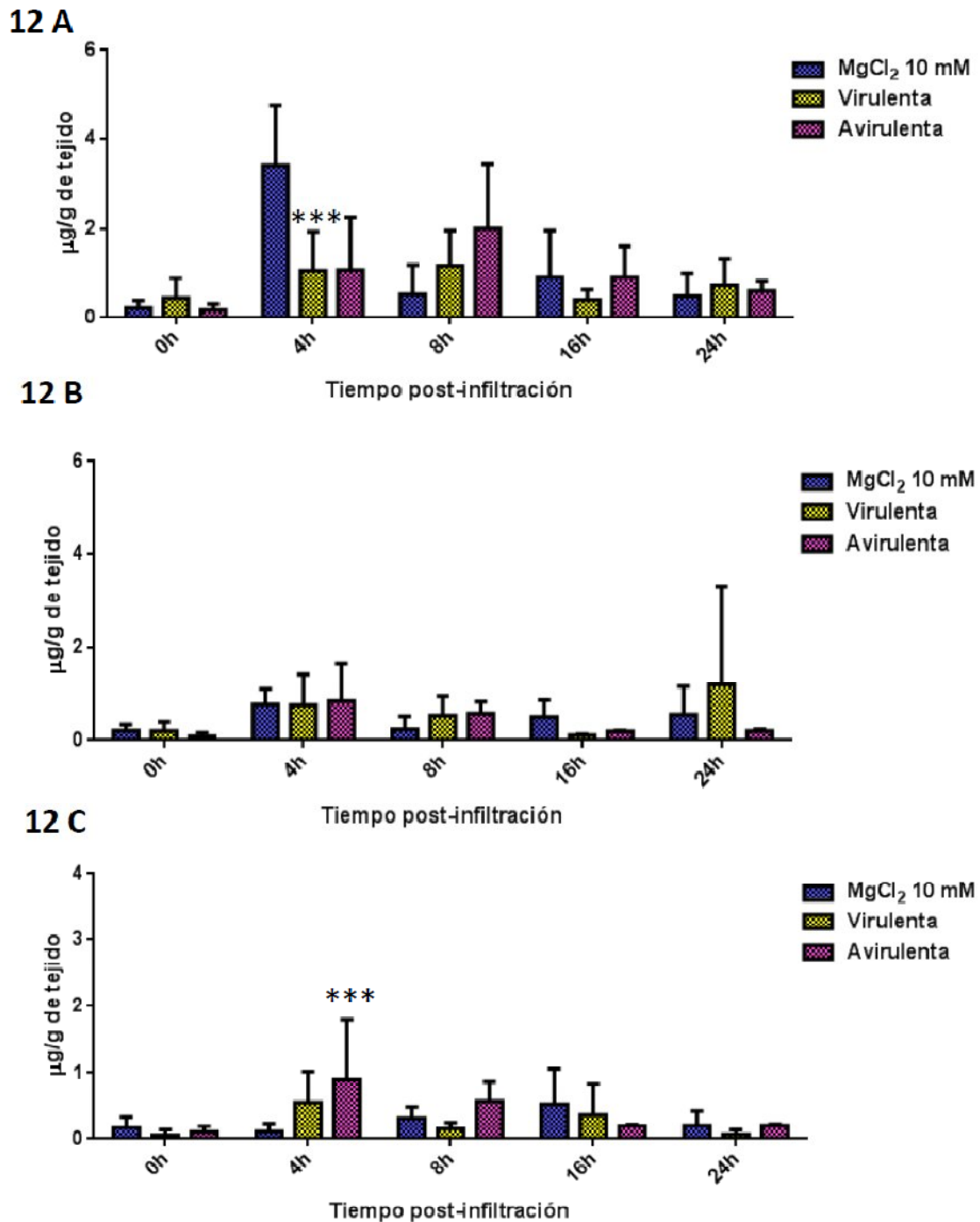
La respuesta de la planta ante la infección no solo ocurre en el sitio de la infección (Huang *et. al.*, 2005; Shulaev *et. al.*, 1997, Li *et. al.*, 2004), por lo que era importante determinar si el tejido no infiltrado al que denominamos sistémico también presentaba cambios en los contenidos de carbohidratos totales (Figura 11).

En el tejido sistémico la sacarosa aumento a las 24 h cuando la planta fue infiltrada con la cepa avirulenta ( $P < 0.0001^{****}$ ), mientras que la infiltración con la cepa virulenta redujo su contenido a las 16 y 24 h aunque siendo significativamente diferente al control con un valor de  $P < 0.0052^{***}$  (Figura 11 A).

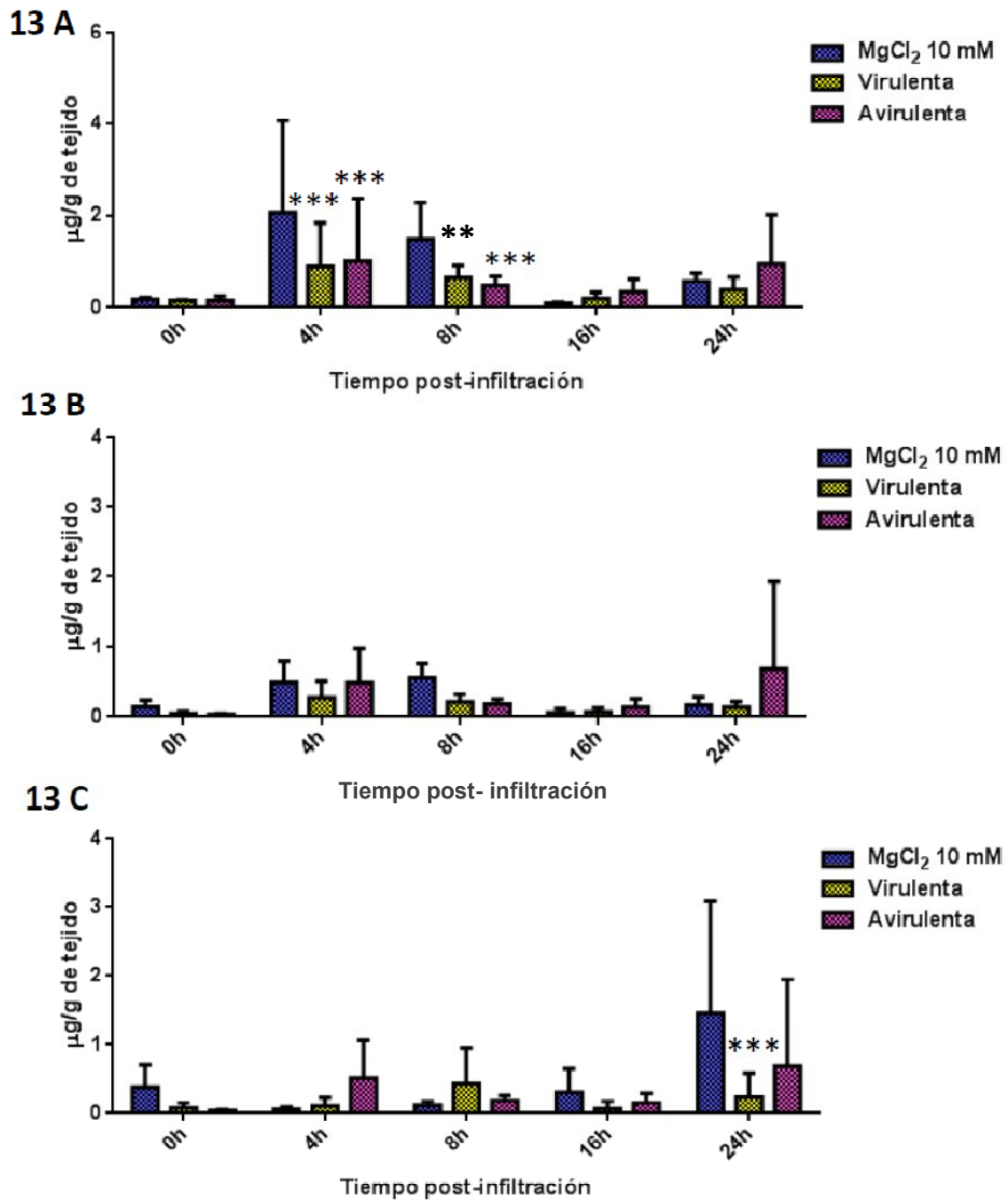
El contenido de glucosa y fructosa total aumentaron solo con la cepa virulenta y al tiempo de las 8 h ( $P < 0.0001^{****}$ )= glucosa,  $P < 0.0001^{****}$ = fructosa) (Figura 11 B y 11 C).

El apoplasto es un continuo que rodea a las células de la hoja, con un volumen variable pero mucho menor al del conjunto de células que rodea y con una composición compleja, en donde se pueden encontrar carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, entre otros, metabolitos que puede usar *P. syringae* para su metabolismo (Rico A. *et al.*, 2008), actividad que puede alterar la composición de carbohidratos en ese compartimento. Por lo anterior, se determinó el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en el apoplasto de hojas infiltradas con  $MgCl_2$  y con las dos cepas de *P. syringae*.

Se encontró una disminución en el contenido de sacarosa a las 4 h ( $P < 0.0020^{**}$ ) (Figura 12 A) y no se detectaron cambios en la glucosa (Figura 12 B) del fluido apoplástico de la hoja infiltrada con la cepa avirulenta, aunque si aumento la fructosa a las 4 h ( $P < 0.0065^{**}$ ). Por su parte, la cepa virulenta no modifico los contenidos de las dos hexosas (Figuras 12 A y 12 B), pero si disminuyó a las 4 h el contenido de sacarosa ( $P < 0.0003^{****}$ ) (Figura 12 A).



**Figura 12. Carbohidratos solubles en el apoplasto de la hoja infiltrada.** Las hojas control fueron infiltradas con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las plantas tratadas con la cepa virulenta y avirulenta fueron infiltradas en la tercera hoja (infiltrada). Los apoplastos se obtuvieron por la técnica de vacío y se cuantificaron los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** sacarosa, **B** glucosa y **C** fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos factores seguido de una prueba de Dunnett.



**Figura 13. Carbohidratos solubles en el apoplasto de la hoja sistémica.** La hoja sistémica fue la cuarta hoja, los tratamientos de infiltración con 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (control) y con la cepa virulenta y avirulenta se realizaron en la tercera hoja (infiltrada). Los apoplastos se obtuvieron por la técnica de vacío y se cuantificaron los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** sacarosa, **B** glucosa y **C** fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos factores seguido de una prueba de Dunnett.

En cuanto al contenido de carbohidratos en el apoplasto del tejido sistémico, se encontró que la sacarosa se redujo a las 4 y 8 h independientemente de la cepa utilizada ( $P < 0.0015$  \*\*\*,  $P < 0.0060$  \*\*) (Figura 13 A). Además, la cepa virulenta disminuyó el contenido de fructosa en los apoplastos a las 24 h ( $P < 0.0052$  \*\*\*) (Figura 13 C), mientras que la cepa avirulenta no modificó los contenidos de ambas hexosas en el apoplasto (Figura 13 B y 13 C).

## 6. Discusión

### 6.1 El curso de la infección de las hojas de jitomate es temporalmente diferente dependiendo de la cepa de *P. syringae* que se infiltre.

La infección en plantas por un patógeno de tipo virulento se caracteriza por tres estadios. En el estadio 1 de la infección se bloquean las defensas basales de la planta al introducir en la célula proteínas de virulencia. A su vez en la planta se modifica la toma de nutrientes, llevando a la zona infectada a comportarse como un tejido demandante de nutrimentos. Durante el estadio 2, las bacterias se multiplican e invaden más tejidos, aunque aún no se observan síntomas a simple vista (pueden ser horas o hasta días) (Abramovitch *et. al.*, 2004; López-Gresa *et. al.*, 2009). Finalmente, en el estadio 3 el tejido invadido se colapsa y muere (Abramovitch *et. al.*, 2004). Esto se encontró hasta las 100 h post-infiltración, donde se incrementaron las zonas muertas del tejido foliar del jitomate y a simple vista se pueden apreciar los puntos necróticos.

Durante la infección con la cepa avirulenta también se representan los distintos estadios. En el estadio 1 la infección reconoce al patógeno a través de la proteína AvrRPM1, que es introducida a la célula vegetal por el sistema de secreción del tipo III, después interacciona en el citoplasma con un receptor RPM1, lo cual lleva a la activación del sistema de defensa de la planta desencadenando la muerte celular (Pedley *et. al.*, 2003; Kim *et. al.*, 2009; Coll *et. al.*, 2011).

En este estadio aún no se observan síntomas a simple vista; sin embargo ha comenzado la muerte celular, debido a que los sistemas de defensa de la planta se han activado (Mur *et. al.*, 2008). Las plantas de jitomate presentaron a las 8 h síntomas de muerte debido a la *P. syringae* cepa avirulenta.

Se sabe que en los dos primeros estadios de la infección con la cepa avirulenta las especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico son muy importantes, ya que

regulan la muerte celular al activar a la metacaspasa-1 (Mur *et. al.*, 2008, Lacomme *et. al.*, 1999).

El tabaco al ser infectado con un virus puede inducir la expresión de la proteína PR1 desencadenando la muerte celular vía activación de Bax (proteína miembro de la inducción de muerte celular). La proteína PR1 es inducida en el modelo clásico de *Arabidopsis thaliana* – *Pseudomonas syringae*. A su vez en este modelo, AvrRPM1, contribuye a la avirulencia mediante la activación de RPS2 (un receptor de enlace a nucleótidos rico en leucina, NB-LRR), el cual puede participar en la respuesta de defensa basal contra bacterias de tipo avirulenta (Lacomme *et. al.*, 1999).

Finalmente, en el estadio 3 la hoja muere y se observó a las 100 h en este sistema de *Solanum lycopersicum*-*Pseudomonas syringae* cepa avirulenta). En el estadio 2 la HR se caracteriza a nivel celular porque tienen lugar los siguientes procesos: la contracción citoplasmática, la condensación de la cromatina, la expansión mitocondrial, la vacuolización y la ruptura del cloroplasto durante la fase final (Mur *et. al.*, 2008; Coll *et. al.*, 2011). Por lo que se propone que en otro estudio se determine alguno de estos parámetros durante la interacción de *P. syringae*-jitomate.

En las primeras 24 h es posible distinguir los efectos de las dos cepas de *P. syringae* en las plantas de jitomate y permite evaluar a los carbohidratos como moléculas señal al evitar los tiempos largos de infección. Por lo anterior se decidió determinar si los contenidos de carbohidratos cambiaban por efecto de la infección y si estos cambios diferían entre el tipo de microorganismo al que se enfrentaba la planta durante 0 y 24 h.

## **6.2 Únicamente la cepa avirulenta de *P. syringae* aumentó los contenidos de hexosas en las hojas infiltradas de jitomate a tiempos cortos de la infección.**

Un gran número de genes relacionados con la defensa son inducidos por carbohidratos, tales como: el inhibidor de proteasa II (Johnson *et. al.*, 1990), la chalcona sintasa (Tsukaya *et. al.*, 1991), PAR-1 y PR-3 (Herbers *et. al.*, 1995), además de los genes relacionados con la fotosíntesis y el metabolismo (Biglin *et. al.*, 2010), implicando a los carbohidratos como una señal que induce la defensa de las plantas (Berger *et. al.*, 2007). Sin embargo, se desconoce si dependiendo del tipo de interacción que se produce, compatible o incompatible se lleva a cabo una movilización de carbohidratos distinta o bien una señalización diferente.

En este estudio encontramos que los contenidos de carbohidratos cambian con respecto al tiempo discretamente en las hojas de jitomate, pero que lo hacen de manera distinta dependiendo de si la cepa es virulenta o avirulenta y también del compartimento examinado (Tabla 2).

A tiempos cortos de la infiltración (entre las 4 h y 8 h) con ambas cepas se detectó en los extractos totales de la hoja infiltrada un aumento en el contenido de sacarosa y solo en la cepa avirulenta se incrementaron también las hexosas tanto en el extracto total como en los apoplastos.

El aumento en el contenido de sacarosa coincide con otros estudios, por ejemplo a las 12 h post infiltración en un estudio de *P. syringae* y jitomate, aunque también se ha detectado incremento en la sacarosa en periodos de tiempo más largos como 10 días post-infiltración en la interacción *Arabidopsis-P. syringae* (Berger *et. al.*, 2007, Berber *et. al.*, 2010, Ward *et. al.*, 2010).

Además, se ha documentado el incremento en sacarosa no solo cuando las plantas interaccionan con *P. syringae*, sino también al exponer a la planta ante distintos patógenos como bacterias, hongos y virus, sugiriendo que es un proceso

fisiológico que podría estar relacionado con la defensa de la planta (López-Gresa *et. al.*, 2009; Ward *et. al.*, 2010).

Tabla 2. Resumen de los cambios detectados en los contenidos de carbohidratos por la infiltración de la tercera hoja de plantas de jitomate con las cepas de *P. syringae*. Solo se muestran aquellos cambios en los que la diferencia fue significativa,  $P < 0.0001$ .

Carbohidratos en:	Cepa	Tejido infiltrado			Tejido sistémico		
		S	G	F	S	G	F
Extracto total	Avirulenta	↑8 h	↑4 h	↑8 h	↑24 h	sc	sc
	Virulenta	↑8 h	↑24 h	sc	sc	↑8 h	↑8 h
Apoplasto	Avirulenta	sc	sc	↑4 h	↓4 y 8 h	sc	sc
	Virulenta	↓4 h	sc	sc	↓4 h	sc	↓24 h

sc significa similar al control; se marcaron con anaranjado los cambios detectados a tiempos prolongados de la infiltración de las cepas.

El aumento de sacarosa que se produce por ambas cepas a tiempos cortos podría **a)** responder a la aportación del carbohidrato por parte del tejido vecino para proveer de energía para los distintos procesos que se desencadenan en las células infectadas o que están montando su respuesta de defensa, o bien **b)** ser producto de una reducción en el importe del disacárido al interior de las células con el objetivo de concentrar sacarosa en el apoplasto y señalar un cambio en el metabolismo, en este sentido se ha observado que el incremento en sacarosa ocasiona la reducción de la actividad fotosintética a través de reducir la transcripción de la PEP carboxilasa, la enzima málica y la rubisco, reducción que se ha observado durante la interacción plantas con patógenos (Pontis, 1978; Kocal, 2008). Aunque a pesar de que la cepa avirulenta aumentó el contenido de sacarosa solo lo hizo en el extracto total y no en los apoplastos, por lo que es probable que este reduciendo la exportación y usando ese carbono para la

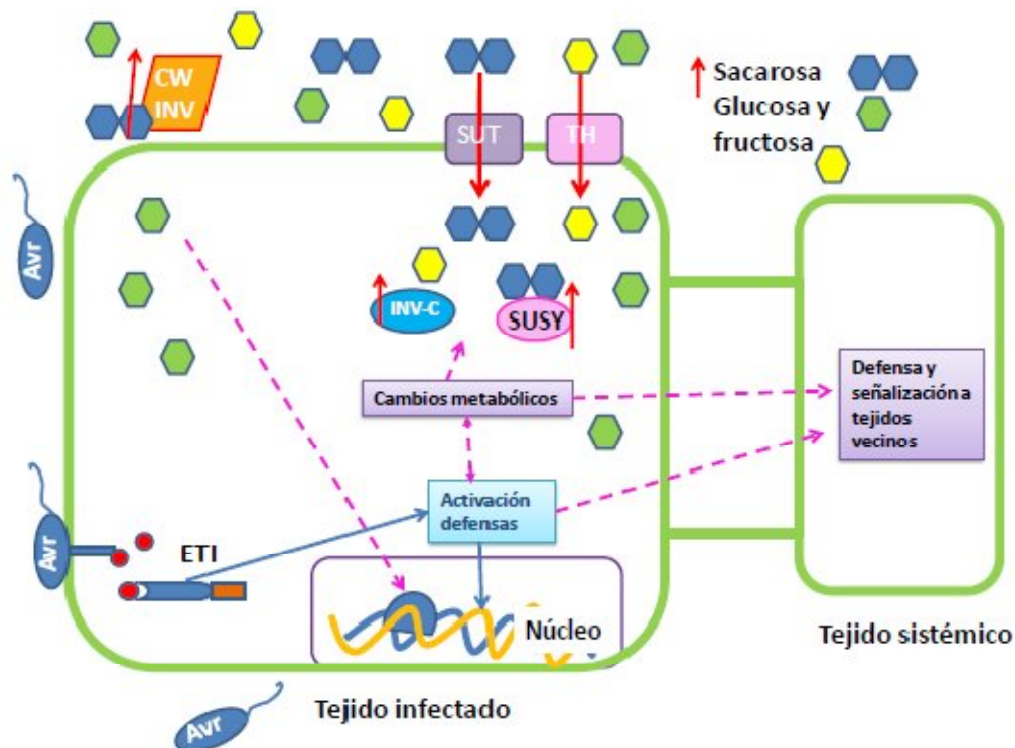


defensa o bien que lleve a cabo la demanda de carbono de otras fuentes externas como los tejidos vecinos.

Otra propuesta sería la de mantener un ambiente rico en carbono para el metabolismo del patógeno y así evitar que se movilice a otras zonas de la planta, sin embargo, esta parece ser una estrategia del patógeno para invadir, ya que hay varios microorganismos que llevan a cabo la manipulación de la transcripción de los transportadores de sacarosa y hexosas (los tipo SWEETs) de la planta por efectores de los patógenos, así se demostró en la interacción *Ustilago-Arabidopsis* y *P. syringae-Arabidopsis* (Chen *et. al.*, 2010). Lo anterior podría explicar porque la cepa virulenta incrementa el contenido de glucosa en la hoja infiltrada a las 24 h.

Análogos de sacarosa como la palatinosa y la turanosa inducen la expresión de Lin6, gen que codifica para una invertasa de pared celular de jitomate, también activa a la vía de las MAPK y reprime a la rubisco, efecto transcripcional en estos 3 genes que es similar al que provoca el evocador del hongo *Fusarium oxysporum lycopersici* (Sinha *et. al.*, 2002). La activación de las invertasas en la pared celular, llevaría a un incremento en el contenido de hexosas en los apoplastos, carbohidratos que habitualmente son para el metabolismo del tejido vegetal (Roitsch *et. al.*, 2004), sin embargo ante un estrés el incremento de hexosas funciona como una señal de que el ambiente no es favorable.

En este trabajo se encontró que la cepa avirulenta produjo un aumento transitorio y a tiempos cortos en el contenido de fructosa (4 h) en los apoplastos del tejido infectado y un aumento en fructosa y glucosa en el extracto total (4 h y 8 h) (Figura 14). El aumento en las hexosas podría sugerirse como una señal que indica que el metabolismo debe modificarse para que la planta se defienda (Roitsch *et. al.*, 2003; Bonfing *et. al.*, 2004 *et. al.*; Scharte *et. al.*, 2005), como se mencionó anteriormente la interacción entre la cepa avirulenta y jitomate es del tipo incompatible en donde la hoja infiltrada muere pero la planta continúa su crecimiento y permanece sana.



**Figura 14. Aumento del contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en el tejido infectado por *P. syringae* cepa avirulenta y su posible relación con la defensa de la planta.** El incremento de fructosa y glucosa podría llevar a la activación de las defensas desencadenando la HR y la producción de moléculas que señalicen para detener la invasión solo en el tejido infectado, ya que no ocurre el aumento en las hexosas por parte de la cepa virulenta en el tejido infectado. CWINV Invertasa de pared celular, TH transportador de hexosas, TS transportador de sacarosa, INVC invertasa citosólica, SUSY sacarosa sintasa.

Contrario a la cepa avirulenta, la cepa virulenta no modifica el contenido de hexosas a tiempos cortos ni en el extracto total, ni en los apoplastos, en esta interacción que es del tipo compatible sugerimos que la planta no tiene la señal de defensa, alto contenido de hexosas, y la bacteria virulenta puede continuar invadiendo y propagándose en la planta.

Sin embargo para apoyar el argumento anterior es necesario profundizar esta investigación midiendo como cambia la expresión y actividad enzimática de la invertasa y de sacarosa sintasas, así como la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis en los tejidos estresados al infiltrar glucosa, fructosa y/o sacarosa.

Un resultado que es interesante de analizar es que la cepa avirulenta aumentó no solo los contenidos de ambas hexosas en el extracto total, sino también la fructosa de los apoplastos. No se ha reportado que *P. syringae* utilice a este carbohidrato, sin embargo *Pseudomonas putida* posee un transportador para fructosa, probablemente por qué tiene la maquinaria no solo para utilizarla como fuente de carbono y energía sino como esqueleto para la formación de biocapas (Vicente *et. al.*, 1975). La biocapa a base de fructanos que ayuda al establecimiento de la colonia mejorado su virulencia y sobrevivencia y que probablemente *P. syringe* cepa avirulenta no posea ya que la fructosa se acumuló.

Otros patógenos como *X. campestris versicatoria* poseen efectores de virulencia que son importantes para la producción de exopolisacáridos bacterianos (ESP), como la enzima fructosa-bifosfato aldolasa (FbaB), que además tiene un papel importante en conducir a los productos de la ruptura aldólica de la fructosa hacia la glucólisis o gluconeogénesis (Guo *et. al.*, 1012) y que sería interesante buscar en ambas cepas de *P. syringae* utilizadas en este trabajo.

Por otra parte, se ha encontrado que la fructosa es un inhibidor de la transcripción de la invertasa, lo que podría evitar la señalización mediada por glucosa durante la defensa de la planta ante el patógeno (Isla *et. al.*, 1991), sin embargo, se desconoce la concentración a la funciona como inhibidor *in vivo*.

Resaltamos la importancia de la actividad de la invertasa en la defensa, ya que otros estudios han encontrado que hay una gran variedad de efectores en los patógenos que inhiben su actividad, tal es el caso de *X. campestris pv versicatoria*,

donde el efector XopB1 inhibe la actividad de invertasa durante la interacción del tipo compatible (Sonnewald, *et. al.* 2012; Lindeberg *et. al.*, 2012). Se ha planteado que la estrategia de los microorganismos para evitar la defensa de la planta a través de la señalización mediada por hexosas, es la de reducir la actividad de invertasa o bien obtener el carbono de otras fuentes que no sean hexosas.

### **6.3 La cepa virulenta de *P. syringae* aumentó los contenidos de hexosas en las hojas sistémicas de jitomate a tiempos cortos de la infección.**

La defensa de la planta contra la invasión ocurre no solo en el sitio en donde primero infectan, sino también en el tejido no infectado, por lo que se decidió estudiar el efecto de la infección en los contenidos de carbohidratos en los tejidos no infectados, en especial la hoja cercana a la hoja infectada.

A pesar de que ambas cepas aumentaron el contenido de sacarosa en el tejido infiltrado, no hubo incremento en la sacarosa en el extracto etanólico del tejido sistémico, pero si una reducción en el apoplasto a las 4 y 8 h para la cepa avirulenta y a las 4 h para la cepa virulenta (Tabla 2). Lo anterior sugiere que la sacarosa es exportada de las células del tejido no invadido hacia las células infectadas.

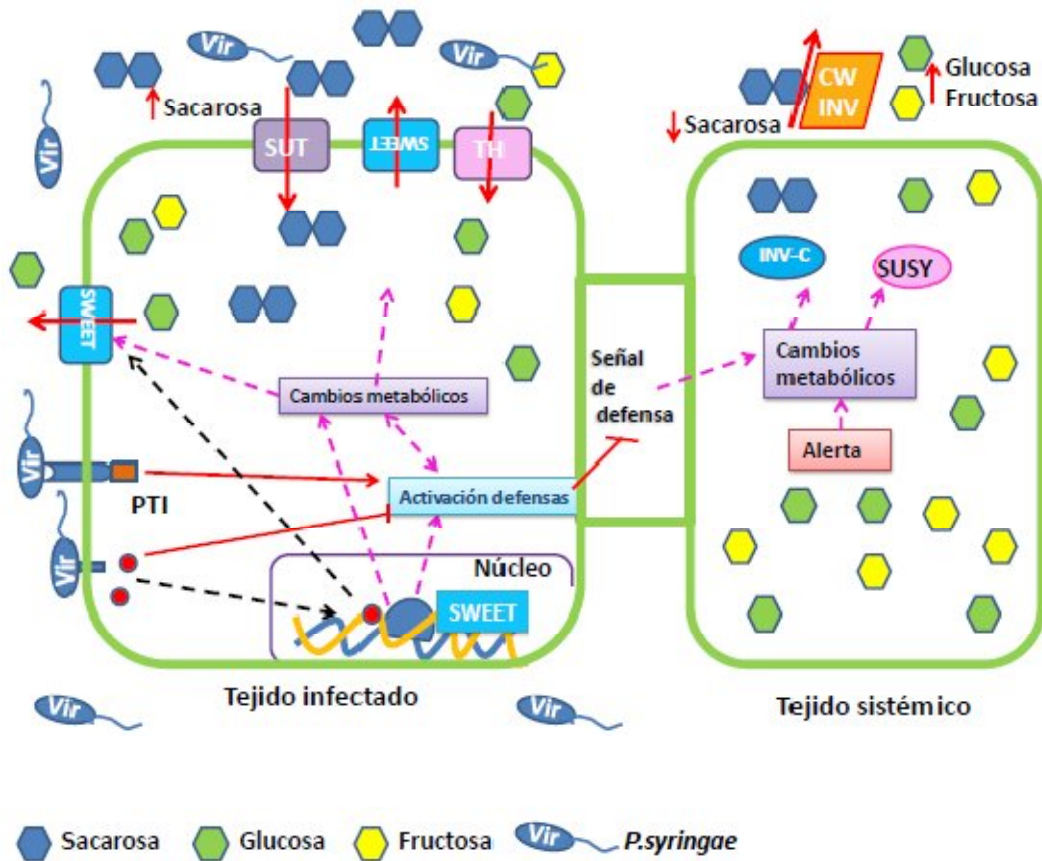
En cuanto al contenido de hexosas la cepa avirulenta no modifico su contenido, opuesto a lo encontrado en las hojas infiltradas con la cepa virulenta, ya que se detectó mayor contenido de ambas hexosas a las 8 h en el extracto total y a las 24 h en los apoplastos.

Los efectos de la infección por *P. syringae* en el contenido de carbohidratos en el tejido sistémico no se había reportado y aporta evidencia de que a poco tiempo de llevarse a cabo la infección, es posible encontrar que los tejidos vecinos responden como si también hubieran sido atacados por el patógeno. Durante la defensa hay mecanismos de señalización a larga distancia a través de las

PAMP's, PR's, NOS y ROS, SA, MAPK para montar la SAR y que se lleve a cabo el reforzamiento de la pared celular y la síntesis de proteínas relacionadas con la defensa (Biemelt *et. al.*, 2006; Hammerschmidt *et. al.*, 2009). En este sentido Sonnewald y colaboradores encontraron que los carbohidratos inducen los transcritos de proteínas relacionadas a la patogénesis PRQ de manera paralela al incremento en la producción de SA (Herbers *et. al.*, 1996).

Por otro lado, la reducción en el contenido de sacarosa apoplástica en conjunto con el aumento en el contenido de glucosa en el extracto total en las hojas infectadas con la cepa virulenta podría afectar de manera negativa a la planta. La glucosa es la principal fuente de energía en las células, es importante en la formación de almidón, también forma parte de la pared celular de las plantas, está asociada con el desarrollo temprano de órganos en crecimiento y juega un papel importante en el ajuste osmótico de células recién divididas (Moore *et. al.*, 2003; Chen *et. al.*, 2010; Major *et. al.*, 2010). Por lo que el incremento aunque transitorio de este carbohidrato en el extracto total asociado a la reducción de sacarosa en el apoplasto apuntan a que el carbono se está metabolizando más rápidamente en las células del tejido sistémico, efecto que no se observa en la interacción incompatible, pese al incremento en la sacarosa a las 4 h no hay cambio en el contenido de hexosas. Por lo tanto, la respuesta de la planta ante las dos cepas de *P. syringae* es distinta.

Es necesario para futuras investigaciones profundizar en elementos que puedan brindarnos evidencia de cuál es el papel en los inicios de una infección; si brindar sólo las hexosas, o bien funcionar como una molécula que amplifique la señal durante la defensa. Dentro de los elementos que pueden aportar evidencia en la señalización se incluyen la expresión y actividad de invertasas de pared celular (metabolitos), transportadores de sacarosa como los SUT y los SWEET, enzimas involucradas en el metabolismo de la misma en el citosol como las distintas invertasas y SUSY (Figura 15).



**Figura 15. Flujo de carbohidratos en la interacción compatible.** La vía en rojo muestra la activación de las defensas por PAMP's de *Pseudomonas syringae*, y la inhibición de las mismas mediante efectores de la bacteria. La acumulación de la sacarosa puede estar asociada con la nutrición del patógeno donde los efectores bacterianos pueden manipular el metabolismo, incrementando transportadores de eflujo de glucosa como los SWEET, donde la planta al percibir una menor cantidad de glucosa, incrementará la expresión de transportadores de sacarosa y de hexosas. Entrando en una competencia con el patógeno por los derivados fotosintéticos. También al incrementarse la demanda de nutrientes, podría incrementarse la actividad de las enzimas invertasas y SUSY. Los efectores bacterianos inhiben las señales de defensa que activan la SAR, dentro de las cuales se debe de encontrar la que se relaciona directamente con los cambios metabólicos y defensas dependientes de carbohidratos.

Además, se pueden emplear distintas plantas mutantes que no presenten defensa sistémica. Con lo que lograría observar la diferencia de que si los carbohidratos funcionan como una molécula señal, o bien se acumulan como consecuencia de una serie de eventos durante la defensa (Cao *et. al.*, 1997; Lei *et. al.*, 2001).

## 7. Conclusiones

La sacarosa se incrementa a las 8 h independientemente del tipo de cepa de *P. syringae* que infecte a las hojas de jitomate, sin embargo, el contenido de hexosas si es distinto, la cepa avirulenta incrementa las hexosas en el tejido infectado a tiempos cortos de la infección, 4 y 8 h, mientras que la cepa virulenta los incrementa pero en la hoja sistémica además de reducir la sacarosa en ese tejido. Lo anterior puede ser reflejo de mecanismos de respuesta distintos ante la infección o bien una forma distinta de percibir al atacante para responder con mecanismos distintos.

## 8. Perspectivas

- A) Determinar el contenido intracelular de carbohidratos. En el laboratorio se intentará realizar plantas mutantes con un sensor recombinante proteína FLIP, en el laboratorio se cuenta con tres sensores FLIP los cuales perciben específicamente glucosa (Doi *et. al.*, 1999; Lager *et. al.*, 2003; Fehr *et. al.*, 2004).
- B) También es importante realizar la medición de la expresión y actividad de enzimas involucradas en el metabolismo, señalización por carbohidratos y en la defensa contra el patógeno.

## 9. Anexos

### Anexo 1: Clasificación taxonómica de *Solanum lycopersicum*

El jitomate es una hortaliza que comúnmente es infectada con *P. syringae*. Es una planta perene que pertenece a la familia *Solanaceae*, anteriormente las descripciones morfológicas realizadas en material de herbario, ubicaban al jitomate dentro del género *Lycopersicon*; sin embargo, en un estudio reciente sobre la variabilidad del jitomate que fue realizado con marcadores genéticos y moleculares, demostró que está estrechamente relacionado con el género *Solanum*, por lo que *Lycopersicon esculentum* ha sido renombrado *Solanum lycopersicum* (Lozano, 2009). Varios datos señalan a México como la región de domesticación de la especie cultivable y se le conoce con el nombre jitomate en apego a como se le llamaba en la época prehispánica “*xitómatl*” (Vela *et. al.*, 2010).

<b>Reino:</b>	<b>Plantae</b>
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Asteridae
<b>Orden:</b>	Solanales
<b>Familia:</b>	Solanaceae
<b>Género:</b>	<i>Solanum</i>
<b>Especie:</b>	<b><i>S. lycopersicum</i></b>





**Anexo 2: Soluciones****Medio KING**

Para preparar 100 mL medio KING líquido se disuelven los siguientes reactivos en agua desionizada, después se esteriliza el medio a 120°C, 1 atm de presión durante 20min.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona Fluka cat.P0443	2 g
Glicerol REROQYFIN cat. R-095 (100%)	1 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Sigma cat. 3786	0.15 g
MgSO <sub>4</sub> Sigma cat.M2773	0.15 g

Los antibióticos se agregan después de esterilizar el medio King, dentro de la campana y después de que se enfrió a aproximadamente 40°C.

<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>
Rinfampicina (5g/1000µL)	5 µg / 5000 µL
Tetraciclina (3g/1000µL)	3 µg / 5000 µL

Para preparar medio sólido se le agrega 1.6g de Agar (Invitrogen cat. 30391).

**MgCl<sub>2</sub> 10 mM**

Pesar 0.0709 g de MgCl<sub>2</sub> y disolver el 1000 mL de agua estéril, finalmente se esteriliza a 120°C, 1 atm de presión durante 20 min.

**Solución teñidora con Azul de tripano**

Preparación de la solución de lactofenol:

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Ácido láctico J.T. Baker cat. 0194-02	10 mL
Fenol pH 8	10 mL
Glicerol REROQYFIN cat. R-095 (100%)	10 mL
Agua destilada	10 mL

Solución teñidora: Por cada 40 mL de Lactofenol agregar 10 mg de Azul de tripano (SIGMA catálogo T6146). Guardar el reactivo a 4°C.

La solución de lactofenol es también utilizada como solución desteñidora

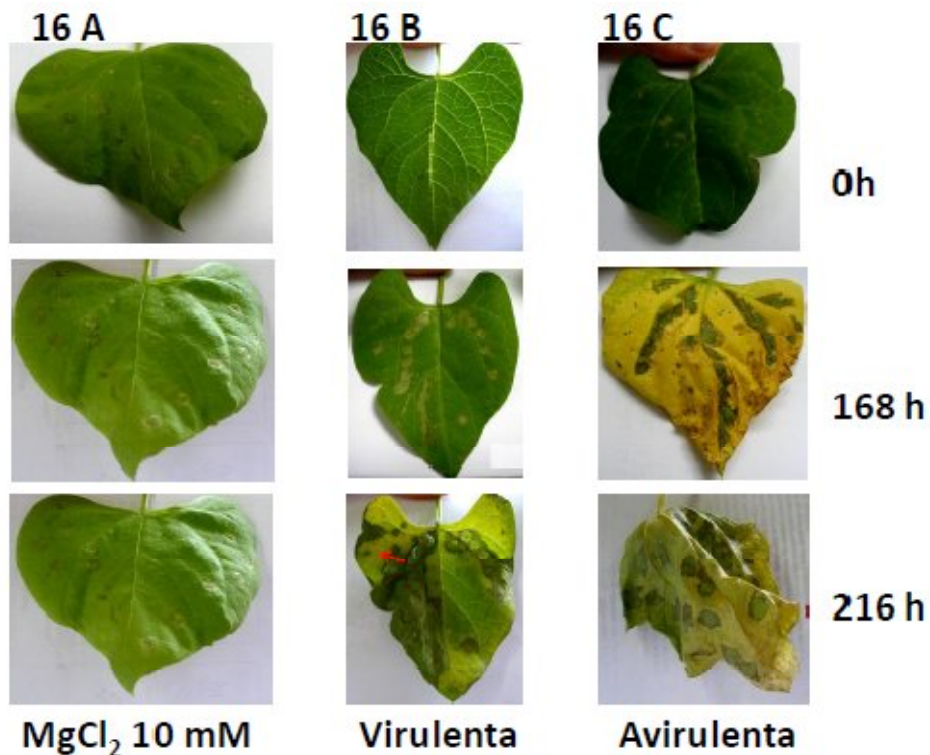
### **Anexo 3: Efecto de la infiltración de las hojas de frijol con *P. syringae***

Un control para observar los síntomas de la enfermedad fue la infiltración de plantas de frijol con las cepas avirulenta y virulenta de *P. syringae*. En la Figura 16 se muestra la infección en plantas de frijol, los síntomas de la enfermedad fueron visibles a las 126 h post infiltración con *P. syringae*. En el caso de la cepa virulenta, hubo una decoloración de la hoja y la aparición de puntos necróticos (Figura 16 B ver flecha roja). Estos resultados son similares a observaciones realizadas en plantas susceptibles de *Arabidopsis*, donde la infiltración con la cepa virulenta genera la enfermedad caracterizada por la aparición de lesiones en la superficie de la hoja. Lo anterior se debe a que esta cepa posee factores de virulencia que inhiben la respuesta basal de la planta y permiten que se desarrolle la infección. Por lo que esta cepa es utilizada para evaluar fenotipos resistentes y/o susceptibles (Abramovitch *et. al.*, 2003; Abramovitch *et. al.*, 2004; Abramovitch *et. al.*, 2006).

Por otro lado, cuando el frijol fue infiltrado con la cepa avirulenta (Figura 16 C), hubo una decoloración rápida de la hoja, así como la deshidratación y muerte de la misma (no mostrado). Como se mencionó anteriormente, la reacción hipersensible ocurre mediante una serie de alteraciones metabólicas en la planta, las cuales se manifiestan con la aparición de la muerte celular programada, o apoptosis lo cual es consecuencia directa de que los factores de avirulencia de la bacteria son reconocidos por el huésped (receptores NB-LRRs) y que desencadenan la respuesta ETI, la cual se caracteriza por ser rápida, prolongada y localizada, para evitar la propagación del microorganismo (Pedley *et. al.*, 2003; Zipfel *et. al.*, 2008; Kim *et. al.*, 2009).

También ésta respuesta es específica y se encuentra mediada principalmente por la ruta de SA (Hammerschmidt *et. al.*, 2009). Existen varios tipos de bacterias avirulentas, que varían dependiendo del gen Avr que poseen y son empleadas para evaluar la resistencia inducida (Mansfield *et. al.*, 2009).

Las plantas de jitomate y frijol, presentaron los síntomas de enfermedad a distintas horas a pesar de ser la misma cantidad de inóculo, esto se debe principalmente a que las plantas de frijol no son el huésped natural de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, llevando a una respuesta retardada.



**Figura 16.** Desarrollo de la infección por *Pseudomonas syringae* en *Phaseolus vulgaris* infiltradas con  $1 \times 10^6$  UFC. **A** hojas infiltradas con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. **B** hoja infiltrada con la cepa virulenta y **C** hoja infiltrada con la cepa avirulenta. Se realizó el seguimiento por 216 h (9 días) post-infiltración. Las fotografías son representativas de 4 experimentos.

#### **Anexo 4. Efecto del punto de infiltración en los contenidos de carbohidratos**

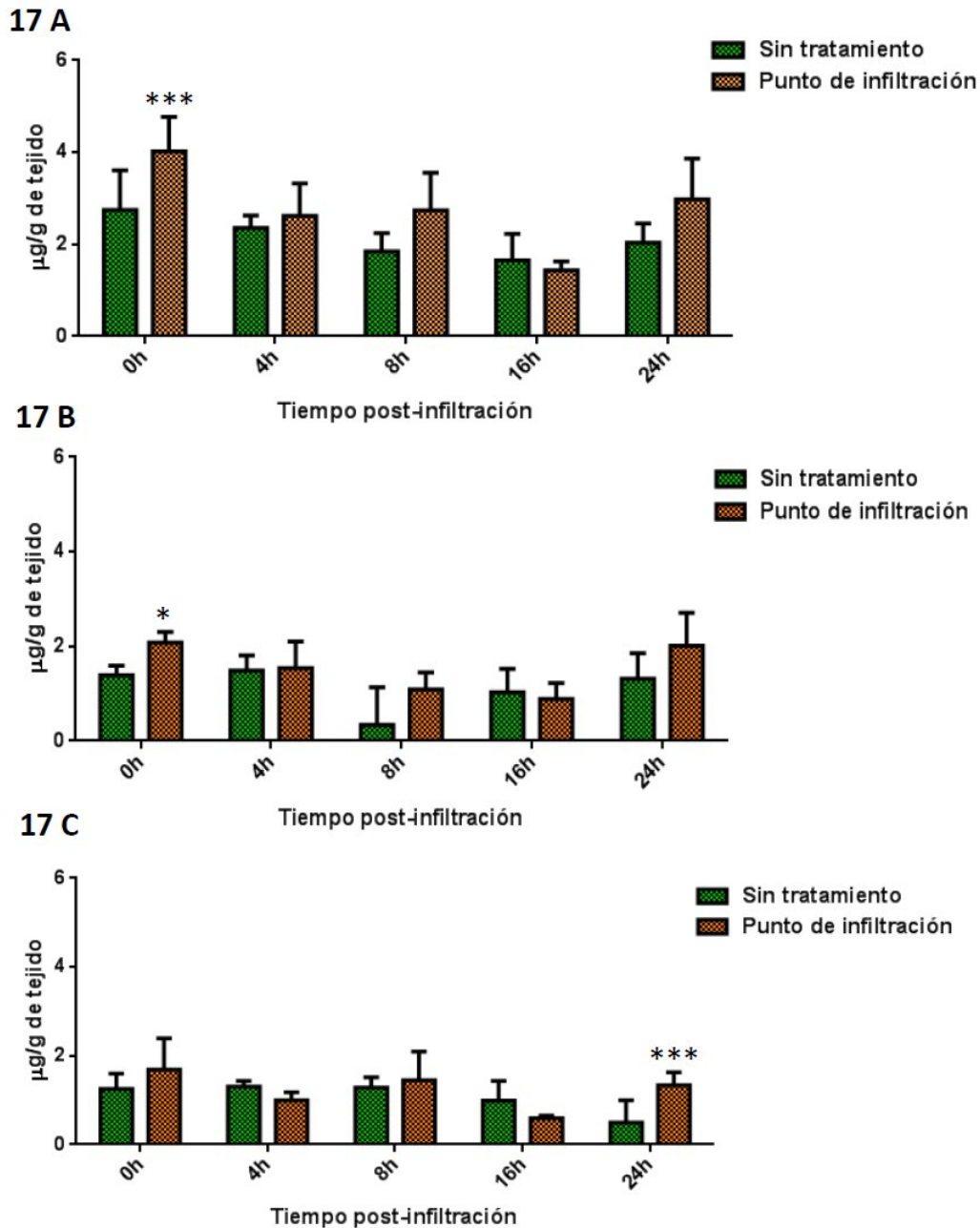
El tratamiento de infiltración mediante jeringa es una práctica común, sin embargo, el tratamiento lleva a la inoculación de líquido y/o la presión que se ejerce con la jeringa, por lo que se determinó si estos tratamientos afectaban el contenido de carbohidratos.

La sola presión que se realiza sin infiltrar líquido indujo un cambio transitorio en los carbohidratos, como un aumento en la sacarosa del tejido sometido al tratamiento al inicio del tratamiento, en donde se debe señalar que aunque el tiempo era alrededor de 5 min e inmediatamente se cortaba la hoja (Figura 17 A). Lo anterior se debe muy probablemente a que las zonas dañadas de las hojas representan un estrés en las mismas. Esto provoca una serie de reacciones similares a lo que ocurre en una herida, pero a corta escala. Se ha encontrado que en el caso de daño se induce la expresión de un transportador de sacarosa SUC3 de *Arabidopsis*, ayudando a la toma de sacarosa la que podría estimular procesos fisiológicos como la respiración y la división celular (Johnson *et. al.*, 1990; Meyer *et. al.*, 2004; Ibraheem *et. al.*, 2008).

También se ha encontrado que la glucosa se incrementa en el tejido herido y que podría estar relacionado con el incremento en la transcripción de invertasas como es el caso de STP3 en *Arabidopsis* (Meyer *et. al.*, 2004; Lafta *et. al.*, 2011).

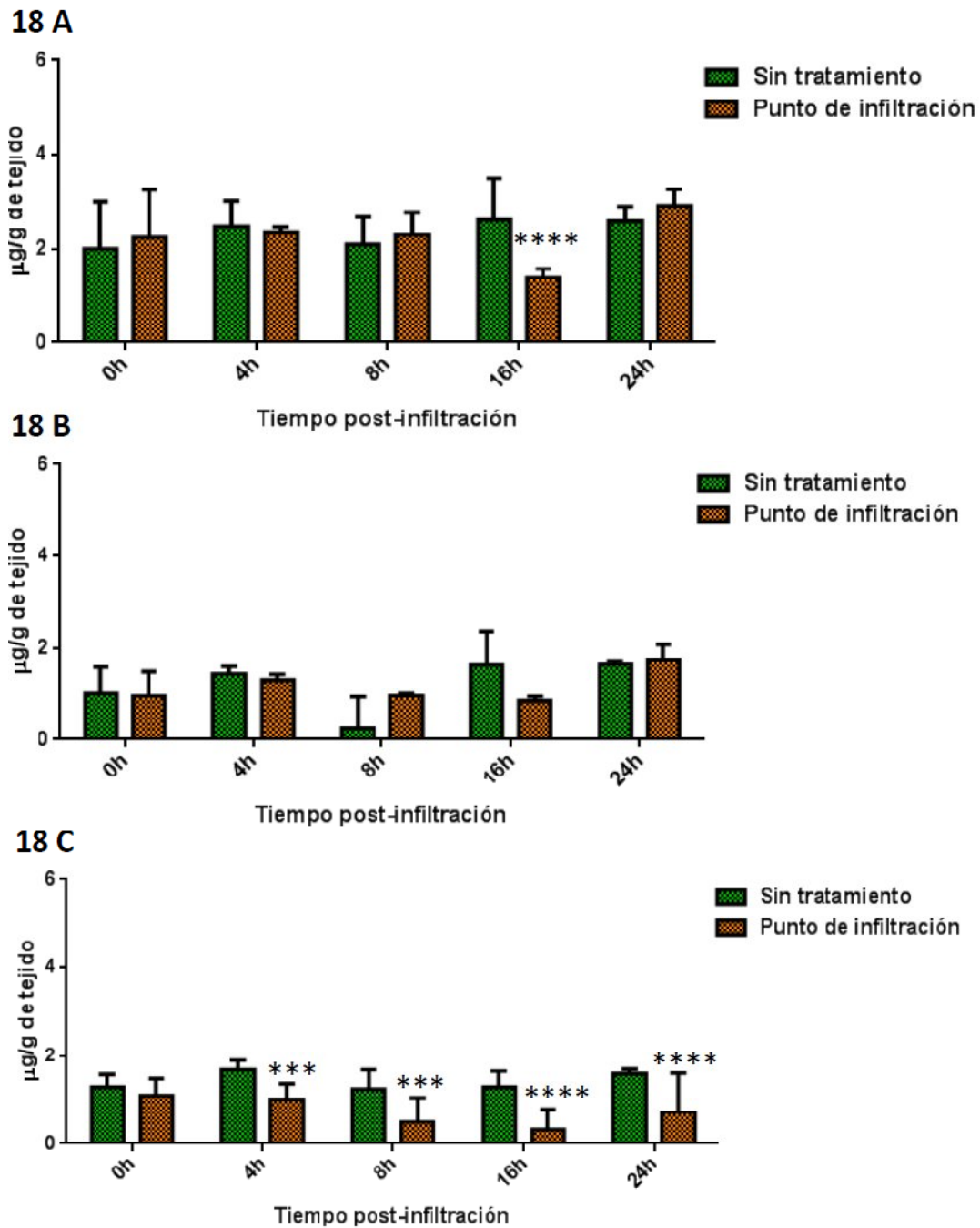
En el caso de la fructosa no hay cambios importantes en las primeras horas después de haber realizado una herida, encontramos que aumenta a las 24 h como se ha encontrado en otros estudios, donde se modifica mayormente en tiempos prolongados después de las 24 h (Lafta *et. al.*, 2011). Algunos transportadores de hexosas como el STP3, pueden importar también fructosa con baja afinidad, ante algún tipo de estrés, lo cual puede ser la razón de que se perciba una menor cantidad de este carbohidrato (Norholm *et. al.*, 2006), sobre todo en las hojas sistémicas a partir de las 4 h del tratamiento (Figura 18). El

tratamiento de herida no modifico los contenidos de carbohidratos en los apoplastos como se observa en las Figuras 19 y 20.

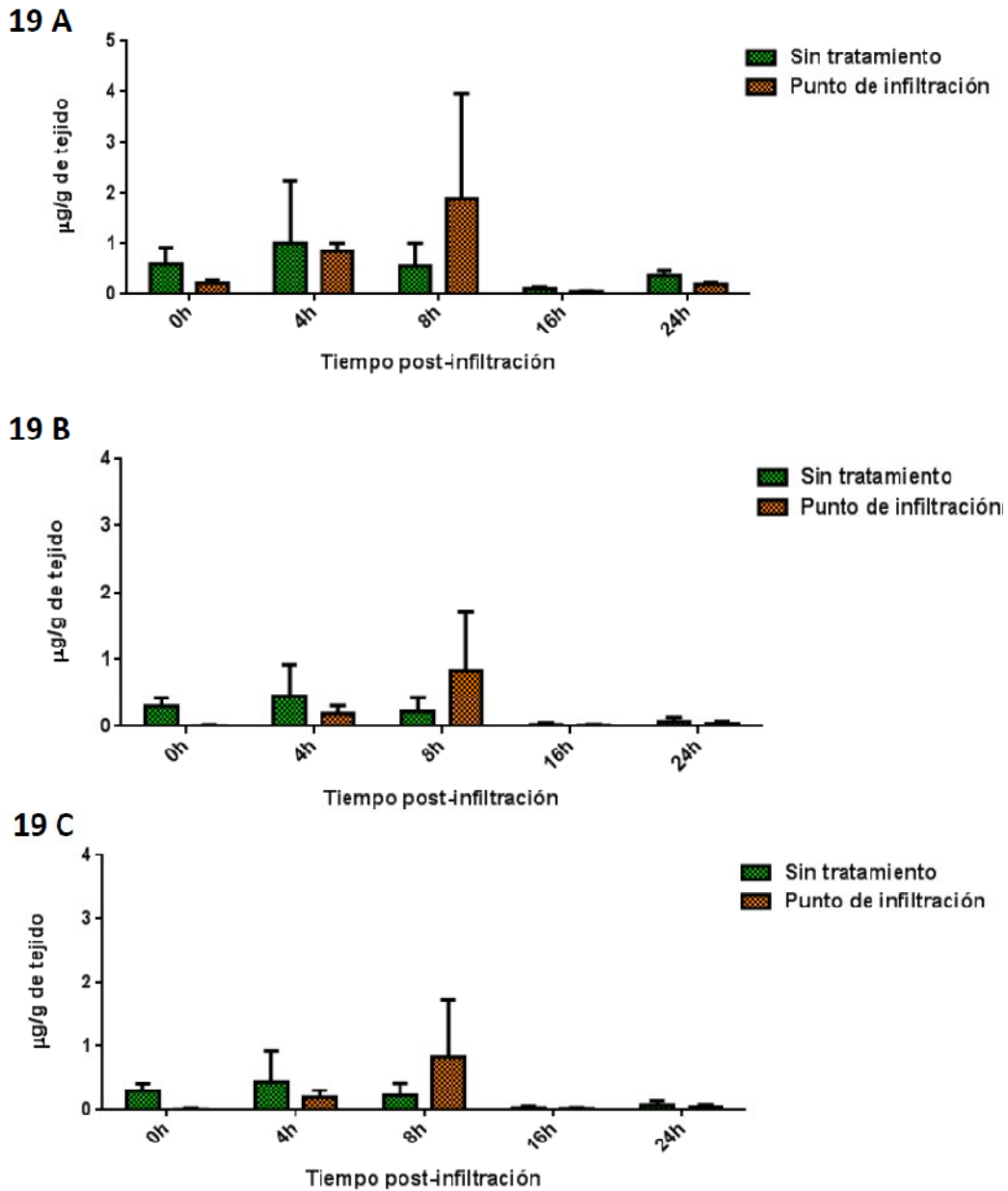


**Figura 17. Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en la hoja tratada.** Los controles fueron hojas sin tratar y el punto de infiltración se refiere a la presión que se realizó con la punta de la jeringa simulando la infiltración. Los extractos etanólicos de hojas se utilizaron para cuantificar los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** Sacarosa, **B** Glucosa y **C** Fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos vías (con  $\alpha=0.005$ ), en el cual se compararon todos los grupos contra el control sin tratamiento.

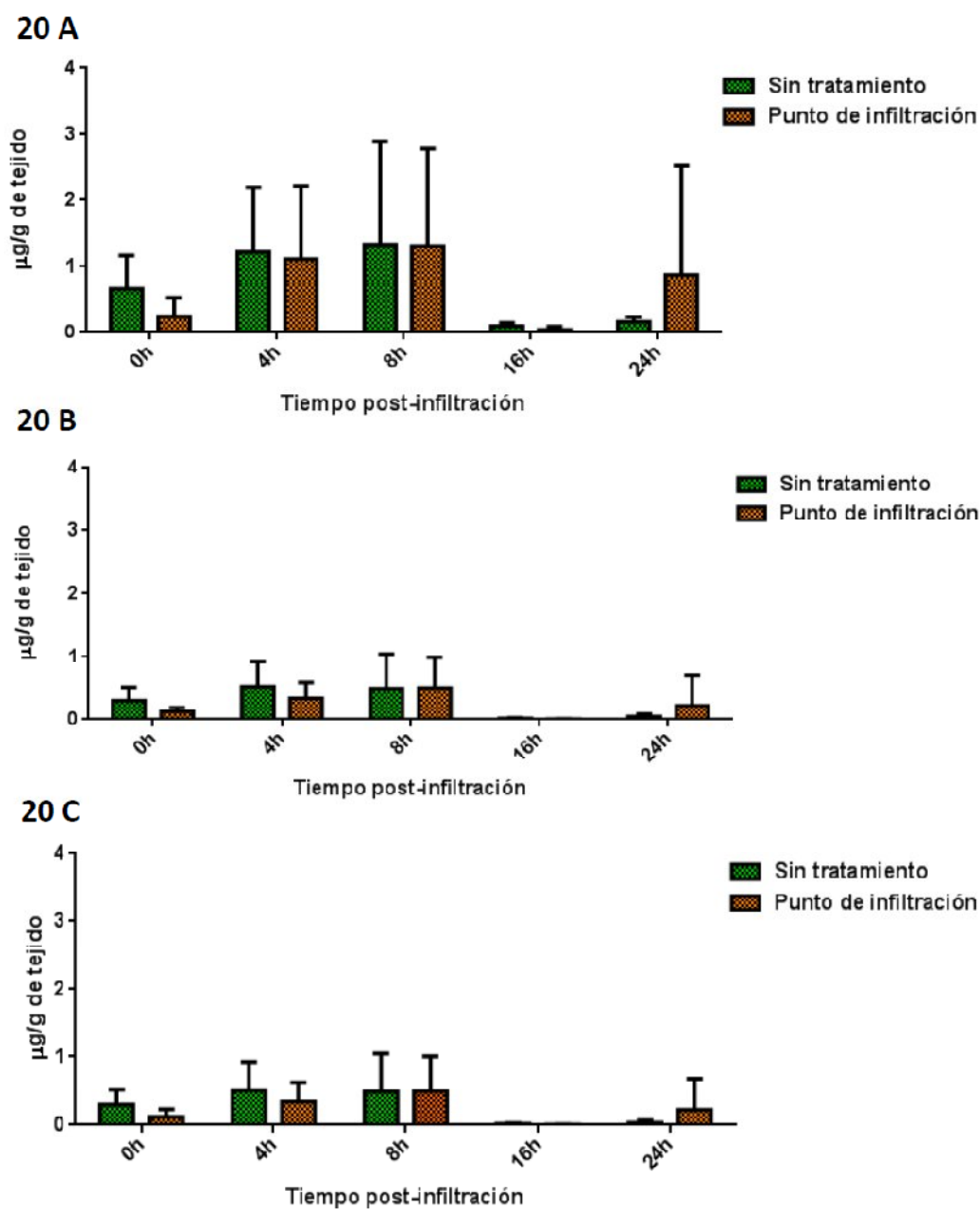
P>0.0001



**Figura 18. Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en la hoja sistémica.** Los controles fueron hojas sin tratar y el punto de infiltración se refiere a la presión que se realizó con la punta de la jeringa simulando la infiltración. Los extractos etanólicos de la cuarta hoja, la sistémica, se utilizaron para cuantificar los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** Sacarosa, **B** Glucosa y **C** Fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos vías (con  $\alpha=0.005$ ), en el cual se compararon todos los grupos contra el control sin tratamiento.  $P>0.0001$ .



**Figura 19. Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en el apoplasto de la hoja tratada.** Los controles fueron hojas sin tratar y el punto de infiltración se refiere a la presión que se realizó con la punta de la jeringa simulando la infiltración. Los extractos apoplásticos de la tercera hoja, se utilizaron para cuantificar los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** Sacarosa, **B** Glucosa y **C** Fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos vías (con  $\alpha=0.005$ ), en el cual se compararon todos los grupos contra el control sin tratamiento.  $P>0.0001$ .



**Figura 20. Efecto de la herida en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en el apoplasto de la hoja sistémica.** Los controles fueron hojas sin tratar y el punto de infiltración se refiere a la presión que se realizó con la punta de la jeringa simulando la infiltración. Los extractos apoplásticos de la cuarta hoja, la sistémica, se utilizaron para cuantificar los carbohidratos mediante un método enzimático. **A** Sacarosa, **B** Glucosa y **C** Fructosa. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de Medidas Repetidas de dos vías (con  $\alpha=0.005$ ), en el cual se compararon todos los grupos contra el control sin tratamiento.  $P>0.0001$ .



### Anexo 5: Tablas de análisis de varianza de ANOVA con Medidas Repetidas para los datos de carbohidratos.

Tabla 3. Análisis de varianza de cantidad de sacarosa en extractos y apoplastos del tejido infiltrado. SACAROSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SOMETIDA A LA INFILTRACIÓN

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	1.798	F (2, 16) = 0.7244	P = 0.4998 ns
Tiempo (T2)	4	19.76	F (4, 32) = 15.00	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X T2	8	6.211	F (8, 64) = 9.059	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X Sujeto	16	2.482		
Interacción T2 X Sujetos	32	1.317		
Sujetos	8	12.55		
Residual	64	0.6856		

#### SACAROSA EN EXTRACTO TOTAL DE LA HOJA SISTÉMICA DEL TRATAMIENTO DE INFILTRACIÓN

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	15.67	F (2, 16) = 5.100	P = 0.0193 *
Tiempo (T2)	4	10.49	F (4, 32) = 4.529	P = 0.0052 **
Interacción T1 X T2	8	10.95	F (8, 64) = 8.674	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X Sujeto	16	3.073		
Interacción T2 X Sujetos	32	2.317		
Sujetos	8	4.895		
Residual	64	1.262		

#### SACAROSA EN LOS APOPLASTOS DE LA HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO LA INFILTRACIÓN

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	0.5432	F (2, 10) = 1.171	P = 0.3493
Tiempo (T2)	4	13.07	F (4, 20) = 8.867	P = 0.0003 ***
Interacción T1 X T2	8	2.309	F (8, 40) = 3.825	P = 0.0020 **
Interacción T1 X Sujeto	10	0.4640		
Interacción T2 X Sujetos	20	1.474		
Sujetos	5	5.735		
Residual	40	0.6036		

#### SACAROSA EN LOS APOPLASTOS DE LA HOJA SISTÉMICA DEL TRATAMIENTO DE INFILTRACIÓN

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	1.414	F (2, 10) = 6.537	P = 0.0153 *
Tiempo (T2)	4	4.272	F (4, 20) = 4.979	P = 0.0060 **
Interacción T1 X T2	8	0.8601	F (8, 40) = 3.973	P = 0.0015 **
Interacción T1 X Sujeto	10	0.2163		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.8579		
Sujetos	5	3.225		
Residual	40	0.2165		

**Tabla 4. Análisis de varianza para la cantidad de Glucosa en extractos y apoplastos del tejido infiltrado.**

**GLUCOSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SOMETIDA A LA INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	3.966	F (2, 16) = 3.385	P = 0.0594 ns
Tiempo (T2)	4	9.217	F (4, 32) = 14.39	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X T2	8	4.136	F (8, 64) = 6.816	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X Sujeto	16	1.172		
Interacción T2 X Sujetos	32	0.6406		
Sujetos	8	0.4924		
Residual	64	0.6067		

**GLUCOSA EN EXTRACTO TOTAL DE LA HOJA SISTÉMICA DEL TRATAMIENTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	2.408	F (2, 16) = 6.649	P = 0.0079 **
Tiempo (T2)	4	0.8507	F (4, 32) = 1.557	P = 0.2097 ns
Interacción T1 X T2	8	1.879	F (8, 64) = 5.404	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X Sujeto	16	0.3621		
Interacción T2 X Sujetos	32	0.5464		
Sujetos	8	0.4926		
Residual	64	0.3478		

**GLUCOSA EN LOS APOPLASTOS DE LA HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO LA INFILTRACIÓN.**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	0.2510	F (2, 10) = 0.626	P = 0.5542 ns
Tiempo (T2)	4	1.239	F (4, 20) = 1.904	P = 0.1492 ns
Interacción T1 X T2	8	0.4555	F (8, 40) = 1.319	P = 0.2623 ns
Interacción T1 X Sujeto	10	0.4006		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.6505		
Sujetos	5	0.3308		
Residual	40	0.3453		

**GLUCOSA EN LOS APOPLASTOS DE LA HOJA SISTÉMICA DEL TRATAMIENTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	0.2240	F (2, 10) = 1.458	P = 0.2782 ns
Tiempo (T2)	4	0.4381	F (4, 20) = 3.342	P = 0.0300 *
Interacción T1 X T2	8	0.1844	F (8, 40) = 1.757	P = 0.1150 ns
Interacción T1 X Sujeto	10	0.1536		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.1311		
Sujetos	5	0.3739		
Residual	40	0.1049		

Tabla 5. Análisis de varianza para la cantidad de Glucosa en extractos y apoplastos del tejido infiltrado.

**FRUCTOSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SOMETIDA A LA INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	6.657	F (2, 16) = 4.280	P = 0.0324 *
Tiempo (T2)	4	16.48	F (4, 32) = 12.72	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X T2	8	4.551	F (8, 64) = 5.881	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X Sujeto	16	1.555		
Interacción T2 X Sujetos	32	1.296		
Sujetos	8	2.381		
Residual	64	0.7738		

**FRUCTOSA EN EXTRACTO TOTAL DE LA HOJA SISTÉMICA DEL TRATAMIENTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	8.742	F (2, 16) = 5.896	P = 0.0121 *
Tiempo (T2)	4	5.253	F (4, 32) = 8.632	P < 0.0001 ****
Interacción (T1 X T2)	8	5.029	F (8, 64) = 7.866	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X Sujeto	16	1.483		
Interacción T2 X Sujetos	32	0.6085		
Sujetos	8	1.011		
Residual	64	0.6393		

**FRUCTOSA EN LOS APOPLASTOS DE LA HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO LA INFILTRACIÓN.**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	0.2096	F (2, 10) = 2.733	P = 0.1130 ns
Interacción T1 X T2	8	0.3025	F (8, 40) = 2.827	P = 0.0065 **
Interacción T1 X Sujeto	10	0.07671		P = 0.0138 *
Interacción T2 X Sujetos	20	0.1023		
Sujetos	5	0.3521		
Residual	40	0.1070		

**FRUCTOSA EN LOS APOPLASTOS DE LA HOJA SISTÉMICA DEL TRATAMIENTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	2	0.5914	F (2, 10) = 4.180	P = 0.0479 *
Tiempo (T2)	4	1.269	F (4, 20) = 2.758	P = 0.0563 ns
Interacción T1 X T2	8	0.6374	F (8, 40) = 3.329	P = 0.0052 **
Interacción T1 X Sujeto	10	0.1415		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.4602		
Sujetos	5	1.548		
Residual	40	0.1915		

Tabla 6. Análisis de varianza de cantidad de sacarosa en extractos y apoplastos del tratamiento herida.

**SACAROSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	6.020	F (1, 5) = 16.94	P = 0.0092 **
Tiempo (T2)	4	5.156	F (4, 20) = 10.17	P = 0.0001 ***
Interacción T1 X T2	4	1.073	F (4, 20) = 7.295	P = 0.0009 **
Interacción T1 X Sujeto	5	0.3553		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.5071		
Sujetos	5	1.073		
Residual	20	0.1470		

**SACAROSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SISTÉMICA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.2024	F (1, 5) = 2.616	P = 0.1667
Tiempo (T2)	4	1.036	F (4, 20) = 1.370	P = 0.2796
Interacción T1 X T2	4	1.262	F (4, 20) = 12.85	P < 0.0001 ****
Interacción T1 X Sujeto	5	0.07738		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.7561		
Sujetos	5	0.4794		
Residual	20	0.09821		

**SACAROSA EN EL APOPLASTO DE HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.1939	F (1, 5) = 2.213	P = 0.1970 ns
Tiempo (T2)	4	2.769	F (4, 20) = 4.745	P = 0.0074 **
Interacción T1 X T2	4	1.469	F (4, 20) = 2.760	P = 0.0562 ns
Interacción T1 X Sujeto	5	0.08760		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.5835		
Sujetos	5	1.585		
Residual	20	0.5321		

**SACAROSA EN EL APOPLASTO DE HOJA SISTÉMICA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.008448	F (1, 5) = 0.01820	P = 0.8979 ns
Tiempo (T2)	4	3.244	F (4, 20) = 2.476	P = 0.0773 ns
Interacción T1 X T2	4	0.5117	F (4, 20) = 1.351	P = 0.2860 ns
Interacción T1 X Sujeto	5	0.4641		
Interacción T2 X Sujetos	20	1.310		
Sujetos	5	2.660		
Residual	20	0.3787		

**Tabla 7. Análisis de varianza de cantidad de glucosa en extractos y apoplastos del tratamiento de punto de infiltración.**

**GLUCOSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	2.496	F (1, 5) = 10.27	P = 0.0239 *
Tiempo (T2)	4	2.473	F (4, 20) = 8.907	P = 0.0003 ***
Interacción T1 X T2	4	0.5297	F (4, 20) = 4.177	P = 0.0128 *
Interacción T1 X Sujeto	5	0.2431		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.2777		
Sujetos	5	0.5453		
Residual	20	0.1268		

**GLUCOSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SISTÉMICA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.01469	F (1, 5) = 0.3685	P = 0.5703 ns
Tiempo (T2)	4	2.018	F (4, 20) = 6.594	P = 0.0015 **
Interacción T1 X T2	4	0.8698	F (4, 20) = 7.215	P = 0.0009 ***
Interacción T1 X Sujeto	5	0.03986		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.3060		
Sujetos	5	0.05776		
Residual	20	0.1206		

**GLUCOSA EN EL APOPLASTO DE HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.0002961	F (1, 5) = 0.04065	P = 0.8482
Tiempo (T2)	4	0.5156	F (4, 20) = 4.127	P = 0.0134
Interacción T1 X T2	4	0.4085	F (4, 20) = 5.425	P = 0.0040
Interacción T1 X Sujeto	5	0.007283		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.1249		
Sujetos	5	0.2404		
Residual	20	0.07530		

**GLUCOSA EN EL APOPLASTO DE HOJA SISTÉMICA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.02084	F (1, 5) = 0.4509	P = 0.5317 ns
Tiempo (T2)	4	0.5060	F (4, 20) = 3.343	P = 0.0299 *
Interacción T1 X T2	4	0.06877	F (4, 20) = 3.132	P = 0.0374 *
Interacción T1 X Sujeto	5	0.04621		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.1514		
Sujetos	5	0.2973		
Residual	20	0.02195		

**Tabla 8. Análisis de varianza de cantidad de fructosa en extractos y apoplastos del tratamiento de punto de infiltración.**

**FRUCTOSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.3248	F (1, 5) = 8.870	P = 0.0309 *
Tiempo (T2)	4	0.9887	F (4, 20) = 3.392	P = 0.0284 *
Interacción T1 X T2	4	0.8044	F (4, 20) = 8.492	P = 0.0004 ***
Interacción T1 X Sujeto	5	0.03662		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.2915		
Sujetos	5	0.09712		
Residual	20	0.09472		

**FRUCTOSA EN EXTRACTO TOTAL DE HOJA SISTÉMICA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	7.304	F (1, 5) = 6.842	P = 0.0473 *
Tiempo (T2)	4	0.6179	F (4, 20) = 8.427	P = 0.0004 ***
Interacción T1 X T2	4	0.2765	F (4, 20) = 4.220	P = 0.0123 *
Interacción T1 X Sujeto	5	1.068		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.07333		
Sujetos	5	0.4428		
Residual	20	0.06551		

**FRUCTOSA EN EL APOPLASTO DE HOJA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.0006584	F (1, 5) = 0.08197	P = 0.7861 ns
Tiempo (T2)	4	0.5248	F (4, 20) = 4.153	P = 0.0131 *
Interacción T1 X T2	4	0.3923	F (4, 20) = 5.060	P = 0.0055 **
Interacción T1 X Sujeto	5	0.008033		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.1263		
Sujetos	5	0.2735		
Residual	20	0.07752		

**FRUCTOSA EN EL APOPLASTO DE HOJA SISTÉMICA SOMETIDA AL TRATAMIENTO PUNTO DE INFILTRACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	Valor F	Valor P
Tratamiento (T1)	1	0.01537	F (1, 5) = 0.3872	P = 0.5610 ns
Tiempo (T2)	4	0.4949	F (4, 20) = 3.175	P = 0.0358 *
Interacción T1 X T2	4	0.06721	F (4, 20) = 3.360	P = 0.0294 *
Interacción T1 X Sujeto	5	0.03968		
Interacción T2 X Sujetos	20	0.1559		
Sujetos	5	0.3624		
Residual	20	0.02000		



## 10. Literatura citada.

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., Martin, G.B. (2006). "Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity." *Nature Reviews* **7**: 601-611.
- Abramovitch, R. B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B., Martin, G.B. (2003). "*Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death." *EMBO Journal* **22**: 60-9.
- Abramovitch, R. B., Martin, G.B. (2004). "Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses." *Current Opinion Plant Biology* **7**: 356-64.
- Alvarez, M. E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, R.A. (1998). "Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity." *Cell* **92**: 773-84.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2007). "Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses." *Plant Science* **172**: 876-87.
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., Teraoka, T. (2007). "Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions." *Plant Biotechnology* **24**: 135-147.
- Ashfield, T., Ong, L.E., Nobuta, K., Schneider, C.M., Innes, W. (2004). "Convergent Evolution of Disease Resistance Gene Specificity in Two Flowering Plant Families." *Plant Cell* **16**: 309-31.
- Attaran, E., Zeier, T.E., Griebel, T., Zeier, J. (2009). "Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **21**: 954-71.
- Beckers, G.M., Jaskiewicz, M., Liu, Y. (2009). "Mitogen activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **21**: 944-53.
- Berber, I., Suat, E., Battal, P., Önlü, H., Erez, M.E. (2010). Levels of Selected Trace Elements, Phytohormones, and Sugars in *Pseudomonas*-Infected *Lycopersicon esculantum* Mill Plants. *Biology Trace Element Research* **133**, 98-109.
- Berger, S., Benediktyova, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L., Roitsch, T. (2007). "Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*." *Journal Experimental Botany* **58**: 797-806.
- Berger, S., Sinha, A.K., Roitsch, T. (2007). "Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions." *Journal Experimental Botany* **58**: 4019-26.
- Biemelt, S., Sonnewald, U. (2006). "Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism." *Journal Plant Physiology* **163**: 307-18.
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R., De Lucia, E.H. (2010). "Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes." *Plant Cell Environment* **33**: 1597-1613.
- Bolouri Moghaddam MR, Van den Ende W. (2012). Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3989-98.



- Bolwell, P. G., Daudi, A. (2009). "Reactive Oxygen Species in Plant–Pathogen Interactions." *Signal Communication Plants* **7**: 113-32.
- Bonfig, K. B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., Berger, S. (2006). "Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves." *Planta* **1**: 1-12.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M., Collmer, A. (2003). "The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000." *PNAS* **100**: 10181-6.
- Büttner, D., He, S-Y. (2009). "Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria." *Plant Physiology* **150**: 1656-64.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., Dong, X. (1997). "The *Arabidopsis* NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats." *Cell* **88**: 57–63.
- Coll, N. S., Epple, P., Dangl, J.L. (2011). "Programmed cell death in the plant immune system." *Cell Death & Differentiation* **18**: 1247-56.
- Creelman, R. A., Mullet, J.E. (1997). "Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression." *The Plant Cell* **9**: 1211-23.
- Chen, L. Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., Frommer, W.B. (2010). "Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens." *Nature* **468**: 527-32.
- Chern, M., Canlas, P.E., Fitzgerald, H.A. Ronald, P. (2005). "Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with *Arabidopsis* NPR1 and rice NH1." *Plant Journal* **43**: 623–35.
- Dodds, P. N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M. (2006). "Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes." *PNAS* **103**: 8888–93.
- Doi, N., Yanagawa, H. (1999). "Design of genetic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution." *Journal FEBS* **453**: 305.
- Edreva, A. (2005). "Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years." *Genetic Application Plant Physiology* **31**: 105-24.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q., Alfano, J.R. (2003). "The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants." *Molecular Microbiology* **49**: 377-87.
- Fehr, M., Lalonde, S., Ehrhardt, D.W., Frommer, W.B. (2004). "Live imaging of glucose homeostasis in nuclei of COS-7 cells." *Journal Fluorescence* **14**: 603-609.

- Flor, H. H. (1971). "Current Status of the Gene-For-Gene Concept." *Annual Review Phytopathology* **9**: 275-96.
- Fox, A. (2010). General aspects of bacterial pathogenesis. University of South Carolina School of Medicine: Microbiology and Immunology. Microbiology and Immunology. Murray. USA, On-line Textbook. **6th**: 18 Chapter.
- Friedman, A. R., Baker, B.J. (2007). "The evolution of resistance genes in multi-protein plant resistance systems." *Current Opinion Genetics & Development* **17**: 493-9.
- Guo, W., Zou, L.F Li, Y.R., Cui, Y.P., Ji, Z.Y., Cai, L.L., Zou, H.S., Hutchins, W.C., Yang, C.H., Chen, G.Y. (2012). "Fructose-bisphosphate aldolase exhibits functional roles between carbon metabolism and., the hrp system in rice pathogen *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*." *PLoS One* **7**: e31855.
- Hammerschmidt, R. (2009). "Systemic Acquired Resistance." *Advances in Botany Research* **51**: 174-209.
- Hammond, J. P., White, P.J. (2008). "Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation." *Journal Experimental Botany* **59**: 93-109.
- Hayes, M.A., Fechan, A., Dry, I.B. (2010). "Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection." *Plant Physiology* **153**: 211-21.
- Helliwell, E.; Yang, Y. (2009) Systemic Signalling in Plant Defence. En: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, L td: Chichester.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W.B., Metraux, J.P., Sonnewald, U. (1996). "Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway." *Plant Cell* **8**: 793-803.
- Herbers, K., Monke, G., Badur, R., Sonnewald, U. (1995). "A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: Isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins." *Plant Molecular Biology* **29**: 1027-38.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H.P., Hajirezaei, M., Sonnewald, U (2000). "Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco." *Molecular Plant Pathology* **1**: 51-9.
- Hirano, S.S., Upper, C.D. (2000). "Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* pathogen, ice nucleus, and epiphyte." *Microbiology Molecular Biology Reviews* **64**: 624-53.
- Huang, J., Schmelz, E.A., Alborn, H., Engelberth, J., Tumlinson, J.H. (2005). "Phytohormones mediate volatile emission during the interaction of compatible and incompatible pathogens: the role of ethylene in *Pseudomonas syringae* infected tobacco." *Journal Chemical Ecology* **31**: 439-59.
- Huffaker, A., Ryan, C.A. (2007). "Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response." *PNAS* **104**: 10732-36.

- Hwang, M.S., Morgan, R.L., Sarkar, S.F., Wang, P.W., Guttman, D.S. (2005). "Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*." *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5182-91.
- Ibraheem, O., Hove, M.R., H., Bradley, G. (2008). "Sucrose assimilation and the role of sucrose transporters in plant wound response." *African Journal Biotechnology* **7**: 4850-55.
- Isla, M., Vattuone, M.A., Sampietro, A.R. (1991). "Modulation of potato invertase activity by fructose." *Phytochemistry* **30**: 423-42.
- Johnson, R., Ryan, C.A. (1990). "Wound-inducible potato inhibition II genes: Enhancement of expression by sucrose." *Plant Molecular Biology* **14**: 527-36.
- Kang, S. (2002). "<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/FunctionalGenomicsAbstracts2002.aspx>."
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. (2006). "Introduction to Proteobacteria." *Prokaryotes* **5**: 3-37.
- Kim, M. G., Geng, X., Lee, S.Y., Mackey, D. (2009). "The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpm1 induces significant defenses by activating the Arabidopsis nucleotide-binding leucine-rich repeat protein RPS2." *Plant Journal* **57**: 645-53.
- Kim, Y. J., Lin, N.C., Martin, G.B. (2002). "Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity." *Cell* **109**: 589-98.
- Kloek, A. P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F., Kunkel, B.N. (2001). "Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms." *Plant Journal* **26**: 509-22.
- Kocal, N., Sonnewald, U., Sonnewald S. (2008). "Cell Wall-Bound Invertase Limits Sucrose Export and Is Involved in Symptom Development and Inhibition of Photosynthesis during Compatible Interaction between Tomato and *Xantomonas campestris pv vesicatoria*." *Plant Physiology* **148**: 1523-36.
- Koch, K. (2004). "Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development." *Current Opinion Plant Biology* **7**: 235-46.
- Lacomme, C. Simons, C. S. (1999). "Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response." *PNAS* **14**: 7956-7961.
- Lafta, A. M., Fugate, K.K. (2011). "Metabolic profile of wound-induced changes in primary carbon metabolism in sugarbeet root." *Phytochemistry* **72**: 476-89.
- Lager, I., Fehr, M., Frommer, W.B., Lalonde, S. (2003). "Development of a fluorescent nanosensor for ribose." *FEBS* **553**: 85-89.
- Larsen, R., Pogliano, K. (2009). <http://genome.jgi-psf.org/psesy/psesy.home.html>.
- Lei, L., Chuanyou, L., Gyu, I. L., Gregg, A. Howe, S. (2001). "Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato." *Current Issue* **99**: 6416–21.
- Li, J., Brader, G., Palva, E.T. (2004). "The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense." *Plant Cell* **16**: 319–331.

- Lindeberg, M., Cunnac, S., Collmer, A. (2012). "*Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. ." Trends in Microbiology **20**: 199-208.
- López-Gresa, M. P., Maltese, F. (2009). "Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions." Phytochemical Analysis **21**: 89–94.
- Lozano, R., Giménez, E., Cara, B.; Capel, J., Angosto, T. (2009). "Genetic analysis of reproductive development in tomato." Internat Journal Development Biology **53**: 1635-1648.
- Major, I. T., Nicole, M.C., Duplessis, S., Séguin, A. (2010). "Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection." Photosynthesis Research **104**: 41-8.
- Mansfield, J. W. (2009). "From bacterial avirulence genes to effector functions via the hrp delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity." Molecular Plant Pathology **10**: 721-34.
- Martínez-Marcelo, V. (2008). Expresión de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Facultad de Química. D. S. Sánchez. México, UNAM. **Licenciatura**.
- Meyer, S., Lauterbach, C., Niedermeier, M., Barth, I., Sjolund, R.D., Sauer, N. (2004). "Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues." Plant Physiology **134**: 684-93.
- Mitchell, R. E., Hale, C.N., Shanks, J.C. (1983). "Production of different pathogenic symptoms and different toxins by strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* not distinguishable by gel-immunodiffusion assay." Physiological Plant Pathology **23**: 315-322.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. (2003). "Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling." Science **300**: 332-6.
- Morris, C. E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., Thompson, B.M. (2008). "The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle." The ISME Journal **2**: 321-34.
- Mosher, R. A., Durrant, W.E., Wang, D., Song, J., Dong, X. (2006). "A comprehensive structure-function analysis of *Arabidopsis* SN1 defines essential regions and transcriptional repressor activity." Plant Cell **18**: 1750–65.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. (2003). "Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes." Cell **113**: 935–44.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. (2008). "The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? ." Journal Experimental Botany **59**: 501–20.
- Norholm, M. H., Nour-Eldin, H.H., Brodersen, P., Mundy, J., Halkier, B.A. (2006). "Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death." FEBS Letters **17**: 2381-7.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V.S., Bolwell, G.P. (2012). "Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism." Planta **236**: 765-79.

- Oh, C.S., Martin, G.B. (2011). "Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase." *Trends Plant Sci* **16**: 132-40.
- Palleroni, N.J. (1993). "*Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacetria." *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 231-251.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F. (2007). "Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance." *Science* **318**: 113–16.
- Pedley, K.F., Martin, G.B. (2003). "Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato." *Annual Review Phytopathology* **41**: 215-43.
- Pego, V., Kortstee, H., Smeekens, C.M. (2000). "Photosynthesis, sugars and the regulation of gene." *Journal of Experimental Botany* **51**: 451-416.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H. (2000). "Arabidopsis map kinase 4 negative regulates systemic acquired resistance." *Cell* **103**: 1111–20.
- Pieterse, C.M., Van Wees S.C., Van Pelt J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., Van Loon, L.C. (1998). "A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **10**: 1571–80.
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H. (2009). "MAPK cascade signalling networks in plant defence." *Current Opinion Plant Biology* **12**: 421-6.
- Ponciano, G., Ishihara, H., Tsuyumu, S., Leach, J.E. (2003). "Bacterial effectors in plant disease and defense: key to durable resistance'." *Plant Disease* **87**: 1272-82.
- Pontis, H.G. (1978). "On the scent of the riddle of sucrose." *Trends Biochemistry Science* **3**: 137-9.
- Postel, S., Kemmerling, B. (2009). "Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**: 1025-31.
- Reape, T.J., McCabe, P.F (2010). "Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants." *Apoptosis* **15**: 249-56.
- Rico, A., McCraw, S.L., Preston, G.M. (2011). "The metabolic interface between *Pseudomonas syringae* and plant cells." *Current Opinion Microbiology* **14**: 31-38.
- Rico, A., Preston, G.M. (2008). "*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast." *Molecular Plant Microbe Interactions* **21**: 269-82.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A.K. (2003). "Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein." *Journal Experimental Botany* **54**: 513-24.
- Roitsch, T., González, M.C. (2004). "Function and regulation of plant invertases: sweet sensations." *Trends Plant Science* **12**: 606-13.
- Rolland, F., Baena-González, E., Sheen, J. (2006). "Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms." *Annual Review Plant Biology* **57**: 675–709.
- Ryan, R.P., Vorhölter, F.J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.A., Bogdanove, A.J., Dow, J.M. (2011). "Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions." *Nature Review Microbiology* **9**: 344-55.

- Saibo, N.J., Lourenço, T., Oliveira, M. (2009). "Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses." *Annual Botany* **103**: 609-23.
- Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruíz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada-Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sánchez, R., Bernal-Lugo, I., Sánchez-Nieto, S. (2012). "Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination." *Journal Experimental Botany* **63**: 4513-26.
- Scharte, J., Schön, H., Weis, E. (2005). "Photosynthesis and carbohydrates metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*." *Plant Cell and Environment* **28**: 1421-35.
- Schulze-Lefert, P., Robatzek, S. (2006). "Plant pathogens trick guard cells into opening the gates." *Cell* **128**: 831-4.
- Sherson, S.M., Alford, H.L., Forbes, S.M., Wallace, G., Smith, S.M. (2003). "Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*." *Journal Experimental Botany* **382**: 525-531.
- Shulaev, V., León, J., Raskin, I. (1997). "Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance." *Nature* **385**: 718–21.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B., Jackson, R.W. (2011). "*Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable." *FEMS Microbiology Review*. **35**: 652–680.
- Sinha, A.K., Hofmann, M.G., Römer, U., Köckenberger, W., Elling, L., Roitsch, T. (2002). "Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato." *Plant Physiology* **128**: 1480-89.
- Smeeckens, S. (2000). "Sugar-Induced Signal Transduction in Plants." *Annual Review Plant Physiology* **51**: 49-81.
- Sonnewald, S., Priller, J.P., Schuster, J., Glickmann, E., Hajirezaei, M.R., Siebig, S., Mudgett, M.B., Sonnewald, U. (2012) Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type three effectors. *PLoS One*. **7**: 51763-51763.
- Spiers, A.J., Buckling, A., Rainey, P.B. (2000). "The causes of *Pseudomonas* diversity." *Microbiology* **146**: 2345-50.
- Tsukaya, H., Oshima, T., Naito, S., Chino, M., Komeda, Y. (1991). "Sugar-dependent expression of the CHSA gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*." *Plant Physiology* **97**: 1414-21.
- Vela, E. (2010). "La calabaza, el tomate y el frijol." *Arqueología mexicana* **36**: 42-63.
- Vicente, M., Pedro, M.A., Torrontegui, G., Díaz, R., Canovas, J.L. (1975). "The Uptake of Fructose by *Pseudomonas putida*." *Microbiology* **102**: 163–66.
- Ward, J.L., Forcat, S., Beckmann, M., Bennett, M., Miller, S.J., Baker, J.M., Hawkins, N.D., Vermeer, C.P., Lu, C., Lin, W., Truman, W.M., Beale, M.H., Draper, J., Mansfield, J.W., Grant, M. (2010). "The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*." *Plant Journal* **63**: 443–57.
- Weigel, R.R., Pfitzner, U.M., Gatz, C. (2005). "Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **17**: 1279–91.

- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F. (2004). "Nitric oxide: a new player in plant signaling and defense responses." *Current Opinion Plant Biology* **7**: 449–55.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I. (2004). "Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *PNAS*, **101**: 15811–16.
- Zhang, X., Dai, Y., Xiong, Y. (2007). "Overexpression of *Arabidopsis* MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance." *Plant Journal* **52**: 1066–79.
- Zipfel, C. (2008). "Pattern-recognition receptors in plant innate immunity." *Current Opinion Immunology* **20**: 10-6.
- Zulak, K. G., Weljie, A.M., Vogel, H.J., Facchini, P.J. (2008). "Quantitative <sup>1</sup>H NMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures." *BMC Plant Biology* **8**: 1471-2229.