



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR
BASES DE CADENA LARGA.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Ariadna González Solís

Tutor: Marina Gavilanes Ruiz
Facultad de Química, UNAM

Miembros del comité tutor
Dr. Felipe Cruz García
Facultad de Química, UNAM
Dr. Mario Rocha Sosa
Instituto de Biotecnología, UNAM

México, D.F.

OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. María del Carmen Quinto Hernández

VOCAL: Dr. Eleazar Martínez Barajas

VOCAL: Dr. Ángel Arturo Guevara García

VOCAL: Dra. Gladys Ileana Cassab López

SECRETARIO: Dr. Francisco Ruíz Terán

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

ASESOR: _____
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

SUSTENTANTE: _____
Ariadna González Solís

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Edgar B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, USA) por haber proporcionado las semillas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre y de las líneas *lcb2a-1* y *sbh1-1* para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Néstor Carrillo (Universidad del Rosario, Argentina) por haber proporcionado las semillas de *Arabidopsis thaliana* de la línea *pflD 18-18* para este trabajo.

Al Dr. Arturo Guevara (Instituto de Biotecnología, UNAM) por haber proporcionado las semillas de *Arabidopsis thaliana* de la línea *mpk6* para este trabajo.

Al Dr. Felipe Cruz García (Facultad de Química, UNAM) por el asesoramiento en las técnicas de biología molecular y por su participación dentro del comité tutorial.

Al Dr. Mario Rocha Sosa (Instituto de Biotecnología, UNAM) por su asesoría dentro del comité tutorial.

A la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo (Facultad de Química, UNAM) por la ayuda técnica durante la realización de este trabajo de tesis.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra (Facultad de Química, UNAM) por su apoyo técnico en el invernadero y en el uso de equipos durante este trabajo.

Ariadna González Solís recibió apoyo del Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir a un congreso nacional.

Durante la realización de este trabajo de tesis, Ariadna González Solís recibió una beca de conclusión de proyecto de PAPIIT DGAPA UNAM IN210812.

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de los Proyectos PAPIIT DGAPA, UNAM IN210812, del proyecto de CONACYT 101521 y del programa PAIP de la Facultad de Química 5000 9115.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. RESPUESTA DE DEFENSA CONTRA PATÓGENOS EN PLANTAS	2
1.1 Los dos esquemas de inmunidad en plantas: PTI y ETI	2
1.2 Sistemas de transducción de señales en los mecanismos de defensa contra patógenos	5
1.2.1 Las cascadas de MAP cinasas	5
1.2.2 Fitohormonas en la señalización de respuestas de defensa	6
1.2.3 Especies reactivas de oxígeno en la transducción de señales	7
1.2.4. Bases de cadena larga como moléculas señalizadoras	8
1.3 La expresión de genes de defensa como un objetivo de las vías de señalización para lograr inmunidad	8
1.4 La muerte celular programada en la defensa contra patógenos	11
1.4.1 La respuesta de hipersensibilidad	12
1.5 Ejemplos de respuestas de defensa activadas por PAMPs	13
1.5.1 La respuesta de defensa desencadenada por la flagelina está mediada por MAP cinasas	13
1.5.2 La xilanasas como un elicitador fúngico que induce la biosíntesis de etileno	14
2. LOS ESFINGOLÍPIDOS EN PLANTAS: MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LAS RESPUESTAS DE DEFENSA	14
2.2 Las bases de cadena larga, precursoras de esfingolípidos complejos.	15
2.3 Síntesis de esfingolípidos	16
2.4 Fumonisina B ₁ como inhibidor de la síntesis de esfingolípidos	17
2.5 Funciones de los esfingolípidos en plantas	18
2.6 Los esfingolípidos en las respuestas de defensa	18
ANTECEDENTES INMEDIATOS	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Material biológico	25
1.1 Cultivo de líneas de <i>A. thaliana</i>	26
1.1.1 Desinfección y siembra de las semillas de <i>A. thaliana</i>	26

1.1.2 Resiembra de plántulas de <i>A. thaliana</i> en tierra	27
2. Ensayos de evaluación de la participación de las BCL en las respuestas de inmunidad inducidas por PAMPs o por efectores	27
2.1 Infiltración de las hojas adultas con MgCl ₂ , FB ₁ , el patógeno avirulento Pst DC3000 <i>avrRPM1</i> , el patógeno virulento Pst DC3000 vir, la flagelina, el péptido flg22 y la xilanasa	27
2.2 Determinación del índice de daño	28
2.2.1 Escala del índice de daño	28
2.3 Exposición de las plántulas a flagelina por aspersión	29
2.4 Detección <i>in situ</i> de H ₂ O ₂	29
2.5 Determinación del crecimiento bacteriano	30
2.5.1 Exposición de las plántulas a FB1	30
2.5.2 Infección de las plántulas con los patógenos Pst DC3000 <i>avrRPM1</i> y Pst DC3000 vir	30
3. Determinación de los niveles de transcrito de genes de defensa en las diferentes líneas mutantes de <i>A. thaliana</i> y en respuesta al tratamiento con FB1	31
3.1 Exposición de plántulas a condiciones donde hay acumulación de BCL endógenas	31
3.1.1 Exposición de plántulas a FB1	31
3.2 Extracción de DNA genómico	31
3.3 Establecimiento de las condiciones para la amplificación de los genes de defensa por PCR	32
3.4 Clonación de los fragmentos de DNA de los genes de defensa en el plásmido pGEM	33
3.4.1 Selección de las colonias transformantes	33
3.5 Extracción de RNA	34
3.6 Geles desnaturalizantes de RNA	34
3.7 Reacciones de RT-PCR	35
3.7.1 Síntesis de cDNA	35
3.7.2 Reacciones de PCR	35
RESULTADOS	37
1 Evaluación de la participación de las BCL en respuestas de inmunidad inducidas por PAMPs o por efectores.	37
1.1 Fenotipos e índice de daño de hojas de plantas tipo silvestres y mutantes adultas expuestas a la FB1 y a las variantes virulenta y avirulenta del patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	37

1.2 Análisis del crecimiento de los patógenos <i>Pseudomonas syringae</i> cepas avirulenta y virulenta en condiciones de acumulación de BCL.	45
1.3 Evaluación de la participación de las BCL en respuestas de inmunidad inducidas por PAMPs.	47
1.3.1 Evaluación de la muerte celular producida por la flagelina en la línea silvestre de <i>A. thaliana</i> .	48
1.3.2 Evaluación de la muerte celular tipo HR producida por la xilanasa en las diferentes mutantes de <i>A. thaliana</i> .	50
1.3.3 Determinación del índice de daño en hojas de plantas expuestas a xilanasa	51
1.3.4 Detección <i>in situ</i> de H ₂ O ₂ en hojas expuestas a FB1, el patógeno avirulento, flagelina, el péptido flg22 y xilanasa.	52
2. Evaluación de la expresión de genes de defensa marcadores de vías señalizadas por fitohormonas, en condiciones en las que hay diferentes niveles de BCL	56
2.1 Evaluación de la progresión de la muerte celular inducida por la acumulación de BCL	56
2.2 Análisis de la expresión de genes relacionados con el mecanismo de defensa contra patógenos	58
2.3 Establecimiento de las condiciones para el análisis de la expresión génica por RT-PCR.	58
2.4 Análisis de la expresión de los genes <i>ACS6</i> , <i>PDF1.2</i> , <i>β-quitinasa</i> y <i>PR-1</i> en respuesta al tratamiento con FB1	60
DISCUSIÓN	66
Validación del modelo de inducción de MCP mediada por acumulación de BCL empleando FB1	66
Mutantes en genes de enzimas de la vía de síntesis de esfingolípidos.	66
Mutantes en elementos de señalización de la vía de BCL	67
Contribución de las BCL a las formas de inmunidad contra patógenos	70
Bases de cadena larga en la ETI	70
Bases de cadena larga en la respuesta de enfermedad	74
Comparación de la MCP inducida por la FB1 y las cepas avirulenta y virulenta de <i>Pseudomonas syringae</i>	75
Las BCL en el control del crecimiento bacteriano en la ETI	77
El uso de PAMPs en el estudio de la inmunidad PTI y las BCL	80
La inducción de genes de defensa en respuesta a la acumulación de BCL y	83

papel de las fitohormonas en esta vía de señalización	
CONCLUSIONES	89
PERSPECTIVAS	90
BIBLIOGRAFÍA	91
APÉNDICE 1 Materiales y métodos adicionales	104
APÉNDICE 2 Preparación de reactivos y medios de cultivo	106
APÉNDICE 3 Resultados adicionales	109

ABREVIATURAS

AAL *Alternaria alternata*

ABA Ácido abscísico

ACS6 Gen de la aminociclo propano carboxilato sintasa

AJ Ácido jasmónico

AS Ácido salicílico

AVR Genes de avirulencia

β -CHI Gen de una quitinasa básica

BCL Bases de cadena larga

BCL-P Bases de cadena larga fosforiladas

CERK Ceramida cinasa

d18:0 Dihidroesfingosina o esfinganina

d18:0-P Esfinganina fosfato

d18:1 4-esfingenina o esfingosina

d18:1-P Esfingosina fosforilada

DAB 3,3'- diaminobencidina

dpi Días post infiltración

ERO Especies reactivas de oxígeno

ETI Inmunidad inducida por efectores

ETS Susceptibilidad inducida por efectores

FB₁ Fumonisin B₁

FLS2 Receptor de la flagelina

GluCer Glucosilceramida

GIPC Glicosil-inositolfosforil-ceramidas

hpi Horas post-infiltración

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno

HPLC Cromatografía de líquidos de alta resolución

HPLC/ESI-MS/MS HPLC fase reversa acoplada a espectrometría de masas con ionización por electroaspersión

HR Respuesta de hipersensibilidad

IPC Inositolfosforil-ceramida

IPCS Inositol-fosforil-ceramida sintasa

LRR-RLK Receptores com dominio de leucinas repetidas y con actividad de cinasa

LRR-RLP Receptores proteicos con un dominio de leucinas repetidas

MAPK Proteínas cinasas activadas por mitógeno

MCP Muerte celular programada

O₂⁻ Ión superóxido

PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PDF1.2 Gen de una defensina

PR Genes relacionados a patogénesis

PRR Receptores de reconocimiento de patrones

Pst DC3000 *avrRPM1* *Pseudomonas syringae* pv. tomato cepa DC3000 *avrRPM1* (avirulenta)

Pst DC3000 *vir* *Pseudomonas syringae* cepa DC3000 (virulenta)

PTI Inmunidad inducida por PAMPs

RE Retículo endoplásmico

RSA Resistencia sistémica adquirida

SAM Micotoxina análoga a la esfinganina

SBH Hidroxilasa de base de cadena larga

SIPK Cinasa de proteína inducida por ácido salicílico

SPT Serina palmitoiltransferasa

t18:0 4-hidroxiesfinganina (fitoesfingosina)

t18:1 4-hidroxiesfingenina (fitoesfingosina fosforilada)

t18:1-P Fitoesfingosina fosforilada

TTSS Sistema de secreción tipo III

UFC Unidades formadoras de colonias

VPE Enzima de procesamiento vacuolar

WIPK Cinasa de proteína inducida por herid

EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR BASES DE CADENA LARGA.

RESUMEN

Las bases de cadena larga (BCL), precursores de los esfingolípidos complejos, son moléculas señalizadoras que participan en la respuesta a sequía, bajas temperaturas y en la muerte celular programada (MCP) que se presenta durante la defensa contra patógenos en plantas. Se han descrito dos mecanismos relacionados con la inmunidad. El primero, la inmunidad innata (PTI), se desencadena tras la percepción de patrones asociados a patógenos (PAMPs), lo que lleva a una respuesta basal de defensa. El segundo, la inmunidad ETI, se basa en el reconocimiento específico de efectores bacterianos por proteínas de resistencia de la célula vegetal que activan una maquinaria de defensa robusta asociada a la respuesta de hipersensibilidad (HR). El objetivo central de este trabajo fue determinar la contribución de las BCL como moléculas señalizadoras en ambos tipos de inmunidad. Para cumplir con este objetivo se utilizaron mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la vía de síntesis de esfingolípidos o con afectaciones en elementos de señalización de la vía de BCL. Estas mutantes fueron expuestas a la toxina FB1 (para inducir un aumento de BCL), a las cepas avirulenta y virulenta de *P. syringae* y a los PAMPs flagelina/flg22 y xilanasa. Los tratamientos se evaluaron de acuerdo al análisis fenotípico de índice de daño, detección *in situ* de H₂O₂, determinación del crecimiento bacteriano y análisis de la expresión de genes relacionados con la defensa. Los resultados mostraron que las BCL, la MPK6 y las ERO producidas en el cloroplasto son elementos de la señalización que desencadena la MCP que se presenta en la respuesta ETI inducida por la bacteria avirulenta. Algunas evidencias indicaron la participación de las BCL durante la respuesta PTI que se induce con la xilanasa y en el modelo de muerte celular por susceptibilidad a efectores que se presenta con el patógeno virulento. El análisis de expresión de genes mostró que la acumulación de BCL se relaciona con la acumulación de transcritos de genes marcadores de las vías del ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico. En conjunto, estos resultados aportan evidencias de la participación de las BCL y otros elementos de señalización de la vía (MPK6 y ERO) en los dos tipos de inmunidad descritos en plantas.

INTRODUCCIÓN

I. RESPUESTA DE DEFENSA CONTRA PATÓGENOS EN PLANTAS

Las plantas poseen sistemas de defensa que les permiten responder a los ataques de organismos patógenos como virus, bacterias, protozoarios y hongos.

En la interacción planta-patógeno se dice que ocurre una relación incompatible o de resistencia cuando la planta combate de forma exitosa la infección, mientras que las manifestaciones de enfermedad o susceptibilidad aparecen cuando hay compatibilidad entre el agente invasor y el hospedero (Wit, 2007). En este contexto, la sobrevivencia de las plantas depende de una oportuna percepción del patógeno y de una eficiente respuesta de defensa.

En general los mecanismos de defensa de las plantas se pueden dividir en:

- a) **Mecanismos de defensa constitutivos**, los cuales están presentes siempre, aun cuando no se haya presentado la interacción con el patógeno. Estos son barreras estructurales como la pared celular y cutículas cerosas que evitan la entrada del agente invasor. También forman parte de estos mecanismos de defensa las sustancias tóxicas para el patógeno que limitan su viabilidad y reducen el riesgo de la infección (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 2004).
- b) **Mecanismos de defensa inducibles**, los cuales se activan cuando se expone la planta al patógeno. Esta interacción dispara la activación de cascadas intracelulares de señalización que tienen como objetivo inducir la transcripción de genes que a su vez conducen a la síntesis *de novo* de diversos compuestos responsables de ocasionar cambios tanto moleculares y bioquímicos como morfológicos. Estos mecanismos pueden ser activados por dos tipos de elicitores: PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) y efectores.

En los casos en los que los patógenos evaden las barreras estructurales y penetran en el tejido vegetal a través de heridas o de poros naturales como estomas e hidátodos, logran llegar al espacio intercelular o apoplasto desde donde establecen una interacción con las células vegetales. El reconocimiento del microorganismo patógeno acoplado con una rápida y efectiva inducción de respuestas de defensa hace la diferencia entre la resistencia y la susceptibilidad.

1.1 Los dos esquemas de inmunidad en plantas: inmunidad PTI y ETI

Diversos estudios han dejado en claro que existen dos modelos de inmunidad en las plantas, la inmunidad innata desencadenada por PAMPs (PTI) y la inducida por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006; Boller y He, 2009).

En el primer caso, la inmunidad innata es la primera línea de defensa tanto espacial como temporal y se basa en la percepción de patrones asociados a patógenos (PAMPs) (Denoux *et al.*, 2008; Postel y Kemmerling, 2009). Los PAMPs son moléculas altamente conservadas en los microorganismos y son esenciales para su ciclo de vida. Algunos ejemplos son la flagelina, el factor de elongación bacteriano EF-Tu, los lipopolisacáridos presentes en la pared celular de

bacterias Gram-negativas, la xilanasas, la quitina y el ergosterol de hongos, entre otros (Newman *et al.*, 2007).

La percepción de estas moléculas se lleva a cabo mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que se encuentran en la membrana plasmática de las células vegetales y que reconocen dominios particulares de los PAMPs (Wit, 2007; Boller y He, 2009). Estos receptores membranales pueden ser “receptores con un dominio de leucinas repetidas y con actividad de cinasa” (LRR-RLK), que como su nombre lo indica, están constituidos por un dominio extracelular de unión al ligando (dominio repetido rico en leucina), un dominio transmembranal y un dominio intracelular con actividad de cinasa, que es el responsable de la trasducción de la señal (Bittel y Robatzek, 2007). El receptor de flagelina FLS2 es un ejemplo de esta familia de receptores (Gómez-Gómez y Boller, 2000). Además de receptores LRR-RLK, las plantas también poseen “receptores proteicos con un dominio de leucinas repetidas” (LRR-RLP), que representan otra clase de proteínas similares estructuralmente a los receptores RLK pero que carecen del dominio cinasa citoplásmico. Un ejemplo de este tipo de receptores se ha reportado en jitomate en respuesta a la interacción con la xilanasas fúngica (Ron y Avni, 2004).

Se sabe que inmediatamente después del reconocimiento de los PAMPs en la superficie celular, se origina una serie de respuestas intracelulares de defensa que tienen como objetivo evitar el ingreso de más microorganismos patógenos (Da Cunha *et al.*, 2006; Wit, 2007). Aunque estos mecanismos moleculares de señalización aún no han sido completamente dilucidados, existen evidencias genéticas y bioquímicas que relacionan las respuestas de defensa inducidas por PAMPs con parámetros como deposición de calosa y acumulación de proteínas relacionadas con la defensa como quitinasas, glucanasas y proteasas (Chisholm *et al.*, 2006; Boller y He, 2009), además de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la señalización mediada por cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y la activación transcripcional temprana de genes de defensa (Serrano *et al.*, 2007). Es importante mencionar que si bien la inmunidad mediada por los PAMPs produce resistencia, es una respuesta de defensa no específica para el patógeno que infecta, ya que independientemente de la naturaleza química del evocador, los mecanismos de defensa que se desencadenan son muy similares.

En respuesta al esquema de inmunidad PTI, algunos patógenos desarrollaron evolutivamente un sistema de secreción para internalizar moléculas efectoras (o factores de virulencia) a la célula que tienen como blanco interferir con el reconocimiento de PAMPs y suprimir las respuestas de defensa a diferentes niveles (Nicaise *et al.*, 2009) o bien pueden promover la acumulación de nutrientes y agua en el apoplasto para el mantenimiento de los patógenos en el espacio intercelular (Buell *et al.*, 2003).

En un análisis funcional del genoma de *Pseudomonas syringae* DC3000 se postuló que cuando se da la interacción entre la planta y la bacteria, esta última internaliza a la célula vegetal alrededor de 31 efectores a través del sistema de secreción tipo III (TTSS) (Buell *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008). Este sistema de secreción, también llamado aparato de secreción Hrp o inyectisoma, es un complejo proteico que le permite a las bacterias Gram-negativas inyectar los efectores o proteínas Hop al citosol de las células vegetales (Hueck, 1998; Büttner y Yang-He, 2009). Una vez que las proteínas efectoras ingresan a la célula tienen como blanco diversos procesos celulares para lograr la supresión de la inmunidad innata, por ejemplo, en el caso de *Pseudomonas syringae* DC3000, los efectores AvrPto y AvrPtoB interactúan físicamente con los dominios cinasa de receptores de PAMPs como FLS2, EFR y BAK1 inhibiendo su actividad (Boller y He, 2009; Kaffarnik *et al.*, 2009). Mientras que las proteínas AvrB, AvrRPM1 y AvrRpt2, interfieren con la función de RIN4, una proteína de la planta implicada en la regulación de las respuestas de defensa (Schechter *et al.*, 2004). Así mismo, el efector HopAI1 es una fosfotreonina liasa capaz de defosforilar a las cinasas MPK3 y a MPK6 interrumpiendo la señalización de defensa (Zhang *et al.*, 2007).

En respuesta a la estrategia de los patógenos que involucra el ataque mediado por efectores, las plantas han desarrollado sistemas altamente específicos y efectivos de reconocimiento de las moléculas efectoras que resultan en el tipo de inmunidad ETI (Kaffarnik *et al.*, 2009; Tsuda *et al.*, 2009). Esta respuesta de defensa involucra el reconocimiento de manera directa o indirecta de las moléculas efectoras por proteínas de resistencia de la planta (proteínas R), que contribuyen al disparo de la señal para manifestar resistencia contra el organismo invasor. Estas proteínas R son moléculas intracelulares, la mayoría de ellas del tipo NB-LRR, denominadas así ya que están constituidas por un dominio central de unión a nucleótido (NB) y un dominio rico en leucinas (LRR) en el carboxilo terminal (Takken y Goverse, 2012).

En los casos en los que las proteínas efectoras son reconocidas por proteínas del hospedero dando origen a una respuesta de defensa, éstas últimas se denominan proteínas de avirulencia. Este modelo de resistencia específico que se basa en el reconocimiento del producto de un gen de avirulencia del patógeno, por medio del producto de un gen de resistencia del hospedero, se denomina resistencia “gen por gen” (Flor, 1971). Entre los mecanismos de defensa que se disparan en este tipo de inmunidad están: fortificación de la pared celular, flujos iónicos, estallido oxidativo, cambios en fosforilaciones de proteínas, inducción de la síntesis de ácido salicílico y expresión de genes de defensa, además de que generalmente en este tipo de inmunidad se presenta la respuesta de hipersensibilidad (Mur *et al.*, 2008). Cabe mencionar que estas respuestas son muy similares a las que se presentan en el caso de la inmunidad PTI, sin embargo, la diferencia entre ambas formas de inmunidad está dada fundamentalmente por

factores como la temporalidad y la magnitud de las respuestas, determinándose así diferentes grados de efectividad de las acciones de la planta en contra del ataque del patógeno.

1.2 Sistemas de transducción de señales en los mecanismos de defensa contra patógenos

Una vez que se detecta el estímulo del patógeno por alguno de los sistemas de percepción, ya sean membranales o citosólicos, da inicio la transducción de la señal, llamada también primer mensajero. Para lograr la transmisión de este estímulo externo se activan complejas redes de señalización intracelulares que se componen de elementos que incluyen, además de los receptores, a mensajeros no proteicos, enzimas y factores de transcripción. Las moléculas (llamadas segundos mensajeros) no proteicas incluyen a los nucleótidos cíclicos, ERO, moléculas de origen lipídico y calcio. Los receptores, como ya se describió anteriormente, perciben un estímulo y son el primer eslabón en la cascada de señalización. A continuación, se activan moléculas secretadas internamente que transmiten y amplifican la señal del receptor hacia otras proteínas.

En las células vegetales, dos de los principales elementos en la transducción de señales son los flujos de Ca^{2+} y las cinasas de proteínas, los cuales están involucrados en muchos procesos que afectan la actividad de cientos de enzimas. Las señales pueden activar corriente abajo a varias rutas que actúan cooperativa y sinérgicamente para llevar a la respuesta final, que puede ser la activación de enzimas y/o de factores de transcripción.

A continuación se describen algunos de los elementos responsables de la transducción de señales que son relevantes en la interacción planta-patógeno.

1.2.1 Las cascadas de MAP cinasas

Uno de los mecanismos que conduce a la activación de las respuestas de defensa consiste en la señalización por cascadas de MAP cinasas. Las MAP cinasas son enzimas citosólicas que tienen como objetivo transducir estímulos externos percibidos por receptores membranales mediante una serie de reacciones de fosforilación (Gechev y Hille, 2005) en respuesta a procesos de desarrollo o condiciones tanto de estrés abiótico como biótico (Ichimura *et al.*, 2006). Este sistema de transducción de señales se conforma de tres elementos: la MAPKKK (cinasa de la cinasa de la MAPK), la MAPKK (cinasa de la MAPK) y la MAPK (MAPK); la secuencia indica el orden en que los componentes se van activando consecutivamente mediante las reacciones de fosforilación (Zhang y Klessig, 2001). Existen múltiples miembros de cada uno de los tres elementos de estas cinasas en la célula que contribuyen de manera específica a la transducción de señales (Mizoguchi *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado aproximadamente 20 MAPKs diferentes (Ichimura *et al.*, 2002).

Se sabe que durante la estimulación con distintos evocadores derivados de hongos y bacterias, así como en respuesta a infecciones, las plantas activan elementos de las cascadas de MAP cinasas, lo que ha llevado a conocer su participación en la activación de respuestas de defensa (Cardinale *et al.*, 2000; Saucedo García y Gavilanes Ruíz, 2005). Un ejemplo es el reporte de Romeis (1999), que da evidencia de la activación de las MAP cinasas conocidas como: SIPK (cinasa de proteína inducida por ácido salicílico) y WIPK (cinasa de proteína inducida por herida), una vez que se ha dado el reconocimiento entre el producto de un gen de avirulencia *Avr-9* del patógeno *Cladosporium fulvum* y el correspondiente producto del gen de resistencia de tomate *Cf-9* expresado en *Nicotiana tabacum*.

1.2.2 Fitohormonas en la señalización de respuestas de defensa

Otros elementos que forman parte de las vías de señalización involucradas en múltiples procesos celulares incluyendo crecimiento, desarrollo, reproducción, respuestas a estrés biótico y abiótico, son las fitohormonas (Pietersé *et al.*, 2009). Las fitohormonas son moléculas pequeñas que actúan como señalizadores, algunos ejemplos son: el ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ), el etileno (ET), el ácido abscísico (ABA), las citocininas, las auxinas, las giberelinas y los brasinoesteroides (Bari y Jones, 2009). En particular AS, AJ y ET (Figura 1) tienen un papel dominante en las respuestas de defensa, es por ello que en los últimos años se han tenido grandes avances en el entendimiento de las vías en las que participan, sin embargo, debido a la complejidad de la interacción entre las diferentes vías de señalización y su regulación, los mecanismos moleculares no han sido entendidos completamente.

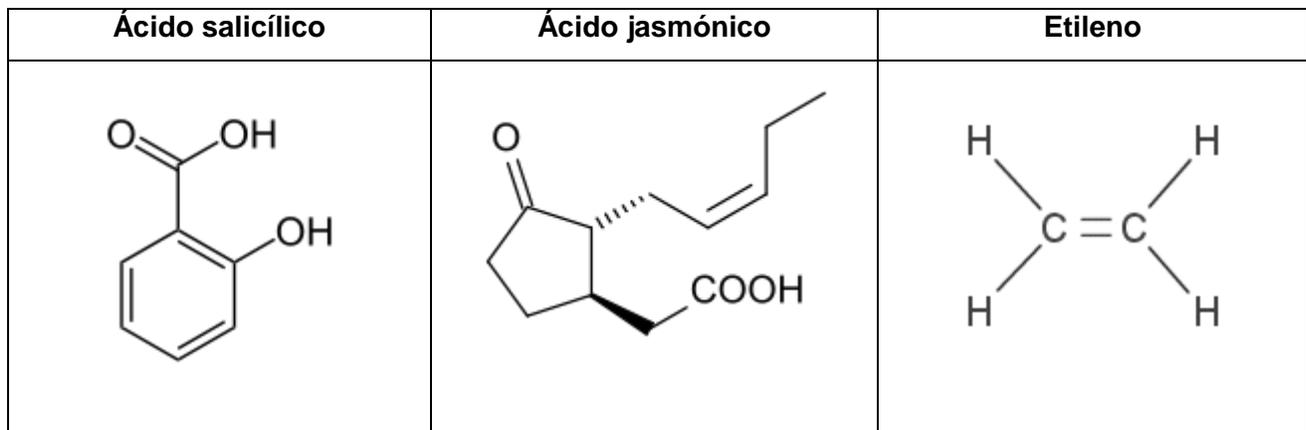


Figura 1. Estructura química de algunas fitohormonas implicadas en las vías de señalización relacionadas con la defensa en plantas.

Se ha visto que la infección de plantas con diversos patógenos resulta en cambios en los niveles de fitohormonas. En diversos estudios se ha documentado que generalmente la producción de AS está asociada a la activación de respuestas de defensa contra patógenos biótrofos y

hemibiótrofos (Glazebrook, 2005; An y Mou, 2011). Además, esta fitohormona es un elemento esencial para desencadenar la respuesta sistémica adquirida (RSA), la cual permite que se activen respuestas de defensa en zonas distantes al sitio de infección con el propósito de tener un efecto protector en tejidos no dañados (Park *et al.*, 2007). Un componente importante de la señalización por AS es el elemento regulador NPR1 (Non-Expressor of PR genes), el cual interacciona con factores de transcripción que están involucrados en activar a genes responsivos de la vía como *PR-1* y *PR-5* (Dong, 2004). Al mismo tiempo, NPR1 regula la supresión de la vía del AJ (Spoel *et al.*, 2003).

Para el estudio de la participación de las fitohormonas en las respuestas de inmunidad en las plantas se ha recurrido al uso de diversas líneas mutantes generadas a partir de especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, en las cuales se ha comprometido la biosíntesis de alguna de estas moléculas, su reconocimiento o algún elemento de la señalización en la que participan. Por ejemplo, las plantas transformadas con el trasgen *nahG*, cuyo producto degrada al AS, o plantas que presentan mutaciones en la ruta biosintética de esta fitohormona, son más susceptibles al ataque de patógenos (Gaffney *et al.*, 1993; Wildermuth *et al.*, 2001).

En contraste con el AS, el AJ y el ET están comúnmente asociados con la respuesta de defensa contra patógenos necrótrofos e insectos y se sabe que estas fitohormonas actúan de manera sinérgica. Lo anterior se ha evidenciado en *Arabidopsis* en donde para la expresión del gen que codifica para una defensina (*PDF1.2*), se requiere la activación de la vía del AJ y del ET simultáneamente (Penninckx *et al.*, 1998).

1.2.3 Especies reactivas de oxígeno en la transducción de señales

La producción de ERO, como el ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se presenta tanto en la respuesta PTI como en la ETI. En general, los PAMPs inducen un aumento temprano pero transitorio de ERO; mientras que el reconocimiento de un patógeno vía la interacción gen-por-gen promueve un estallido oxidativo, que aunque ocurre a tiempos tempranos, también se caracteriza por ser una acumulación masiva de estas especies que se mantiene por tiempos prolongados.

Existen diversas fuentes de ERO que participan activamente en la defensa contra patógenos. Un ejemplo es la NADPH oxidasa (Torres *et al.*, 2005), que junto con las peroxidasas de la pared celular contribuyen al estallido oxidativo que se presenta en el apoplasto (Bolwell *et al.*, 1998). Estudios realizados con mutantes de la NADPH oxidasa han revelado la importancia de esta fuente de producción de ERO para el reconocimiento de los patógenos (Torres *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). Además del estallido oxidativo que se ha asociado con el apoplasto, también

existen evidencias de la producción de ERO intracelulares que tienen funciones en la defensa, en particular en organelos como el cloroplasto, la mitocondria y los peroxisomas.

Algunas de las funciones que se le han atribuido a las ERO durante la interacción planta-patógeno son tener un efecto antimicrobiano directo sobre las células del patógeno, así como participar en el fortalecimiento de barreras estructurales favoreciendo el entrecruzamiento de las glicoproteínas de la pared celular para limitar la entrada del patógeno (Bradley *et al.*, 1992). Además, otras evidencias proponen la participación de las ERO como señalizadores intracelulares, ya que debido a sus características redox estas moléculas potencialmente pueden inducir el control de factores de transcripción mediante cambios redox y/o a su vez interactuar con otros componentes celulares de señalización como cascadas de fosforilación de MAP cinasas, fitohormonas y señalización por calcio (Van Breusegem *et al.*, 2001; Mazars *et al.*, 2010; Torres, 2010; Lachaud *et al.*, 2011).

1.2.4 Bases de cadena larga como moléculas señalizadoras

Recientemente se ha descrito la función de señalización de las bases de cadena larga (BCL). Estas son moléculas lipídicas precursoras de esfingolípidos. Los trabajos de Ng *et al.* (2001) y Coursol *et al.* (2003, 2005) establecieron que la esfingosina fosforilada (d18:1-P) y la fitoesfingosina fosforilada (t18:1P), respectivamente, actúan como moléculas señalizadoras durante la sequía. Estas BCL fosforiladas regulan las actividades de canales iónicos en *Commelina communis* y *Arabidopsis thaliana*, lo cual tiene implicaciones en el cierre de estomas. Así mismo, se ha estudiado la función de las BCL en la muerte celular que ocurre durante la defensa contra patógenos (Lachaud *et al.*, 2011; Saucedo-García *et al.*, 2011a). Si bien no se conocen todos los eslabones que llevan a cabo la transducción de la señal mediada por estas moléculas, cada vez se cuenta con más evidencias para poder llegar a describir su mecanismo de acción. En la siguiente sección se profundizará más acerca de las BCL y sus implicaciones en la señalización durante la defensa contra patógenos.

1.3 La expresión de genes de defensa como un objetivo de las vías de señalización para lograr inmunidad

La activación de sistemas de transducción de señales después del reconocimiento del patógeno resulta en la activación de la expresión de cientos de genes que codifican para proteínas involucradas en diversas funciones para contender el ataque de un patógeno, ejemplos de ello son:

(a) Proteínas que participan en estructurar barreras físicas para el confinamiento del patógeno (Ođjakova y Hadjiivanova, 2001).

(b) Enzimas del metabolismo secundario para la síntesis de compuestos antimicrobianos.

(c) Proteínas relacionadas con patogenicidad (PRs).

De acuerdo con Antoniw *et al.* (1980), una PR es cualquier proteína sintetizada por las plantas en respuesta a la infección de un patógeno. Las PRs se distinguen por sus propiedades bioquímicas, ya que éstas son proteínas de bajo peso molecular (6-43 kDa), termoestables y altamente resistentes al ataque de proteasas (Edevra, 2005). Se localizan principalmente en vacuola y apoplasto, siendo este último el sitio principal para su acumulación. Sin embargo, también se han detectado PRs en las “papillae” de las paredes celulares que se forman en respuesta a los patógenos (Bradley *et al.*, 1992). Se ha comprobado que plantas transgénicas que sobreexpresan PRs presentan una mayor resistencia al ataque de patógenos (Mauch *et al.*, 1998) y que la mayoría son inducidas por la acción de los compuestos señalizadores como ácido salicílico, ácido jasmónico y/o etileno.

Las proteínas PR se han clasificado en 17 familias (Tabla 1) y se han agrupado de acuerdo a diversas características como secuencia primaria, actividad enzimática o biológica (Van Loon *et al.*, 2006). En general se conoce que estas proteínas ejercen su efecto en contra del patógeno ya que tienen actividad antimicrobiana, algunas con actividad hidrolítica de compuestos de paredes celulares o que son moléculas tóxicas para el patógeno (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

A continuación se detallan las características de algunas de las familias PR a las que pertenecen los genes que se estudian en este proyecto:

PR-1. Los genomas de las plantas contienen familias multigénicas que codifican para proteínas tipo PR-1, las cuales se han clasificado de acuerdo a su punto isoeléctrico como ácidas o básicas. Estas proteínas se caracterizan por presentar 35 % de identidad en la secuencia de aminoácidos, así como un dominio conservado PR-1, el cual está formado por cuatro α -hélices y cuatro β -plegadas (Van Loon *et al.*, 2006). Aún cuando estas PRs se han clasificado en la misma familia de acuerdo a su identidad en la secuencia, pueden tener diferente actividad biológica.

El genoma de *Arabidopsis* contiene 22 genes que codifican para proteínas tipo PR-1, en particular el gen con número de acceso At2g12610 se expresa en condiciones de infección con la bacteria fitopatogena *Pseudomonas syringae pv. tomato*, con el hongo *Alternaria brassicicola*, tras la infestación con el insecto *Pieris rapae*, así como con la aplicación exógena de ácido salicílico (Rogers y Ausubel, 1997). De acuerdo a lo anterior, se ha considerado la expresión de este gen como marcador de la activación la vía de señalización de la fitohormona AS.

Aunque no se sabe con certeza la función de las proteínas tipo PR-1, se ha propuesto que poseen actividad antimicrobiana (Niderman *et al.*, 1995) y está claro que la inducción de la

expresión de los genes que codifican para estas proteínas está generalmente asociada a la manifestación de la HR. Estudios recientes sugieren la función de proteínas PR-1 como de proteasa mediadora de la respuesta de muerte celular (Lu *et al.*, 2012).

Tabla 1. Familia de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR).

Familia	Miembro representativo	Función
PR-1	PR-1 ^a de tabaco	Desconocida
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3-glucanasa
PR-3	P y Q de tabaco	Quitinasas clase I, II, IV, VI y VIII
PR-4	R de tabaco	Proteínas de unión a quitina
PR-5	S de tabaco	Tipo taumatina
PR-6	Inhibidor del tomate	Inhibidor de proteinasa
PR-7	P ₆₉ de tomate	Endoproteinasa
PR-8	Quitinasa de calabaza	Quitinasa clase III
PR-9	Peroxidasa de tabaco	Peroxidasa
PR-10	PR-10 de perejil	Ribonucleasa
PR-11	Quitinasa clase V de tabaco	Quitinasa clase V
PR-12	Rs-AFP3 de perejil	Defensinas
PR-13	THI-2.1 de Arabidopsis	Tioninas
PR-14	LTP4 de cebada	Proteínas de transferencia de lípidos
PR-15	OxOa de cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP de cebada	Tipo de oxalato oxidasa
PR-17	Prp27 de tabaco	Desconocida

Tomada de Van Loon *et al.*, 2006.

Defensinas. Corresponden a la familia PR-12 y también reciben el nombre de PR péptidos, ya que se caracterizan por ser polipéptidos de un peso molecular menor a los 10 kDa, cargados positivamente y con ocho residuos de cisteína a lo largo de la cadena polipeptídica (Egorov y Odintsova, 2012). El nombre defensina (con abreviación PDF) fue dado debido a sus propiedades antifúngicas y/o antibacterianas determinadas *in vitro* (Thevissen *et al.*, 2003). Tres tipos de defensinas de *A. thaliana* han sido purificadas: AtPDF1, AtPDF2 y AtPDF3. La familia AtPDF1 está compuesta por siete genes que codifican para las defensinas de la AtPDF1.1 a la AtPDF1.5. Tres genes *AtPDF1.2a*, *b* y *c* codifican para el mismo péptido (AtPDF1.2).

Se ha reportado que se induce la expresión del gen *AtPDF1.2a* al infectar la planta con diversos patógenos y con tratamientos de ET y JA. Por esta razón, este gen se utiliza como un marcador

para estudiar la respuesta de defensa mediada por las fitohormonas ET/JA (Lay y Anderson, 2005). Estudios en estos genes marcadores han dado la pauta para desarrollar la teoría de que la resistencia contra patógenos necrótrofos está relacionada con vías de señalización en las que participan las fitohormonas ET y JA; mientras que la vía del AS se activa en contra de patógenos biótropos principalmente (Manners *et al.*, 1998; Sels *et al.*, 2008).

Quitinasas: Estas enzimas hidrolizan quitina, que es el principal componente estructural de paredes celulares de hongos, en unidades de *N*-acetilglucosamina, ya sea por ruptura de los enlaces glucosídicos 1-3 o 1-4. La producción de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen que codifica la quitinasa han confirmado poseer resistencia al ataque de patógenos (Sharma *et al.*, 2011). *β*-quitinasa (At3g12500) es un gen de *Arabidopsis* que codifica para una quitinasa básica involucrada en las vías de señalización del ET y JA.

Se ha visto que cuando las respuestas de defensa que se activan no son suficientemente efectivas para contender con el ataque del patógeno, la siguiente estrategia es la muerte celular del tejido vegetal infectado para evitar la diseminación del patógeno (Morel y Dangl, 1997; Greenberg y Yao, 2004). A continuación se describe la muerte celular en el contexto de la interacción planta-patógeno con énfasis en la respuesta de hipersensibilidad.

1.4 La muerte celular programada en la defensa contra patógenos

La muerte celular de tejidos del organismo hospedero ocurre en muchas de las interacciones entre las plantas y los patógenos que las infectan (Dangl *et al.*, 1996). Sin embargo, esta muerte celular puede estar asociada tanto con la resistencia, como con la susceptibilidad a la infección, dependiendo del estilo de vida del patógeno y de las características de la planta, es por ello que resulta muy importante diferenciar los tipos de muerte celular que se presentan en los diversos escenarios de la interacción planta-patógeno. Para comenzar con esta distinción es necesario mencionar que los organismos patógenos se clasifican de acuerdo a su estilo de vida en necrótrofos, biótropos y hemibiótropos (Greenberg, 1996, 1997; Wit, 2007). Los patógenos necrótrofos son aquellos que se benefician de los nutrientes de las células vegetales, sin requerir una activa participación del hospedero, por lo que comúnmente proliferan en tejidos vegetales senescentes o con heridas (Morel y Dangl, 1997). Además, estos patógenos frecuentemente producen toxinas para destruir el tejido vegetal antes de la colonización (Wit, 2007). En este proceso de infección, el tipo de muerte celular involucrada es la necrosis la cual, a diferencia de la muerte celular programada (MCP), se caracteriza por ser una muerte descontrolada que se presenta generalmente tras la exposición a compuestos altamente tóxicos,

estrés por intenso calor o frío o heridas traumáticas que causan un daño inmediato en la membrana u organelos celulares (Gilchrist, 1998).

Por otro lado, los patógenos biótrofos requieren de la planta viva para completar su ciclo de vida, ya que dependen de los nutrimentos del hospedero (Dangl y Jones, 2001); mientras que los patógenos hemibiótrofos pueden actuar como biótrofos o necrótrofos dependiendo de las condiciones en que se encuentren, de acuerdo al tipo de hospedero o al particular estadio de su ciclo de vida (Glazebrook, 2005). En el caso particular del ataque de tejidos vegetales por los patógenos biótrofos se presenta un tipo de MCP, que a diferencia de promover la proliferación del invasor, como ocurre en el caso de la infección con patógenos necrótrofos, está asociada a la defensa y se conoce como respuesta de hipersensibilidad (HR). Otra diferencia con la necrosis es que este tipo de muerte es programada, lo que involucra una secuencia de eventos que llevan a la destrucción de las células de una manera organizada y controlada en respuesta a un estímulo (Smirnoff, 2005; Reape *et al.*, 2008). Lo anterior se logra mediante la activación de una maquinaria genéticamente regulada que requiere de una activa participación del metabolismo celular (Gilchrist, 1998).

1.4.1 La respuesta de hipersensibilidad

La HR es un tipo de MCP que se puede observar macroscópicamente como una lesión de muerte localizada en el sitio de infección por el patógeno (Agrios, 1997; Morel y Dangl, 1997; Mur *et al.*, 2008) y que tiene como función limitar el avance del organismo invasor restringiendo su acceso a los nutrimentos y al agua provenientes de la planta (Figura 2) (Reape *et al.*, 2008). Como ya se mencionó, de acuerdo a las características de la HR, esta estrategia de defensa resulta exitosa para contener el ataque de organismos biótrofos, ya que en el caso de necrótrofos la muerte de tejido vegetal representa una ventaja para la proliferación del patógeno (Glazebrook, 2005).



Figura 2. Respuesta de hipersensibilidad producida en *Arabidopsis thaliana* al ser expuesta al patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000 (avrRPM1).

Originalmente se creía que la HR se desencadenaba solamente por eventos de reconocimiento de un gen de avirulencia del patógeno y el correspondiente gen de resistencia de la planta

hospedera, en lo que se denomina resistencia gen-por-gen (Flor, 1971; Bent, 1996; Hammond-Kosack y Jones, 1996); sin embargo, recientemente también se ha visto que la HR ocurre en respuesta al reconocimiento de PAMPs como flagelina (Naito *et al.*, 2007) o xilanas (Bailey *et al.*, 1990). Diversos estudios han permitido ir caracterizando este tipo de MCP y se ha determinado que la HR presenta características de apoptosis en donde hay fragmentación del DNA, condensación de la cromatina y pérdida del potencial de membrana (Greenberg y Yao, 2004), la célula también presenta cambios bioquímicos y morfológicos que se presentan en la autofagia como formación de vesículas de doble membrana y ruptura del tonoplasto (Talbot y Kershaw, 2009). Debido a lo anterior, se ha postulado que la HR es una combinación de los principales tipos de muerte celular en donde la temporalidad de los eventos de señalización es determinante para establecer el reclutamiento de las maquinarias celulares de muerte, ya sea por muerte celular tipo apoptosis (para una muerte rápida) o por autofagia (para una muerte más lenta) dependiendo de las particularidades de la interacción de la planta con el patógeno (Love *et al.*, 2008).

1.5 Ejemplos de respuestas de defensa activadas por PAMPs

1.5.1 La respuesta de defensa desencadenada por la flagelina está mediada por MAP cinasas

La flagelina es una proteína estructural de los flagelos bacterianos, se sabe que actúa como PAMP y por lo tanto, desencadena la respuesta de inmunidad PTI (Felix *et al.*, 1999). Se ha demostrado que el reconocimiento de esta proteína se lleva a cabo mediante la detección de una secuencia muy conservada de 22 aminoácidos, que se encuentra cercana a la región del amino terminal y se denomina flg22 (Felix *et al.*, 1999; Zipfel *et al.*, 2004). La percepción de esta secuencia depende del receptor FLS2 (flagellin sensing), el cual es un receptor cinasa del tipo de LRR-RLK (Gómez-Gómez y Boller, 2000). En los últimos años se han dilucidado diversos elementos de la cadena de transducción de señales que se presenta tras el reconocimiento de la flagelina (o del péptido flg22). Se han identificado cambios transitorios en el flujo de iones, como entrada de H⁺ y salida de K⁺ y Cl⁻ a través de la membrana plasmática (Felix *et al.*, 1999). Además, la flagelina induce el incremento de los niveles de Ca²⁺ citosólico (Zimmermann *et al.*, 1997), la producción de ERO (Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez *et al.*, 1999) y la activación de cascadas de MAP cinasas (Nühse *et al.*, 2000). En particular, en *Arabidopsis* se ha estudiado que en esta vía se activan tanto la cinasa MPK6 como la MPK3, que a su vez son activadas por las cinasas MKK4 y MKK5, respectivamente, con una previa activación de la MAPKKK MEKK1 (Asai *et al.*, 2002). También se sabe que los blancos de estas MAPK son factores de transcripción de la familia WRKY, específicamente WRKY22 y WRKY29 (Asai *et al.*, 2002).

Así mismo, en la vía de señalización por flagelina se ha determinado que se induce la activación de genes involucrados en la transducción de señales y genes que codifican para proteínas con potencial actividad antimicrobiana (Zipfel *et al.*, 2004). De esta manera, además de la inducción de genes involucrados con la defensa, el tratamiento con flagelina induce la activación de elementos relacionados con la amplificación de la señal y la detección de posibles microorganismos invasores.

1.5.2 La xilanasa como un elicitador fúngico que induce la biosíntesis de etileno

La xilanasa es una proteína fúngica de 22 kDa que actúa como PAMP. Esta enzima tiene actividad de endo-1,4- β -D-xilanasa, por lo que actúa cortando las cadenas de xilano de la pared celular de plantas liberando xilobiosa y xilosa, como una estrategia del hongo para proliferar en el tejido vegetal.

Se ha reportado que la xilanasa es capaz de elicitar lesiones tipo HR en plantas de tomate y tabaco (Bailey *et al.*, 1992; Yano *et al.*, 1998; Ron *et al.*, 2000) sin ser necesaria su actividad enzimática (Enkerli *et al.*, 1999), ya que el reconocimiento de un pentapéptido por receptores membranales de la célula vegetal es suficiente para desencadenar PTI (Rotblat *et al.*, 2002). También se ha probado que la xilanasa induce la biosíntesis de etileno en hojas de *Nicotiana tabacum* (Fuchs *et al.*, 1989; Dean y Anderson, 1991), de ahí que se haya nombrado como xilanasa inductora de etileno (EIX), mientras que el receptor membranal que la reconoce se denomina LeiEIX y corresponde a un RLP (Ron y Avni, 2004). A pesar de que aún no se conocen los elementos de la vía de señalización mediada por la xilanasa, se sugiere que la endocitosis del receptor es lo que causa el inicio de la transducción de la señal (Bar y Avni, 2009). Las manifestaciones de defensa inducidas por este PAMP son biosíntesis de etileno, producción de fitoalexinas, producción de PRs y HR (Bailey *et al.*, 1990,1991,1992).

2. LOS ESFINGOLÍPIDOS EN PLANTAS: MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LAS RESPUESTAS DE DEFENSA

Los esfingolípidos constituyen una clase de lípidos que se encuentra distribuida en membranas celulares de eucariontes y en algunas bacterias (Sperling y Heinz, 2003). De acuerdo a su estructura química, los esfingolípidos son moléculas anfipáticas que contienen dos cadenas largas hidrofóbicas que integran la porción de ceramida y una cabeza polar. Una de las cadenas hidrofóbicas es una base esfingoidea o base de cadena larga (BCL) y la otra está formada por un ácido graso; ambas estructuras están unidas entre sí por un enlace amida entre el grupo amino de la BCL y el carboxilo del ácido graso (Figura 3). Al grupo hidroxilo terminal de la BCL se pueden unir grupos polares como: fosfatos, dando origen a ceramidas fosfato y hexosas,

originando glucosilceramidas (GluCer), mientras que el enlace con un grupo inositol fosfato da lugar a las inositol fosforilceramidas (IPC). En el caso en que el grupo polar esté constituido tanto por un grupo inositol fosfato y un carbohidrato se generan las glucosilinositol fosfoceramidas (GIPC) (Sperling y Heinz, 2003; Lynch y Dunn, 2004, Pata *et al.*, 2010).

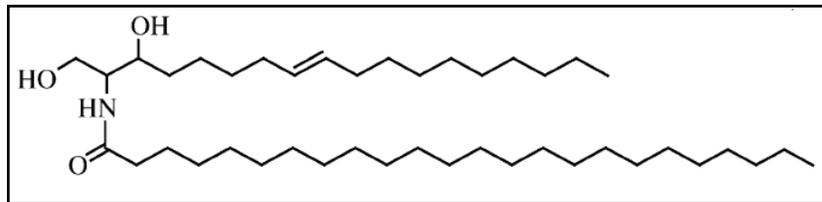


Figura 3. Estructura de la ceramida integrada por una BCL y un ácido graso (Tomada de Dunn *et al.*, 2004)

Debido a las numerosas posibilidades estructurales de los tres componentes ensamblados, los esfingolípidos son moléculas muy diversas y con un alto grado de complejidad. Por ejemplo, los ácidos grasos y las BCL pueden variar tanto en el número de carbonos en las cadenas hidrofóbicas como en el número y la posición de las insaturaciones, en la presencia de hidroxilaciones o de metilaciones (Dunn *et al.*, 2004). Gracias al desarrollo de nuevos procedimientos de extracción y análisis se pudo determinar que en *Arabidopsis* las GIPC son las especies predominantes, siendo su contenido de 64.4 % en hojas, en contraste con el contenido de GluCer que representa un 30 % de los esfingolípidos totales (Markham *et al.*, 2006; Markham y Jaworsky, 2007).

En plantas se distinguen cuatro clases de esfingolípidos para su estudio: las BCL, las ceramidas, las GIPC y las GluCer. Aún cuando las BCL y ceramidas son menos abundantes (10 veces menos) que GIPC y GluCer, dichas moléculas y sus derivados fosforilados han cobrado gran importancia debido a que se han identificado como moléculas señalizadoras (Pata *et al.*, 2010).

2.2 Las bases de cadena larga, precursoras de esfingolípidos complejos.

Los precursores metabólicos de los esfingolípidos complejos son las BCL, cuyas estructuras constan de largas cadenas alquílicas de longitud variable (14-22 átomos de carbono) y de una región polar constituida por un grupo amino en el C2 y al menos dos grupos hidroxilo en C1 y C3. Las cadenas alquílicas pueden presentar insaturaciones en C4 y C8 (Karlsson, 1970). Las BCL que predominan en las plantas tienen una cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono y difieren en el número de hidroxilaciones, así como en el número, posición y configuración estereoquímica de los dobles enlaces (Figura 4).

2.3 Síntesis de esfingolípidos

Los esfingolípidos pueden ser formados por dos vías: la síntesis *de novo* o la vía de salvamento. En esta última, las ceramidas y BCL son liberadas de esfingolípidos complejos y reutilizadas para síntesis de otros esfingolípidos (Hannun y Obeid, 2008).

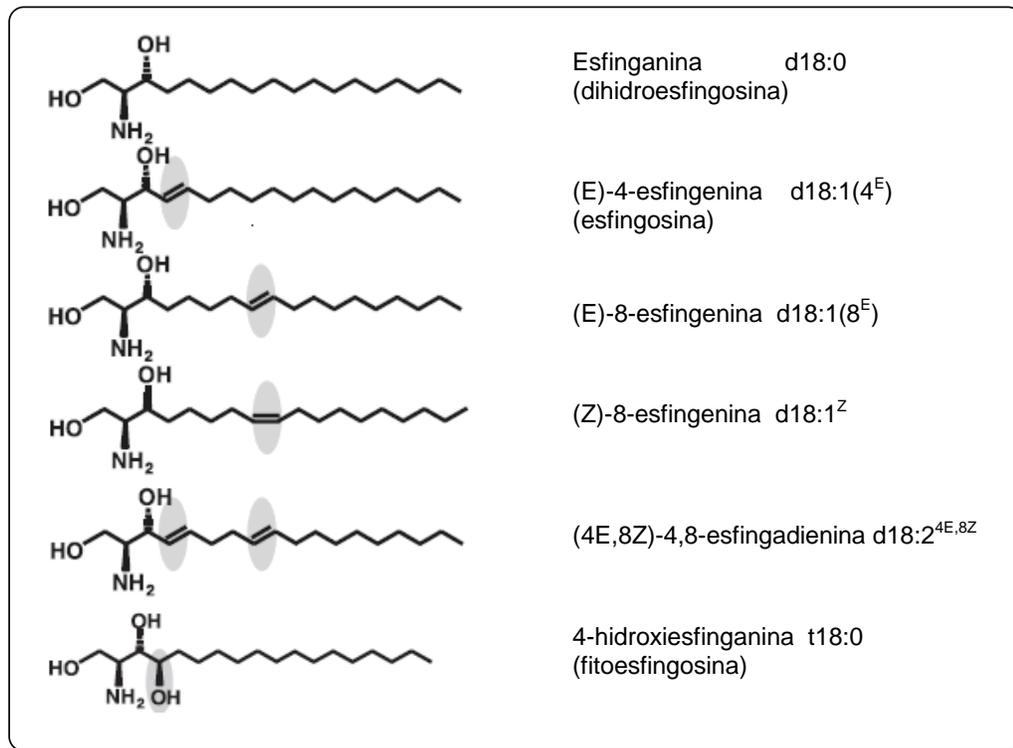


Figura 4. Estructura de algunas BCL presentes en plantas (Adaptado de Sperling y Heinz, 2003).

La biosíntesis *de novo* comienza en el retículo endoplásmico con la condensación de palmitoil-CoA con *L*-serina para producir 3-cetoesfinganina; esta reacción es catalizada por la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT), que es un heterodímero formado por las subunidades LCB1 y LCB2 (Hanada, 2003). En un segundo paso, la 3-cetoesfinganina es reducida con NADPH vía una oxidoreductasa (3-cetoesfinganina reductasa) para dar esfinganina (Lynch y Dunn, 2004). En una subsecuente reacción alterna a la formación de ceramida, la esfinganina puede ser fosforilada por la esfinganina cinasa para formar esfinganina-1-fosfato. Para la formación de ceramida el grupo amino de la esfinganina es acilado mediante un enlace amida, este paso es catalizado por la enzima esfinganina *N*-aciltransferasa también llamada ceramida sintasa. Posteriormente, las ceramidas son transportadas al aparato de Golgi en donde son el sustrato de otras enzimas para la inserción de grupos polares y formar esfingolípidos complejos, por ejemplo, mediante la adición de un residuo de glucosa se forma la glucosilceramida (Figura 5).

Una modificación covalente que pueden sufrir las BCL es la hidroxilación de la esfinganina (d18:0) para formar fitoesfingosina (t18:0); esta reacción es catalizada por las hidroxilasas de BCL denominadas SBH. En el genoma de *Arabidopsis* hay dos genes *SBH*, *SBH1* y *SBH2* (Chen *et al.*, 2008).

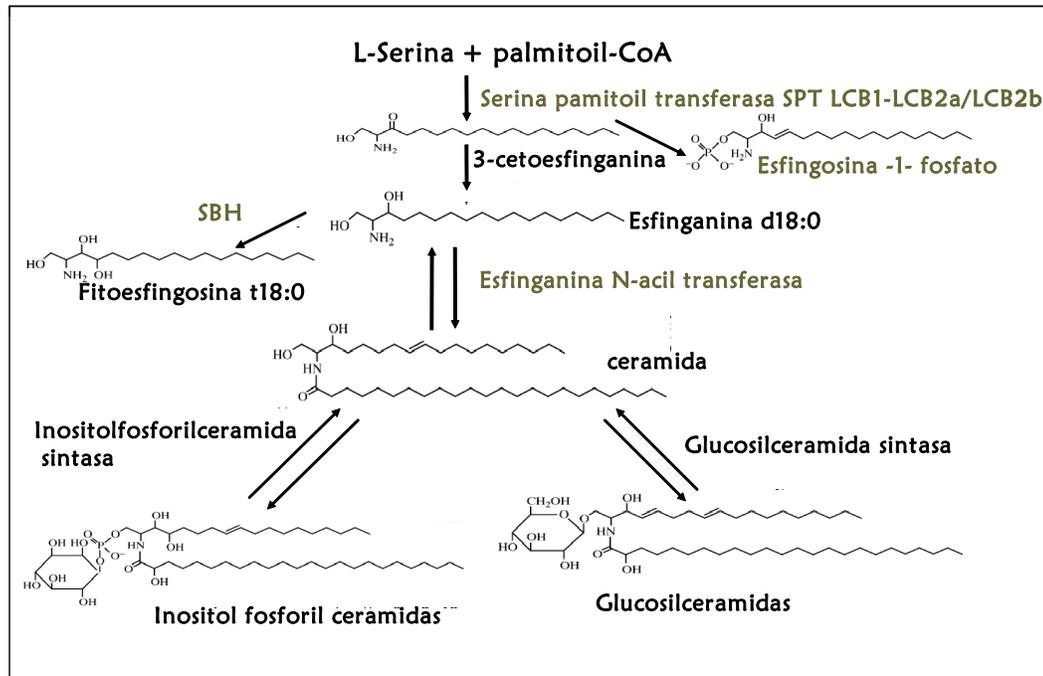


Figura 5. Ruta de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en plantas (Adaptada de Sperling y Heinz, 2003).

2.4 Fumonisina B₁ como inhibidor de la síntesis de esfingolípidos

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides* que frecuentemente contaminan el maíz y otros granos. La toxina predominante de este grupo y la más potente por su toxicidad es la fumonisina B₁ (FB₁) (Figura 6) (Desai *et al.*, 2002). La fumonisina B₁ es un aminopentol con dos ácidos tricarbálicos unidos mediante un enlace éster a la cadena hidrocarbonada. Esta fumonisina es un potente inhibidor competitivo de la ceramida sintasa, la enzima que cataliza la acilación de esfingánina en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos (Figura 5). Por lo tanto, la inhibición de esta enzima altera la síntesis de esfingolípidos produciendo una acumulación de BCL (Merrill *et al.*, 1996). La inhibición se debe a las similitudes estructurales que presentan las BCL y la micotoxina. De acuerdo al modelo de inhibición, el aminopentol compite con el sustrato (las BCL), al mismo tiempo que los ácidos tricarbálicos interactúan con el enlace del ácido graso acil-CoA (Desai *et al.*, 2002).

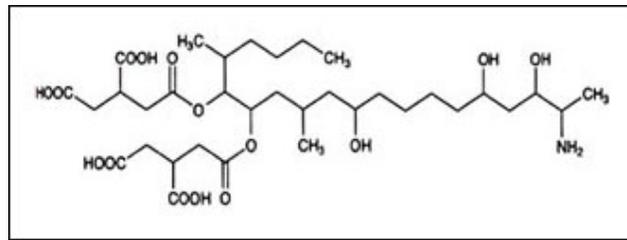


Figura 6. Estructura de la fumonisina B₁ (Merrill *et al.*, 1996).

2.5 Funciones de los esfingolípidos en plantas

Más allá de su función estructural en las membranas celulares, se ha evidenciado la participación de los esfingolípidos complejos como componentes de balsas lipídicas, en donde desempeñan funciones que resultan importantes para la distribución y funcionamiento de proteínas, el tráfico celular y la transducción de señales (Mongrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha demostrado la importancia de los esfingolípidos en las etapas de crecimiento de las plantas (Dietrich *et al.*, 2008), ya que se ha probado que la supresión parcial de gen *LCB1* por RNAi da como resultado reducción de tamaño en las plantas y alteraciones en su morfología (Chen *et al.*, 2006). Otra evidencia es la doble mutante *sbh1-1 sbh2-1*, que carece de BCL trihidroxiladas debido a mutaciones en los genes que codifican para las hidroxilasas de BCL, que presenta reducción en el tamaño debido a defectos en la división celular (Chen *et al.*, 2008).

Respecto a las funciones de las BCL, se ha documentado que el cierre de los estomas está mediado por la elevación de los niveles de esfingosina fosforilada (d18:1-P) que afecta las actividades de canales iónicos en *Commelia communis* y *Arabidopsis thaliana* (Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2003; Coursol *et al.*, 2005). También se sabe de la participación de BCL en la regulación de la muerte celular (Shi *et al.*, 2007) y en particular en la MCP que se presenta en la inmunidad (Saucedo-García *et al.*, 2011), lo que da pie a analizar más profundamente la participación de los esfingolípidos en la inmunidad contra patógenos.

2.6 Los esfingolípidos en las respuestas de defensa

Una evidencia de la participación de los esfingolípidos en las respuestas de defensa es el trabajo de Takahashi *et al.* (2009), quienes publicaron que la enzima SPT está involucrada en la resistencia a un patógeno no hospedero. En este estudio se vio que la sobreexpresión del gen *LCB2*, que codifica para una subunidad de la SPT (primera enzima de la síntesis de esfingolípidos), provoca muerte celular en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Además, se determinó que la expresión del gen *LCB2* es inducida por la infección con un patógeno no hospedero y que las plantas que no expresan el gen *LCB2* presentan un mayor crecimiento del

patógeno no hospedero. Estos resultados ponen en evidencia que la biosíntesis de esfingolípidos es necesaria para desencadenar respuestas de defensa contra un patógeno no hospedero. En este trabajo, se sugirió la participación de las BCL como mediadoras de la defensa, aunque no se presentaron evidencias contundentes que comprobaran su papel en la inmunidad. En este aspecto, el uso de micotoxinas ha contribuido al estudio y entendimiento de la participación de las BCL en la defensa contra patógenos. Al igual que las fumonisinas, producidas por el hongo *Fusarium verticillioides*, las micotoxinas AAL producidas por *Alternaria alternata f. sp. lycopersici*, han sido caracterizadas como micotoxinas SAMs (sphinganine analog mycotoxins), ya que su estructura es muy similar a la de la BCL esfinganina (Sánchez-Rangel y Plasencia, 2010). Ambas micotoxinas son inhibidoras de la ceramida sintasa causando un bloqueo en la síntesis de esfingolípidos complejos con una acumulación de BCL (Abbas *et al.*, 1994).

En este contexto, una de las primeras evidencias que propuso a la FB₁ como inductora de muerte celular tipo HR fue el trabajo de Stone *et al.*, (2000). En este reporte se propuso que la exposición a esta micotoxina produce un fenotipo de muerte celular precedido de respuestas de defensa como deposición de calosa, producción de ERO, acumulación de camalexina y la expresión del gen de defensa *PR-1*. Aunque en este caso no se atribuyó el efecto de inducción de MCP a las BCL, independientemente se sabía que la FB₁, al inhibir la ceramida sintasa de la vía de síntesis *de novo* de esfingolípidos, provocaba una acumulación de BCL (Abbas *et al.*, 1994).

Tomando como evidencia los hallazgos anteriores, en los últimos años se ha explorado la participación de las BCL como moléculas señalizadoras en una vía que conduce a MCP-HR. En el 2007 se reportó que la acumulación de BCL, y no la falta de esfingolípidos complejos, era responsable de la inducción de MCP (Shi *et al.*, 2007). En este trabajo se analizó la de *Arabidopsis fbr11-1* que al ser expuesta a la FB₁ no produce ERO y no manifiesta MCP. *FBR11-1* codifica para la subunidad LCB1 de la SPT, primera enzima de la vía de síntesis *de novo* de esfingolípidos, por lo tanto, con la mutación de este gen la planta presentaba una atenuada formación de BCL en respuesta a la exposición a la toxina. Recientemente, más allá de confirmar el papel de las BCL como moléculas señalizadoras, se postuló a la esfinganina (d18:0) como la molécula responsable de la inducción de muerte celular y se identificó a la MPK6 como un transductor de señales corriente abajo de la acumulación de esta BCL, así como que este tipo de MCP estaba ligado a reacciones de defensa contra patógenos (Saucedo-García *et al.*, 2011a).

En otro estudio en el que se utilizó el sistema de células de tabaco, se demostró que la aplicación exógena de esfinganina produce incrementos en la concentración de calcio, tanto en el citosol como en el núcleo, así como la inducción de muerte celular (Lachaud *et al.*, 2010). Interesantemente, en este mismo estudio se logró identificar que el aumento en la concentración

de calcio en el núcleo constituye una señal esencial para desencadenar la muerte celular. Lo anterior sugiere una conexión entre la señalización por BCL y los incrementos de calcio para la regulación de la MCP, pero además este hallazgo es importante para la descripción de una posible bifurcación de las vías de señalización en las que participan las BCL. Un primer escenario estaría relacionado con la manifestación de muerte celular y otro con la expresión de reacciones de defensa. Aunque esta bifurcación de vías pareciera contradictoria, ambas tienen el mismo objetivo: la sobrevivencia de la planta, sin embargo, aún no se conocen los elementos y mecanismos implicados en la elección de una u otra vía. En la figura 7 se presentan algunos de los componentes hasta ahora descritos en la vía de señalización que involucra BCL.

Por otra parte, el trabajo de Peer *et al.* (2010) aportó una evidencia importante de la participación de BCL en la respuesta de defensa contra patógenos, ya que se detectó la acumulación de estas especies durante infección bacteriana en plantas de *Arabidopsis*. Interesantemente, la infección con la cepa virulenta de *Pseudomonas syringae pv. tomato*, provocó un aumento rápido pero transitorio de fitoesfingosina, mientras que en el caso de la infección con el patógeno avirulento, la acumulación de esta BCL fue sostenida. Estos aumentos con diferentes temporalidades podrían reflejar la participación de BCL tanto en la respuesta PTI, como en la ETI, sin embargo, no se han estudiado a profundidad las funciones de estas especies esfingoideas en los dos tipos de inmunidad en plantas.

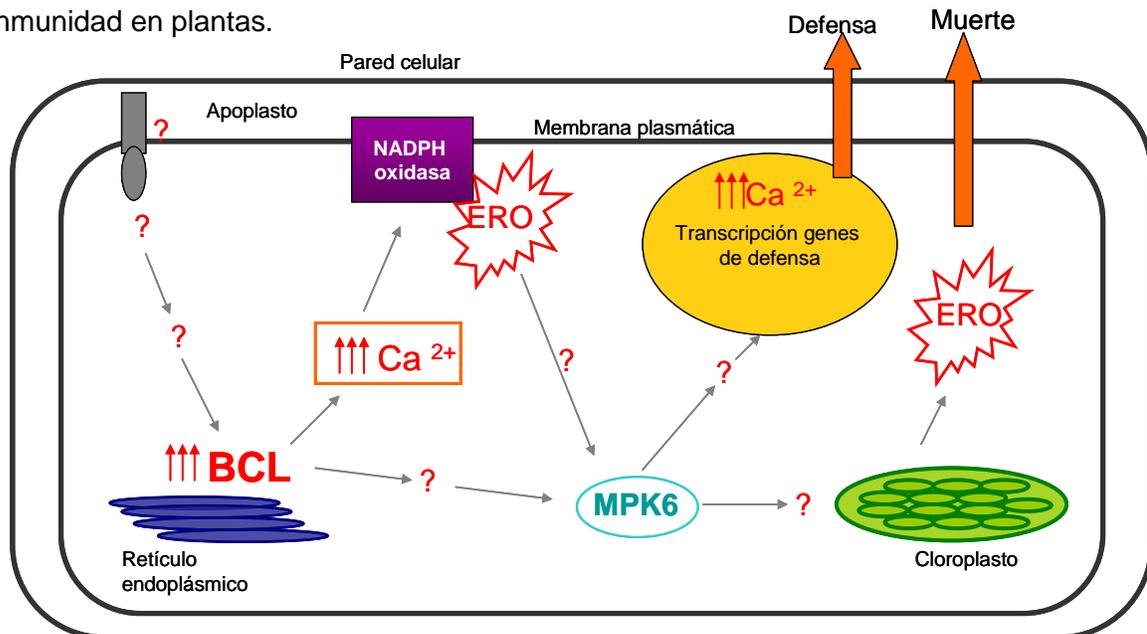


Figura 7. Modelo que considera los elementos conocidos de la vía de transducción de señales mediada por las BCL. La acumulación de BCL promueve la elevación de Ca^{2+} citosólico y nuclear, esta señalización por calcio promueve la formación de ERO en la NADPH oxidasa. Así mismo, los incrementos de BCL promueven la activación de MAP cinasas, incluyendo a la MPK6, cuya activación señala un posible segundo estallido oxidativo procedente del cloroplasto. Paralelamente, se activa la transcripción de genes relacionados con defensa.

ANTECEDENTES INMEDIATOS

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado el papel de las BCL en las respuestas de defensa en plantas.

Inicialmente, se realizaron estudios que confirmaron que la exposición de tejidos de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana* a la toxina FB1 produce una lesión de muerte celular tipo HR, lo cual sugiere una relación entre el tratamiento con la toxina y la defensa, ya que la HR es una respuesta típica en las plantas para defenderse de patógenos biótrosos (Palacios Bahena, 2008; González Solís, 2009; Saucedo García, 2011). Para profundizar en este efecto se realizaron experimentos en donde se determinó que la micotoxina confiere protección a la planta contra la infección de patógenos. En el caso de frijol, se vio que el tratamiento con FB1 disminuyó el tamaño de la lesión causada por el patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Palacios Bahena, 2008). A su vez, experimentos en plántulas de *Arabidopsis thaliana* comprobaron que con un pretratamiento de 12 h con FB1 antes de la exposición al patógeno avirulento *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, se lograba la disminución del crecimiento del patógeno, tanto en la magnitud como la velocidad de su diseminación (Lozano Rosas, 2010); estos resultados apoyan la hipótesis de que la FB1 está promoviendo la activación de reacciones de defensa.

Ya con el antecedente de que la fumonisina B1 actúa como un agente inhibidor de la síntesis de esfingolípidos favorece la acumulación de sus precursores, que son las BCL (Wang *et al.*, 1991), se realizaron experimentos para explorar la participación de las BCL en las reacciones de defensa desencadenadas por la FB1.

La primera evidencia que apoyó la participación de las BCL en la defensa, fue que la fitoesfingosina se acumula de manera similar, en temporalidad y magnitud, tras la exposición al patógeno no hospedero *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y a la FB1 (Palacios Bahena, 2008). Adicionalmente, nuestro laboratorio determinó la cinética de acumulación de diversas BCL libres y fosforiladas en *Arabidopsis* en presencia de FB1, lo cual reveló que la esfingalina (d18:0) es la especie que aumenta en mayor proporción, sugiriendo su participación como elemento inductor de la MCP (González Solís, 2009; Saucedo García *et al.*, 2011a).

Otra evidencia obtenida por nuestro grupo sobre la participación de las BCL en la defensa contra patógenos, fue la contribución del gen *LCB2a* a la MCP inducida por FB1. Esto se logró gracias al uso de la mutante de *Arabidopsis* *lcb2a-1*, la cual no presenta la subunidad LCB2a y por tanto, el complejo LCB1-LCB2a de la SPT. Como resultado, esta mutante acumula menos BCL en comparación con plantas tipo silvestre con el tratamiento con FB1, además, presenta una muerte celular programada muy atenuada en respuesta al tratamiento con la toxina.

Paralelamente, en nuestro laboratorio se han estudiado otras manifestaciones de defensa en respuesta al tratamiento con FB1 y por tanto en asociación con las BCL:

- **Activación de MAP cinasas**

Resultados en maíz y frijol sugieren que las MAP cinasas que se activan por BCL, son las mismas inducidas por patógenos en otras especies vegetales (Saucedo García, 2007). En *Arabidopsis* se identificó a la MPK6 como la MAPK implicada en la señalización por BCL (Saucedo-García et al., 2011a).

- **Producción de ERO**

Se determinó que la exposición de embriones de maíz a la FB1 es capaz de estimular la formación del radical superóxido (Rodríguez Mejía, 2006), también se detectó la producción de H₂O₂ tanto en frijol como en *Arabidopsis* a diferentes tiempos de la exposición a esta micotoxina (González Solís, 2009; Tapia de Aquino, 2012). En concordancia con estos resultados, en protoplastos de *Arabidopsis* se comprobó que BCL tanto endógenas, como exógenas, incrementan la producción del ión superóxido (Rodríguez-Mejía, no publicado).

Para confirmar que las BCL están relacionadas con ERO y defensa, se utilizó el sistema de células en suspensión de *Arabidopsis*, en donde se probó que en condiciones de inhibición de síntesis de esfingolípidos, se abate la producción de H₂O₂ durante la infección con el patógeno avirulento *Pseudomonas syringae* DC3000 *avrRPM1* (Rodríguez-Mejía, no publicado). Además, en el sistema de frijol se verificó la cinética de producción de H₂O₂ en respuesta a la infección con el patógeno no hospedero *Pseudomonas syringae* (González Solís, 2009).

Finalmente, el uso de la mutante de *Arabidopsis pfl1 18-18* que produce una menor cantidad de ERO en el cloroplasto, permitió determinar el papel de este organelo como importante fuente de producción de ERO durante la defensa (Tapia de Aquino, 2012).

En conjunto, todos estos resultados de la acción de las BCL y su relación con varios parámetros clásicos de defensa, contribuyen a apoyar la participación de estas moléculas en la inmunidad de las plantas.

HIPÓTESIS

El aumento de BCL está involucrado en uno de los modelos de inmunidad.

La vía de señalización mediada por la elevación de BCL que conduce a la MCP-HR, involucra la transcripción selectiva de genes de defensa a través de vías mediadas por fitohormonas.

OBJETIVO GENERAL

Profundizar en el conocimiento de la participación de las BCL en los mecanismos de inmunidad en las plantas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Utilizar mutantes de *Arabidopsis thaliana* en las que está comprometida la vía de señalización por BCL en respuesta a patógenos. En esas mutantes:

a) Explorar la participación de las BCL en respuestas de inmunidad inducidas por PAMPs o por efectores a través de:

- Evaluar ETI en respuesta a la infección con las cepas avirulenta y virulenta del patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000.
- Evaluar PTI en respuesta a tratamientos con PAMPs (flagelina/flg22 y xilanasa).
- Evaluar el efecto de la acumulación de BCL en respuesta al tratamiento con FB1.

En los tratamientos descritos, analizar:

- Las características fenotípicas de manifestación de muerte celular/ índice de daño.
- Producción de H₂O₂.
- Crecimiento bacteriano de las cepas avirulenta y virulenta del patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000 en plántulas, en presencia y ausencia de FB1.

b) Evaluar la expresión de genes de defensa marcadores de las vías del ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno, en condiciones en las que hay diferentes niveles de BCL.

- Establecer el sistema experimental para la detección de los transcritos de genes de defensa: *PR-1*, *PDF1.2*, *ACS-6*, *β*-quitinasa.
- Determinar los niveles de transcritos de genes de defensa involucrados en diferentes vías de señalización, en las plantas con y sin exposición a FB1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

En este estudio se utilizó la línea tipo silvestre (ecotipo Columbia-0) y cuatro líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*: *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk6* y *pflD 18-18*, que tienen defectos en la vía de síntesis de esfingolípidos, en la expresión de MAP cinasas o en la producción de ERO en el cloroplasto (Tabla 2). En el caso de la línea *lcb2a-1* se trata de una mutante en el gen *LCB2A*, que codifica para la subunidad LCB2A de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT), que cataliza la primera reacción de la vía de síntesis de esfingolípidos en plantas (Tamura *et al.*, 2001). En esta línea, el gen *LCB2A* ha sufrido una interrupción debido a la inserción de un transposón, dando un gen inactivo que no se transcribe y que por lo tanto, no produce la proteína. Sin embargo, en esta línea la SPT es aún activa, ya que las funciones de la subunidad LCB2A, que ya no es producida a partir del gen *LCB2A*, son mantenidas por la subunidad LCB2B, cuyo gen está intacto. Por otra parte, la mutante *sbh1-1* presenta inserciones de T-DNA en el gen que codifica para la hidroxilasa 1 de bases esfingoideas (*SBH1*). Por efecto de esta mutación, esta línea presenta una disminución del 50 % en el contenido de BCL trihidroxiladas (Chen *et al.*, 2008).

Tabla 2. Líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este proyecto.

Nombre	Genotipo	Fenotipo	Respuesta a FB1
WT (Col-0)	Silvestre	Normal. Niveles normales de BCL y de esfingolípidos complejos.	Acumulación de BCL.
<i>lcb2a-1</i>	Inserción de un transposón en el gen <i>LCB2A</i> de la serina palmitoiltransferasa (SPT) (Dietrich <i>et al.</i> , 2008).	Normal. Niveles normales de BCL y de esfingolípidos complejos.	Resistencia a FB1. Menor acumulación de BCL que la WT.
<i>sbh1-1</i>	Inserciones de T-DNA en el gen que codifica para la hidroxilasa 1 de bases esfingoideas (<i>SBH1</i>) (Chen <i>et al.</i> , 2008)	Reducción del 50 % de BCL trihidroxiladas.	Hipersensible a FB1
<i>mpk6</i>	Inserciones de T-DNA en el gen que codifica para la MPK6 (Liu y Zhang, 2004; Saucedo-García <i>et al.</i> , 2011a).	Niveles normales de esfingolípidos y BCL.	Resistencia a FB1
<i>pflD 18-18</i>	Inserción del gen de la flavodoxina (Tognetti <i>et al.</i> , 2006)	Producción atenuada de ERO en el cloroplasto.	Menor producción de ERO que la WT.

La mutante *mpk6*, fue generada por inserción de T-DNA, por lo que esta línea no expresa a la proteína MAP cinasa 6.

Las plantas de la línea *pflD 18-18* expresan a la proteína flavodoxina (Fld) en el cloroplasto, la cual tiene flavin mononucleótidos como grupo prostético y cumple con la misma función que la ferredoxina. La expresión de la flavodoxina le confiere a las plantas una menor producción de ERO en el cloroplasto (Tognetti *et al.*, 2006; Zurbriggen *et al.*, 2007)

Las líneas de *Arabidopsis thaliana lcb2a-1* y *sbh1-1* fueron generadas y generosamente proporcionadas por el Dr. Edgar B. Cahoon, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Nebraska, Lincoln EE.UU. La línea *mpk6*, correspondiente a la línea SALK-073907 (Liu y Zhang, 2004), fue proporcionada por el Dr. Arturo Guevara García del Instituto de Biotecnología de la UNAM y la línea *pflD 18-18* fue generada y donada por el Dr. Néstor Carillo del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

1.1 Cultivo de líneas de *A. thaliana*

1.1.1 Desinfección y siembra de las semillas de *A. thaliana*

Para su desinfección, las semillas se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se les agregó 1 mL de una solución comercial de NaHClO₄ (Cloralex) 20 % y 1 µL de Tween 20 (cf 0.1 %). El tubo con las semillas se agitó vigorosamente por 20 min en un Mixer modelo 5432 Eppendorf y posteriormente se centrifugó durante aproximadamente 10 s en una mini centrífuga (Labnet modelo C-1200), el sobrenadante se eliminó con una micropipeta utilizando puntas estériles.

Las semillas se lavaron nuevamente con 1 mL de la solución de NaHClO₄ al 20 % por 10 min con agitación vigorosa en un Mixer modelo 5432 Eppendorf. A continuación, el tubo con las semillas se centrifugó por aproximadamente 10 s en una mini centrífuga (Labnet modelo C-1200), el sobrenadante se eliminó con una micropipeta utilizando puntas estériles. Las semillas se enjuagaron 5 veces consecutivas con 1 mL de agua estéril y con agitación por 30 s hasta eliminar completamente el NaHClO₄ y el Tween 20. Cada vez se centrifugó en una mini centrífuga (Labnet modelo C-1200) por 10 s y se eliminó el sobrenadante con una micropipeta. Después del último lavado se agregó agua estéril procurando cubrir totalmente a las semillas para que quedaran suspendidas y pudieran depositarse con ayuda de la punta de una micropipeta, sobre el medio de cultivo sólido de las cajas de Petri.

Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas de Petri de 4 u 8 cm de diámetro, sobre mallas de nylon (63 micras de abertura de poro) en medio sólido de Gamborg B-5 suplementado con sacarosa (Apéndice 2). Las cajas con las semillas sembradas se cubrieron con aluminio y se mantuvieron por 48 h a 4 °C. Posteriormente, se transfirieron a una cámara de incubación a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h oscuridad/ 8 h de luz. Para realizar los experimentos se utilizaron las plántulas de 3 semanas de edad.

1.1.2 Resiembra de plántulas de *A. thaliana* en tierra

En el caso de plantas adultas, plántulas de 2 semanas de edad crecidas en medio de cultivo fueron trasplantadas a macetas con una mezcla de sustratos Sunshine Mix 4, vermiculita y agrolita (en proporciones 3/1/1, w/w/w) hidratados con agua estéril.

Las plantas se utilizaron para realizar los experimentos a las 16-20 semanas de edad.

Otra forma de obtener las plantas adultas fue a partir de la siembra de semillas directamente en tierra en una maceta con la mezcla de sustratos mencionada anteriormente. Una vez transcurridas tres a cuatro semanas se transplantaron de 1 o 2 plantas por maceta.

2. Ensayos de evaluación de la participación de las BCL en las respuestas de inmunidad inducidas por PAMPs o por efectores

Se realizó la evaluación de fenotipos de plantas silvestres y las líneas mutantes que fueron sometidas a distintos tratamientos:

- Exposición a FB1 para modificar los niveles endógenos de BCL, y con ello lograr una repercusión en la manifestación de muerte celular inducida por esta toxina.
- Exposición al patógeno avirulento *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (Pst DC3000 *avrRPM1*) o a la variante virulenta *Pseudomonas syringae* DC3000 (Pst DC3000 vir) para evaluar la implicación de las BCL en el esquema de inmunidad ETI.
- Exposición a los PAMPs flagelina/flg22 y xilanasa para la evaluación de la inmunidad PTI fueron.

2.1 Infiltración de las hojas adultas con MgCl₂, FB₁, el patógeno avirulento Pst DC3000 *avrRPM1*, el patógeno virulento Pst DC3000 vir, la flagelina, el péptido flg22 y la xilanasa

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* de 10-16 semanas de edad con apariencia sana, de las diferentes líneas: silvestre, *lcb2a-1*, *mpk6*, *sbh1-1* y *pflid18-18*.

Se infiltraron alrededor de 12-14 hojas por planta en la parte media lateral derecha del envés, con aproximadamente 20 µL de las soluciones o suspensiones del tratamiento deseado (Tabla 3).

Para la infiltración se utilizó una jeringa de insulina de 1.0 mL y sin aguja, aplicando una ligera presión sobre la hoja, para que la solución penetrara en los intersticios intercelulares del tejido sin que la hoja se rompiera. Se llevó a cabo el registro de la evolución de las lesiones producidas por los tratamientos a través de fotografías, las observaciones de la magnitud de la lesión fueron expresadas como Índice de Daño a distintos tiempos según el tratamiento.

Tabla 3. Tratamientos de infiltración utilizados en hojas de plantas de *A. thaliana*.

Tratamiento	Concentración
Control (MgCl ₂)	10 mM
FB ₁	10 μM
Pst DC3000 <i>avrRPM1</i>	1 x 10 ⁸ o 1 x 10 ⁶ UFC/mL
Pst DC3000 vir	1 x 10 ⁸ o 1 x 10 ⁶ UFC/mL
Flagelina	10 μM
Péptido flg22	10 μM
Xilanasa	3 mg/mL

2.2 Determinación del índice de daño

El progreso de la infección por un patógeno o de la lesión se evaluó de acuerdo al Índice de daño, que se calculó asignando un valor conforme al tamaño e intensidad de la lesión en un conjunto de hojas de diferentes plantas expuestas al tratamiento, para dar una muestra representativa que se pudiera tratar estadísticamente.

2.2.1 Escala del índice de daño

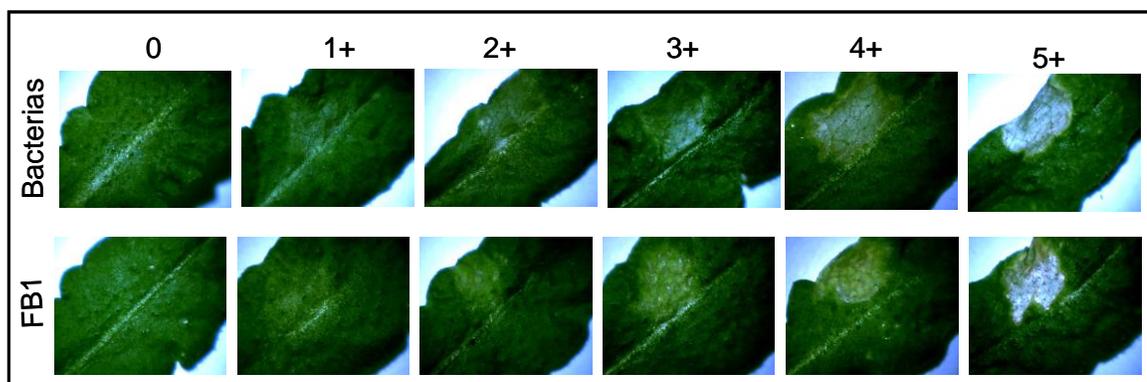


Figura 8. Establecimiento de la escala que estima el grado de lesión en hojas de *Arabidopsis thaliana* infiltradas con *Pseudomonas syringae* o con FB1. Se muestran las fotografías representativas que ilustran el grado de la lesión que corresponde a cada punto de la escala de acuerdo al tratamiento. La infección con las bacterias da lugar a una lesión típica que inicia como una zona de color gris y con deshidratación del tejido, la cual va aumentando en intensidad hasta llegar a verse el tejido totalmente necrosado. La infiltración con FB1 da lugar a una lesión clorótica (típica coloración amarilla), que va aumentando en magnitud hasta llegar a una lesión muy parecida a la ocasionada por las bacterias. La fotografía fue tomada con una cámara Motic-100 acoplada a un microscopio de disección Zeigen.

A cada lesión se le asignó un número o grado que fuera proporcional a la magnitud de la lesión visible de acuerdo a la siguiente escala (Figura 8): 1+= 1-19 % de lesión en el sitio de infiltración, 2+= 20-39 %, 3 += 40-59 %, 4 +=60-79 %, 5 += 80-100 % (Yang *et al.*, 2002).

El índice de daño (ID) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{(\#hojasgrado5x5) + (\#hojasgrado4x4) + (\#hojasgrado3x3) + (\#hojasgrado2x2) + (\#hojasgrado1x1)}{\#totaldehojas}$$

2.3 Exposición de las plántulas a flagelina por aspersión

Además del tratamiento por infiltración con la flagelina también se recurrió a la exposición de plántulas por aspersión a este PAMP. Plántulas de las líneas silvestre, *lcb2a-1*, *mpk6*, *sbh1-1* y *pfl18-18* con una edad de 3 semanas fueron expuestas a una solución de flagelina 10 μ M, aplicando alrededor de 8 a 10 aspersiones correspondientes a un volumen total de 1 mL de solución, procurando mantener el atomizador a una distancia de 15 cm de la caja de Petri, de tal manera que todas las plántulas recibieran una cantidad similar de la solución.

2.4 Detección *in situ* de H₂O₂

Se utilizó la técnica de tinción *in situ* con 3,3-diaminobencidina (DAB) para detectar el H₂O₂ generado en el tejido como una manifestación de defensa. Esta técnica se basa en la formación de un precipitado color rojizo al contacto de H₂O₂ con el reactivo DAB. El ensayo fue adaptado del reportado por Thordal-Christensen *et al.*, (1997). Para la visualización del precipitado formado fue necesario decolorar el tejido vegetal con etanol

Se infiltraron hojas con MgCl₂ (control), FB₁, flagelina, flg22, *Pst DC3000 avrRPM1* o xilanasas (ver concentraciones en la Tabla 3). Después de los tratamientos, las plantas se mantuvieron durante 24, 48 y 72 h a 22 °C con fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad.

Posteriormente, las hojas infiltradas se cortaron e inmediatamente se introdujeron cada una en un tubo eppendorf de 2 mL con la solución de DAB (1 mg/mL pH 3.8) y se mantuvieron bajo luz continua durante 2 h. Al terminar el tratamiento con DAB, las hojas se sumergieron en etanol al 96 % en ebullición (74 °C), hasta que quedaran completamente decoloradas.

Una vez que el tejido fue completamente decolorado, las hojas se sacaron del etanol y se colocaron en una caja de Petri (4 cm de diámetro) con medio de hidratación (Glicerol/H₂O/Ácido acético 70/20/10, v/v/v). Finalmente, se llevó a cabo el registro fotográfico en una cámara Motic 100 acoplada a un microscopio de disección Zeigen.

2.5 Determinación del crecimiento bacteriano

2.5.1 Exposición de las plántulas a FB1

Una vez cultivadas las plántulas como se mencionó, se procedió a exponerlas a la toxina FB1. Esto se llevó a cabo transfiriendo la malla en donde fueron crecidas las plántulas a una nueva placa con medio de Gamborg suplementado con FB1 10 μ M o medio sin la toxina como control. La exposición se llevó a cabo durante 12 h con fotoperiodo continuo previo al tratamiento de infección con los patógenos.

2.5.2 Infección de las plántulas con los patógenos *Pst DC3000 avrRPM1* y *Pst DC3000 vir*

La infección con los patógenos se llevó a cabo como se detalló por Lozano Rosas (2010). A partir de un cultivo fresco de los patógenos, *P. syringae* cepas avirulenta y virulenta, se preparó una suspensión bacteriana correspondiente a una concentración de 1×10^8 UFC/mL (Apéndice 2). A partir de esta suspensión se hizo una dilución 1:10 con $MgCl_2$ 10 mM/Silwet Cf 0.01 % (estéril) para obtener una suspensión bacteriana 1×10^7 UFC/mL.

La infección de las plántulas se realizó por aspersion de cada una de las cajas aplicando de 8 a 10 aspersiones (correspondientes a 1 mL) manteniendo el atomizador a una distancia aproximada de 15 cm, de tal manera que todas las plántulas recibieran una cantidad homogénea de la solución. Las plántulas infectadas se mantuvieron en cámaras a 22 °C bajo fotoperiodo continuo.

El conteo bacteriano se realizó al tiempo 0 (al término de la aspersion), a 24 y 48 h; para ello se tomaron muestras de plántulas de entre 0.1 y 0.25 g de peso fresco. Las plántulas se lavaron con etanol 70 % y con H_2O estéril, posteriormente se colocaron en una bolsa de plástico (8 x 10 cm) con 400 μ L de $MgCl_2$ 10 mM (estéril) donde se trituraron con ayuda de un pistilo de mortero.

Al término de la maceración del tejido se realizó una primera dilución transfiriendo 200 μ L del homogenado a un tubo eppendorf con 800 μ L de $MgCl_2$ 10 mM y se agitó en un vortex. A partir de esa suspensión se hicieron una serie de diluciones sucesivas tomando 100 μ L que fueron transferidos a tubos eppendorf con 900 μ L de $MgCl_2$ 10 mM, para tener diluciones correspondientes a 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 .

De cada dilución, incluyendo el homogenado original, se tomaron 5 μ L que se colocaron en una caja de Petri con el medio B de King (con el antibiótico de acuerdo a la cepa de *Pst*). Este procedimiento se realizó por triplicado para cada dilución en condiciones de esterilidad. Las placas se mantuvieron a 29 °C y a las 48 h se realizó el conteo de colonias.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de *t-Student* para la determinación de las diferencias significativas del crecimiento bacteriano en las diferentes condiciones evaluadas.

3. Determinación de los niveles de transcrito de los genes de defensa en respuesta al tratamiento con FB1

3.1 Exposición de plántulas a condiciones en donde hay acumulación de BCL endógenas

Para evaluar si la expresión de genes de defensa está relacionada con las BCL, se recurrió al tratamiento con la FB1 como estrategia para inducir la acumulación endógena de estas especies químicas. Lo primero que se realizó fue la evaluación de los fenotipos de las plántulas de las diferentes líneas tratadas con esta toxina.

3.1.1 Exposición de plántulas a FB1

Las plántulas silvestres y mutantes de 3 semanas de edad se transfirieron en las mallas donde fueron crecidas, a medio de Gamborg con FB1 10 μ M y medio sin la toxina como control. La exposición a la toxina para la evaluación de fenotipos se llevó a cabo durante 9 y 12 d con fotoperiodo continuo. Una vez terminados los tratamientos, se evaluó el fenotipo llevándose a cabo el registro fotográfico con una cámara digital Nikon.

La exposición a la FB₁ para el análisis de los transcritos de los genes de defensa se llevó a cabo durante 12 y 24 h con fotoperiodo continuo. Una vez concluido el tratamiento, se recolectaron las plántulas, se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

3.2 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de plántulas silvestres de 3 semanas de edad. Se siguió la metodología reportada por Edwards *et al.* (1991) la cual está diseñada especialmente para extraer DNA genómico de plantas para análisis por PCR.

El tejido vegetal (~0.2 g) se homogenizó en un mortero estéril agregando constantemente nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El tejido pulverizado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril con 400 μ L de buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM/NaCl 250 mM/EDTA 25 mM/ SDS 0.5 %). El tubo se agitó vigorosamente en vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h.

Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min a 4 °C en una centrifuga MiniSpin® Eppendorf, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 300 μ L de isopropanol (99.9 %), se agitó en vortex y la muestra se mantuvo durante 2 min a temperatura ambiente.

En seguida se centrifugó durante 5 min a 13 000 rpm a 4 °C en una centrifuga MiniSpin® Eppendorf y finalmente la pastilla se resuspendió en 100 μ L de H₂O estéril.

3.3 Establecimiento de las condiciones para la amplificación de los genes de defensa por PCR

Con los oligonucleótidos reportados en la Tabla 4 se procedió al establecimiento de las condiciones de amplificación de los fragmentos de DNA a partir de DNA genómico. Para ello se probaron diferentes cantidades de molde, número de ciclos y temperaturas de alineamiento.

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de los transcritos de los genes de defensa.

Gen	No. de acceso	Secuencia del oligonucleótido	Tm (°C)	Longitud (pb)
UBIQUITIN 5	At3g62250	FW 5'-ATGCAGATCTTCGTGAARACCCTRACGGG-3'	63.4	446
		RV 5'-ACGTAGGTGAGDCCRCACCTTRCCRCAGTA-3'	65.3	
PDF1.2	At5g44420	FW 5'-TTTGCTGCTTTTCGACGCAC-3'	56.9	82
		RV 5'-CGCAAACCCCTGACCATG-3'	56.8	
PR-1	At2g19990	FW 5'-AAGAAACGCTCGTGGTTCAC-3'	55.8	90
		RV 5'-TCTGTGCATAGGTGCGAAGA-3'	56.2	
β -CHI	At3g12500	FW (5'-GGTCTATGCTGCAGCGAGTT-3')	57.6	59
		RV 5'-GGCTGCTTACAGTATGGTTTCG-3'	55.8	
ACS6	At4g11280	FW 5'-CCGATGAAGAGTTTGTAGACGAGTT-3'	56.5	70
		RV 5'-ATCTCAGCGTGCCTTGCAAG-3'	58.2	

Tabla 5. Condiciones empleadas en las reacciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de DNA de los genes de defensa.

Amplicón	Desnaturalización	Amplificación PCR	Extensión final
PR-1 (313 pb)	94 °C por 5 min	Desnaturalización: 94 °C por 30 s Alineamiento: 58 °C 1 min Extensión: 72 °C por 1 min (33 ciclos)	72 °C por 5 min
PDF1.2 (82 pb)	94 °C por 5 min	Desnaturalización: 94 °C 30 s Alineamiento: 58 °C 1 min Extensión: 72 °C por 1 min (30 ciclos)	72 °C por 5 min
β -quitinasa (59 pb)	94 °C por 5 min	Desnaturalización: 94 °C por 30 s Alineamiento: 58 °C por 1 min Extensión: 72 °C por 1 min (30 ciclos)	72 °C por 5 min
ACS6 (70 pb)	94 °C por 5 min	Desnaturalización: 94 °C 30 s Alineamiento: 58 °C por 1 min Extensión: 72 °C por 1 min (30 ciclos)	72 °C por 5 min
Ubiquitina 5 (446 pb)	94 °C por 5 min	Desnaturalización: 94 °C 30 s Alineamiento: 58 °C 1 min Extensión: 72 °C por 1 min (23 ciclos)	72 °C por 5 min

Una vez que se tuvieron las condiciones adecuadas, se realizó la amplificación de cada uno de los genes de defensa analizados y de ubiquitina como control (Tabla 5). Las reacciones de PCR

se realizaron en un volumen final de 20 μ L con los componentes de acuerdo a la Tabla 6. Se utilizó un termociclador marca Applied Biosystems modelo Gene AMP9700. Los productos de las reacciones de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

Para confirmar que los fragmentos amplificados por PCR correspondían a los genes de interés se realizó la clonación de los productos de PCR y la secuenciación del DNA plasmídico.

3.4 Clonación de los fragmentos de DNA de los genes de defensa en el plásmido pGEM

A partir de geles de agarosa se cortaron las bandas correspondientes al amplicón de cada gen de interés y se purificaron empleando el kit Zymoclean DNA Recovery® (Apéndice 1). La ligación se llevó a cabo con el vector pGEM-T Easy Vector (Promega), utilizando una relación aproximada de inserto:vector de 3:1. Para la ligación se mezclaron 5 μ L de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 μ L de plásmido, 1 μ L de T4 DNA ligasa (3U/ μ L). La mezcla se incubó 1 h a 37 °C.

3.4.1 Selección de las colonias transformantes

La transformación de células competentes de *E.coli* DH5 α se realizó mediante choque térmico como se describe en el Apéndice 1. Para la selección de las colonias transformantes se utilizó el medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Las cajas se incubaron por 24 h a 37 °C y se seleccionaron las colonias color blanco las cuales son las que contienen el plásmido recombinante. Para comprobar la transformación, se sembraron colonias en 3 mL medio LB líquido y se purificó el plásmido mediante el procedimiento del kit ZYMO RESEARCH® (Apéndice 1).

Posteriormente, 200 ng del plásmido se digirieron con 1 unidad de EcoR1 en un volumen final de 20 μ L y se incubó a 37 °C por 2 h. Los productos de la digestión se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %. Posteriormente, los plásmidos recombinantes se secuenciaron para confirmar la identidad.

La secuenciación del DNA plasmídico se llevó a cabo en un secuenciador Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 ubicado en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

3.5 Extracción de RNA

La extracción de Se realizó RNA total se realizó a partir de plántulas de 3 semanas de edad. Las muestras incluyeron tanto los tratamientos con FB₁ a 12 y 24 h como sus respectivos controles.

El tejido vegetal (~0.2-0.3 g) se pulverizó en mortero estéril agregando continuamente nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El tejido pulverizado se transfirió con ayuda de una espátula a tubos eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de Trizol (Invitrogen, No. Cat. 15596-026). Se agitaron los

tubos en el vortex durante 3 min, y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrífuga MiniSpin® Eppendorf.

El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf de 1.5 mL con ayuda de una micropipeta. Los tubos se incubaron durante 5 min a 30 °C y se les adicionaron 200 µL de cloroformo 99.95% (JT Baker 9180-03), para después centrifugarlos a 14 000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrífuga MiniSpin® Eppendorf. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 500 µL de isopropanol 99.9 % frío (JT Baker 9084-03). En seguida los tubos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12 000 rpm por 10 min a 4 °C en una centrífuga MiniSpin® Eppendorf.

El sobrenadante se eliminó invirtiendo el tubo y la pastilla se lavó con 1 mL de Etanol 70%, posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C en una centrífuga MiniSpin® Eppendorf. Los lavados con etanol se repitieron 3 veces. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 40 µL de H₂O-DEPC.

La cuantificación de RNA se realizó utilizando en NANODROP 2000® Thermo Scientific y la integridad del RNA se verificó en geles de agarosa desnaturalizantes.

3.6 Geles desnaturalizantes de RNA

Se prepararon geles de agarosa con la siguiente composición: agarosa 2 %/ MAE pH 7.0 1X/ Formaldehído 3 %/ bromuro de etidio 0.1 µg/ mL. En estos geles se cargaron las muestras de RNA previamente desnaturalizadas. La desnaturalización de las muestras de RNA se realizó mezclando en un tubo eppendorf de 0.5 mL estéril, la cantidad de RNA correspondiente a 3 µg con buffer de muestra FRB (Apéndice 2), en una relación 3:15. Las muestras se calentaron durante 10 min a 65° C y se mantuvieron en hielo hasta ser cargados en el gel. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis con buffer MAE 1 X frío preparado con H₂O-DEPC (Apéndice 2) durante 45 min a 100 V. El gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta Benchtop UV. El registro de la imagen se realizó con un equipo Kodak Image Station modelo 400R-PRO.

3.7 Reacciones de RT-PCR

3.7.1 Síntesis de cDNA

A partir del RNA obtenido se realizó la reacción de RT en la cual la transcriptasa reversa sintetiza cDNA a partir del RNA mensajero. Las reacciones para obtener el cDNA se efectuaron en tubos eppendorf estériles de 0.5 mL a los cuales se agregó: 1 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de Oligo dT 60 μ M, el volumen necesario para tener 3 μ g de RNA y la cantidad necesaria de H₂O-DEPC para completar un volumen final de 10 μ L.

Todos los componentes se mezclaron y se centrifugaron en una mini centrífuga (Labnet modelo C-1200) para coleccionar todos los componentes en el fondo del tubo. Posteriormente, los tubos se incubaron en heatblock a 70 °C durante 10 min y se colocaron en hielo. A cada tubo se añadieron 2 μ L de buffer M-MLV Transcriptasa reversa, 1 μ L de M-MLV transcriptasa reversa (SIGMA M1302) y 7 μ L de H₂O-DEPC.

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente a 37 °C durante 50 min. En seguida se calentaron en un heatblock a 80 °C por 1 min para desnaturalizar a la enzima y finalmente se agregaron 80 μ L de H₂O estéril a cada tubo. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

3.7.2 Reacciones de PCR

A partir de 4 μ L de cDNA de cada muestra se realizó la amplificación de los transcritos de genes de defensa *PR-1*, *PDF1.2*, *β -quitinasa* y *ACS6*, utilizando *ubiquitina 5* como control de carga ya que este gen no muestra variación en su expresión en respuesta al tratamiento con FB1.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ L con los reactivos indicados en la Tabla 6. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp9700 de la marca Applied Biosystems. Las condiciones del termociclador para la amplificación de cada gen así como las temperaturas de alineamiento para cada par de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 5. Las secuencias de los oligonucleótidos que se emplearon para estas reacciones se reportan en la Tabla 4.

Tabla 6. Reactivos utilizados para la preparación de la mezcla de reacción para PCR.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 5 X Go Taq + Mg^{2+} (1.5 mM)	4
dNTPs (10 mM)	0.6
Oligonucleótido Forward (Concentración en la reacción)	0.5 0.25 μM
Oligonucleótido Reverse (Concentración en la reacción)	0.5 0.25 μM
Taq Polimerasa <i>Thermus aquaticus</i> expresada en <i>E.coli</i>	0.3
cDNA	~4
H ₂ O estéril (c.b.p 20 μL)	10.1

Para la electroforesis se cargaron 10 μL de cada reacción en un gel de agarosa al 2 % (TBE 1X/ bromuro de etidio 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando TBE 1X como buffer de corrida, a 100 V durante 30 min. El gel se observó en un transiluminador Benchtop UV y la imagen del gel se capturó en el equipo KODAK Image Station modelo 400R-PRO. El análisis de la densitometría de las bandas de los amplicones se realizó con el software Carestream 5.0

RESULTADOS

En este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* en dos estadios de desarrollo, el primero corresponde a plántulas de 3 semanas de edad crecidas en caja de Petri y el segundo a plantas de entre 16 y 20 semanas de edad crecidas en maceta. Cada uno de estos sistemas presenta diferentes ventajas para evaluar la participación de las BCL en relación con las respuestas de defensa.

Con el sistema de plántulas se requiere un menor tiempo para el crecimiento, se logra concentrar un mayor número de plantas en menos espacio para cada experimento y se puede analizar el fenotipo de varias maneras sencillas. Además de estas ventajas, un aspecto fundamental para este trabajo es que ya se conoce, para el genotipo silvestre y la línea mutante *lcb2a-1*, la cinética de acumulación de BCL en respuesta al tratamiento de FB1 (Saucedo *et al.*, 2011a). Así mismo, utilizando plántulas se determinó el efecto de la FB1 en la proliferación bacteriana al infectar plantas de las líneas WT, *lcb2a-1*, *mpk6* y *pflD 18-18*, con las cepas virulenta y avirulenta de *Pseudomonas syringae* (Lozano Rosas, 2010; Coronel Román, 2011).

Por su parte, el sistema de plantas adultas resulta adecuado para la observación de la respuesta tipo HR al infiltrar directamente en las hojas las diversas sustancias a evaluar y permite llevar a cabo el análisis de tinciones histoquímicas.

En los sistemas descritos anteriormente, se obtuvieron los resultados que a continuación se presentan divididos en dos partes. La primera parte está enfocada al análisis de la participación de las BCL en los dos tipos de inmunidad, ETI y PTI. En general, en esta sección se utilizaron plantas adultas de diferentes líneas de *Arabidopsis* que presentan modificaciones genéticas que afectan los niveles de BCL o bien líneas deficientes en algún elemento que participa en la vía de señalización que involucra a estas especies lipídicas.

La segunda parte incluye los resultados del estudio de la expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa, en este caso los experimentos se llevaron a cabo en las mismas líneas mutantes, pero en el sistema de plántulas de 3 semanas de edad.

1. Evaluación de la participación de las BCL en respuestas de inmunidad inducidas por PAMPs o por efectores.

1.1 Fenotipos e Índice de Daño de hojas de plantas tipo silvestres y mutantes adultas expuestas a la FB1 y a las variantes avirulenta y virulenta del patógeno *Pseudomonas syringae*.

Para tener evidencias de la participación de las BCL en los modelos de inmunidad se recurrió al sistema de plantas adultas, en el cual es posible evaluar la temporalidad y magnitud de la

manifestación de muerte celular en el tejido foliar en respuesta a la infección con las dos cepas bacterianas. El objetivo fue ver si había diferencias en la manifestación de HR o enfermedad en las líneas mutantes con alteraciones en los niveles endógenos de BCL, que no expresan MPK6 o tienen reducida la cantidad de ERO en el cloroplasto. En este escenario, la infección con el patógeno avirulento se utilizó como estrategia para evaluar la manifestación de una típica respuesta de HR y de inmunidad ETI. Por otro lado, el propósito de infectar con la cepa virulenta fue ver el comportamiento en las mutantes durante una interacción de susceptibilidad.

Además, se recurrió a la infiltración de la FB1 como estrategia para ver la contribución de la acumulación de BCL en la manifestación de la muerte celular.

Se infiltraron las hojas de plantas adultas con $MgCl_2$ (tratamiento control), con la FB1, con el patógeno avirulento o el patógeno virulento. Después de transcurridos los tiempos de tratamiento a partir de la infiltración (1, 2, 3, 4 y 7 d), se realizó la observación de 20-30 hojas provenientes de 2 o 3 plantas diferentes para la evaluación del índice de daño (ID) y se escogió una hoja representativa para el registro fotográfico. En el Apéndice 3 se muestran las tablas con los valores de ID de las Figuras 9, 10, 11, 14 y 15, así como los resultados de los análisis estadísticos.

En la Figura 9 se presenta la gráfica de la evaluación del ID en las líneas mutantes a diferentes tiempos post-infiltración con la fumonisina. En general, se aprecia que al primer tiempo de registro, que corresponde a las 24 hpi, el ID es de cero para todos los casos y que a partir de ese tiempo los valores de intensidad de la lesión se incrementan, en diferentes magnitudes dependiendo de la línea. En particular, en las hojas de plantas tipo silvestre se observó que la magnitud de la lesión presentó un aumento continuo durante todos los tiempos analizados y que finalmente a los 7 d el índice de daño fue de 2.90.

En cuanto a la mutante *lcb2a-1*, a tiempos cortos de 2 y 3 d los valores fueron semejantes a los presentados por las hojas de plantas WT. Mientras que a tiempos largos, de 4 y 7 d, esta línea mutante mostró índices de daño de aproximadamente una unidad menores en comparación con la línea control, que representan una diferencia estadísticamente significativa.

En respuesta a la infiltración con la FB1 la mutante *sbh1-1* mostró las lesiones de mayor magnitud y severidad, en los tiempos de observación hasta 4 días, en comparación con las demás líneas. El progreso de las lesiones fue muy similar en las mutantes *mpk6* y *pflD 18-18*, ambas mostraron valores equiparables, que además siempre estuvieron por encima de los índices presentados por el genotipo silvestre, pero por debajo de los mostrados por la línea *sbh1-1*. Al día 7 las líneas *mpk6*, *pflD 18-18* y *sbh1-1* no presentaron diferencia estadísticamente significativa, teniendo valores de índice de daño muy similares (4.01, 4.21 y 4.29 respectivamente).

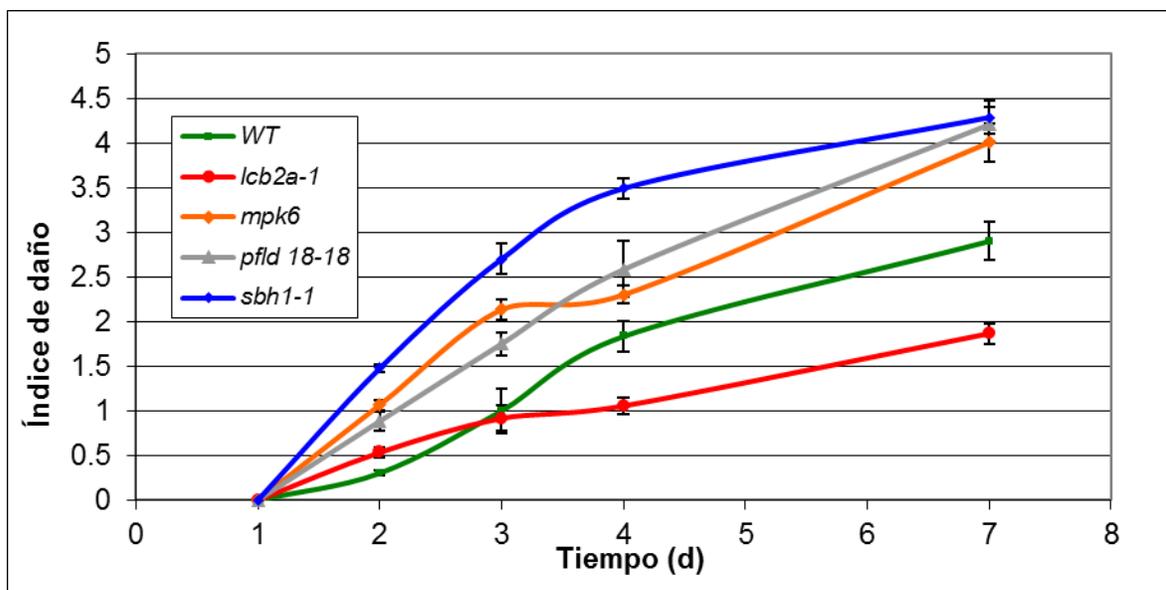


Figura 9. Progreso de la lesión de muerte celular inducida por FB1. Se muestra el índice de daño en hojas de plantas tipo silvestre y mutantes (*lcb2a-1*, *mpk6*, *pflid 18-18* y *sbh1-1*). Las hojas de las plantas de las diferentes líneas se infiltraron con FB1 10 μ M. A los 1, 2, 3, 4, y 7 días después de la infiltración, se calculó del índice de daño asignando un valor de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión en el sitio de infiltración (ver Materiales y Métodos). Se presentan los resultados del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea. Los valores y análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

De la misma manera se realizó el análisis de la evolución de las lesiones utilizando hojas infectadas con la cepa avirulenta o virulenta de la bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000. Inicialmente se utilizó un inóculo de cada cepa de 1×10^8 UFC/mL, los resultados utilizando esta carga bacteriana para la infección se muestran en las Figuras 10 y 11. En general, en el caso de ambos patógenos se detectó que el desarrollo de la lesión se dio principalmente durante los primeros 4 d después de la infiltración, posteriormente de los 4 a 7 d hubo cambios muy sutiles en los valores de índices de daño.

El análisis de la infección con la bacteria avirulenta (Figura 10) mostró que la cinética de formación de la lesión tipo HR fue muy similar entre las líneas de *Arabidopsis* durante los primeros días, a excepción de lo ocurrido en la mutante *lcb2a-1*. Como se observa en la gráfica, el valor inicial para las líneas WT, *mpk6*, *pflid 18-18* y *sbh1-1* fue cercano a 1 y posteriormente se fue incrementando hasta alcanzar, a los 4 dpi, valores de alrededor de 4. En el caso particular de la mutante *lcb2a-1*, el ID al tiempo inicial de 24 h fue de 0.40, sin embargo a partir del segundo tiempo de registro presentó el mismo comportamiento que las demás líneas hasta los 4 d. En el último tiempo de análisis, correspondiente a los 7 días, se registraron índices de daño similares para las hojas de plantas tipo silvestre (4.63) y mutante *lcb2a-1* (4.55). Por debajo de estos valores se encontró a la mutante *sbh1-1*, la cual presentó un ID de 4.01. En contraste, las hojas

de las líneas *mpk6* y *pflD 18-18* tuvieron valores mayores a la WT, de 4.81 y 5.00, respectivamente. El análisis estadístico permitió observar que solamente existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de índice de daño de la mutante *pflD 18-18* y *sbh1-1*.

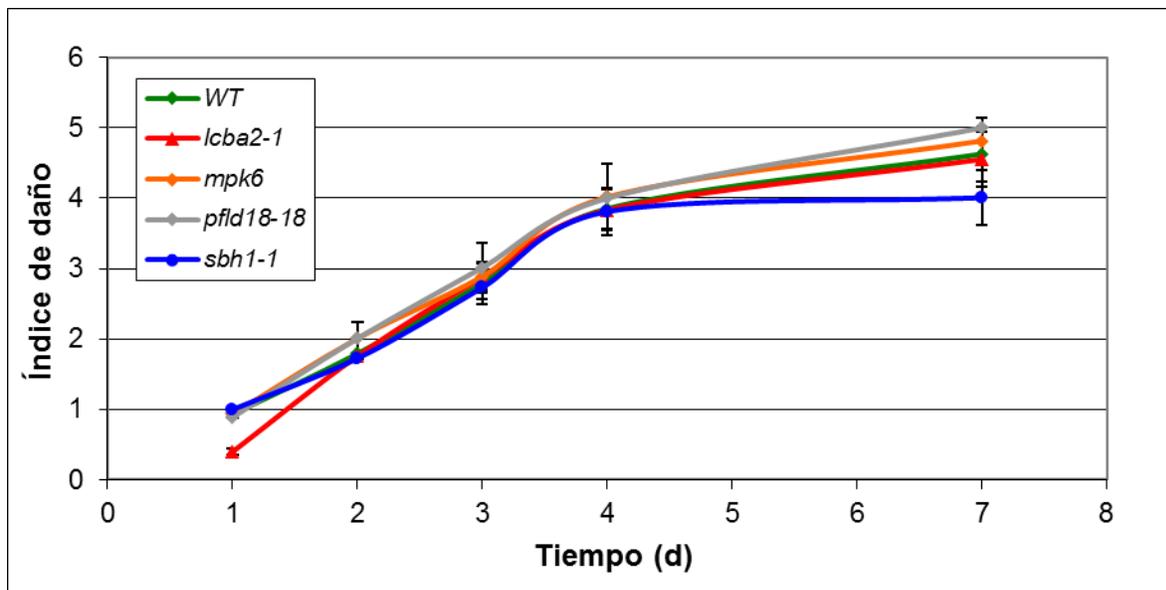


Figura 10. Progreso de la lesión de muerte celular inducida por el patógeno avirulento en hojas de plantas tipo silvestre y mutantes (*lcb2a-1*, *mpk6*, *pflD 18-18* y *sbh1-1*). A los 1, 2, 3, 4 y 7 días después de la infiltración con *P. syringae* DC3000 *avrRPM1* (Pst *avr*) 1×10^8 UFC/mL, se calculó del índice de daño asignando un valor de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión en el sitio de infiltración. Se presentan los resultados del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea. Los valores y análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

En la Figura 11 se muestran los resultados de la infección con patógeno virulento en donde se aprecia que, de la misma manera que con los otros tratamientos, el mayor aumento en el ID ocurrió en los 4 primeros días después de la infiltración y posteriormente los incrementos fueron de menor magnitud.

Inicialmente, a las 24 h de infección las hojas de plantas silvestres registraron un ID de 0.13, que aumentó progresivamente hasta un valor de 3.87, a los 4 dpi. La magnitud de las lesiones permaneció sin grandes cambios hasta el tiempo final del experimento, en donde se tuvo un índice de enfermedad de 3.88.

En comparación con las hojas de plantas silvestres, las líneas mutantes presentaron valores mayores en el tiempo inicial, sin embargo, en los tiempos de 2 y 3 dpi las magnitudes de los ID fueron muy similares en todos los casos. A los 4 días se registró un menor daño en las hojas de la mutante *lcb2a-1*. Al tiempo final de 7 d, aunque se perciben ligeras variaciones en el índice de daño de acuerdo a los valores registrados, solamente hay diferencia estadísticamente significativa entre las mutantes *lcb2a-1* y *sbh1-1*.

Comparando las cinéticas de formación de lesión con ambos patógenos se puede ver que las diferencias se encontraron básicamente en las primeras 24 h después de la infección, ya que posteriormente los valores fueron muy similares. En las etapas tempranas, la lesión que evolucionó más rápidamente fue la inducida por la bacteria avirulenta.

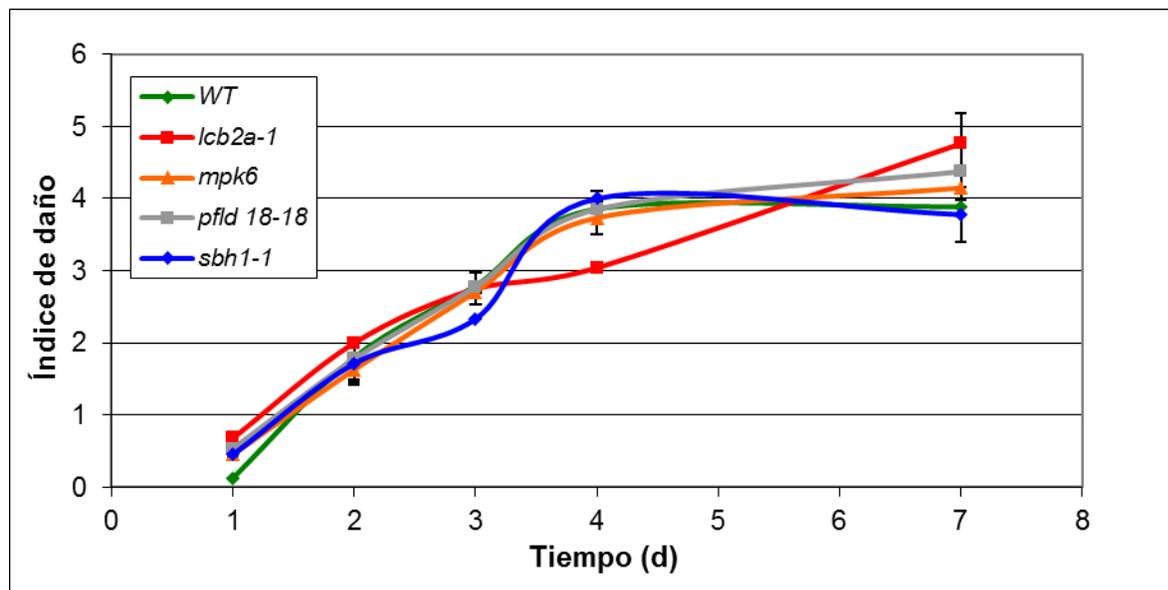


Figura 11. Progreso de la lesión de muerte celular inducida por el patógeno virulento en hojas de plantas tipo silvestre y mutantes (*lcb2a-1*, *mpk6*, *pflD 18-18* y *sbh1-1*). A los 1, 2, 3, 4 y 7 días después de la infiltración con *P. syringae* DC3000 (*Pst vir*) 1×10^8 UFC/mL, se calculó del índice de daño asignando un valor de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión en el sitio de infiltración. Se presentan los resultados del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea. Los valores y análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

En la Figura 12 se muestran los registros fotográficos de hojas representativas a los 4 días después de la infiltración con los distintos tratamientos que se usaron para la determinación del índice de daño. Las hojas infiltradas con el tratamiento control ($MgCl_2$) se observaron sanas y sin ninguna lesión. En contraste, a este tiempo ya fue evidente una lesión clorótica en las hojas de plantas silvestres infiltradas con FB1 al igual que en las líneas *mpk6* y *pflD 18-18*. También hubo lesión en la hoja de la mutante *sbh1-1*, sin embargo, en este caso además de las señales de clorosis, ya se observó tejido seco en la zona del tratamiento. Por su parte, la línea *lcb2a-1* a los 4 d no mostró signos de lesión.

Las hojas de todas las líneas mostraron lesiones ocasionadas por la infección con la bacteria avirulenta. Estas lesiones resultaron muy parecidas entre sí en cuanto a magnitud, en general se observaron como un área del tejido deshidratado y de color grisáceo. Por otro lado, en la infección con la bacteria virulenta se observó como una zona totalmente deshidratada y con una

coloración amarillenta típica de marchitamiento, este fenotipo fue muy similar entre las hojas de todas las líneas.

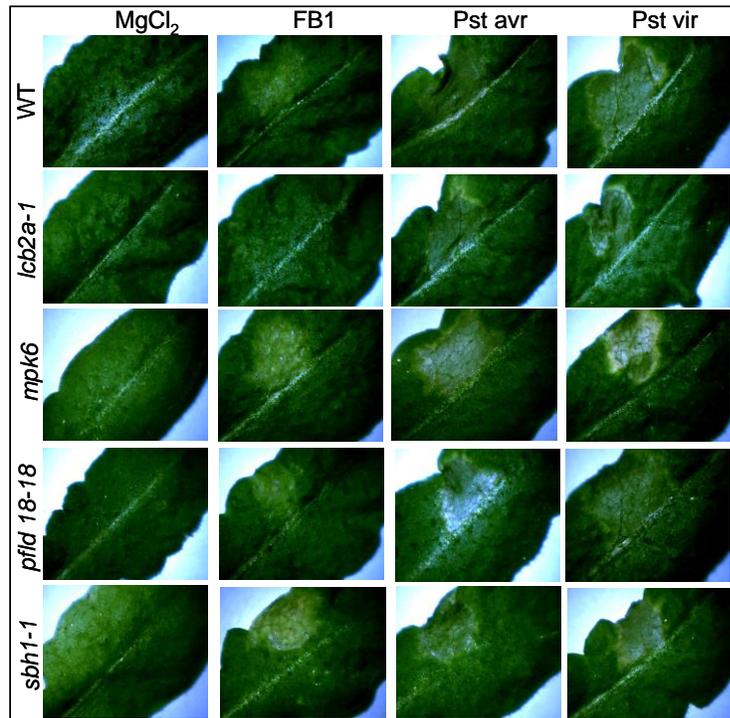


Figura 12. Efecto de las infiltraciones a los 4 d. Las hojas fueron infiltradas con $MgCl_2$ como control, FB1 ($10 \mu M$), *P. syringae* DC3000 *avrRPM1* (*Pst avr*) 1×10^8 UFC/mL o *P. syringae* DC3000 (*Pst vir*) 1×10^8 UFC/mL. Se muestra una imagen representativa de 20-30 hojas infiltradas provenientes de por lo menos tres plantas para cada línea.

El análisis fenotípico a un tiempo más largo (7 días post infiltración) se muestra en la Figura 13, nuevamente se hace evidente que el tratamiento control no indujo ningún daño en las hojas infiltradas. A este tiempo, las lesiones producidas por el tratamiento con FB1 fueron muy similares entre las líneas WT, *mpk6*, *pflid 18-18* y *sbh1-1*, observándose como una región deshidratada y clorótica. Sin embargo, en la mutante *lcb2a-1*, la lesión ocasionada por la toxina fue de menor magnitud. Las infecciones con ambos patógenos dieron origen a lesiones que después de los 7 d se observaron de apariencia muy similar, presentando una zona de muerte de tejido vegetal de color amarillo y con apariencia de deshidratación.

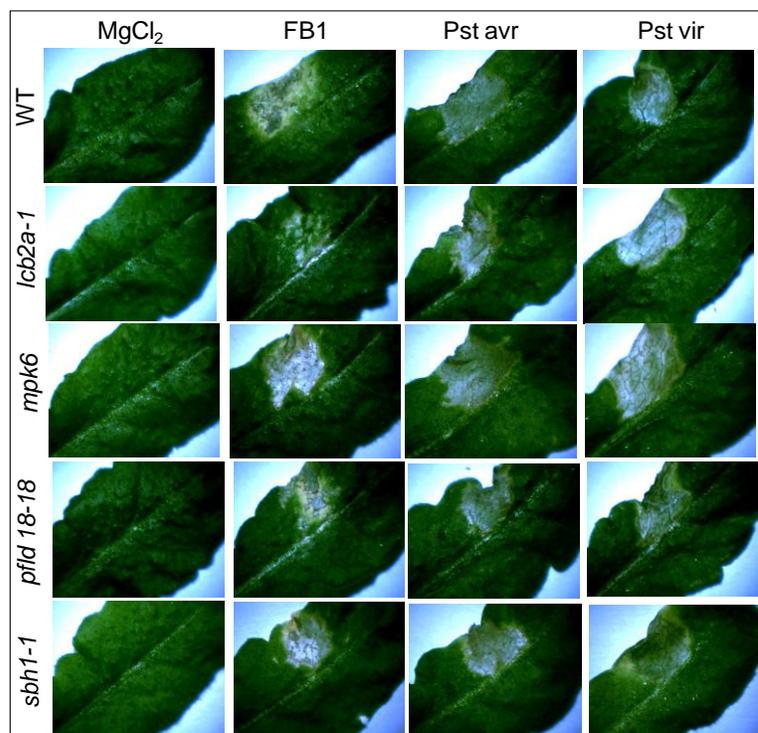


Figura 13. Efecto de las infiltraciones a los 7 d. Las hojas fueron infiltradas con $MgCl_2$ como control, FB1 ($10 \mu M$), *P. syringae* DC3000 *avrRPM1* (Pst avr) 1×10^8 UFC/mL o *P. syringae* DC3000 (Pst vir) 1×10^8 UFC/mL. Se muestra una imagen representativa de 20-30 hojas infiltradas provenientes de por lo menos tres plantas para cada línea.

Debido a que con un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL para llevar a cabo la infección no se encontraron diferencias en el índice de daño entre los diferentes genotipos, se probó una menor concentración de inóculo variando a 1×10^6 UFC/mL para desafiar a las plantas con los patógenos. Evidentemente, la magnitud de la lesión generada con esta nueva concentración de inóculo fue menor, lo cual se puede apreciar en que los índices de daño alcanzados en este caso variaron entre 0.0 y 1.13 (evaluando las infecciones con ambas cepas bacterianas), mientras que con el inóculo más concentrado se obtuvieron resultados entre 0.13 y 5.0.

En la Figura 14 se presentan los resultados de la infección con la bacteria avirulenta. En este caso, con la reducción en la carga bacteriana inicial sí se pudieron detectar diferencias en el ID entre las líneas de Arabidopsis evaluadas. En general, al primer tiempo de observación el ID fue de 0 para todos los casos y posteriormente hubo incrementos graduales.

En el caso de la línea silvestre los valores fueron en aumento paulatino desde el segundo día hasta alcanzar un índice de daño de 0.72 a los 7 días. La mutante *lcb2a-1*, no presentó lesiones en respuesta al tratamiento durante los primeros dos días de observación, sin embargo, posteriormente mostró valores de 0.15, 0.32 y 0.61 a los 3, 4 y 7 d, respectivamente. La línea *mpk6* tuvo valores por debajo de 0.10 hasta los 4 días mientras que a los 7 días registró 0.44 de ID. Las otras dos líneas mutantes tuvieron índices de daño muy similares cercanos a 0 desde el

inicio del experimento hasta el día 7. En este último tiempo, las diferencias entre los ID son estadísticamente significativas, excepto en el caso de las líneas silvestre y *lcb2a-1*.

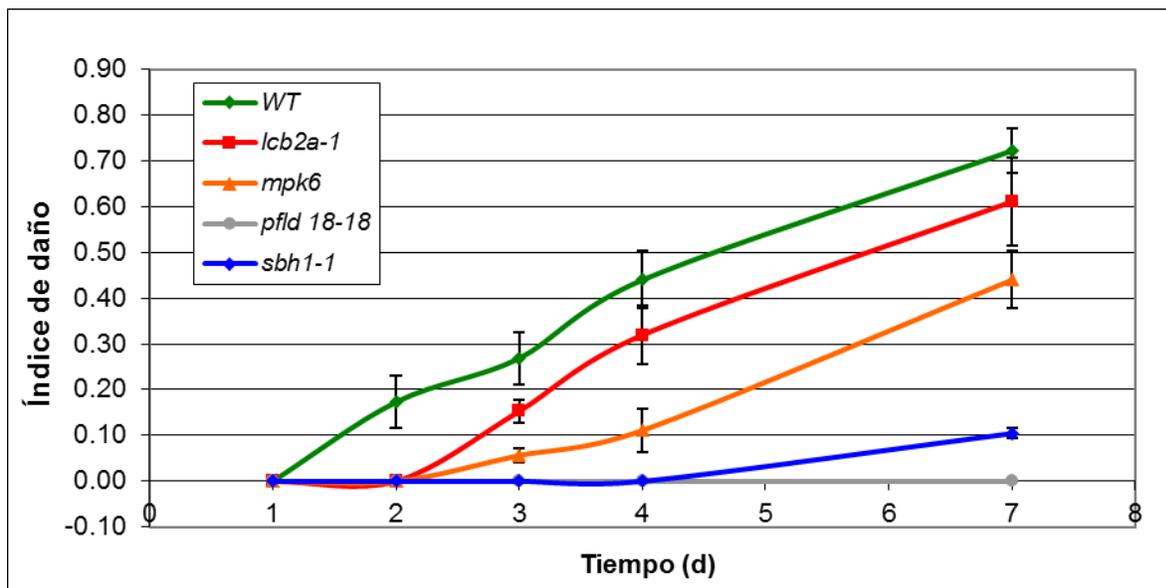


Figura 14. Progreso de la lesión de muerte celular inducida por el patógeno avirulento en hojas de plantas tipo silvestre y mutantes (*lcb2a-1*, *mpk6*, *pflD 18-18* y *sbh1-1*). A los 1, 2, 3, 4 y 7 días después de la infiltración con *P. syringae* DC3000 *avrRPM1* (*Pst avr*) 1×10^6 UFC/mL se calculó del índice de daño asignando un valor de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión en el sitio de infiltración. Se presentan los resultados del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea. Los valores y análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

En este mismo contexto, en la Figura 15 se presentan los resultados de la evaluación del índice de daño en respuesta al tratamiento con el patógeno virulento. Se observa que la línea silvestre inició con un valor de 0 a las 24 hpi y posteriormente registró valores por encima de todas las demás líneas hasta alcanzar un ID de 1.13 a los 7 d.. Por otra parte, la línea *mpk6* presentó valores que fueron incrementando desde un valor de 0 hasta un máximo registrado de 0.74. En todos los tiempos, los ID de esta mutante estuvieron por debajo de los valores de la WT. Por otro lado, las mutantes *lcb2a-1*, *pflD 18-18* y *sbh1-1* mostraron valores cercanos a cero durante todo el tiempo de observación después de la infección con la bacteria virulenta.

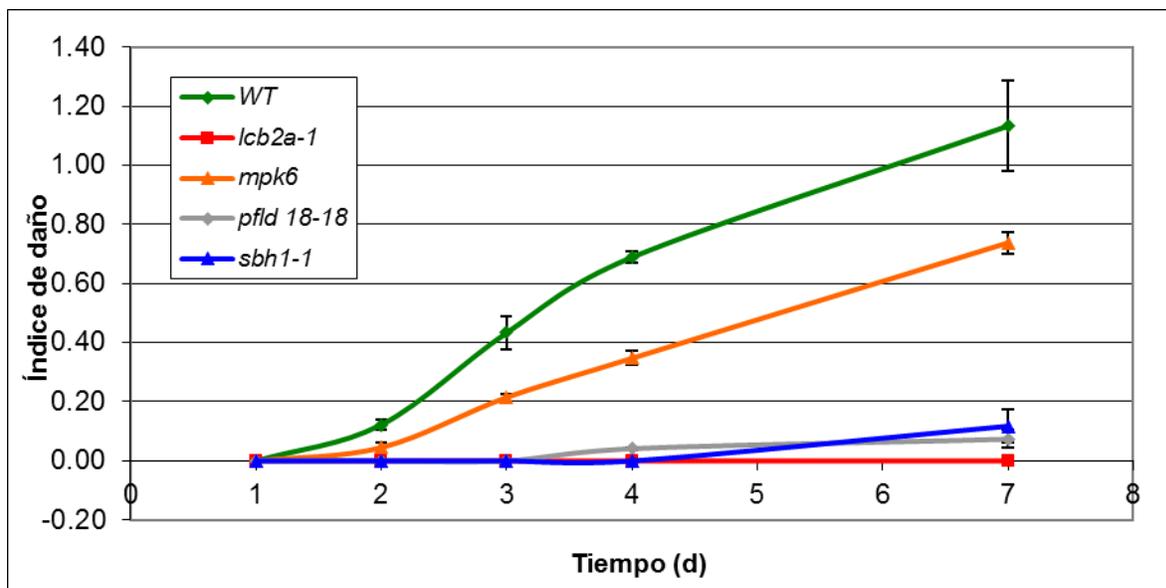


Figura 15. Progreso de la lesión de muerte celular inducida por el patógeno virulento en hojas de plantas tipo silvestre y mutantes (*lcb2a-1*, *mpk6*, *pflD 18-18* y *sbh1-1*). A los 1, 2, 3, 4 y 7 días después de la infiltración con *P. syringae* DC3000 (*Pst vir*) 1×10^6 UFC/mL se calculó del índice de daño asignando un valor de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión en el sitio de infiltración. Se presentan los resultados del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea. Los valores y análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

Una comparación con los datos de las dos cepas bacterianas (Figuras 14 y 15), muestra que la línea WT presentó valores muy similares entre ambas infecciones en tiempos cortos de hasta 3 días. Posteriormente, a tiempos más prolongados, de 4 y 7 d, la infección con la bacteria virulenta superó los valores de ID producidos por la infección con la cepa avirulenta.

En cuanto a la línea *lcb2a-1*, esta es la mutante que mostró los cambios más significativos con las dos infecciones, observándose una reducción de los valores de ID en respuesta a la infección con la bacteria virulenta en comparación con lo ocurrido con la bacteria avirulenta.

Por su parte, la mutante *mpk6* también presentó valores ligeramente superiores en el caso de la infección con la cepa virulenta. Por su parte, tanto la línea *pflD 18-18* como la *sbh1-1* con las dos cepas mostraron valores cercanos a 0 durante todo el tiempo de la evaluación.

1.2 Análisis del crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* cepas avirulenta y virulenta en condiciones de acumulación de BCL.

Continuando con el estudio del papel de las BCL en el contexto de los dos tipos de inmunidad, el siguiente objetivo fue evaluar el efecto de una elevación inducida de BCL endógenas (por adición de FB1), en la proliferación de los patógenos avirulento y virulento en plántulas infectadas. Para ello se analizaron los resultados de experimentos de proliferación bacteriana en plántulas que fueron expuestas durante 12 h a la FB1, para inducir la elevación de BCL, y posteriormente

infectadas con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. tomato cepas DC3000 (virulenta) y cepa DC3000 *avrRPM1* (avirulenta) (Lozano Rosas, 2010; Coronel Román, 2011).

En el Apéndice 3 se presentan los resultados de las cargas bacterianas iniciales al momento de la infección para cada línea de Arabidopsis.

En la Figura 16 se muestran los resultados de la proliferación bacteriana a las 24 h después de la infección. A este tiempo, la línea silvestre presentó un crecimiento de la bacteria avirulenta de 4.6 log UFC/g de tejido. Sin embargo, cuando las plántulas fueron tratadas con FB1, previamente al desafío con las bacterias, el crecimiento bacteriano resultó ser un orden de magnitud menor en comparación con el control sin la toxina, siendo las diferencias entre estos valores estadísticamente significativas. Con respecto al crecimiento de la cepa virulenta en la WT, el crecimiento de este patógeno mostró valores muy similares (7.1 y 6.8 log UFC/g tejido), en las condiciones con y sin FB1 respectivamente. Sin embargo, al contrastar los datos obtenidos con los dos patógenos, se observó que los crecimientos del patógeno virulento fueron dos órdenes de magnitud superiores en relación con el patógeno avirulento.

En cuanto a la mutante *lcb2a-1*, los niveles de la proliferación del patógeno avirulento resultaron idénticos tanto en las muestras control como en las plántulas previamente tratadas con FB1. Así mismo, los conteos del patógeno virulento en las dos condiciones fueron valores muy similares, de 7.7 y 8.0 log UFC/g tejido. No obstante, la comparación entre los crecimientos de ambas cepas mostró un incremento en el crecimiento del patógeno virulento de 3 órdenes de magnitud en comparación con el avirulento.

De manera similar, las muestras de la mutante *mpk6* tuvieron cargas bacterianas parecidas en las condiciones control y con la FB1, con ambos patógenos. Mientras que la proliferación del patógeno virulento estuvo 2 órdenes de magnitud por encima del crecimiento de la cepa avirulenta.

Para la mutante *pflD 18-18*, los valores de los conteos del crecimiento bacteriano de Pst *avr*, obtenidos en ausencia y presencia de FB1, fueron log 7.7 y 8.4 UFC/ g tejido, respectivamente. Estos datos resultaron mayores que los del patógeno virulento (log 6.6 y 7.3 UFC/ g tejido, sin y con exposición a la FB1, respectivamente).

Por último, la mutante *sbh1-1* registró niveles de la bacteria avirulenta de log 5.1 UFC/ g tejido, mientras que las muestras de plántulas expuestas a FB1, presentaron un crecimiento de log 3.9 UFC/ g tejido, lo que representa una diferencia significativa de alrededor de un orden de magnitud por debajo del conteo del mismo patógeno en las plántulas control. Los resultados de la infección con el patógeno virulento presentaron valores similares de log 6.6 y 6.9 UFC/ g tejido para las muestras control y tratadas, respectivamente.

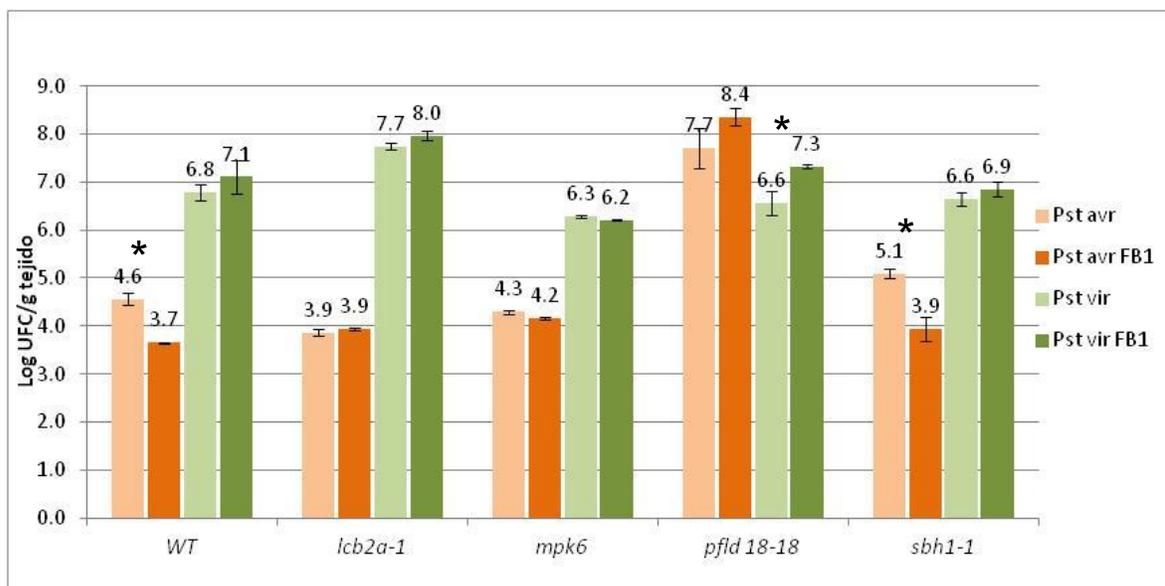


Figura 16. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* Pst DC3000 avrRPM1 o Pst DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos WT, *lcb2a-1*, *mpk6*, *pflD 18-18* y *sbh1-1* fueron expuestas por 12 h a la toxina FB1 y enseguida se les aplicó por aspersión un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* cepa avirulenta DC3000 avrRPM1 (Pst avr) o cepa virulenta DC3000 (Pst vir). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 h. Se muestran los promedios \pm ES, n=6. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$ t-Student).

Haciendo una comparación entre las diferentes líneas de *Arabidopsis*, se observan valores similares de crecimiento de la bacteria avirulenta entre las líneas WT, *lcb2a-1*, *mpk6* y *sbh1-1* que presentan valores de 4.6, 3.9, 4.3 y 5.1 log UFC/mL, respectivamente. Por otro lado, el máximo valor de proliferación de esta cepa se presentó en el caso de la mutante *pflD 18-18* donde se obtuvo una cifra de 7.7 log UFC/mL. Las únicas líneas en donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento con la FB1 son la línea tipo silvestre y la mutante *sbh1-1*.

La tendencia general del crecimiento bacteriano de la cepa virulenta está por arriba de los valores de la cepa avirulenta. De estos valores, se destaca que solamente se encontraron diferencias entre el control y el tratamiento en el caso de la mutante *pflD 18-18*.

1.3 Evaluación de la participación de las BCL en respuestas de inmunidad inducidas por PAMPs.

Para conocer si las BCL endógenas contribuyen a la señalización en las respuestas de defensa que se presentan en el tipo de inmunidad PTI, la estrategia usada fue la exponer las diferentes mutantes a PAMPs conocidos. La flagelina fue la primera opción para el estudio de la participación de las BCL en la inmunidad PTI, debido a que se conoce muy bien su receptor membranal y la cascada de señalización que desencadena. Así, como una primera aproximación

se utilizó la flagelina purificada de *Salmonella typhimurium* para investigar su efecto en el fenotipo de las diferentes líneas de *Arabidopsis* estudiadas. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

1.3.1 Evaluación de la muerte celular producida por la flagelina en la línea silvestre de *A. thaliana*.

Para detectar muerte celular como parámetro de evaluación del efecto de la flagelina, se examinaron los fenotipos tanto de plántulas de 3 semanas de edad (Figura 17) como de hojas de plantas adultas (Figura 18) expuestas a este PAMP. En la Figura 17 se observan los fenotipos de las plántulas que fueron asperjadas con la flagelina y sus respectivos controles. Como es evidente, en este experimento no se observó ningún efecto del tratamiento durante 7 d, que corresponde al tiempo más largo analizado.

Ya que en el sistema de plántulas no fue posible detectar algún efecto del tratamiento, la siguiente estrategia consistió en la infiltración de la flagelina directamente en hojas adultas de plantas silvestres esperando detectar lesiones de muerte celular tipo HR (Figura 18). Sin embargo tampoco se detectaron señales de muerte celular a los 7 días post-exposición y tampoco a tiempos más largos (13 d, resultados no mostrados).

Debido a que no se observó ninguna manifestación de muerte celular utilizando la flagelina purificada de *Salmonella typhimurium*, como alternativa se recurrió al uso del péptido flg22, el cual corresponde a la mínima secuencia de aminoácidos capaz de iniciar la respuesta de defensa. Se examinó el fenotipo de hojas de plantas WT infiltradas y el resultado fue que este evocador tampoco indujo la aparición de señales de muerte celular hasta tiempos largos (14 d) de observación (Resultado no mostrado).

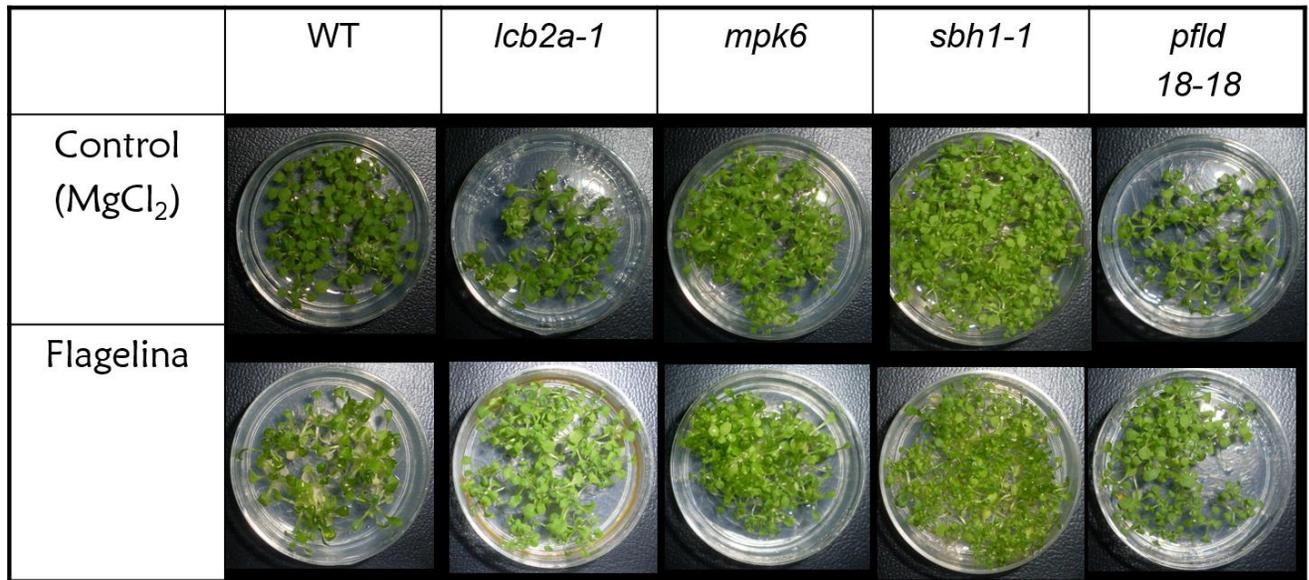


Figura 17. Efecto de la flagelina en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Plántulas de 3 semanas de edad de los genotipos indicados, fueron asperjadas con 1 mL de una solución de flagelina 10 μ M. Se muestra el registro fotográfico realizado a los 7 días.

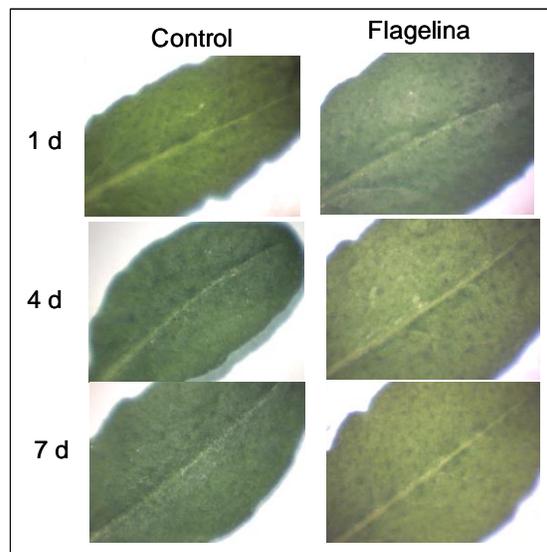


Figura 18. Efecto de la flagelina en el fenotipo de hojas de plantas silvestres. Hojas de plantas silvestres fueron infiltradas con flagelina 10 μ M y con MgCl₂ 10 mM como control. Se muestra el registro fotográfico realizado a los 1, 4 y 7 días de exposición.

Adicionalmente a la evaluación de los fenotipos, se probó la tinción con diaminobencidina para detectar H₂O₂ como una manifestación de defensa en respuesta a los tratamientos con los PAMPs, flagelina y flg22. Estos resultados se presentan en una sección más adelante.

1.3.2 Evaluación de la muerte celular tipo HR producida por la xilanasa en diferentes mutantes de *A. thaliana*.

Ya que no se obtuvieron resultados satisfactorios con la flagelina ni con el péptido flg22, se recurrió al tratamiento con la xilanasa. Se utilizó este PAMP debido a que se ha reportado que en jitomate y tabaco produce la respuesta de muerte celular tipo HR (Bailey *et al.*, 1990, Yano *et al.*, 1998, Ron *et al.*, 2000). Por lo tanto, el análisis de los fenotipos se realizó en hojas de plantas adultas de las diferentes líneas infiltradas con la xilanasa.

Como se observa en la Figura 19, a los 3 dpi ninguna de las hojas presentó lesión en la zona de infiltración. Sin embargo, la exposición a este PAMP si indujo la aparición de áreas de muerte que fueron evidentes. A los 11 días, fueron muy evidentes las lesiones en todas las hojas infiltradas de las diferentes plantas analizadas. En la línea silvestre se observó una zona de muerte celular restringida al sitio de infiltración, la cual se caracterizó por presentar coloración amarilla y apariencia de deshidratación del tejido. Estas mismas características, las presentaron las mutantes *lcb2a-1* y *mpk6*, aunque en el caso de la mutante *lcb2a-1* la lesión se encontró rodeada de una zona de clorosis. En contraste, la hoja de la línea *pflid 18-18* mostró señales de muerte de menor intensidad; se apreció un área de clorosis y algunos puntos aislados de deshidratación del tejido. Por su parte, la hoja del genotipo *sbh1-1*, manifestó una muerte celular en la zona de infiltración, así como señales de clorosis en otras áreas.

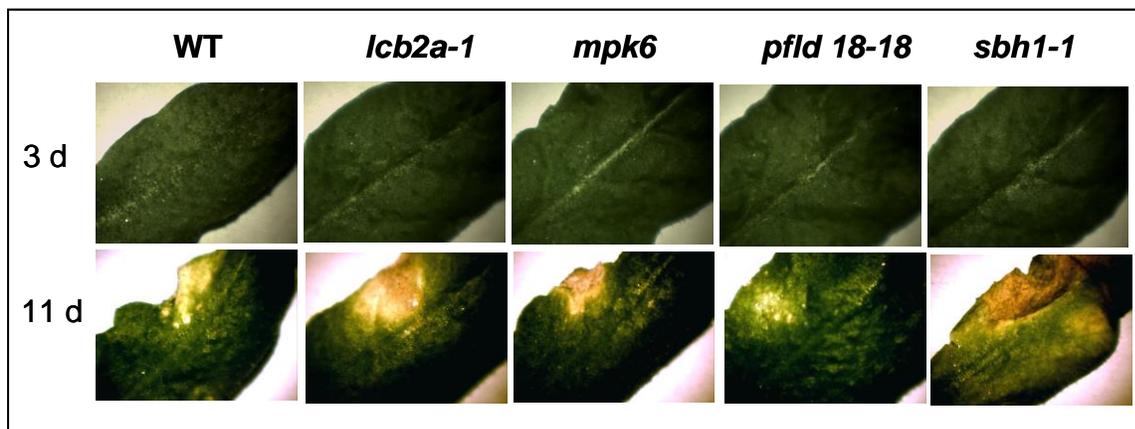


Figura 19. Fenotipos de hojas infiltradas con xilanasa. Se realizó la infiltración con una solución de xilanasa 3 mg/mL en el envés de las hojas de las líneas de Arabidopsis indicadas. Las fotografías provienen del análisis de 18 hojas por genotipo.

Es importante resaltar que las respuestas al tratamiento con la xilanasa no dieron resultados uniformes. Es decir, los tiempos para el desarrollo de las lesiones por la xilanasa fue diferente en las hojas infiltradas, aun siendo de la misma planta. Este comportamiento se observó en todas las líneas analizadas, por lo tanto, si bien las fotografías del tiempo final analizado son las más representativas para cada condición, hubo una gama de fenotipos los cuales pudieron ser

evaluados de una mejor manera mediante el índice de daño a los largo del tiempo de experimentación, como se muestra en la siguiente sección.

1.3.3 Determinación del índice de daño en hojas expuestas a xilanasa.

Para complementar las observaciones de los fenotipos, se determinó el índice de daño. Este Índice se calculó a partir de las observaciones de alrededor de 18 hojas provenientes de diferentes plantas de las líneas de Arabidopsis en estudio. En la Figura 20 se muestran los resultados del análisis del índice de daño a los 4, 7, 9, 11 y 14 días después de la infiltración con xilanasa.

Resulta evidente que en todos los genotipos la infiltración con la xilanasa induce la aparición de una lesión la cual va aumentando en intensidad a lo largo del tiempo. En general, desde la exposición a la xilanasa la lesión evoluciona rápidamente hasta los 7-9 días y posteriormente el ID se mantiene relativamente constante. Analizando lo que ocurre en el caso de la línea silvestre, podemos ver que la señal de lesión apareció después del día 4 y para los 7 dpi el ID fue de 1.55, posteriormente no se registraron grandes cambios en este valor hasta el tiempo final analizado donde se tuvo un índice de 2.0. Valores menores a los reportados para la WT solamente los presentó la mutante *pflid 18-18*, la cual inició al tiempo de 4 d con un ID de 0 que posteriormente fue en aumento paulatino hasta alcanzar el máximo valor de 1.33 a los 14 d de experimentación. Por otra parte las tres líneas restantes, *sbh1-1*, *lcb2a-1* y *mpk6* tuvieron ID mayores que la silvestre en todos los tiempos de análisis. Al tiempo inicial de 4 d, los valores fueron de 0.33, 0.5 y 0.77 para las mutantes *mpk6*, *sbh1-1* y *lcb2a-1*, respectivamente. Entre estas mutantes las diferencias fueron estadísticamente significativas, al contrario de lo ocurrido entre las líneas WT y *pflid 18-18* las cuales no mostraron lesión a este tiempo. Al transcurso de 7 d, se aprecia claramente que el genotipo *pflid 18-18* presentó valores por debajo de todas las otras líneas reflejando diferencias estadísticamente significativas. En este tiempo los Índices de daño para las líneas WT, *lcb2a-1*, *mpk6* y *sbh1-1* son 1.55, 2.16, 1.83 y 2.27, respectivamente. Dentro de este grupo solamente hay diferencias con significancia estadística entre WT y *sbh1-1*.

A los 9, 11 y 14 días los resultados son muy similares, la mutante *sbh1-1* manifestó lesiones de mayor intensidad que se reflejaron en ID más elevados y significativamente diferentes a los valores de las líneas WT, *mpk6* y *pflid 18-18*.

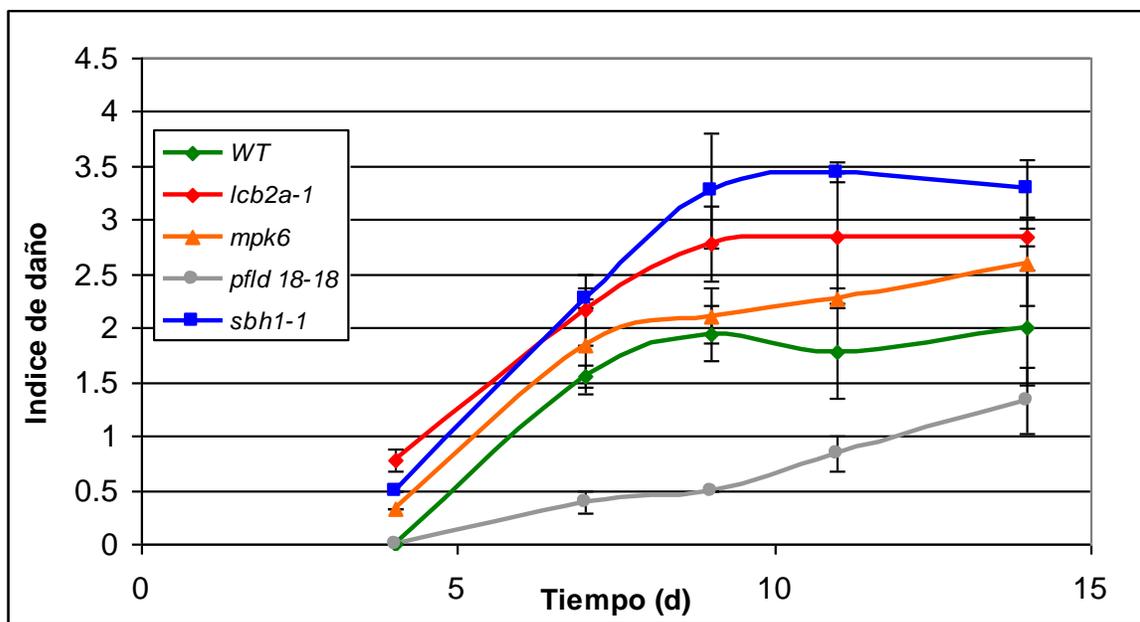


Figura 20. Progreso de la lesión de muerte celular producida por la xilanasa. Se muestra el índice de daño a los 4, 7, 9, 11 y 14 días después de la infiltración con xilanasa 3 mg/mL. El cálculo del índice de daño se realizó asignando un valor de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión en el sitio de infiltración. Se presentan los resultados de tres experimentos independientes con una $n=18$. Los valores y análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

1.3.4 Detección *in situ* de H_2O_2 en hojas expuestas a FB1, el patógeno avirulento, flagelina, el péptido flg22 y xilanasa.

La siguiente estrategia consistió en evaluar la producción de H_2O_2 en las hojas de plantas de las diferentes líneas de *Arabidopsis* expuestas tanto a tratamientos que desencadenan inmunidad ETI (Pst avr), como a tratamientos que involucran el establecimiento de la inmunidad PTI (flagelina, flg22 y xilanasa). También, se incluyó el tratamiento con la FB1 como estrategia experimental para promover la acumulación de BCL.

El registro de producción de H_2O_2 resulta un indicador de una de las manifestaciones de defensa en respuesta a cada tratamiento y, con la técnica de detección utilizada, es posible visualizar de una manera muy clara la zona de tinción que corresponde a la formación de un precipitado color café por reacción del H_2O_2 con el DAB.

Para poder relacionar la producción de H_2O_2 con un fenotipo en cada línea mutante estudiada se incluyeron las fotografías representativas de hojas de plantas a los 4 d después de la infiltración (Figura 21). Es importante mencionar que para cada condición se analizaron 4 hojas de dos plantas diferentes y que el experimento se realizó en 3 ocasiones independientes, las imágenes que se muestran a continuación corresponden a los resultados representativos de cada condición.

En la Figura 21 se muestran los fenotipos de las hojas a los 4 dpi. Es evidente que a este tiempo, las hojas de las diferentes líneas que fueron infiltradas con el tratamiento control ($MgCl_2$) se observan con apariencia sana y sin ninguna lesión.

En la segunda columna de la Figura 21 se observan las hojas infiltradas con la toxina FB1, en este caso las hojas de la planta silvestre presentaron una clara lesión de muerte en la zona de infiltración, que se aprecia con coloración gris y apariencia de deshidratación del tejido. En contraste, en las hojas de la mutante *lcb2a-1* expuestas a la toxina no se observó ningún tipo de lesión. Por otra parte, la hoja representativa de la mutante *mpk6* presentó una lesión clorótica en la zona de infiltración con FB1, una respuesta similar a la que presentó la mutante *pflid 18-18*, la cual se observa con una lesión con clorosis aún mayor. Las hojas del genotipo mutante *sbh1-1* tratadas con la fumonisina presentaron una clara lesión de muerte con señales de clorosis en los bordes y deshidratación del tejido.

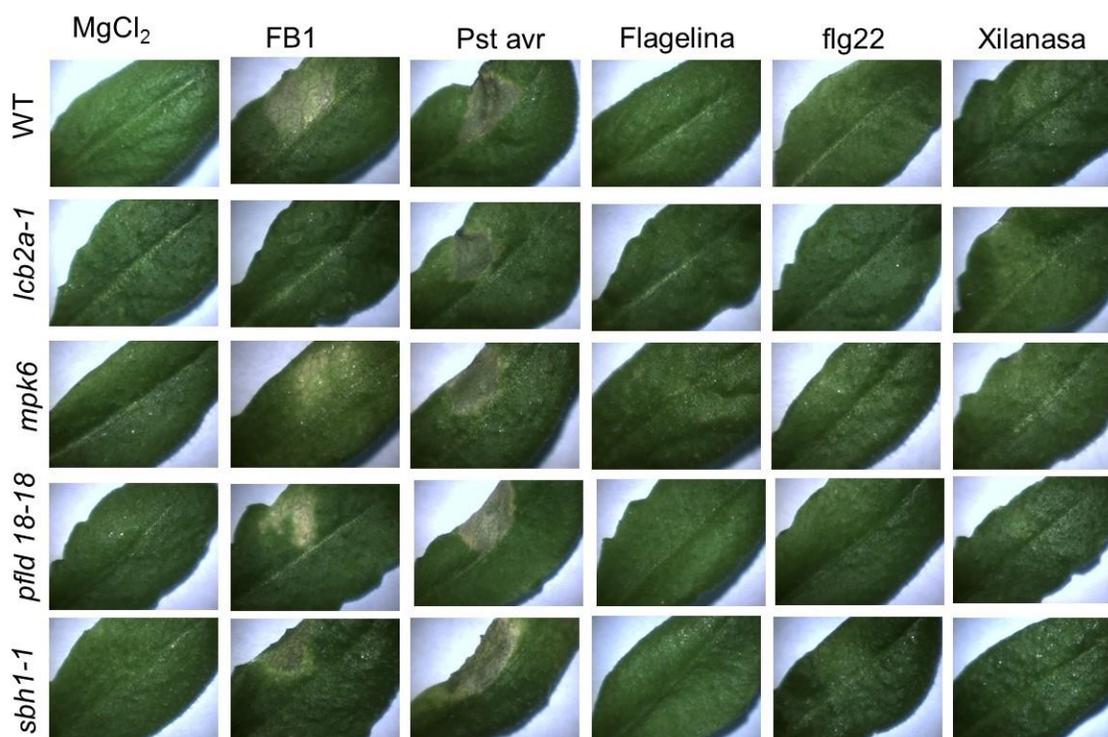


Figura 21. Fenotipos de hojas de plantas a 4 d del tratamiento indicado. Se muestran los resultados representativos de 3 experimentos independientes en los que en cada uno se analizaron 4 hojas de 2 plantas.

El análisis del siguiente tratamiento corresponde a la infiltración de hojas de la línea tipo silvestre y las mutantes con el patógeno avirulento. En este caso, todas las hojas examinadas presentaron una lesión muy similar con coloración gris y deshidratación del tejido. Finalmente, en las tres últimas columnas de la Figura 21 se muestran los tratamientos de infiltración con los PAMPs

flagelina, flg22 y xilanasas, en donde se observa que todas las hojas de las diferentes líneas presentaron una apariencia sana y sin lesión.

Las Figuras 22 y 23 corresponden a la detección de H_2O_2 por la técnica de tinción *in situ* con DAB, las imágenes provienen de hojas de plantas que fueron expuestas a los mismos tratamientos con los que se obtuvieron los fenotipos anteriores, sin embargo, la tinción con el DAB se realizó a tiempos más tempranos de 24 y 72 h.

Los resultados de la Figura 22 corresponden al tiempo de 24 h después de los tratamientos. Como se observa en la primera columna, con el tratamiento control no se observó formación del precipitado café en ninguna de las líneas analizadas. Igualmente, a este tiempo no se detectó coloración en respuesta a la exposición a la FB1 en las hojas de las plantas evaluadas. Por el contrario, el tratamiento de infiltración con el patógeno avirulento, que se observa en la tercera columna de la Figura 22, dio como resultado una coloración café rojiza que indica la presencia de H_2O_2 en la zona de infección, tanto en las hojas de plantas silvestres como de las mutantes. En cuanto a los tratamientos con flagelina y flg22 se observa claramente que no hay señales de precipitación del DAB en las condiciones evaluadas. Por último, en el caso de la exposición a xilanasas, la hoja de la planta silvestre mostró el precipitado café rojizo en la zona de infiltración. En cuanto a las líneas mutantes, también se detectó la presencia de la coloración aunque en menor intensidad en comparación con la hoja de la planta silvestre.

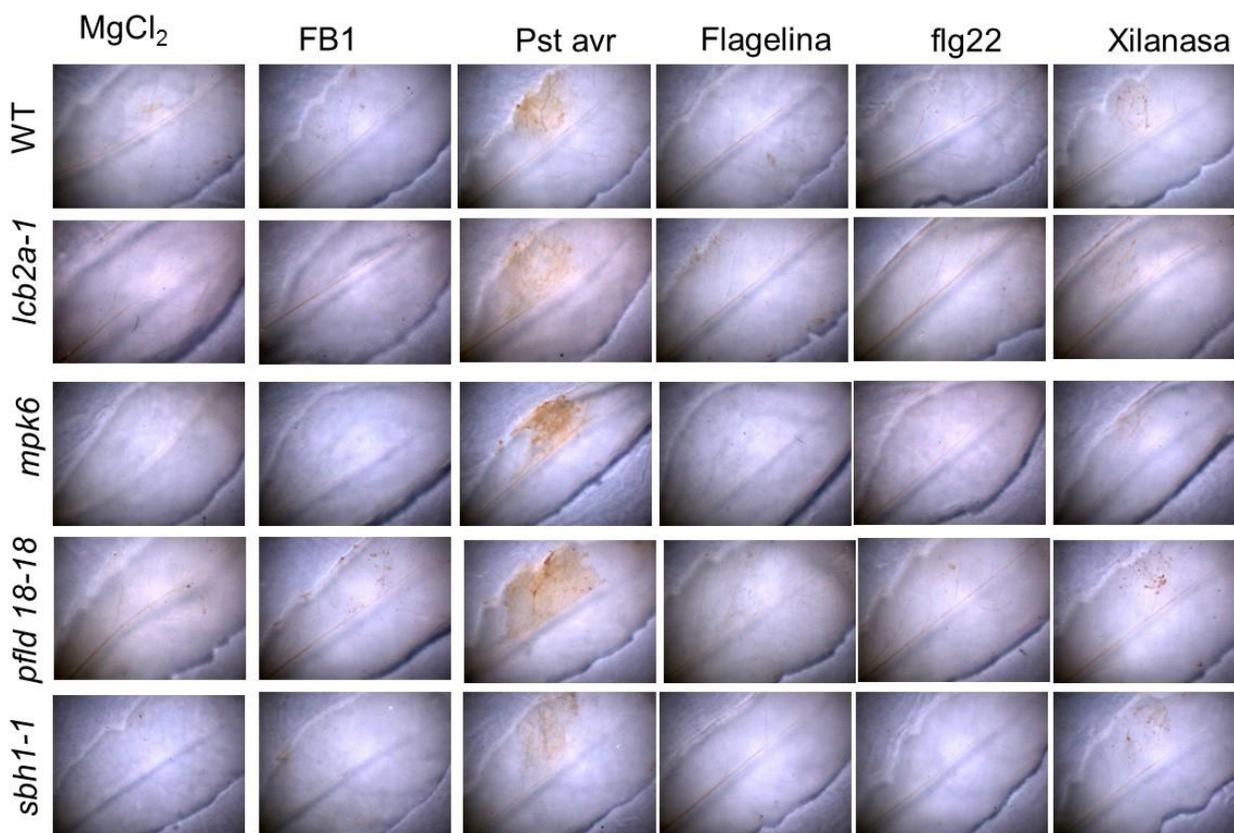


Figura 22. Producción de H_2O_2 . LA tinción con DAB se realizó después de 24 h de exposición a los tratamientos indicados. Se muestran los resultados representativos de 3 experimentos independientes en los que en cada uno se analizaron 4 hojas de 2 plantas. Todas las imágenes fueron contrastadas 0.05 % con el programa Image J.

Los resultados de la Figura 23 muestran las imágenes obtenidas después de 72 h de tratamiento. No se detectó producción de H_2O_2 en ninguna de las líneas tratadas con $MgCl_2$. Por otra parte, a este tiempo, la exposición a FB1 propició la generación de H_2O_2 , en la hoja de la planta silvestre; mientras que las hojas de los genotipos *lcb2a-1* y *mpk6* no generaron el precipitado café rojizo en respuesta al tratamiento. En contraste, se observa que tanto la mutante *pflid 18-18* como la *sbh1-1* presentaron la tinción característica tras la exposición a la toxina.

Así mismo, se pudo detectar en las hojas de todas las líneas la generación de H_2O_2 en respuesta a la infección con el patógeno avirulento, lo cual se observa en la tercera columna de la Figura 23 como una típica coloración café rojiza, que se desarrolló exclusivamente en la zona de infiltración. A este tiempo, las hojas infiltradas con la flagelina y el péptido flg22 no presentaron producción de H_2O_2 después del tratamiento con el DAB. En cuanto al tratamiento con la xilanasa, tanto el genotipo silvestre como las mutantes presentaron una ligera tinción en la zona de la infiltración con este PAMP.

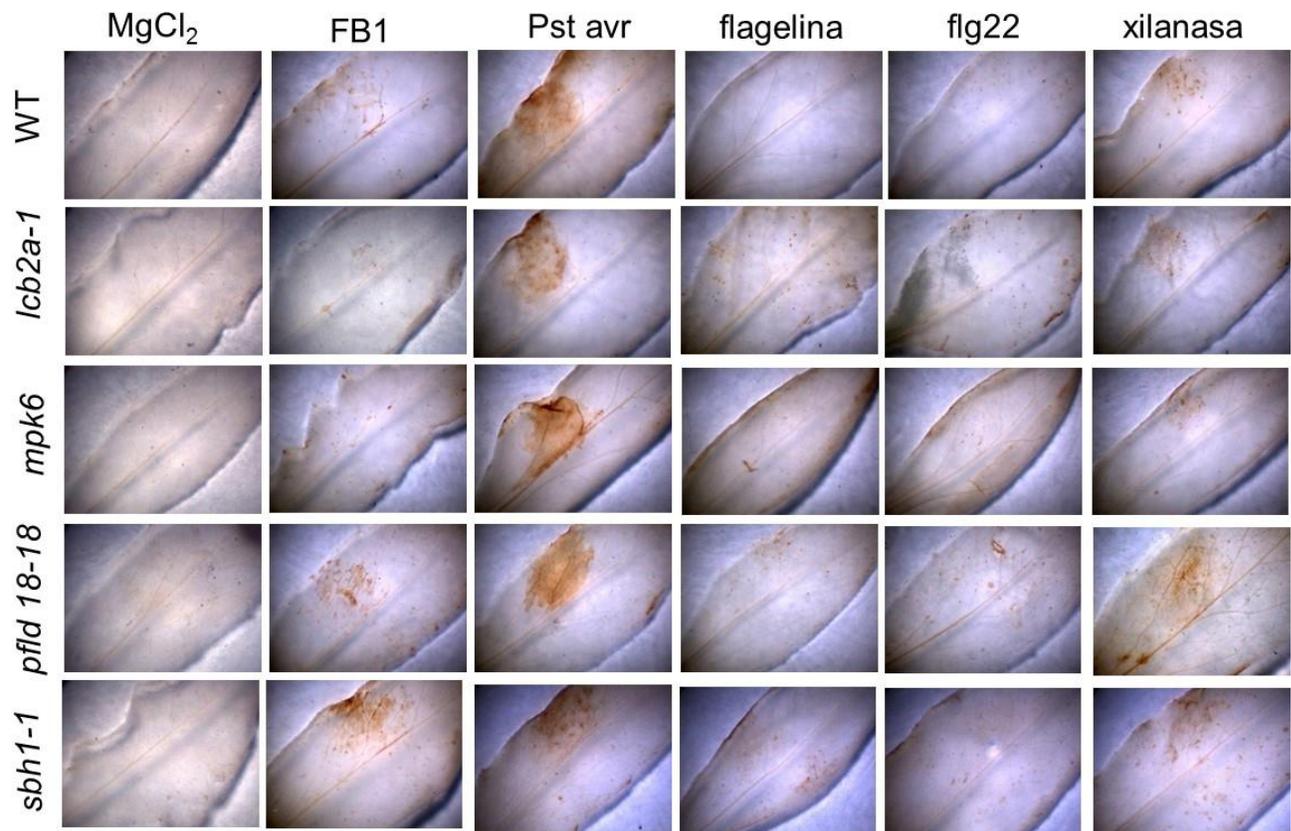


Figura 23. Producción de H_2O_2 . La tinción con DAB se realizó después de 72 h de exposición a los tratamientos indicados. Se muestran los resultados representativos de 3 experimentos independientes en los que en cada uno se analizaron 4 hojas de 2 plantas. Todas las imágenes fueron contrastadas 0.05 % con el programa Image J.

2. Evaluación de la expresión de genes de defensa marcadores de vías señalizadas por fitohormonas en condiciones en las que hay diferentes niveles de BCL

En esta segunda sección del trabajo se buscó tener una aproximación a nivel molecular de las implicaciones de las BCL en vías de señalización de defensa que están mediadas por ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno. El enfoque experimental consistió en evaluar los niveles de transcritos de genes que son marcadores de estas vías, en plántulas de las líneas genéticamente modificadas que fueron tratadas con la FB1.

2.1 Evaluación de la progresión de la muerte celular inducida por la acumulación de BCL

Ya que el objetivo de esta segunda parte del trabajo era determinar la expresión temporal de transcritos de algunos genes de defensa en plántulas tipo silvestres y 4 líneas mutantes expuestas a la FB1, inicialmente fue importante evaluar los cambios fenotípicos que induce esta

toxina. Los efectos de la toxina son detectables a tiempos largos, por lo que la progresión de la muerte celular inducida por la acumulación de BCL se evaluó a los 9 y 12 d, mientras que los análisis de expresión de genes de defensa se realizaron a tiempos cortos de 12 y 24 h. Cabe mencionar que además de estos tiempos de análisis de los transcritos, inicialmente se incluyeron tiempos de 1, 3 y 6 h con el objetivo de detectar cambios tempranos en la acumulación de transcritos, sin embargo, estos resultados no se incluyeron ya que se encontró una gran variabilidad en los patrones de expresión.

En la Figura 24 se muestran los fenotipos de las plántulas de las diferentes líneas a los 9 y 12 días de exposición a la toxina FB1. Es conveniente hacer notar que el diseño experimental incluyó, para cada genotipo y condición, dos diferentes experimentos en los que se analizaron dos muestras biológicas independientes.

Como se observa, las plántulas que no fueron expuestas a la toxina se mantuvieron sanas durante todo el tiempo del experimento. En cuanto a las muestras expuestas a la FB1, a los 9 días se observó clorosis en varias de las plántulas silvestres; mientras que en el caso de la mutante *lcb2a-1* solamente algunas hojas mostraron este fenotipo de muerte. A este tiempo, no se observó muerte celular en la línea *mpk6*, en contraste con los fenotipos de las líneas *pfl18-18* y *sbh1-1* en las que fue evidente la clorosis en algunas de las plántulas tratadas.

A un tiempo más largo de exposición a la toxina (12 d) fue evidente la muerte generalizada en las plántulas tanto del genotipo silvestre como de las líneas *sbh1-1* y *pfl18-18*, mientras que las mutantes *lcb2a-1* y *mpk6* manifestaron tolerancia al tratamiento, ya que mostraron muerte celular tardía y disminuida.

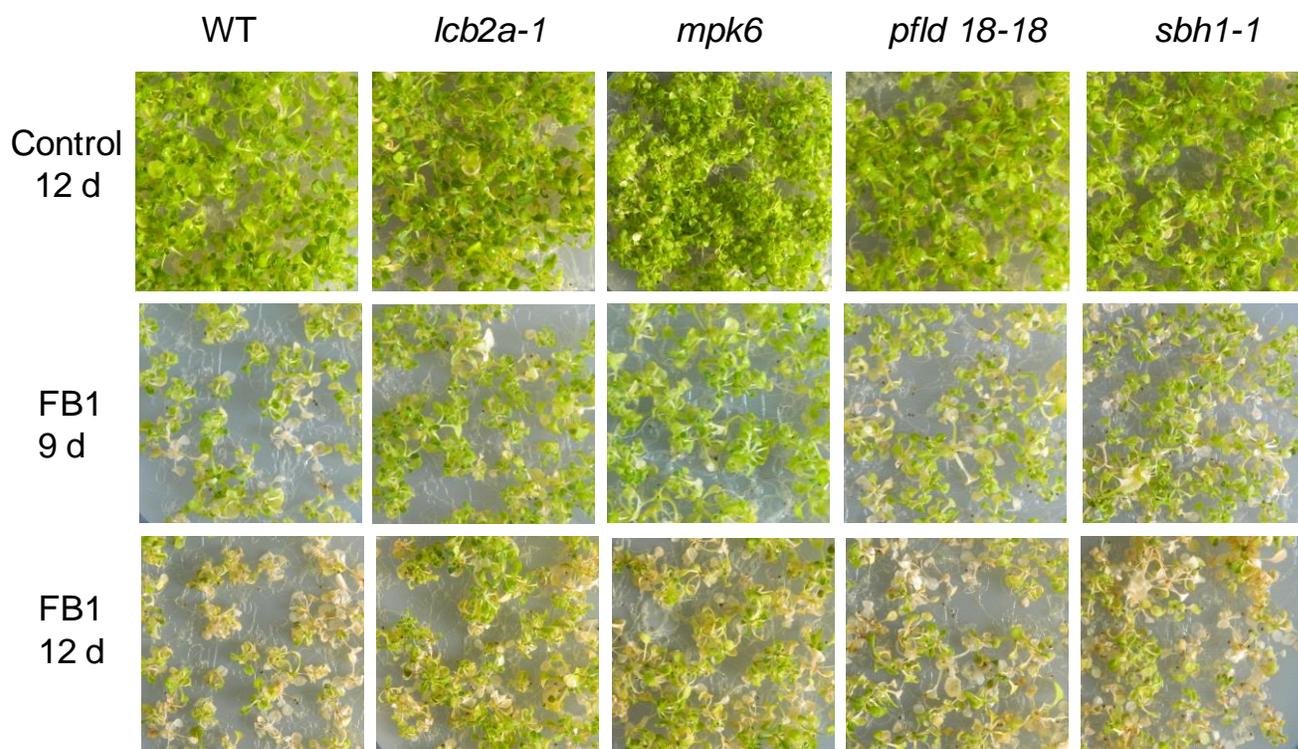


Figura 24. Efecto de la FB1 en la inducción de muerte celular en plántulas. Para cada condición se transfirieron las plántulas de 3 semanas de edad a medio de Gamborg suplementado con y sin FB1 10 μ M, se mantuvieron en fotoperiodo continuo. Se muestran los fenotipos a los 9 y 12 días de exposición a la toxina y a los 12 días de exposición al tratamiento en el caso del control.

2.2 Análisis de la expresión de genes relacionados con el mecanismo de defensa contra patógenos

Una vez descritos los efectos fenotípicos inducidos por el aumento de BCL en las diversas mutantes, en este mismo sistema, de plántulas crecidas en caja de Petri, se realizó el análisis de la expresión de algunos genes de defensa que están vinculados a la activación de vías de señalización por fitohormonas. Para esto se realizaron análisis por RT-PCR partiendo de RNA de muestras de plántulas expuestas a FB1 durante 12 y 24 h con sus respectivos controles.

2.2.1 Establecimiento de las condiciones para el análisis de la expresión génica por RT-PCR

Un aspecto muy importante, para realizar los análisis de expresión génica, fue verificar la integridad del RNA que se utilizó para la síntesis de los cDNAs, así como realizar la calibración de las muestras, ya que el análisis incluyó cinco genes en cinco diferentes genotipos y en diferentes condiciones. Para ello, cada muestra se cuantificó en el NANODROP y su integridad se analizó por electroforesis desnaturizante en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Como se

presenta en la Figura 25, el RNA se observó íntegro y en cantidades muy similares entre las muestras analizadas.

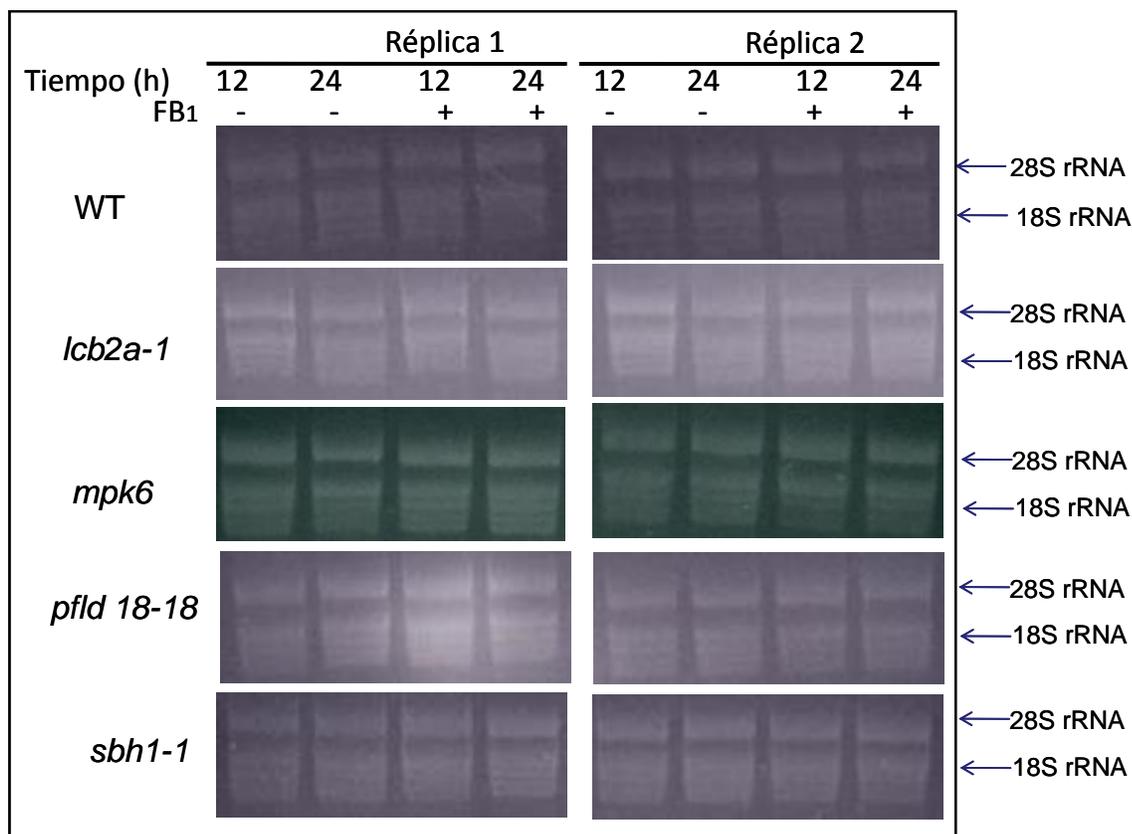


Figura 25. Integridad del RNA obtenido de plántulas de los genotipos indicados. Las plántulas se expusieron a la FB1 por los tiempos indicados y el RNA fue aislado. La electroforesis desnaturizante se realizó cargando 3 µg de RNA por muestra. Se presentan las muestras correspondientes a dos réplicas biológicas y se indican las bandas de las especies de rRNA, 18 y 28S.

Posteriormente, se llevó a cabo la estandarización de las condiciones para la amplificación de los genes a estudiar. Inicialmente se realizó la amplificación de los genes a partir de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* para comprobar que se obtuvieran fragmentos de los tamaños esperados. En la Figura 26 se muestra el patrón de amplificación de los genes *PDF1.2*, *ACS-6*, *β-quitinasa*, *PR-1* y *Ubiquitina*. Se observa que los amplicones corresponden a fragmentos con los tamaños esperados de acuerdo al diseño de los oligonucleótidos (Tabla 4). El gen de la *Ubiquitina 5* se utilizó como control de carga, ya que los niveles de su transcrito no variaron significativamente en respuesta al tratamiento de 12 y 24 h con la toxina.

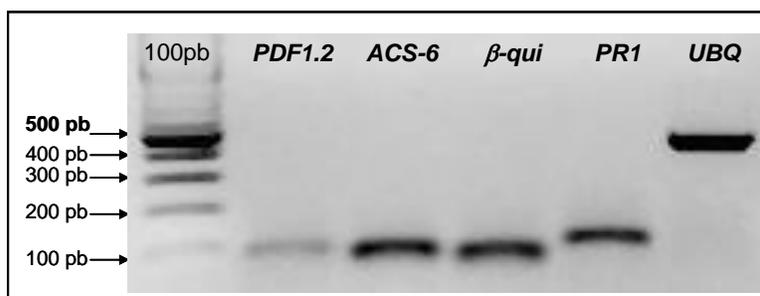


Figura 26. Amplificación de los genes *PDF1.2*, *ACS-6*, *β-quitinasa*, *PR-1* y *Ubiquitina 5* a partir de DNA genómico de plántulas. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la sección de Materiales y Métodos.

Para el establecimiento de las condiciones de amplificación a partir de los cDNAs se realizaron varias pruebas modificando la temperatura de alineamiento, cantidad de cDNA y el número de ciclos de amplificación. Las mejores condiciones establecidas para cada transcrito se resumen en la Tabla 5 de la sección de Materiales y Métodos.

2.4 Análisis de la expresión de los genes *ACS6*, *PDF1.2*, *β-quitinasa* y *PR-1* en respuesta al tratamiento con FB1.

Una vez que se establecieron las condiciones de amplificación, se realizaron los ensayos de RT-PCR para determinar si la acumulación de BCL tenía una asociación con la expresión de estos genes, para ello se analizaron por duplicado dos réplicas biológicas para cada gen y para cada genotipo.

A continuación se presentan los resultados en donde se muestra una imagen representativa de los niveles de transcrito para todos los genes, incluyendo al gen de la Ubiquitina como control interno de carga para cada condición. Así mismo, en cada caso se presenta una gráfica que integra los resultados de las réplicas del experimento.

En la Figura 27 se muestran los resultados para el genotipo silvestre, en donde se observa que hay una clara acumulación de los transcritos de *ACS6*, *PDF1.2* y *PR1* al tiempo de 24 h de exposición a la FB1. Por su parte, los transcritos del gen de la *β-quitinasa*, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones analizadas.

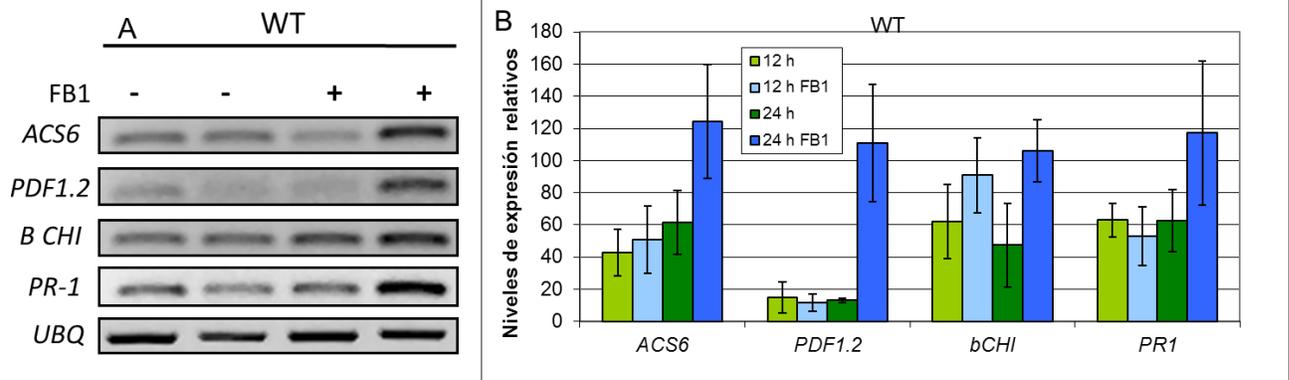


Figura 27. Efecto de la FB1 en los niveles de transcritos de los genes *ACS6*, *PDF1.2*, β -quitinasa, y *PR-1* en plántulas tipo silvestre. (A) Se muestran los resultados representativos de dos réplicas biológicas. (B) Se presenta el análisis de cuatro réplicas provenientes de dos muestras biológicas independientes, en donde los valores corresponden a los promedios \pm DS, n=4. Se muestran los efectos de la toxina a 12 y 24 h. Se utilizó la expresión del gen de Ubiquitina como control interno de carga. Los análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

Los resultados de la mutante *lcb2a-1*, se presentan en la Figura 28, en este caso por efecto de la mutación se observó una acumulación del transcritos de los genes *ACS6*, β -quitinasa y *PR-1*, con respecto al control de *Ubiquitina*. Sin embargo, el análisis de las réplicas mostró que no hay diferencias entre los tratamientos con la toxina y sus controles. En el caso del gen *PDF1.2* se detectó una baja señal de transcritos, menor al 50 %, para todas las condiciones probadas.

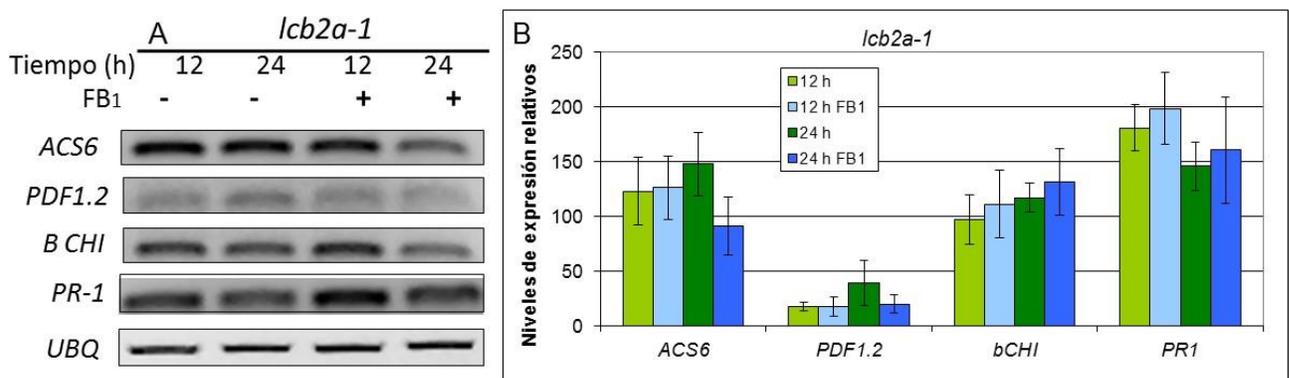


Figura 28. Efecto de la FB1 en los niveles de transcritos de los genes *ACS6*, *PDF1.2*, β -quitinasa, y *PR-1* en plántulas *lcb2a-1*. (A) Se muestran los resultados representativos de dos réplicas biológicas. (B) Se presenta el análisis de cuatro réplicas provenientes de dos muestras biológicas independientes, en donde los valores corresponden a los promedios \pm DS, n=4. Se muestran los efectos de la toxina a 12 y 24 h. Se utilizó la expresión del gen de Ubiquitina como control interno de carga. Los análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

También se determinó la abundancia de transcritos, de los genes anteriores, en las plántulas de la línea mutante *mpk6*. El análisis de las réplicas biológicas para el gen *ACS6* mostró una clara acumulación de transcritos en las plántulas tratadas con la FB1 sólo a las 12 h. Mientras que en el caso del gen *PR1* solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre

los niveles relativos de expresión entre las muestras de 12 h y 12 de tratamiento con FB1. Por otro lado, se tuvieron niveles por debajo del 20 % para el RNA mensajero del gen *PDF1.2* en todas las condiciones evaluadas. En este caso, la mutación afectó la acumulación de transcrito en respuesta al tratamiento con FB1.

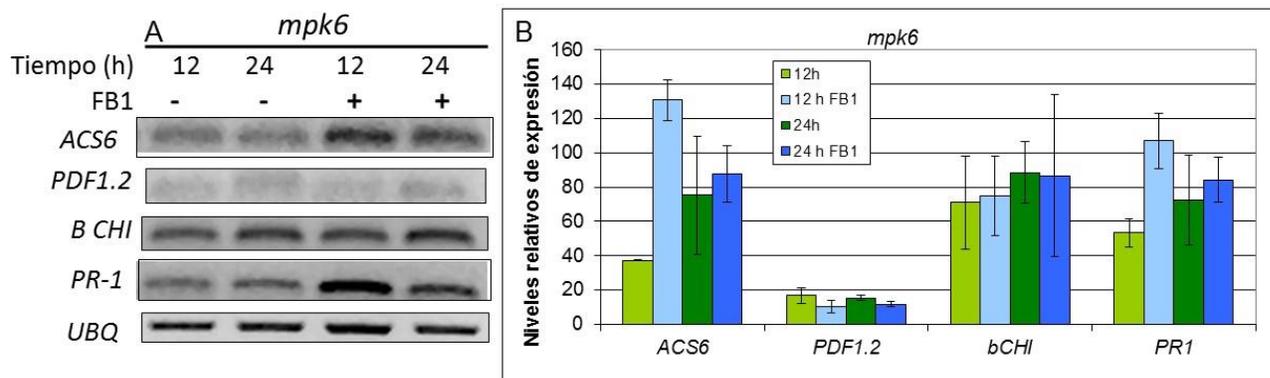


Figura 29. Efecto de la FB1 en los niveles de transcrito de los genes *ACS6*, *PDF1.2*, β -quitinasa, y *PR-1* en plántulas *mpk6*. (A) Se muestran los resultados representativos de dos réplicas biológicas. (B) Se presenta el análisis de cuatro réplicas provenientes de dos muestras biológicas independientes, en donde los valores corresponden a los promedios \pm DS, n=4. Se muestran los efectos de la toxina a 12 y 24 h. Se utilizó la expresión del gen de Ubiquitina como control interno de carga. Los análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

Para la mutante *pflD 18-18* (Figura 30), se detectaron niveles similares del RNAm de *ACS6* tanto en los tratamientos control como en los de exposición a FB1. En cuanto a *PDF1.2* hubo una expresión relativa de menos del 20 % a tiempos de 12 h sin y con FB1, sin embargo, el análisis con las dos réplicas biológicas mostró acumulaciones aparentes de transcrito de hasta 100 % en los tratamientos a 24 h, si bien estos niveles no fueron reproducibles.

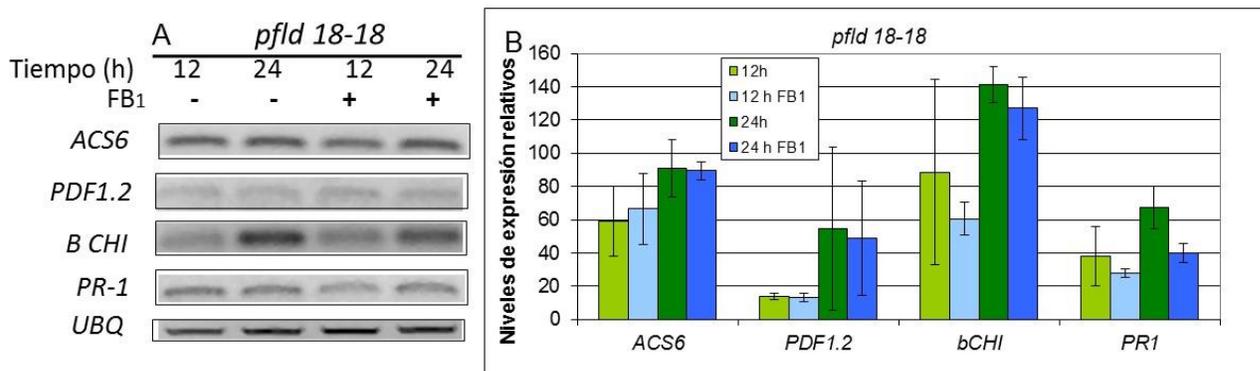


Figura 30. Efecto de la FB1 en los niveles de transcrito de los genes *ACS6*, *PDF1.2*, β -quitinasa, y *PR-1* en plántulas *pflD 18-18*. (A) Se muestran los resultados representativos de dos réplicas biológicas. (B) Se presenta el análisis de cuatro réplicas provenientes de dos muestras biológicas independientes, en donde los valores corresponden a los promedios \pm DS, n=4. Se muestran los efectos de la toxina a 12 y 24 h. Se utilizó la expresión del gen de Ubiquitina como control interno de carga. Los análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

Por otro lado, para la β -quitinasa y para *PR1* no hubo una tendencia clara en las muestras que recibieron el tratamiento con la toxina. Se registraron acumulaciones del transcrito de la β -quitinasa a las 12 y 24 h sin tratamiento, así como a las 24 h de exposición a la FB1. Los niveles de *PR1* en las muestras tratadas con FB1 fueron inferiores al nivel que se presentó a 24 h sin tratamiento.

Por su parte, la mutante *sbh1-1* mostró una acumulación de transcrito del gen *ACS6* a al tiempo de 12 h con y sin el tratamiento con la FB1, así como a las 24 h de exposición a la toxina (Fig. 31). Por otra parte se detectó un abatimiento en la acumulación de transcrito de los genes β -quitinasa y *PDF1.2* comparando la condición de 12 h con el resto de las condiciones evaluadas. Hubo una acumulación clara del transcrito de *PR-1* en condiciones de exposición a la FB1 por 24 h en esta mutante en comparación con su control, aunque también se registraron elevados niveles de expresión en la condición de 12 h con y sin tratamiento.

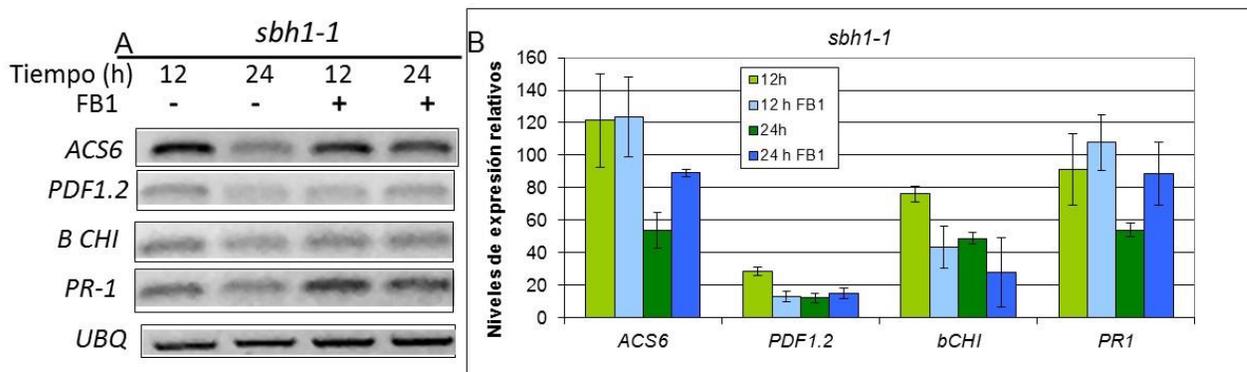


Figura 31. Efecto de la FB1 en los niveles de transcrito de los genes *ACS6*, *PDF1.2*, β -quitinasa, y *PR-1* en plántulas *sbh1-1*. (A) Se muestran los resultados representativos de dos réplicas biológicas. (B) Se presenta el análisis de cuatro réplicas provenientes de dos muestras biológicas independientes, en donde los valores corresponden a los promedios \pm DS, n=4. Se muestran los efectos de la toxina a 12 y 24 h. Se utilizó la expresión del gen de Ubiquitina como control interno de carga. Los análisis estadísticos se muestran en el Apéndice 3.

Finalmente, en la Figura 32 se presentan los mismos datos organizados de manera que se puedan comparar el patrón de acumulación de transcritos entre los diferentes genotipos. Se observa que para el gen *ACS6* la línea silvestre presentó diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de transcrito con el tratamiento de exposición a FB1 durante 24 h. Para este mismo gen, la mutante *mpk6* registró acumulación de transcrito a las 12 y 24 h con FB1, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas en comparación con los niveles de transcrito a las 12 h. Así mismo, la mutante *sbh1-1*, presentó incrementos en los niveles de

transcrito a 12 y 24 h de tratamiento con FB1, sin embargo, los niveles del control de 12 h también resultaron muy elevados.

Cabe hacer notar que la mutante *lcb2a-1* presentó, en general, los niveles más abundantes de ACS6 en relación con las demás líneas. En general, las mutaciones en las cuatro líneas probadas afectaron la respuesta al tratamiento con FB1, en el sentido de que solamente en la línea silvestre fue evidente una acumulación de transcrito de los genes estudiados a 24 h de exposición a FB1.

El caso del gen *PDF1.2* resulta el más claro en cuanto a un efecto del tratamiento con FB1 en los niveles de transcrito, es evidente que el genotipo silvestre es el que presentó una acumulación mayor al tiempo de 24 h de tratamiento con la toxina, mientras que en el resto de las mutantes los niveles están por debajo del 60 % de expresión relativa, salvo el caso de la línea *pflD 18-18* donde el comportamiento de las réplicas biológicas fue muy distinto.

Los niveles relativos de acumulación de transcrito del gen de la β -quitinasa mostraron que no hay un patrón asociado al tratamiento con la FB1. Sin embargo, es claro que la mutante *sbh1-1* es la que presenta los menores niveles de transcrito de este gen.

Por último, el análisis del *PR1* permitió observar en el caso del genotipo silvestre una mayor acumulación de transcrito a las 24 h de tratamiento con la toxina. En cuanto a la mutante *mpk6*, hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores de 12 h FB1 con su respectivo control, mientras que para la mutante *pflD 18-18*, se encontraron niveles de transcrito disminuidos en las condiciones de tratamiento con FB1. Por otra parte, aunque no se apreciaron diferencias entre control y tratamientos, la mutante *lcb2a-1* presentó niveles por encima de las demás líneas.

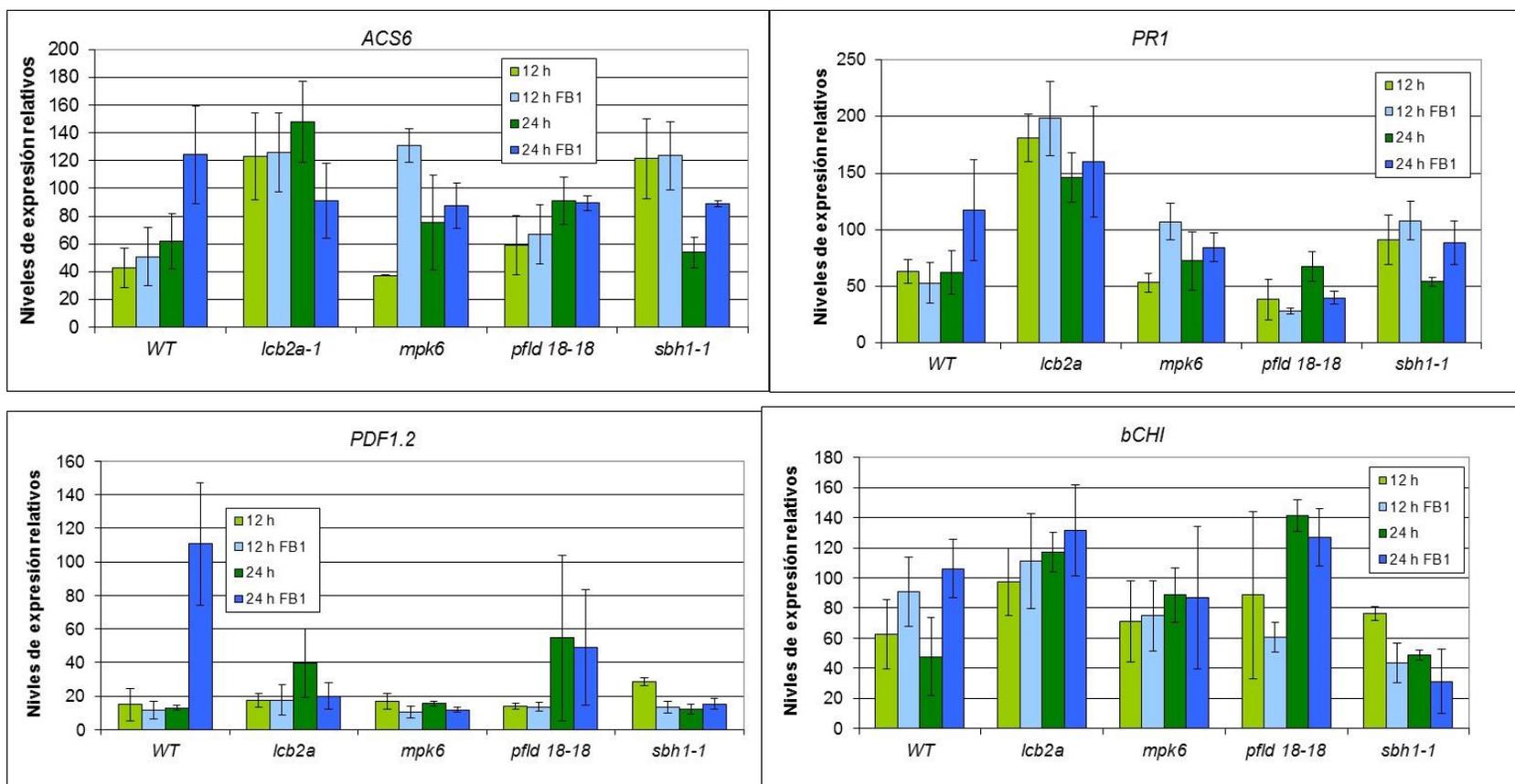


Figura 32. Comparación del efecto de la FB1 en los niveles de transcrito de los cuatro genes de defensa. Se graficaron los resultados mostrados en las Figuras 27-31.

DISCUSIÓN

Validación del modelo de inducción de MCP mediada por acumulación de BCL empleando FB1

Diversos estudios han comprobado que las BCL cumplen con funciones de señalización durante procesos celulares en las plantas como la apertura de estomas, la defensa contra patógenos y la respuesta al frío (Ng *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2007; Saucedo-García *et al.*, 2011a; Dutilleul *et al.*, 2012). En este trabajo se evaluó la participación de las BCL, precursoras de esfingolípidos, en las dos formas de inmunidad conocidas en plantas, que son la inducida por PAMPs (PTI) y la desencadenada por efectores (ETI).

Con este objetivo, para tener un panorama de lo que ocurre en el tejido vegetal tras la acumulación de las BCL, se recurrió en primer lugar al tratamiento con FB1, debido a que está bien establecido que la toxina promueve un incremento de estas especies esfingoideas al inhibir a la ceramida sintasa que participa en el metabolismo de esfingolípidos (Merrill *et al.*, 1996). En los resultados, se observó que la exposición a FB1 de las hojas de plantas con genotipo silvestre indujo la aparición de lesiones de muerte celular similares a las que aparecen durante la HR, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Stone *et al.*, 2000; González-Solís, 2009; Saucedo-García *et al.*, 2011a) y con parámetros como la fragmentación de DNA que también se ha detectado en estas condiciones (Saucedo-García *et al.*, 2011a).

Mutantes en genes de enzimas de la vía de síntesis de esfingolípidos. Inicialmente, se exploró si había alguna diferencia en la manifestación de la respuesta de MCP entre diferentes genotipos de *Arabidopsis* que presentan modificaciones en el metabolismo de las especies esfingoideas. Para ello, se realizó un análisis fenotípico en el que los efectos de la acumulación de BCL en dos mutantes: la *lcb2a-1* y la *sbh1-1*, se expresaron como el índice de daño ocasionado por el tratamiento con la toxina. Este parámetro permite tener una estimación del daño foliar que incluye tanto la intensidad de la lesión, como su frecuencia de aparición en una población experimental de plantas. Los resultados mostraron que el genotipo *lcb2a-1* presentó índices de daño menores a todas las demás líneas analizadas cuando se le infiltró la toxina. En términos de las modificaciones genéticas que presenta esta línea, este comportamiento se explica porque, la mutante *lcb2a-1* al ser expuesta a la FB1 acumula menores cantidades de BCL debido a que tiene silenciado el gen *LCB2a*, que codifica para una de las subunidades de la SPT, primera enzima en la síntesis de esfingolípidos. Este gen, a diferencia de la isoforma *LCB2b*, se expresa con mayor intensidad en la hoja (Dietrich *et al.*, 2008). Lo anterior se ha comprobado cuantificando BCL en el sistema de plántulas de tres semanas de edad (González Solís, 2009; Saucedo-García *et al.*, 2011a). Adicionalmente, esta tolerancia a la toxina se demostró en plántulas de tres semanas de edad (Saucedo-García *et al.*, 2011a). En contraste, la mutante *sbh1-1* presentó el mayor índice de daño en todos los tiempos del análisis, comparado con el

genotipo silvestre y las demás mutantes. En esta línea que carece de una hidroxilasa de BCL (la SBH1), se promueve la acumulación de las especies dihidroxiladas y la disminución de las trihidroxiladas (Chen *et al.*, 2008). Se ha reportado que especies dihidroxiladas como la esfinganina (d18:0) intervienen selectivamente en la señalización hacia la MCP (Saucedo-García *et al.*, 2011a), por lo que se puede interpretar que la susceptibilidad de la línea *sbh1-1* a la FB1 expresada como índice de daño, se debe a un mayor contenido de las BCL dihidroxiladas. Del análisis de esta sección se puede concluir que efectivamente hay una diferencia en la manifestación macroscópica de la muerte celular inducida por la FB1 en los genotipos que tienen alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos, lo que confirma la implicación de las BCL en la vía de señalización hacia la MCP.

Mutantes en elementos de señalización de la vía de BCL. Ya se ha descrito que el calcio (Ca^{2+}), las ERO, la MPK6 y la cinasa dependiente de calcio CPK3, son elementos que participan en vías de señalización mediadas por BCL (Shi *et al.*, 2007; Lachaud *et al.*, 2010; Lachaud *et al.*, 2011; Saucedo *et al.*, 2011a; Saucedo *et al.*, 2011b; Lachaud *et al.*, 2012). Por lo tanto, en este estudio también se incluyeron las plantas mutantes *pflD 18-18* y *mpk6*, que tienen alguna afectación en algunos elementos de señalización de la vía de las BCL para evaluar el efecto de la FB1 en el fenotipo de las hojas. En la línea *pflD 18-18*, que expresa a la proteína flavodoxina bacteriana en el cloroplasto, se reduce la acumulación de ERO en este organelo (Tognetti *et al.*, 2006). La línea *mpk6* carece de esta MAP cinasa involucrada en la señalización por BCL, tanto en la vía que conduce a la MCP como en la que concede tolerancia al frío (Saucedo-García *et al.*, 2011; Dutilleul *et al.*, 2012). Los resultados para estas dos líneas mostraron índices de daño a los 2, 3 y 4 días de exposición a la toxina, que estuvieron por arriba de los observados en las plantas tipo silvestre y *lcb2a-1*, pero menores a los de la mutante *sbh1-1*. En el último día del análisis, los índices de daño para las mutantes *pflD 18-18*, *mpk6* y *sbh1-1* fueron muy similares. Lo anterior muestra que aun cuando se tengan afectados estos dos elementos de señalización de la vía de BCL, se puede establecer la lesión de muerte celular e incluso con mayor intensidad que en la planta tipo silvestre. Se ha propuesto que las ERO del cloroplasto son importantes para la ejecución de la muerte celular, ya que el estrés oxidativo causa daño irreversible de las membranas tilacoidales, lo cual afecta en general el metabolismo de las células vegetales (González-Solís, 2009; Zurbriggen *et al.*, 2010; Nomura *et al.*, 2012; Tapia de Aquino, 2012; Xing *et al.*, 2013). Por lo tanto, se esperaba una disminución en la manifestación de muerte celular en la mutante *pflD 18-18* tras el tratamiento con la toxina. Es importante enfatizar que con la expresión de la flavodoxina en la mutante *pflD 18-18* no se disminuye al 100% la acumulación de ERO en el cloroplasto (Tapia de Aquino, 2012), por lo que aún las ERO residuales que se generan en esta mutante pueden ser suficientes para llevar a las células vegetales a la muerte

celular. Alternativamente, en este contexto se puede considerar el trabajo de Kim *et al.* (2012), en el que se propone que el oxígeno singulete $^1\text{O}_2$ sintetizado en el cloroplasto actúa como molécula señalizadora para llevar a la muerte celular sin daño oxidativo. De acuerdo a las modificaciones que presenta la mutante *pflD 18-18*, en donde se disminuyen en particular O_2^- y H_2O_2 por efecto de la inserción de la flavodoxina (Allen, 1995; Tognetti *et al.*, 2006) y no se afecta la formación de $^1\text{O}_2$, se puede proponer que esta ERO en particular tiene un efecto en la señalización hacia la MCP por acumulación de BCL.

Considerando que las ERO forman parte de la vía de señalización que involucra a las BCL (Shi *et al.*, 2007; Lachaud *et al.*, 2011, Saucedo-García *et al.*, 2011b), es importante mencionar otra posible fuente generadora de ERO en la célula que ha sido implicada en la vía de BCL. El trabajo de Lachaud *et al.* (2011) reportó que la NADPH oxidasa (localizada en la membrana plasmática) es la primera fuente de ERO que se activa tras la exposición de células de tabaco BY-2 a la BCL esfinganina (d18:0). Para evaluar si había alguna diferencia en la producción de ERO al tratar las hojas de los diferentes genotipos con FB1, se realizó una tinción histoquímica con diaminobencidina, la cual reacciona con el H_2O_2 formando un precipitado color café-rojizo *in situ*, que se puede observar directamente en el tejido de la hoja después de la decoloración de la clorofila. Es importante mencionar que esta técnica no es de alta sensibilidad, por lo tanto, lo que puede visualizarse con esta metodología corresponde a la formación de grandes cantidades de H_2O_2 en las células vegetales (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). En las Figuras 22 y 23 se muestran los resultados de este análisis, en donde se observa que el tratamiento control que consistió en la infiltración de MgCl_2 , no originó el precipitado rojizo, lo cual indica que a los tiempos analizados el daño mecánico de la infiltración no influye en la generación de H_2O_2 . De igual manera, al tiempo de 24 h no se detectó la formación de H_2O_2 en ninguno de los genotipos después de la exposición a la toxina. En contraste, al tiempo de 72 h se detectó la coloración característica del precipitado justo en la zona de infiltración en la hoja de la planta tipo silvestre, con lo que se demuestra que en condiciones normales, la acumulación de BCL induce la producción de ERO, como se había reportado anteriormente (Stone *et al.*, 2000; González-Solís, 2009). Analizando lo que ocurre en las mutantes con alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos, la planta *lcb2a-1* no presentó producción de H_2O_2 ni a 72 h, lo cual se puede relacionar con el disminuido fenotipo de muerte celular y con las afectaciones en la síntesis de BCL. En contraste, a este tiempo de 72 h, en la mutante *sbh1-1* se detectó H_2O_2 en la zona de infiltración, lo cual correlaciona con un fenotipo de muerte exacerbado, así como con mayores índices de daño en los tiempos analizados. Los resultados con la mutante *sbh1-1* sugieren que la acumulación de BCL dihidroxiladas promueve la generación de H_2O_2 , lo que se observa cualitativamente con una mayor intensidad en la coloración. Con estos resultados se puede

sugerir que la acumulación de H_2O_2 precede y están relacionada con una manifestación más tardía de muerte celular.

Por otra parte, resulta interesante analizar lo que ocurrió en cuanto a la producción de H_2O_2 en la mutante *pfl1 18-18* después de la exposición a FB1. En esta línea de Arabidopsis afectada el sistema de generación de ERO en el cloroplasto, se observó producción de H_2O_2 en la zona de infiltración con la toxina. Estos resultados indican que la acumulación de BCL por efecto de la FB1, induce la generación de ERO a las 72 h. Lo anterior podría deberse a que hay contribución de otras fuentes generadoras de ERO, como mitocondria o NADPH oxidasas, que se han relacionado más bien con producción de ERO a tiempos tempranos (Torres *et al.*, 2002; Lachaud *et al.*, 2011). O bien, la presencia de H_2O_2 , detectado por la tinción con DAB, también puede estar relacionada con que la disminución de ERO del cloroplasto ya que el efecto de la flavodoxina no es total. En apoyo a lo anterior, se ha determinado en plántulas *pfl1 18-18* de 3 semanas de edad que la reducción de ERO es de 36.7 % en comparación con la silvestre a las 72 h de tratamiento con FB1 (Tapia de Aquino, 2012).

Con respecto a la mutante *mpk6*, se ha establecido que esta cinasa está corriente abajo de la acumulación de BCL en la vía que conduce a la MCP (Saucedo-García *et al.*, 2011a), comprobándose también que en las plántulas de Arabidopsis, la MPK3, a la cual comúnmente se le atribuye una función redundante con la MPK6, no suple la función de inducción de MCP (Saucedo-García *et al.*, 2011a). Por lo anterior, la ausencia de la cinasa MPK6 hacía prever una tolerancia a la toxina como la observada en plántulas de Arabidopsis (Saucedo-García *et al.*, 2011a). Sin embargo, las plantas adultas de la línea *mpk6* presentaron mayores índices de daño que las plantas tipo silvestres a lo largo de los tiempos evaluados. La diferencia observada en plantas adultas con respecto a plántulas hace pensar en la posibilidad de que el estado de desarrollo pueda ser crítico para el establecimiento de estas respuestas. Otra alternativa, es la forma de administración de la toxina, ya que en el caso de las plántulas, la exposición a la toxina se llevó a cabo agregándola al sustrato de donde fue absorbida por la raíz. Así mismo, estos resultados sugieren la presencia de otros elementos de señalización involucrados que puedan suplir la función de la MPK6 en la MCP.

Por último, en la línea *mpk6* no fue perceptible la acumulación de H_2O_2 en el tejido infiltrado con la toxina. Estos resultados pueden explicarse ubicando la formación de esta ERO por el cloroplasto corriente debajo de la MPK6. Sin embargo, el hecho de que en este genotipo *mpk6* se presente muerte celular (alto índice de daño) aun en ausencia de ERO del cloroplasto, sugiere que las ERO del cloroplasto, no son necesarias para que se presente la MCP. Lo anterior indica que las BCL podrían participar en diferentes vías de señalización que lleven hacia la MCP o a manifestaciones de defensa. Al respecto, se ha descrito una vía inducida por BCL que lleva a

MCP que involucra a una cinasa de calcio, CPK3, lo cual revela que puede haber otras vías en paralelo activadas por BCL que llevan a muerte celular y que quizás no necesitan las ERO del cloroplasto (Lachaud *et al.*, 2012).

Contribución de las BCL a las formas de inmunidad contra patógenos

Bases de cadena larga en la ETI

Una vez que se describió el efecto de la acumulación de BCL causada por FB1 en el fenotipo de diferentes líneas de *Arabidopsis*, se procedió a evaluar lo que ocurre cuando estos genotipos se desafían con el patógeno virulento o el avirulento. *Arabidopsis thaliana* cuenta con los mecanismos moleculares para establecer una respuesta eficiente de defensa contra la cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* DC3000 (*avrRpm1*), por lo cual esta interacción incompatible permite evaluar lo que ocurre durante la inmunidad ETI. En el trabajo de Peer *et al.* (2010) se describió que la infección con *Pseudomonas syringae avrRpm1* induce la acumulación de fitoesfingosina (t18:0), lo cual evidenció que durante la interacción planta-patógeno, las BCL son especies candidatas para la señalización de la respuesta de defensa. En ese trabajo, las características de la acumulación de BCL en términos temporales y cuantitativos, así como el hecho de que sucediera en una interacción patógeno-hospedero genéticamente incompatibles, sugirió la asociación de las BCL con una respuesta tipo ETI. Sin embargo, esos datos no fueron apoyados por evidencias experimentales que relacionaran la cinética de acumulación de BCL con parámetros de respuestas de defensa como HR, expresión de genes de defensa, producción de fitoalexinas, de ERO, crecimiento bacteriano, etc. Con estos antecedentes, en este trabajo se propuso explorar si justamente algunas de estas respuestas de defensa se producían en los dos modelos de ETI y PTI, induciendo la acumulación de BCL por adición de FB1. Este estudio se extendió a diferentes genotipos carentes de elementos señalizadores en la vía de BCL, para valorar su contribución a estos mecanismos.

En concordancia con lo anterior, el siguiente paso fue evaluar la muerte celular estimando si había diferencias en las lesiones presentadas por las plantas de diferentes genotipos al ser infectadas con las dos cepas del patógeno. Es importante diferenciar que la lesión que se presenta tras la infección con el patógeno avirulento corresponde a una respuesta de hipersensibilidad o HR, la cual es un tipo de MCP que ocurre para limitar el avance de patógenos biótropos/hemibiótrofos evitando que se diseminen al resto del tejido. Mientras que la muerte celular que se induce en respuesta a la infección con el patógeno virulento es una lesión de enfermedad que puede avanzar al resto de la planta. Sin embargo, en sus fases iniciales e intermedias, las lesiones producidas por ambos patógenos se observan con características muy similares.

En el conjunto de experimentos, en los que se evaluó el índice de daño ocasionado por los patógenos, inicialmente se utilizó una carga bacteriana de 1×10^8 UFC/mL para la infección de las plantas, lo cual resultó una dosis excesiva que no permitió encontrar diferencias en la intensidad de la lesión producida. Sin embargo, algo que resultó evidente fue que la lesión ocasionada por el patógeno avirulento apareció desde tiempos tempranos y llegó a índices de daño de 1 a las 24 h, en casi todos los genotipos, siendo la excepción la línea *lcb2a-1*, mientras que con la infección de la cepa virulenta, al tiempo de 24 h se presentaron índices por debajo de 1. Lo anterior está de acuerdo con el hecho de que el establecimiento de la respuesta HR es muy rápido, ya que se encienden los mecanismos que llevan a la muerte desde las primeras horas del ataque del patógeno (Heath, 2000). Se ha reportado que hay diferencias dinámicas, tanto cualitativas como cuantitativas, entre la inmunidad ETI y la producción de enfermedad que dependen de varios factores, como estado de salud general de las plantas, condiciones ambientales y dosis de patógeno utilizadas (Hamdoun *et al.*, 2013). Debido a que no se pudieron detectar diferencias entre los genotipos al desafiar a las plantas con los patógenos, la siguiente estrategia fue reducir la carga de infección cien veces menos a la anteriormente utilizada, es decir, a 1×10^6 UFC/mL.

Con la reducción en los niveles de bacterias usados en la infección, se detectó que en el caso del genotipo *lcb2a-1* expuesto al patógeno avirulento hubo valores de índice de daño significativamente menores en comparación con la planta tipo silvestre en tiempos de 2 y 3 días, mientras que a tiempos más largos de evaluación (4 y 7 d) los resultados fueron similares a la WT. Lo anterior sugiere que hay deficiencia en el desempeño de la planta mutante para desplegar la respuesta de defensa que lleve a la HR. En este sentido, aunque no se conoce el blanco de las moléculas del patógeno para activar la respuesta mediada por BCL, el resultado indica que la afectación a nivel de la subunidad LCB2a de la SPT repercute en el establecimiento de la respuesta que lleva a la muerte celular.

Por otro lado, los resultados mostraron que el genotipo *sbh1-1* presentó un bajo índice de daño con la infección del patógeno avirulento (1×10^6 UFC/mL). Es decir, la afectación de esta mutante para sintetizar BCL trihidroxiladas tuvo un efecto negativo en la respuesta tipo HR. Lo anterior se puede relacionar con lo reportado por Peer *et al.* (2010), en donde se comprobó que al infectar plantas *sbh1-1* con el patógeno avirulento hay una menor acumulación de la fitoesfingosina (t18:0) en comparación con la planta silvestre, por lo que se puede inferir que esta menor acumulación se relaciona con un despliegue insuficiente de defensas. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en plántulas expuestas a la FB1, ya que la adición de la toxina a plántulas silvestres lleva a una acumulación de BCL dihidroxiladas que se expresa en un fenotipo de muerte celular, mismo que es presentado por las plántulas de la mutante *sbh1-1*

expuestas a la FB1 (Saucedo-García *et al.*, 2011a). Lo anterior hace evidente que hay muchos mecanismos involucrados, además de los inducidos por acumulación de BCL, que se activan cuando la planta es infectada por la bacteria.

El análisis de las mutantes que presentan afectaciones en elementos de la vía de señalización reveló de manera muy clara que la mutante *pflD 18-18*, desafiada con una menor carga bacteriana del patógeno avirulento (1×10^6 UFC/mL), no mostró lesión tipo HR durante todo el curso de tiempo analizado. Esto sugiere que para la ejecución de la muerte celular programada, en la inmunidad ETI, las ERO del cloroplasto tienen una importante función. Sin embargo, es importante destacar que la dosis bacteriana es determinante para esta respuesta, ya que con una carga de 1×10^8 UFC/mL sí se desarrollaron lesiones de muerte muy similares para todos los genotipos, mientras que con una dosis menor se afecta el establecimiento de la respuesta en esta mutante. En este sentido, se ha comprobado que en la interacción entre las plantas de tabaco y el patógeno no hospedero *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, la producción de ERO en el cloroplasto es esencial para el progreso de la MCP. En este estudio se determinó que la inhibición en la acumulación ERO del cloroplasto correlacionó con la supresión de la MCP, pero no se afectaron parámetros que contribuyen a la defensa, como inducción de genes de patogenicidad, producción de ácido salicílico y ácido jasmónico (Zubriggen *et al.*, 2009).

En cuanto a la mutante *mpk6*, los resultados de índice de daño al infectar con el patógeno avirulento estuvieron por debajo de la respuesta obtenida en la planta tipo silvestre, sugiriendo que hay deficiencia en el desempeño de la planta para desplegar una respuesta de defensa que lleve a la HR, por lo que la MPK6 sería un elemento que contribuye en la señalización durante la respuesta ETI. Esto está de acuerdo con el reporte de Menke *et al.* (2004) donde se comprobó que el silenciamiento de la MPK6 compromete las respuestas de defensa.

Los resultados del análisis de los índices de daño como un parámetro de evaluación de la MCP, sugieren la participación de las BCL, la MPK6 y las ERO producidas en el cloroplasto, como elementos de señalización durante la respuesta ETI inducida por la bacteria avirulenta.

Bases de cadena larga en la respuesta de enfermedad

A diferencia de lo que sucede en una interacción incompatible (entre la cepa avirulenta *Pseudomonas syringae* DC3000 (*avrRpm1*) y *Arabidopsis thaliana*), con la cepa virulenta se establece una interacción compatible o de enfermedad, también nombrada susceptibilidad desencadenada por efectores. En este caso, aunque se reconocen PAMPs y hay un despliegue de respuestas de defensa, estas son insuficientes y el establecimiento de la inmunidad PTI no es exitoso, pues las plantas presentan una eventual susceptibilidad a la infección que se manifiesta como enfermedad. Con el objetivo de evaluar si había alguna diferencia en la manifestación de

muerte celular por enfermedad en las mutantes, se realizó el mismo tipo de experimentos que los descritos anteriormente para determinar el índice de daño pero usando la cepa virulenta de *Pseudomonas syringae* DC3000.

Al comparar los valores de índice de daño de las diferentes líneas infectadas con las dos cepas bacterianas, se observó que a los 7 dpi, los genotipos WT, *mpk6* y *pflD 18-18* presentaron índices de daño menores con el patógeno virulento que con el avirulento. Esto es consistente con el hecho de que la lesión en el caso de una interacción compatible comienza más tardíamente y llega a ser de mayor intensidad a tiempos largos. Resulta muy interesante que las hojas de las plantas *lcb2a-1* no presentaron muerte del tejido cuando fueron expuestas al patógeno virulento (1×10^6 UFC/mL), esto sugiere que la disminución de BCL endógenas producida por la carencia de la subunidad LCB2a de la SPT impide la manifestación de la muerte que se produce por enfermedad en la planta ante el ataque de un organismo virulento. Por consiguiente, las BCL podrían estar implicadas también en una muerte de tipo necrótico, como se ha visto en el caso de la infección con patógenos necrótrofos como el hongo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* al infectar *Nicotiana benthamiana* (Rivas-San Vicente, 2004; Rivas-San Vicente *et al.*, 2013).

En general, se presentaron menores índices de daño en las mutantes en comparación con la silvestre después de la infección con el patógeno virulento, lo cual implica que las mutaciones en los diferentes genes repercutieron en el desarrollo de la lesión causada por el proceso de enfermedad. Lo anterior es interesante, ya que existen diferencias entre los mecanismos que se establecen para llevar a la muerte por enfermedad y a la muerte que se presenta como defensa. Por tanto, estos resultados sugieren que las BCL pueden estar involucradas en ambos procesos. En este contexto, en el reporte de Peer *et al.* (2010) se encontró que hubo acumulación de BCL al tratar a las plantas con un patógeno virulento, sin embargo esta elevación fue transitoria y a tiempos tempranos, a diferencia de lo que ocurrió con una cepa avirulenta en donde la elevación fue sostenida a lo largo de los tiempos evaluados. Esta elevación transitoria de BCL a tiempos tempranos de la interacción compatible, podría ser ocasionada por el reconocimiento de PAMPs. Al respecto, Hamdoun *et al.* (2013) reportaron que con una dosis de 1×10^6 UFC/mL los resultados de medición de marcadores de defensa, como acumulación de ácido salicílico y expresión del gen *PR1*, son muy similares entre las cepas avirulenta y virulenta. Estos datos resultan sorprendentes ya que de acuerdo a la literatura no es de esperarse tener una activación tan robusta de respuestas de defensa en una interacción de enfermedad como la del caso de inmunidad ETI. Esto es una evidencia de la importancia del reconocimiento de PAMPs, aun cuando las respuestas de defensa no sean exitosas. En el reporte de Hamdoun *et al.* (2013), las diferencias significativas entre la susceptibilidad a efectores y la activación de la inmunidad

ETI se presentan al infiltrar 1×10^7 UFC/mL, lo cual representa una cantidad de bacterias excesiva en comparación con la cantidad a la que las plantas están expuestas naturalmente.

En conclusión, la infección de las plantas con una carga bacteriana de 1×10^6 UFC/mL de las cepas avirulenta y virulenta del patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000, induce lesiones que varían en intensidad dependiendo del genotipo, lo cual implica que los elementos afectados en cada mutante son importantes para la manifestación de las respuestas, tanto de inmunidad como de enfermedad.

Comparación de la MCP inducida por FB1 y cepas avirulenta y virulenta de *Pseudomonas syringae*

Es importante hacer una comparación del progreso, la intensidad y las características de la lesión ocasionada por la FB1 y los patógenos avirulento y virulento, ya que un denominador común en los tres tratamientos es la acumulación de BCL. Si bien, durante la interacción con los patógenos puede haber muchos otros factores importantes que desencadenen la muerte del tejido vegetal, en el caso del tratamiento con FB1 se tiene la clara contribución de la acumulación de BCL que se acumulan. Primeramente, las características de la lesión varían ya que, como se puede observar en la Figura 12, la coloración de la lesión por efecto del tratamiento con FB1 es de un tono amarillento, mientras que con los patógenos la coloración es grisácea y se aprecia más como una deshidratación del tejido, aunque también aparecen zonas cloróticas principalmente alrededor de la zona de infección. Por otro lado, la progresión de la lesión es mucho más rápida en el caso de la interacción con el patógeno avirulento, lo cual concuerda con que la respuesta de HR es muy temprana (Heath, 2000). En cuanto a la temporalidad, la lesión de muerte por FB1 es más retardada que con los patógenos y a los mismos tiempos de análisis llega en general a valores menores de índice de daño que los que alcanza la infección con los patógenos con una carga de 1×10^8 UFC/mL. Sin embargo, es importante considerar que los parámetros cuantitativos son dependientes de la dosis y del tiempo de exposición.

Con el objetivo de evaluar en los genotipos en estudio si había diferencias en la producción de ERO al ser infectados con los patógenos, se realizó la tinción con DAB para la detección de H_2O_2 . Se sabe que la producción de ERO se presenta como una de las primeras respuestas de defensa ante el ataque de patógenos (Bolwell y Wojtaszek, 1997; Lamb y Dixon, 1997), lo que se conoce como explosión oxidativa. Sin embargo, esta producción de ERO (principalmente H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$) transcurre en fases dependiendo de si la interacción es compatible o incompatible y se ha ligado principalmente a las NADPH oxidasas (Torres *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006). En una primera fase, denominada transitoria, se detecta una producción de ERO rápida pero débil y pasajera. Esta fase transitoria es detectada tras la inoculación de un patógeno avirulento o uno virulento

(Torres *et al.*, 2006). Debido a que en esta fase los niveles de ERO son bajos y transitorios solamente pueden ser detectados con técnicas de alta sensibilidad. La segunda fase, llamada persistente, es considerada una característica propia y esencial de la interacción incompatible, es decir, de cuando existe el reconocimiento específico por la interacción gen-por-gen al ser inoculado un patógeno avirulento (Orlandi *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 2006). En este caso se presenta una producción masiva y prolongada de ERO la cual es detectable con la técnica de tinción histoquímica con diaminobencidina (González Solís, 2009).

En el laboratorio hemos detectado una fase que corresponde a una producción masiva de H_2O_2 , que se presenta a tiempos largos, alrededor de las 48 h después de la infiltración con los patógenos avirulento y virulento (González Solís, 2009). Por la correlación de esta respuesta con parámetros estructurales y funcionales de los cloroplastos, esto se ha interpretado como una producción masiva de ERO que sucede en este organelo celular a tiempos avanzados y que permite definir la irreversibilidad de la muerte celular programada (González Solís, 2009; Ishida y Wada, 2009, Dong y Chen, 2013). La detección de H_2O_2 posterior a la infección con el patógeno avirulento es una referencia de la producción de ERO durante una interacción incompatible. En este caso se observó que todos los genotipos presentaron la coloración indicativa del complejo DAB- H_2O_2 a las 24 h de exposición a la bacteria avirulenta, lo cual es consistente con otros reportes en donde se comprueba que el estallido oxidativo en la fase persistente es característico de la interacción de la planta con el patógeno avirulento (Lamb y Dixon, 1997; González-Solís, 2009). De igual manera, al tiempo de 72 h se detectó H_2O_2 en las hojas de todos los genotipos expuestas al patógeno avirulento, sin embargo, en este tiempo más largo las ERO corresponden a la fase de “ejecución de muerte”, que se relaciona con la irreversibilidad del proceso. Estos resultados indican que las modificaciones en relación al contenido y tipo de BCL, en el caso de las mutantes *lcb2a-1* y *sbh1-1*, y de los elementos de vías de señalización referentes a las líneas *mpk6* y *pflid 18-18*, no repercuten en la generación de ERO durante una interacción incompatible. Esto podría indicar que hay vías alternativas para la transducción de las múltiples señales producidas por la bacteria para establecer la respuesta de defensa. Así mismo, el hecho de que haya sido evidente la señal de producción de H_2O_2 en la mutante *pflid 18-18*, apoya como ya se había mencionado, que la expresión de la flavodoxina en esta mutante no abate totalmente la producción de ERO del cloroplasto y por lo tanto estas especies pueden ser detectadas con la técnica de tinción con DAB. Además, no se descartan otras fuentes de ERO, como NADPH oxidasas y mitocondria, que también han sido descritas en el establecimiento de la inmunidad ETI.

Las BCL en el control del crecimiento bacteriano en la ETI

Una estrategia para explorar de forma directa la participación de BCL en los mecanismos de inmunidad de las plantas, fue determinar el crecimiento de las cepas avirulenta y virulenta del patógeno *Pseudomonas syringae* en plántulas previamente tratadas con FB1. En este caso, se utilizó un sistema de plántulas de 3 semanas de edad crecidas en cajas de Petri, que permitió dar un tratamiento con FB1 previo a la infección por aspersion con los patógenos. El razonamiento de este experimento fue que la exposición a la toxina FB1 12 h antes de la infección, propiciaría la acumulación de BCL en diferentes proporciones en los casos de las mutantes *lcb2a-1* y *sbh1-1*, lo cual podría inducir respuestas de defensa que se manifestarían ante el desafío con las dos cepas bacterianas. Mientras que en los casos de las mutantes *mpk6* y *pfl18-18*, los niveles de BCL no deberían variar, sin embargo, las afectaciones a nivel de la cinasa MPK6 y las ERO del cloroplasto sí podrían interferir con la respuesta de inmunidad ante el ataque de las cepas avirulenta y virulenta, debido a la posición de estos componentes corriente abajo de las BCL. Según lo reportado por Stone *et al.* (2000) y Peer *et al.* (2010), se puede predecir que las BCL activarían respuestas de defensa que se traducirían en una disminución de la proliferación bacteriana dependiendo de la interacción entre los genotipos de las plantas y del patógeno.

Los resultados mostraron que efectivamente, las plantas pueden montar la inmunidad ETI al ser infectadas con el patógeno avirulento, ya que las plantas WT, *lcb2a-1*, *mpk6* y *sbh1-1*, sin exposición a la FB1, desarrollaron un crecimiento bacteriano alrededor de dos órdenes de magnitud por debajo de los niveles observados en las plantas infectadas con el patógeno virulento a las 24 h. Cabe destacar que los niveles iniciales de inoculación fueron prácticamente idénticos para todos los genotipos (Apéndice 3). Estos resultados validan que efectivamente las cepas utilizadas y el ensayo de infección con las bacterias permiten evidenciar el fenotipo expresado por los mecanismos moleculares de la inmunidad ETI, de acuerdo a lo que ya ha sido reportado anteriormente (Tao *et al.*, 2003; Bonfig *et al.*, 2006; Hamdoun *et al.*, 2013). Asimismo, estos resultados complementan el reporte de Peer *et al.* (2010), en donde se describió que la exposición al patógeno avirulento estimulaba la formación sostenida de BCL endógenas, aunque estos autores no midieron respuestas de inmunidad. En general, lo que ocurre durante la interacción con la bacteria avirulenta es una combinación de PTI y ETI, por lo que son reconocidos tanto los PAMPs por receptores membranales, como los efectores por receptores dentro de la célula (Jones y Dangl, 2006). Esto resulta en una respuesta de defensa vigorosa y sostenida que se expresó en una disminución del crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta. El único caso en el que los niveles de proliferación del patógeno avirulento fueron mayores que con el virulento fue el de la línea *pfl18-18*, lo cual pone de manifiesto que las ERO del cloroplasto son muy importantes en el establecimiento de la respuesta ETI.

El siguiente punto que es importante resaltar, es que en general no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de proliferación bacteriana de la cepa virulenta en las plántulas con el pre-tratamiento con FB1 y sus respectivos controles. En este contexto, los resultados apoyan la idea de que la acumulación de BCL por efecto de la FB1, no tiene repercusión en el crecimiento de la bacteria virulenta. Solamente el genotipo *pflD 18-18* presentó un crecimiento ligeramente menor (10 %) de la cepa virulenta en condiciones control en comparación con el tratamiento de FB1.

Lo más relevante de estos resultados es lo que ocurrió con el tratamiento con FB1 y la posterior exposición al patógeno avirulento, condición en la que presumiblemente los niveles aumentados de BCL promoverían reacciones de defensa, que llevarían a un menor crecimiento bacteriano en la planta. En esta condición, las plantas tipo silvestre y *sbh1-1* presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con FB1 y sus respectivos controles sin el tratamiento con la toxina (menor crecimiento bacteriano tras la exposición a la FB1). En las mismas condiciones en las que se realizó este experimento se han medido las BCL en plántulas WT encontrando una acumulación diferencial desde las 4 h de exposición a FB1 (González-Solís, 2009; Saucedo-García *et al.*, 2011a), así como una activación de la MPK6 dependiente de BCL a los 15 min (Saucedo-García *et al.*, 2011a). Lo anterior implica que desde tiempos tempranos la acumulación de BCL puede activar respuestas de defensa. Con el mismo razonamiento se pueden analizar los resultados de la línea *sbh1-1*, en donde se acumulan mayoritariamente especies de BCL dihidroxiladas (Chen *et al.*, 2008). Al analizar lo que ocurre con las otras mutantes vemos que, al tiempo de 24 h, las líneas *lcb2a-1*, *mpk6* y *pflD 18-18*, no muestran diferencias entre el control y el tratamiento con FB1. Sin embargo, el hecho de que la mutante *lcb2a-1* es capaz de montar una respuesta de defensa gracias a la elevación de BCL, aunque sea modesta y tardía, se refleja en la reducción del crecimiento bacteriano a tiempos más largos (48 h) (Saucedo-García *et al.*, 2011a).

Con estos resultados se puede concluir que las BCL tienen participación como moléculas señalizadoras durante la respuesta ETI.

Aunque ya se han descrito las manifestaciones de defensa que se activan tras la infección con patógenos, hasta la fecha no se conoce el mecanismo mediante el cual el reconocimiento del patógeno lleva a la acumulación de las BCL. Tomando en cuenta que hay acumulación transitoria de fitoesfingosina a tiempos cortos después de la exposición a patógenos, virulento y avirulento (Peer *et al.*, 2010), una señal podría ser el reconocimiento de PAMPs que desencadena la síntesis *de novo* de BCL. Posteriormente, la elevación sostenida podría estar relacionada con la interacción de efectores con proteínas R. Para corroborar estas hipótesis, se tendrá que dilucidar si los receptores de membrana que reconocen PAMPs pueden señalizar de alguna manera hasta

el retículo endoplásmico, en donde ocurre la síntesis *de novo* las BCL. De igual manera, se tendrá que investigar cómo se lleva a la señalización por la interacción de efectores-proteínas R. Con el estudio de la proteína RIN4 se ha logrado establecer el mecanismo mediante el cual se limita la entrada de microorganismos patógenos al modular la apertura de estomas. Este ejemplo podría dar indicios de los primeros eventos de señalización cuando se establece la respuesta ETI en relación con las BCL, ya que estas especies también están involucradas en el cierre de estomas. En ausencia de infección, se sabe que RIN4 interacciona con las proteínas de resistencia RPM1 y RPS2, regulándolas negativamente (Mackey *et al.*, 2002). Mientras que en presencia de los efectores AvrRpm1 o AvrB internalizados por la bacteria, RIN4 interacciona con dos isoformas de la ATPasa de H⁺, AHA1 y AHA2, para poder regular la apertura y cierre de estomas y con ello a limitar la entrada de los patógenos (Liu *et al.*, 2009). En este caso, la interacción proteína-proteína es fundamental para la activación de la respuesta, este mecanismo es interesante porque ya se sabe que las BCL están involucradas en el cierre de estomas, por lo que su interacción con proteínas también podría ser crítica para activar la señalización por BCL asociada a respuestas de defensa como la MCP tipo HR.

El uso de PAMPs en el estudio de la inmunidad PTI y las BCL

El estudio de la manifestación individual de las inmunidades PTI y ETI resulta muy complejo, debido a que ante la presencia de cualquier microorganismo, ya sea que eventualmente cause enfermedad o no, los mecanismos de inmunidad innata (PTI) se inducen. Si el invasor es un patógeno avirulento, adicionalmente se disparan los mecanismos más específicos de defensa que son los de la respuesta ETI. El éxito de una u otra forma de defensa depende de muchos factores como la cantidad del agente invasor, las condiciones ambientales que favorezcan su crecimiento y las condiciones mismas de la planta. Por ello, en los experimentos con la bacteria avirulenta se presenta tanto el reconocimiento de PAMPs, como la interacción específica con efectores. Ambas formas de inmunidad involucran componentes que conforman vías de señalización complejas, con algunos elementos compartidos (Henry *et al.*, 2013). Así mismo, en el caso de la bacteria virulenta, aunque los PAMPs sean detectados, los factores de virulencia internalizados (que no tienen contraparte en el hospedero) suprimen las respuestas de defensa PTI (Mudgett, 2005; Jones y Dangl, 2006). Una alternativa experimental para superar estas complicaciones, ha sido el uso de una cepa de *Pseudomonas syringae* denominada *HrcC*, con la cual se puede inducir la inmunidad PTI sin tener activada la inmunidad ETI (Guttman *et al.*, 2002). Esto se logró mediante la modificación del sistema de secreción tipo III para evitar la internalización de los efectores, por lo que con esta cepa se puede estudiar solamente la interacción de los PAMPs de la bacteria que son reconocidos por los receptores de la planta. Con

esta cepa se ha encontrado que marcadores de respuestas de defensa como la producción de ácido salicílico y la transcripción del gen *PR1*, se inducen en menor proporción en comparación de lo que ocurre con la respuesta ETI, lo cual comprueba que esta última es más robusta y por lo tanto más efectiva para controlar la infección bacteriana, además revela que ambos tipos de inmunidad comparten múltiples reacciones comunes de defensa (Hamdoun *et al.*, 2013).

Debido a que no se sabe si las BCL participan como moléculas señalizadoras durante la respuesta PTI, en este trabajo se decidió exponer a plantas de diferentes genotipos directamente a algunos PAMPs. La primera elección fue la flagelina, ya que se han descrito elementos de la vía de señalización que se activa después del reconocimiento de este PAMP por el receptor FLS2 (Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Nühse *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002) y porque ya ha sido reportado que la exposición a este PAMP induce la respuesta tipo HR (Naito *et al.*, 2007). Anteriormente, la MCP presentada en la HR era asociada exclusivamente a la inmunidad causada por efectores (ETI), sin embargo, ya se ha publicado que los tratamientos con flagelina y xilanas también generan lesiones de muerte celular (Bailey *et al.*, 1990; Naito *et al.*, 2007). Desafortunadamente, no se tuvieron resultados favorables con el tratamiento de flagelina, purificada a partir de flagelos de *Salmonella typhimurium*, tanto en el sistema de plántulas de tres semanas de edad, como en el de plantas adultas, ya que no se pudo detectar fenotípicamente la lesión de muerte celular. La comparación de las secuencias de la flagelina de *Salmonella typhimurium* utilizada y la del péptido flg22 arrojó un 77.3 % de identidad. El análisis de las secuencias resulta interesante, ya que por la falta de inducción de muerte celular, pareciera que aun cuando los PAMPs y las respuestas que desencadenan sean muy conservadas, esas pequeñas diferencias en secuencia pudieran ser críticas para el reconocimiento por los receptores membranales de las células vegetales. Sin embargo, también es importante considerar que en el reporte de Naito *et al.*, (2007), se describe que el tratamiento con flagelina genera lesiones tipo HR, mientras que con el péptido flg22 no se presenta muerte celular. De acuerdo con esto, aunque el reconocimiento del péptido de 22 aminoácidos puede inducir la vía de señalización que involucra fitohormonas, fosforilación de MAPKs e inducción de factores de transcripción, debe haber otro mecanismo que se inicie por el reconocimiento de otra secuencia presente en la flagelina pero ausente en el péptido flg22, que sea el que lleva a la progresión de muerte celular. En este sentido, en el presente trabajo, al infiltrar el péptido flg22 no se detectó muerte celular, lo cual concuerda con lo reportado (Naito *et al.*, 2007). Sin embargo, en las condiciones de exposición a la flagelina y el flg22, tampoco fue posible detectar H₂O₂ *in situ* como manifestación de una respuesta de defensa. También es posible que la generación de esta ERO no alcance los niveles necesarios para ser detectada por la técnica usada.

Como una alternativa para el análisis de los efectos por PAMPs se decidió trabajar con xilanasa. Esta es una proteína de origen fúngico elegida porque también está reportado que induce la respuesta tipo HR (Bailey *et al.*, 1990; Yano *et al.*, 1998; Ron *et al.*, 2000). En este caso sí fue posible detectar lesión de muerte celular en las hojas de plantas tipo silvestre tratadas con xilanasa, por lo cual se procedió a infiltrar hojas de todos los genotipos con el objetivo de detectar posibles diferencias.

Si bien aún no está descrita esta vía de señalización, se sabe que el receptor LeEix2 reconoce una secuencia de 5 aminoácidos de la xilanasa (Rotblat *et al.*, 2002; Bar *et al.*, 2009). Tras el reconocimiento, el receptor unido a la proteína es endocitado y se activan los elementos de señalización que llevan a la HR.

Los resultados mostraron que las plantas mutantes *sbh1-1* presentaron mayores índices de daño en comparación con las mutantes *pflD 18-18* y las plantas silvestres, lo cual sugiere la implicación de BCL dihidroxiladas, que son las prevalecientes en esta mutante, en la señalización de muerte celular por xilanasa. Sin embargo, la mutante *lcb2a-1* también presentó índices de daño por arriba de la WT, lo cual indica que aún con afectaciones a nivel de la subunidad LCB2a de la SPT, la señalización hacia la muerte se puede llevar a cabo.

En contraste, la mutante *pflD 18-18* mostró los menores índices de daño con la exposición a este PAMP, sugiriendo que las ERO del cloroplasto pueden tener una función muy importante en la respuesta de muerte celular inducida por la xilanasa. Sin embargo, en el análisis de la producción de H₂O₂, no se detectaron diferencias entre los diferentes genotipos evaluados a los tiempos de 24 y 72 hpi, por lo tanto, las diferencias en magnitud de la lesión tipo HR que presentan las diferentes líneas de Arabidopsis evaluadas con xilanasa, no está en relación a la producción de esta ERO.

Una estrategia experimental que sería fundamental para dilucidar la posible participación de las BCL en la inmunidad PTI es la medición de las especies fosforiladas y desfosforiladas de BCL en tratamientos con flagelina, flg22, xilanasa y la cepa *HrcC*.

La inducción de genes de defensa en respuesta a la acumulación de BCL y el papel de las fitohormonas en esta vía de señalización.

Se sabe que en plantas la señalización por fitohormonas es fundamental durante las respuestas de defensa contra organismos patógenos (Derksen *et al.*, 2013). Y, como ya se discutió en secciones anteriores, cada vez se cuenta con más elementos para sostener que las BCL también participan como segundos mensajeros en los mecanismos de defensa. Por esta razón, en la segunda parte de este trabajo se evaluó si hay interrelación entre las vías de señalización por fitohormonas y la vía en la que las BCL son mediadores. Para ello, se hicieron experimentos en

los que se analizó la expresión de genes marcadores de vías señalizadas por las fitohormonas AS, AJ o ET, en condiciones de acumulación de BCL por exposición a FB1. El gen ACS6 codifica para la enzima aminociclopropano carboxilato sintasa, la cual participa en la síntesis de ET, por lo tanto este gen se ha catalogado como marcador de la vía en la que participa esta fitohormona. El gen que se utilizó como marcador de la vía del AS fue *PR1*, cuyo transcrito se acumula con tratamientos que inducen la producción de esta fitohormona. Por su parte, el gen *PDF1.2* que codifica para una defensina y el gen de la β -quitinasa se han considerado marcadores de las vías de señalización del ET y el JA.

En un trabajo que se hizo con protoplastos obtenidos de diferentes líneas mutantes afectadas en elementos de vías de fitohormonas, se postuló que la vía de señalización que lleva a MCP y que es inducida por FB1 involucra a las fitohormonas AS, AJ y ET (Asai *et al.*, 2000). Sin embargo, en este reporte el único indicador que se midió fue la viabilidad de los protoplastos y no se evaluaron parámetros moleculares. Por esta razón, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si había acumulación de transcritos de genes relacionados con las vías de señalización que involucran fitohormonas, en condiciones en donde hay diferentes niveles de BCL o está afectada su señalización.

Debido a que la detección de los transcritos se realizó en el sistema de plántulas, inicialmente fue necesario evaluar los fenotipos de las diferentes líneas expuestas a la FB1, para poder ver si había una relación con la expresión de genes relacionados con defensa y la manifestación de muerte celular. En las imágenes de la Figura 24, se observa que las plántulas tipo silvestre, *pfl* 18-18 y *sbh1-1* presentaron lesiones cloróticas más exacerbadas que en los genotipos *lcb2a-1* y *mpk6*. En estas últimas mutantes sí hubo muerte celular pero más tardía, lo que indica una tolerancia a la toxina. Estos resultados confirman que el gen LCB2a es importante para el establecimiento de la respuesta de muerte y que la MPK6 está involucrada en la señalización mediada por BCL (Saucedo-García *et al.*, 2011a). En este mismo sentido, en la mutante *sbh1-1* la manifestación de la muerte celular fue más exacerbada, lo cual se relaciona con la acumulación de especies esfingoideas dihidroxiladas (Chen *et al.*, 2008). Estos resultados son consistentes con los fenotipos en plantas adultas, la excepción fue la mutante *mpk6*, la cual registró índices de daño por arriba de la planta tipo silvestre en plantas adultas, mientras que en plántulas la manifestación de muerte fue atenuada.

En cuanto a la evaluación de la expresión de genes relacionados con defensa, en la línea tipo silvestre a las 24 h de tratamiento con FB1, se indujo la acumulación de los transcritos de los genes ACS6, PDF1.2 y PR1. Lo anterior coincide con resultados previos en donde también se ha visto la activación de genes de defensa en respuesta al tratamiento con FB1 o directamente con la exposición a BCL (Stone *et al.*, 2000; Lachaud *et al.*, 2011). Para estos tres genes la

exposición por 12 h a la toxina no tuvo efectos en la acumulación de transcritos con respecto a sus respectivos controles, lo cual indica la temporalidad para la transducción de señales por BCL en este sistema biológico. Por lo tanto, en la línea silvestre se determinó que la exposición a la FB1 indujo la acumulación de transcrito de genes relacionados con las vías del AS, ET y AJ.

En el caso de la mutante *lcb2a-1*, en ninguno de los dos tiempos analizados con exposición a la FB1, se observó una tendencia de acumulación de los transcritos de los genes de defensa evaluados, con respecto a los controles. Sin embargo, en comparación con las otras mutantes, la línea *lcb2a-1* presentó niveles más altos de los transcritos de los genes *ACS6*, *BCHI* y *PR1* aun en condiciones control. Esto es interesante, pues sugiere una relación entre la activación de respuestas de defensa y la modificación genética a nivel de la SPT (que en esta mutante que, sólo expresa a la subunidad LCB2b, únicamente forma el dímero LCB1/LCB2b de la SPT). En reportes anteriores ya se ha encontrado una relación entre la sobreexpresión de la subunidad LCB2 de la SPT de Nicotiana y la activación de respuestas de defensa, si bien en ese trabajo no pudieron detectarse cambios en los niveles endógenos de BCL (Takahashi *et al.*, 2009). Por lo tanto, en la mutante *lcb2a-1*, la ausencia de la subunidad LCB2a podría producir una compensación a través de la sobre expresión del gen *LCB2b*, lo cual puede explicar el aumento basal de transcritos de genes de defensa aun en ausencia de FB1. El aumento en la acumulación de transcritos de genes de defensa sugiere que la planta intenta montar una respuesta más efectiva ante el ataque de un patógeno, lo cual no se refleja en los datos de crecimiento bacteriano, en donde con el pre-tratamiento con FB1, la disminución en el crecimiento bacteriano se logra a tiempos más tardíos en comparación con las plántulas silvestres.

En la mutante *sbh1-1*, en donde el tratamiento con FB1 induce una acumulación preferente de BCL dihidroxiladas, no hubo una tendencia clara de aumento de transcritos de los genes evaluados en las condiciones de tratamiento con FB1, en comparación con los controles. Estos resultados sugieren que las especies de BCL trihidroxiladas, que están en menores niveles en esta línea, tienen una importante función en la señalización para activar genes relacionados con defensa.

El análisis de los resultados que se obtuvieron para la mutante *mpk6* indica que a las 12 h de tratamiento con FB1 hubo incremento en los niveles de transcrito del gen *ACS6*. Por lo tanto, aun en ausencia de la MPK6, hay otros elementos de señalización que regulan la transcripción de este gen relacionado con la vía de síntesis del etileno. En este contexto, se sabe que la regulación que involucra MPK6 y la vía de síntesis del etileno se da a nivel post-transcripcional, con la fosforilación de las isoformas *ACS2* y *ACS6*, por las cinasas MPK6 y CDPK. La fosforilación estabiliza e incrementa la actividad de estas enzimas y por lo tanto causa una mayor producción de etileno (Lui y Zhang, 2004). En este caso, en esta mutante que carece de la cinasa

está afectada la regulación a nivel de la fosforilación de las proteínas ACS6 y ACS2, así el incremento en la acumulación de transcrito del gen *ACS6* puede ser una manera de compensar la falta de activación de la enzima con una mayor cantidad de proteína.

En la mutante *pfl1 18-18* tampoco hubo diferencias en la expresión de los genes en relación al tratamiento con FB1, lo cual podría indicar que las alteraciones a nivel del cloroplasto por la expresión de la flavodoxina pueden repercutir en la comunicación con el núcleo para activar genes de defensa. Este resultado sugiere que la participación de las ERO del cloroplasto tienen una función ejecutora y no señalizadora de la muerte celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el gen *PDF1.2*, marcador de las vías de ET y del JA, hubo mayores niveles de transcrito con la exposición por 24 h a FB1 en las plántulas tipo silvestre, mientras que en el resto de las mutantes no se detectó la expresión de este gen con el tratamiento con la toxina. Esto sugiere comunicación de las vías de señalización por BCL y por las fitohormonas ET/JA; sin embargo, no ocurrió lo mismo con el otro gen marcador de estas vías. En relación con estos resultados, hay evidencias en el sistema de *Nicotiana* que comprueban que para la muerte celular causada por otra micotoxina, la AAL producida por el hongo *Alternaria alternata*, es necesaria la señalización por etileno y por las MAP cinasas MEK2-SIPK-WIPK (Mase *et al.*, 2013). Así mismo, en este trabajo se demostró que las mutantes de *Arabidopsis* *etr-1* y *ein3*, afectadas en la vía de síntesis del etileno, presentan reducción de la muerte celular causada por FB1 (Mase *et al.*, 2013), lo que refuerza la relación entre la vía de señalización en la que participa el etileno con las BCL.

Modelo

A partir de los resultados de este trabajo, apoyados de otras evidencias de la literatura planteamos el siguiente modelo. Hay evidencias que sustentan la idea de que las BCL son moléculas de señalización que se encuentran corriente arriba de otros elementos que pueden bifurcar la señal del estímulo inicial hacia dos destinos diferentes, pero ambos relacionados con la defensa contra patógenos (Lachaud *et al.*, 2010). Un primer escenario se relaciona con altos niveles de Ca^{2+} en el citosol, que desencadenan respuestas de defensa, como producción de ERO de NADPH oxidasas, activación de genes relacionados con defensa, fortificación de la pared celular, producción de compuestos antimicrobianos, etc. Mientras que el segundo escenario es la activación de la programación para muerte celular que se ha relacionado con los siguientes eventos, entre los que aún no está establecida una relación: elevación de niveles de Ca^{2+} en el núcleo, regulación por una proteína 14-3-3 y la cinasa CPK3 (Lachaud *et al.*, 2012; Thuleau *et al.*, 2013), activación de la enzima de procesamiento vacuolar (γ VPE) (Kuroyanagui *et al.*, 2005) y la producción de ERO del cloroplasto (Figura 33A). En este sentido, la muerte celular como respuesta de defensa no es totalmente necesaria, sino más bien representa un último recurso para evitar la proliferación del patógeno. Una evidencia que sustenta estos dos escenarios es la mutante *dnd1* (*defense no death*) en la cual está afectado un canal de calcio. En esta mutante durante la interacción incompatible con la bacteria *Pseudomonas syringae avrRpt2-RPS2* no se presenta MCP tipo HR, sin embargo sí se despliegan mecanismos de defensa como la inducción de genes relacionados con patogenicidad y se logra limitar el crecimiento del patógeno (Clough *et al.*, 2000).

Por otro lado durante la interacción compatible, es decir, cuando hay susceptibilidad a la enfermedad, la elevación transitoria de BCL es ocasionada por el reconocimiento inicial de PAMPs, aunque finalmente las respuestas de defensa no sean exitosas (Figura 33B). En este escenario, la muerte celular que se produce también podría estar mediada por procesos similares a los que tienen lugar durante la interacción incompatible, pero con temporalidad y regulación diferentes.

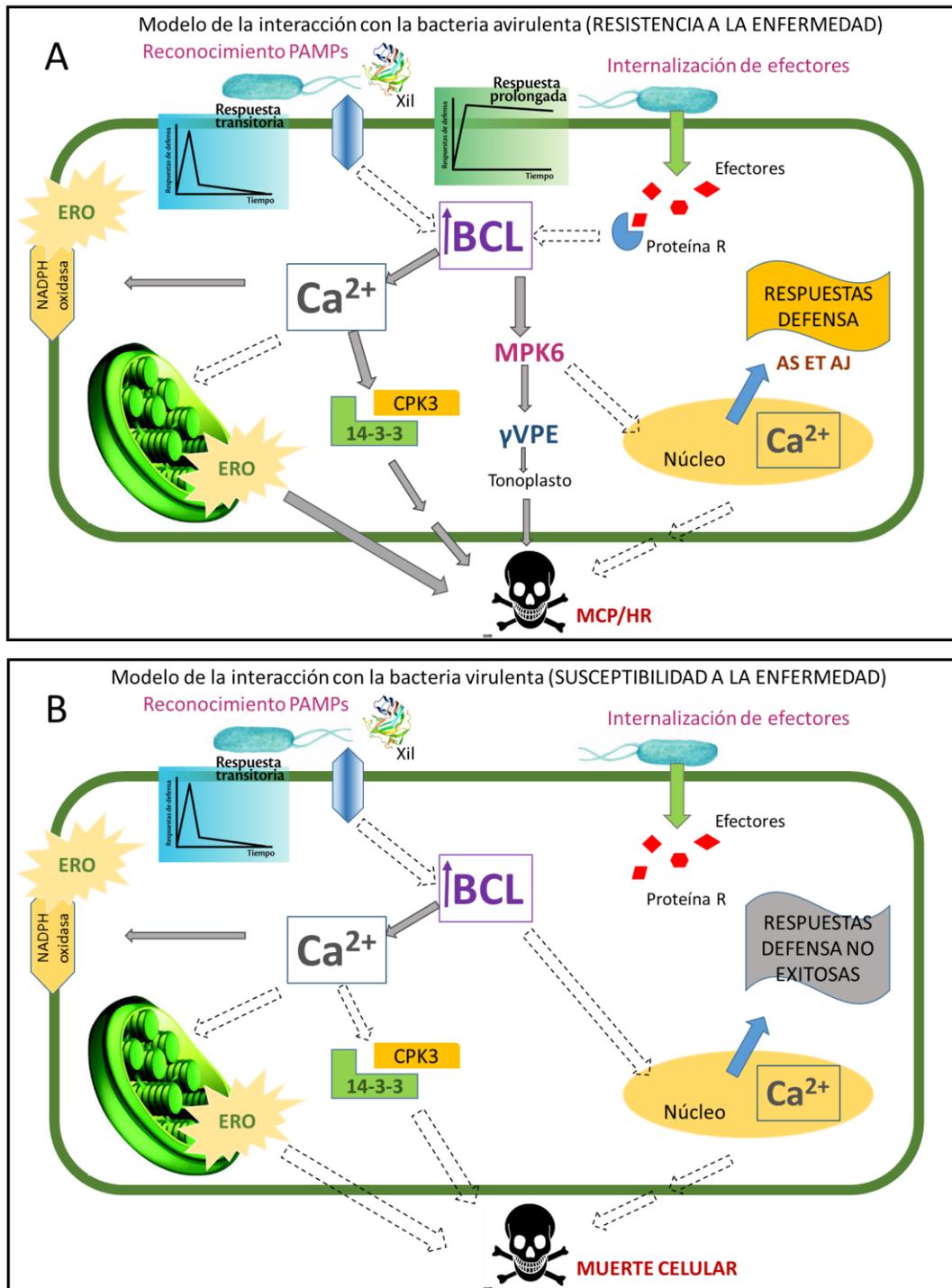


Figura 33. Modelos de la participación de BCL en mecanismos de inmunidad. A) Participación de las BCL en la inmunidad mediada por efectores (ETI). B) Participación de las BCL en la inmunidad desencadenada por PAMPs y en la susceptibilidad por efectores. BCL, bases de cadena larga; CPK3, cinasa dependiente de calcio; 14-3-3, proteína regulatoria; ERO, especies reactivas de oxígeno; γ VPE enzima de procesamiento vacuolar; MCP/HR, muerte celular programada tipo HR; AS, ácido salicílico; AJ, ácido jasmónico; ET, etileno; Xil, xilanasa. \dashrightarrow Sugiere la interacción entre los elementos señalizadores. \longrightarrow Evidencias de la interacción entre los elementos señalizadores.

CONCLUSIONES

- ❖ Las BCL participan en las en las reacciones típicas de resistencia a la enfermedad (ETI) y en reacciones de susceptibilidad a efectores (ETS).
- ❖ Las BCL podrían participar en la vía de señalización que se presenta tras el reconocimiento del PAMP xilanasa en células vegetales.
- ❖ Las BCL, la MPK6 y las ERO producidas en el cloroplasto son elementos de la señalización que desencadena la MCP que se presenta en la respuesta ETI inducida por la bacteria avirulenta.
- ❖ La producción de altos niveles de ERO está asociada a una etapa avanzada de la MCP.
- ❖ La acumulación de BCL induce la expresión de genes de defensa relacionados con las vías del ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico.

Conclusión general

Las BCL contribuyen a los mecanismos de inmunidad en células vegetales de manera diferencial: en la ETI permiten una respuesta eficiente y sostenida y en la PTI, una respuesta transitoria.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se abordó el tema de la participación de las BCL en los tipos de inmunidad ETI y PTI, las siguientes estrategias experimentales podrían dar más evidencias para complementar los resultados obtenidos.

- ❖ Evaluar la participación de las BCL en la inmunidad PTI utilizando la cepa de *Pseudomonas syringae HrcC* que permite inducir inmunidad innata sin que se active la inmunidad ETI.
- ❖ Purificar flagelina de *Pseudomonas syringae* e infiltrarla en hojas de plantas de los diferentes genotipos para evaluar la manifestación de muerte celular como una respuesta de defensa.
- ❖ Cuantificar las especies fosforiladas y desfosforiladas de BCL a diferentes tiempos después de tratamientos con flagelina, flg22, xilanasa y con la cepa *HrcC*, con el objetivo de proponer BCL específicas que participen en la señalización de la respuesta PTI.
- ❖ Verificar en la mutante *dnd1 (defense no death)* la bifurcación de vías de señalización en donde participan las BCL. Evaluar en esta mutante la producción de ERO y la activación de MPK6.
- ❖ Detectar H₂O₂ con diaminobencidina en hojas de plantas de diferentes genotipos infectadas con el patógeno avirulento (1 x 10⁸ UFC/mL) y con la infección por los patógenos avirulento y virulento (1 x 10⁶ UFC/mL). Con el objetivo de explorar la temporalidad de producción de ERO en las reacciones de virulencia en comparación con las reacciones de defensa que se presentan tras la exposición a la bacteria avirulenta.
- ❖ Determinar la localización subcelular de ERO (H₂O₂) en respuesta a la exposición con FB1 y los patógenos avirulento y virulento.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH Jr, Riley RT. (1994) Fumonisin and AAL toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology*, 106:1085-1093.
- Agrios G. *Plant Pathology*. 4^o Ed. Academic Press (1997) New York, EU. pp.103.
- Allen RD. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* 107:1049–1054.
- An C y Mou Z. (2011) Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53:412-428.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC. (1980) Comparison of three pathogenesis related proteins from plants. *The Journal of General Virology*, 47:79-87.
- Asai T, Stone JM, Heard, JE, Kovtun, Y, Yorgey, P, Sheen, J, Ausubel, FM. (2000) Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate, ethylene and salicylate dependent signaling pathways. *The Plant Cell*, 12:1823-1835.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gómez-Gómez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. (2002) MAP kinase signaling cascade in innate immunity. *Nature*, 415:977-983.
- Bailey BA, Dean JFD, Anderson JD. (1990) An ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase elicits electrolyte leakage and necrosis in *Nicotiana tabacum* cv Xanthi leaves. *Plant Physiology*, 94:1849-1854.
- Bailey BA, Korcak RF, Anderson JD. (1992) Alteration in *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi cell membrane integrity following treatment with ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase. *Plant Physiology*, 100:749-755.
- Bailey BA, Taylor R, Dean JFD, Anderson JD. (1991) Ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase is translocated through the xylem of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi Plants. *Plant Physiology*, 97:1181-1186.
- Bar M, Sharfman M, Schuster S, Avni A. (2009) The coiled-coil domain of EHD2 mediates inhibition of LeEix2 endocytosis and signaling. *PLOS ONE*, 4(11): e7973. doi:10.1371/journal.pone.0007973.
- Bar M y Avni A. (2009) EHD2 inhibits signaling of leucine rich repeat receptor-like proteins. *Plant Signaling and Behavior*, 4:682-684.
- Bari R y Jones JDG. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69:473-488.
- Bent AF. (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell*, 8:1757-1771.
- Bittel P y Robatzek S. (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:335-341.

- Boller T y He SY. (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324:742-744.
- Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK, Murphy TM. (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology*, 116:1379-1385.
- Bolwell GP y Wojtaszek, P. (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense- a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51:347-366.
- Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S. (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differential affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*, 225:1-12.
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiology*, 137:104-116.
- Bradley DJ, Kjellbom, Lamb CJ. (1992) Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70:21-30.
- Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nelson WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q, Khouri H, Fedorova N, Tran B, Russell D, Berry K, Utterback T, Van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng WL, Ramos AR, Alfano JR, Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Schneider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM, Collmer A. (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:10181-10186.
- Büttner D y Yang-He S. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, 150:1656-1664.
- Cardinale F, Jonak C, Ligterink W, Niehaus K, Boller T, Hirt H. (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:36734-36740.
- Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM, Cahoon EB. (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the identification and functional characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *The Plant Cell*, 18:3576-3593.
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworsky JG, Cahoon EB. (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20:1862-1878.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124:803-814.

- Clough SJ, Fengler KA, Yu I, Lippok B, Smith RK, Bent AF. (2000) The Arabidopsis *dnd1* “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:9323–9328.
- Coronel Román D. (2011) Especies reactivas de oxígeno del cloroplasto en la defensa contra patógenos mediada por bases esfingoideas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM. (2003) Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, 423:651-654.
- Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S. (2005) Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiology*, 137:724-737.
- Da Cunha L, McFall AJ, Mackey D. (2006) Innate immunity in plants, a continuum of layered defenses. *Microbes and Infection*, 8:1372-1381.
- Da Silva D, Lachaud C, Cotelle V, Brière C, Grat S, Mazars C, Thuleau P. (2011) Nitric oxide production is not required for dihydrosphingosine-induced cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling and Behavior*, 6:736-739.
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, 8:1793-1807.
- Dangl J y Jones JDG. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411:826-833.
- Dean JFD y Anderson JD. (1991) The ethylene biosynthesis-induced xylanase II. Purification and physical characterization of the enzyme produced by *Trichoderma viride*. *Plant Physiology*, 95:316-323.
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J. (2008) Activation of defense response pathways by OGs and flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant*, 1:423-445.
- Derksen H, Rampitsch C, Daayf F. (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science*, 207:79– 87.
- Desai K, Sulluads MC, Allegood J, Wang E, Schmelz EM, Hartl M, Humpf HU, Liotta DC, Peng Q, Merrill AH. (2002) Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585:188-192.
- Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM, Cahoon EB. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal*, 54:284-298.
- Dong X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:547-552.

- Dong J y Chen W. (2013) The role of autophagy in chloroplast degradation and chlorophagy in immune defenses during *Pst DC3000 (AVrRps4)* Infection. *PLoS ONE*, 8(8):e73091. doi:10.1371/journal.pone.0073091.
- Dunn TM, Lynch DV, Michaelson LV, Napier JA. (2004) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 93:483-497.
- Dutilleul C., Benhassaine-Kesri G, Demandre C, Rézé N., Launay A, Pelletier S, Renou JP, Zachowski A, Baudouin E, Guillas I. (2012) Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytologist*, 194:181-91.
- Edevra A. (2005) Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*, 31:105-124.
- Edwards K, Johnstone C, Thomson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 25:1349.
- Egorov TA y Odintsova TI. (2012) Defense peptides of plant immunity. *Russian Journal of Biorganic Chemistry*, 38:1-9.
- Enkerli J, Felix G, Boller T. (1999) The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiology*, 121:391-398.
- Felix G, Duran J, Volko S, Boller T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18:265-276.
- Flor HH. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9:275-296.
- Fuchs Y, Saxena A, Gamble HR, Anderson JD. (1989) Ethylene biosynthesis-inducing protein from Cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiology*, 89:138-143.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261:754-756.
- García-Pineda E y Lozoya-Gloria E. (2004). Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22:414-422.
- Gechev TS y Hille J. (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *The Journal of Cell Biology*, 168:17-20.
- Gilchrist DG. (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology*, 36:393-414.
- Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 45:205-227.
- Gómez-Gómez L y Boller T. (2000) FLS2: An LRR receptor like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 5:1003-1011.

- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 18:277–284.
- González Solís A. (2009) La generación de H₂O₂ en la respuesta de hipersensibilidad mediada por las bases de cadena larga en *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Greenberg JT. (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:12094-12097.
- Greenberg JT. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:525-545.
- Greenberg JT y Yao N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6:201-211.
- Guttman DS, Vinatzer BA, Sarkar SF, Ranall MV, Kettler G, Greenberg JT. (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science*, 295: 1722-1726.
- Hamdoun S, Liu Z, Gill M, Yao N, Lu H. (2013) Dynamics of defense responses and cell fate change during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interactions. *PLoS ONE* 8(12):e83219. doi:10.1371/journal.pone.0083219.
- Hammond-Kosack K y Jones J. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8:1773-1791.
- Hanada K. (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipids metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1632:16-30.
- Hannun YA y Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9:139-150.
- Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44:321–334.
- Henry E, Yadeta KA, Coaker G. (2013) Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytologist*, 199:908–915.
- Hueck CJ. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:379-433.
- Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K. (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:36969-36976.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B, Morris P, Innes R, Ecker J, Schell D, Klessig D, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker J. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7:301-308.
- Ishida H y Wada S. (2009) Autophagy of whole and partial chloroplasts in individually darkened leaves. *Plant Physiology*, 149:885-893.

- Jones AME, Thomas V, Bennet MH, Mansfield J, Grant M. (2006) Modifications to the Arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, 142:1603-1620.
- Jones JDG y Dangl JL. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444:323-329.
- Kaffarnik FAR, Jones AME, Rathjen JP, Peck SC. (2009) Effector proteins of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* alter the extracellular proteome of the host plant, *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8:145-156.
- Karlsson KA. (1970) On the chemistry and occurrence of sphingolipid long chain bases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 5:6-43.
- Kim MG, Kim SY, Kim WY, Mackey D, Lee SY (2008). Responses of *Arabidopsis thaliana* to challenge by *Pseudomonas syringae*. *Molecules and Cells*, 25:323-331.
- Kim C, Meskauskiene R, Zhang S, Lee KP, Ashok ML, Blajicka K, Herrfurth C, Feussner I, Apel K. (2012) Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *The Plant Cell*, 24:3026-3039.
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:32914-32920.
- Lachaud C, Da Silva D, Amelot N, Béziat C, Brière C, Cotelle V, Graziana A, Grat S, Mazars C, Thuleau P. (2011) Dihydro-sphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Molecular Plant*, 4:310-318.
- Lachaud C, Da Silva D, Cotelle V, Thuleau P, Xiong TC, Jauneau A, Brière C, Graziana A, Bellec Y, Faure JD, Ranjeva R, Mazars C. (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium*, 47:92-100.
- Lachaud C, Prigent E, Thuleau P, Grat S, Da Silva D, Briere C, Mazars C, Cotelle V (2012) 14-3-3 regulated Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in Arabidopsis. *Cell Death and Differentiation*, 20:209-17.
- Lamb C y Dixon R. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:251-275.
- Lay FT y Anderson MA. (2005) Defensins- Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6:85-101.
- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G. (2009) RIN4 Functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol* 7(6): e1000139. doi:10.1371/journal.pbio.1000139.
- Liu Y y Zhang S. (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis *The Plant Cell*, 16:3386–3399.

- Love AJ, Milner JJ, Sadanandom A. (2008) Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends in Plant Science*, 13:589-595.
- Lozano Rosas MG. (2010) Crecimiento bacteriano en mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteración en la síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Lu S, Faris JD, Sherwood R, Edwards MC. (2012) Dimerization and protease resistance: new insight into the function of PR-1. *Journal of Plant Physiology*, 170:105-110.
- Lynch D y Dunn T. (2004) An Introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist*, 161:677-702.
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* 108: 743–754.
- Manners JM, Penninckx IAMA, Vermaere K, Kazan K, Brown RL, Morgan A, Maclean DJ, Curtis MD, Cammue BPA, Broekaert WF. (1998) The promoter of plant defensin gene *PDF1.2* from Arabidopsis is systemically activated by fungal pathogens and jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Molecular Biology*, 38:1071-1080.
- Markham J y Jaworski J. (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21:1304-1314.
- Markham J, Li J, Cahoon E, Jaworski J. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:22684-22694.
- Mase K, Mizuno T, Ishihama N, Fujii T, Mori H, Kodama M, Yoshioka H. (2012) Ethylene signaling pathway and MAPK cascades are required for AAL toxin-induced programmed cell death. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 25:1015-1025.
- Mase K, Ishihama N, Mori H, Takahashi H, Kaminaka H, Kodama M, Yoshioka H. (2013) Ethylene-responsive AP2/ERF Transcription factor MACD1 participates in phytotoxin-triggered programmed cell death. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 26:868-879.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. (1998) Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiology*, 88:936-942.
- Mazars C, Thuleau P, Lamotte O, Bourque S. (2010) Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Molecular Plant*, 4:706-718.
- Menke FLH, van Pelt JA, Pieterse CMJ, Klessig DF. (2004) Silencing the mitogen activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16:897-907.
- Merrill A, Liotta D, Riley R. (1996) Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends in Cell Biology*, 6:218-223.
- Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K. (1997) Environmental stress response in plants: The role of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Biotechnology*, 15:15-19.

- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R., Bessoule JJ. (2004) Lipid rafts in higher plant cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:36277-36286.
- Morel JB y Dangl JL. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*, 4:671-683.
- Mudgett MB. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56:509-531. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144218.
- Mur LA y Kenton P. (2006) The outcomes of concentration specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140:249-262.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. (2008) The hypersensitive response; a centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59:501-520.
- Naito K, Ishiga K, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. (2007) N-terminal domain including conserved flg22 is required for flagellin-induced hypersensitive cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 73:281-285. DOI:10.1007/s10327-007-0017-9.
- Newman MA, Dow JM, Molinaro A, Parrilli M. (2007) Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research*, 13:69-84.
- Ng C, Carr K, McAinsh M, Powell, B, Hetherington, A. (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410:596-599.
- Nicaise V, Roux M, Zipfel C. (2009) Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology*, 150:1638-1647.
- Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Möisinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 108:17-27.
- Nomura H, Komori T, Uemura S, Kanda Y, Shimotani K, Nakai K, Furuichi T, Takebayashi K, Sugimoto T, Sano S, Suwastika N, Fukusaki E, Yoshioka H, Nakahira Y, Shiina T. (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signaling in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 3:926. DOI:10.1038/ncomms1926.
- Nühse TS, Peck SC, Hirt H, Boller T. (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MPK6. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:7521-7526.
- Odjakova M y Hadjiivanova C. (2001) The complexity of pathogen defense in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27:101-109.

- Orlandi EW, Hutcheson SW, Baker CJ. (1992) Early responses associate with race-specific recognition in soybean leaf tissue and cell suspensions treated with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40:173-180.
- Palacios Bahena S. (2008) Participación de esfingolípidos membranales en respuestas de defensa en plantas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D. (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for systemic acquired resistance. *Science*, 318:113-116.
- Pata MO, Hannun YA, Ng CKL. (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytologist*, 185:611-630.
- Peer M, Stegmann M, Mueller MJ, Waller F. (2010) *Pseudomonas syringae* infection triggers *de novo* synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 584:4053-4056.
- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF. (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10:2103-2113.
- Pietersé CMJ, León-Reyes A, Van der Ent S, Van Wess SCM. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature*, 5:308-316.
- Postel S y Kemmerling B. (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20:1025-1031.
- Reape T, Molony M, McCabe P. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany*, 59:435-444.
- Rivas San-Vicente M. (2004) Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Rivas-San Vicente M, Larios-Zarate G, Plasencia J. (2013) Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Planta*, 237:121-136.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49:317-343.
- Rodríguez Mejía P. (2006) Relación entre la actividad de la NADPH oxidasa, compuestos esfingoideos y respuesta a patógenos en células vegetales. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Rogers EE y Ausubel F. (1997) *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in *PR-1* gene expression. *The Plant Cell*, 9:305-316.

- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H, Jones JDG. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *The Plant Cell*, 11:273–287.
- Ron M y Avni A. (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene inducing xylanase is a member of a resistance like gene family in tomato. *The Plant Cell*, 16:1604-1615.
- Ron R, Kantety R, Martin GB, Avidan N, Eshed Y, Zamir D, Avni A. (2000) High-resolution linkage analysis and physical characterization of the EIX responding locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:184-189.
- Rotblat B, Enshell-Seiffers D, Gershoni J.M, Schuster S, Avni A. (2002) Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *The Plant Journal*, 32:1049-1055.
- Sánchez-Rangel D y Plasencia J. (2010) The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Reviews*, 29:73-86.
- Saucedo García, M. (2007) Activación de MAPKs inducidas por bases de cadena larga en una especie mono y una dicotiledónea. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Saucedo García M. (2011) La muerte celular programada de Arabidopsis inducida por la FB1 requiere de la acumulación de bases de cadena larga y de la señalización mediada por MPK6. Tesis de Doctorado, UNAM.
- Saucedo-García M, Guevara-García A, González-Solís A, Cruz-García F, Vázquez-Santana S, J Markham JE, Lozano-Rosas MG, Dietrich C, Ramos-Vega M, Cahoon EB, Gavilanes-Ruiz M. (2011) MPK6, esfinganine and the *LCB2a* gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in Arabidopsis. *New Phytologist*, 191:943–957.
- Saucedo-García M, González-Solís A, Rodríguez-Mejía P, Olivera-Flores TJ, Vázquez-Santana S, Cahoon EB, Gavilanes-Ruiz M. (2011) Reactive oxygen species as transducers of sphinganine mediated cell death pathway. *Plant Signaling & Behavior*, 6:1616-1619.
- Saucedo-García M y Gavilanes-Ruiz M. (2005) Las MAP cinasas: elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Educación Bioquímica*, 24:4-11.
- Schechter LM, Roberts KA, Jamir Y, Alfano JR, Collmer A. (2004) *Pseudomonas syringae* Type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *Journal of Bacteriology*, 186:543-555.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. (2008) Pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:941-950.
- Serrano M, Robotzek S, Torres M, Kombrink E, Somssich IE, Robinson M, Schulze-Lefert P. (2007) Chemical interference of pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses in Arabidopsis reveals a potential role for fatty-acid synthase type II complex-derived lipid signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 282:6803–6811.

- Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Gupta VK. (2011) Role of chitinases in plant defense. *Asian Journal of Biochemistry*, 6:29-37.
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun Y, Zuo J. (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 17:1030-1040.
- Smirnoff N. (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Oxford, UK. pp.197-200.
- Sperling P y Heinz E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1632:1-15.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Van Loon KKLC, Dong X, Pieterse CMJ (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15:760-770.
- Stone J, Heard J, Asai T, Ausubel F. (2000) Stimulation of fungal mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *The Plant Cell*, 12:1811-1822.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F. (2003) Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*, 15:317-330.
- Talbot NJ y Kershaw M. (2009) The emerging role of autophagy in plant pathogen attack and host defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:1-7.
- Tamura K, Mitsuhashi N, Nishimura I, Imai H. (2001) Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant Cell Physiology*, 42:1274-1281.
- Takahashi Y, Berberich T, Kanzani H, Matsumura H, Saitoh H, Kusano T, Terauchi R. (2009) Serine palmitoyltransferase, the first enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in non-host resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22:31-38.
- Takken FLW y Goverse A. (2012) How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:1-10.
- Tapia de Aquino CR. (2012) Cuantificación y efecto en la ultraestructura del cloroplasto de especies reactivas de oxígeno inducidas por un aumento de bases esfingoides en plantas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Thevissen K, Ferket K, Francois I, Cammue B. (2003) Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, 24:1705-1712.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge D. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11:1187-1194.

- Thuleau P, Aldon D, Cotelle V, Brière C, Ranty B, JP Galaud, Mazars C. (2013) Relationships between calcium and sphingolipid-dependent signalling pathways during the early steps of plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833:1590–1594.
- Tognetti VB, Palatnik JF, Fillat MF, Melzer M, Mohammad-Reza H, Valle EM y Carrillo N. (2006) Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance. *The Plant Cell*, 18:2035–2050.
- Torres MA, Dangl JL, Jones J. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:517-522.
- Torres MA, Jones J, Dangl JL. (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Natural Genetics*, 37:1130-1134.
- Torres MA, Jones J, Dangl JL. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141:373-378.
- Torres MA. (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138:414-429.
- Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, Katagiri F. (2009) Network properties of robust immunity in plants. *PLOS Genetics*, 5:e1000772.
- Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, Inze D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161:405-414.
- Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11:184-191.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH. (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266:14486-14490.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414:562-565.
- Wit PJGM. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64:2726-2732.
- Xing F, Li Z, Sun A, Xing D. (2013) Reactive oxygen species promote chloroplast dysfunction and salicylic acid accumulation in fumonisin B1-induced cell death. *FEBS Letters*, 587:2164–2172.
- Yang CH, Gavilanes-Ruiz, Okinaka Y, Vedel R, Berthuy I, Boccara M, Chen JW, Perna NT, Keen NT. (2002) *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 15:472-80.
- Yano A, Suzuki K, Uchimiya H, Shinshi H. (1998) Induction of hypersensitive cell death by fungal protein in cultures of tobacco cells. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 11:115-123.
- Zimmermann, S, Nurnberger, T, Frachisse, JM, Wirtz, W, Guern, J, Hedrich, R, Sheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen

- defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:2751–2755.
- Zhang S y Klessig DF. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6:520-527.
- Zhang S, Liu Y, Klessig DF. (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *The Plant Journal*, 23:39-347.
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou JM. (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP/induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*, 1:175-185.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T. (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, 428:764-767.
- Zurbriggen MD, Carrillo N, Hajirezaei MR. (2010) ROS signaling in the hypersensitive response: When, where and what for? *Plant Signaling & Behavior*, 5:393-396.
- Zurbriggen MD, Carrillo N, Tognetti VB, Melzer M, Peisker M, Hause B, Hajirezaei MR. (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *The Plant Journal*, 60:962–973.
- Zurbriggen MD, Tognetti VB, Carrillo N. (2007) Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms. The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 59:355-60.

APÉNDICE 1. Materiales y métodos adicionales

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los productos de las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2 % preparado con amortiguador TBE 1X y bromuro de etidio (0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El DNA se visualizó en el gel en un transiluminador, la banda correspondiente al amplicón se cortó y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente pesado. El peso de la porción de gel cortada se obtuvo por diferencia y se procedió a la purificación con el “Zymoclean DNA Recovery Kit” (Zymo Research D4001). A la porción del gel de agarosa conteniendo la banda de interés se le adicionaron 3 volúmenes de buffer ADB por cada volumen de agarosa. La mezcla se incubó a 55 °C hasta que la agarosa se fundió. Se transfirió la solución resultante a una columna Zymo-Spin acoplada en un tubo colector. Se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm. La solución del tubo colector se decantó y se volvió a colocar la columna. Se añadieron 200 μL de Wash Buffer y se centrifugó a 8 000 rpm por 30 s. El lavado se realizó por duplicado. Una vez concluido el lavado, la columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 10 μL de agua estéril a la columna y se incubó por un min. Por último se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min para recuperar el DNA. La muestra se almacenó a -20 °C.

Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

La cepa de *E. coli* DH5 α se inoculó por asada en 10 mL de caldo Luria (LB) en un matraz de 125 mL y se incubó a 37 °C con agitación (250 rpm) durante toda la noche. De este cultivo se tomaron 2 mL para inocular 200 mL de caldo LB en un matraz de 1 L que se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta una densidad óptica de 0.37 a 590 nm. El cultivo se transfirió a 4 tubos Falcon de 50 mL estériles que se mantuvieron en hielo durante 5-10 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3 000 rpm a 4 °C durante 7 min.

El botón celular se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl₂ fría (CaCl₂ 10 mM/Glicerol 15 %) y se centrifugó a 3 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Los botones resultantes se suspendieron en 10 mL de solución de CaCl₂ fría. El contenido de los tubos se transfirió a un solo tubo Falcon y se dejó reposar en hielo durante 30 min. Después se centrifugó a 3 000 rpm por 7 min a 4 °C.

Finalmente, el botón celular se resuspendió en 2.5 mL de solución de CaCl₂ fría y se distribuyó en alícuotas de 100 μL en tubos Eppendorf de 1.5 mL que se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Reacciones de ligación

La clonación de los fragmentos de DNA amplificados se llevó a cabo en el vector pGEM-T Easy Vector (Promega). Para la reacción de ligación se colocaron en un tubo eppendorf de 0.5 mL: 50 ng del vector (1 μ L), 150 ng del producto de PCR, 5 μ L de 2X Rapid Ligation Buffer, 3U/ μ l de T4 DNA ligasa (1 μ L). La mezcla anterior se llevó a un volumen final de 10 μ l, se agitó moderadamente y se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Transformación de las células competentes de *E.coli* por choque térmico.

Se agregaron 5 μ L de las reacciones de ligación a 50 μ L de células competentes en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril que se mantuvo en hielo durante 20 min. El choque térmico se realizó incubando el tubo a 42 °C durante 45 s en un heat-block. Una vez transcurrido este tiempo, se colocó el tubo en hielo durante 2 min. Se añadieron 500 μ L de medio SOC a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C durante 1.5 horas con una agitación de 225 rpm en la incubadora Lab-Line Orbit Environ Shaker. Una vez terminado el tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó durante 4 min a 1400 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 100 μ L de medio SOC. Finalmente se dispersaron 100 μ L de la suspensión de células en cajas Petri con medio LB selectivo (ampicilina/IPTG/X-Gal). Las cajas de Petri se incubaron a 37 °C hasta el crecimiento de colonias.

Almacenamiento de células transformantes

Para almacenar las células transformantes se sembraron bacterias en 3 mL de medio líquido LB y se incubaron a 37 °C, con agitación de 200 rpm durante 14-16 h. Se tomaron 350 mL de cultivo y se agregaron 150 mL de una mezcla de glicerol-LB (1:1) estéril, teniendo una concentración final de glicerol de 15 %.

Purificación del DNA plasmídico

Se tomaron células de *E. coli* transformantes con la punta de una micropipeta estéril y se inocularon en un tubo de ensayo con tapón de rosca con 3 mL de caldo LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL). El cultivo se incubó con agitación constante (225 rpm) durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente se procedió a la purificación del plásmido de acuerdo al procedimiento del KIT ZYMO RESEARCH®. Para ello, los 3 ml de cultivo se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 min. El paquete celular se resuspendió en agua estéril y se le añadieron 100 μ l de solución de lisis. Se agitó la mezcla por inversión y se dejó en hielo durante 2 min. Enseguida se añadieron 350 μ l del buffer de neutralización y se agitó por inversión nuevamente.

Se centrifugó a 11 000 rpm durante 2 min y en sobrenadante se transfirió a una columna Zymo-Spin acoplada a un tubo colector. Se colectó el líquido en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se desechó. Se añadieron 200 μ l de buffer de lavado, se centrifugó para colectar y se eliminó el líquido. El DNA plasmídico se eluyó con 30 μ l de buffer de elución y se colectó en un tubo limpio. La concentración del DNA plasmídico se determinó en el NANODROP 2000® Thermo Scientific.

Secuenciación

La secuenciación se realizó por el método de terminación de cadena con didesoxinucleótidos cuyos productos se resolvieron en un secuenciador automático de la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca Mor.

APÉNDICE 2. Preparación de reactivos y medios de cultivo

3,3'-diaminobencidina

DAB (Sigma-Aldrich D5637-1G) 100 mg
Agua desionizada estéril 100 mL
Ajustar el pH a 3.8 con NaOH.

Agua-Dietil pirocarbonato (H₂O-DEPC)

DEPC (SIGMA No. Cat. D5758) 430 μ L
Agua desionizada 1L
Se preparó agitando toda la noche y posteriormente se esterilizó en autoclave (121 °C/15 lb/in²) durante 1 h.

Amortiguador de muestra FRB para RNA

Formamida (JT Baker) 2.2 mL
Formaldehído 37 % (SIGMA F 8775) 0.8 mL
MAE 20 X pH 7.0, 250 μ L
Glicerol 80 % 400 μ L
H₂O-DEPC 350 μ L
Azul de Bromofenol, una pizca

Amortiguador para DNA TBE 10X

Tris 0.9 M
Ácido Bórico 0.8 M
EDTA pH 8.0 20 mM

Amortiguador para RNA MAE 20X

MOPS (SIGMA M1254) 0.4 M
Acetato de sodio 100 mM
EDTA pH 6.5-7.0 20 mM

CaCl₂ 60 mM

CaCl₂ anhidro 0.882 g
Glicerol 15 mL
Agua estéril desionizada 85 mL
Ajustar pH a 7 con HCl

Caldo Luria

Medio Luria (SIGMA L1900) 15.5 g
Agua estéril 1 L
Esterilizar 20 min a 121° C

Etanol 70 % para la extracción de RNA

Etanol absoluto 70 mL
H₂O-DEPC 30 mL

Flagelin22 (péptido flg22)

GeneScript Cat.No. RP19986

Gel agarosa 2 % para DNA

Agarosa 0.5 g
TBE 10X 2.5 mL
Bromuro de etidio (0.5 mg/mL) 13 µL
Agua desionizada estéril 22.5 mL

Gel agarosa 2 % para RNA

Agarosa 0.6 g
MAE 20X 1.5 ml
H₂O-DEPC 26.1 ml
Formaldehído 37 % 2.4 ml
Bromuro de etidio 0.5 mg/mL 5 µL

IPTG 0.1 M

IPTG 23.83 g
Agua desionizada 1 L

Medio sólido de Gamborg

Medio de Gamborg B-5 (SIGMA No. Cat. G5893) 3.2 g
Agar 10 g
Sacarosa 10 g
Agua desionizada 1 L

Medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal

Medio Luria Base 15.5 g
Agar 15 g
Agua 1L
Ajustar pH a 7
Esterilizar 20 min y dejar enfriar a 50° C
Ampicilina 100 µg/mL
IPTG 5 mM
X-Gal 80 µg/µL

Xilanasa 3 mg proteína/ml

Xilanasa de *Trichoderma viride*
(1,4-β-D-Xilaxilanolhidrolasa EC 3.2.1.8) SIGMA X-3876

Medios de cultivo para *Pseudomonas syringae*

Medio base. Medio B de King

Proteasa peptona 10 g/L

K₂HPO₄ 1.5 g/L

Glicerol 12 g/L

Agar 15 g/L

Para *Pst* DC3000 *avrRPM1*, agregar por cada 200 mL de medio B de King

200 µL de Rifampicina a una concentración 50 µg/mL.

200 µL de Tetraciclina a una concentración de 20 µg/mL.

2 mL MgCl₂ 1 M

Para *Pst* DC3000 *vir*, agregar por cada 200 mL de medio B de King

200 µL de Rifampicina a una concentración de 50 µg/mL.

2 mL MgCl₂ 1 M

Preparación del inóculo bacteriano de *Pst*

De un stock de la cepa de *Pst* congelada a -70° C se toma una alícuota y se estría en una placa de agar King B/Rif/Tet en el caso de la cepa avirulenta y en una placa de agar King B/Rif en el caso de la cepa virulenta. Se incuba durante 48 h a 29° C. Posteriormente, se selecciona una colonia aislada, se estría en la placa de agar correspondiente y se incuba a 29 °C durante 24 h. Se toman asadas de la placa de agar y se prepara una suspensión bacteriana en solución de MgCl₂ 10 mM estéril. Se ajusta la densidad óptica a una $\lambda=600$ nm a 0.1 UDO.

(0.1 UDO= 1 x 10⁸ UFC/mL).

APÉNDICE 3. Resultados adicionales

Valores de los índices de daño de hojas de plantas silvestres y mutantes adultas expuestas a la FB1 y a los patógenos *Pseudomonas syringae* DC3000 cepa avirulenta (*avrRPM1*) y virulenta.

Tabla S1. Índices de daño de hojas de plantas silvestres y mutantes infiltradas con FB1. Los valores se representan en la Figura 9. Se presenta el promedio y el ES del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea.

Día	WT	<i>lcb2a-1</i>	<i>mpk6</i>	<i>pflD 18-18</i>	<i>sbh1-1</i>
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2	0.30 ± 0.03	0.53 ± 0.06	1.07 ± 0.06	0.88 ± 0.11	1.48 ± 0.04
3	1.00 ± 0.25	0.92 ± 0.14	2.13 ± 0.12	1.75 ± 0.13	2.70 ± 0.17
4	1.83 ± 0.17	1.06 ± 0.10	2.30 ± 0.10	2.58 ± 0.31	3.49 ± 0.11
7	2.90 ± 0.21	1.87 ± 0.12	4.01 ± 0.21	4.21 ± 0.19	4.29 ± 0.19

Tabla S2. Índices de daño de hojas de plantas silvestres y mutantes infiltradas con el patógeno avirulento Pst DC3000 *avrRPM1*. (Inóculo 1×10^8 UFC/mL). Los valores se representan en la Figura 10. Se presenta el promedio y el ES del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea.

Día	WT	<i>lcb2a-1</i>	<i>mpk6</i>	<i>pflD 18-18</i>	<i>sbh1-1</i>
1	0.93 ± 0.06	0.40 ± 0.04	0.93 ± 0.06	0.89 ± 0.00	1.00 ± 0.00
2	1.79 ± 0.01	1.76 ± 0.02	2.01 ± 0.24	2.01 ± 0.24	1.73 ± 0.02
3	2.79 ± 0.18	2.88 ± 0.22	2.89 ± 0.19	3.01 ± 0.35	2.73 ± 0.23
4	3.85 ± 0.26	3.83 ± 0.29	4.02 ± 0.47	4.00 ± 0.00	3.81 ± 0.33
7	4.63 ± 0.32	4.55 ± 0.39	4.81 ± 0.32	5.00 ± 0.00	4.01 ± 0.38

Tabla S3. Índices de daño de hojas de plantas silvestres y mutantes infiltradas con el patógeno virulento Pst DC3000 (Inóculo 1×10^8 UFC/mL). Los valores se representan en la Figura 11. Se presenta el promedio y el ES del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea.

Día	WT	<i>lcb2a-1</i>	<i>mpk6</i>	<i>pflD 18-18</i>	<i>sbh1-1</i>
1	0.13 ± 0.06	0.68 ± 0.06	0.45 ± 0.00	0.54 ± 0.03	0.45 ± 0.04
2	1.80 ± 0.20	2.00 ± 0.00	1.63 ± 0.17	1.78 ± 0.00	1.71 ± 0.29
3	2.80 ± 0.17	2.75 ± 0.22	2.71 ± 0.02	2.78 ± 0.19	2.33 ± 0.00
4	3.87 ± 0.23	3.04 ± 0.07	3.73 ± 0.23	3.85 ± 0.26	4.00 ± 0.00
7	3.88 ± 0.05	4.76 ± 0.41	4.15 ± 0.26	4.38 ± 0.00	3.78 ± 0.38

Tabla S4. Índices de daño de hojas de plantas silvestres y mutantes infiltradas con el patógeno avirulento Pst DC3000 *avrRPM1*. (Inóculo 1×10^6 UFC/mL). Los valores se representan en la Figura 14. Se presenta el promedio y el ES del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea.

Día	WT	<i>lcb2a-1</i>	<i>mpk6</i>	<i>pflD 18-18</i>	<i>sbh1-1</i>
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0
2	0.17 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0
3	0.27 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0
4	0.44 ± 0.06	0.32 ± 0.06	0.11 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0
7	0.72 ± 0.05	0.61 ± 0.10	0.44 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.01

Tabla S5. Índices de daño de hojas de plantas silvestres y mutantes infiltradas con el patógeno virulento *Pst* DC3000 (Inóculo 1×10^6 UFC/mL). Valores de la Figura 15. Se presenta el promedio y el ES del análisis de un total de 20-30 hojas provenientes de 2-3 plantas para cada línea.

Día	WT	<i>lcb2a-1</i>	<i>mpk6</i>	<i>pflD 18-18</i>	<i>sbh1-1</i>
1	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.00 ± 0
2	0.12 ± 0.02	0.00 ± 0	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0	0.00 ± 0
3	0.43 ± 0.06	0.00 ± 0	0.21 ± 0.01	0.00 ± 0	0.00 ± 0
4	0.69 ± 0.02	0.00 ± 0	0.35 ± 0.02	0.04 ± 0	0.00 ± 0
7	1.13 ± 0.15	0.00 ± 0	0.74 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.12 ± 0.06

Tabla S6. Índices de daño de hojas de plantas silvestres y mutantes infiltradas con xilanasasa (3 mg/mL). Valores de la Figura 20. Se presenta el promedio y el ES n=18.

Día	WT	<i>lcb2a-1</i>	<i>mpk6</i>	<i>pflD 18-18</i>	<i>sbh1-1</i>
4	0 ± 0	0.77 ± 0.10	0.33 ± 0	0 ± 0	0.5 ± 0
7	1.55 ± 0.10	2.16 ± 0.33	1.83 ± 0.44	0.38 ± 0.10	2.27 ± 0.10
9	1.94 ± 0.25	2.77 ± 0.35	2.11 ± 0.25	0.50 ± 0	3.27 ± 0.54
11	1.77 ± 0.42	2.83 ± 0.60	2.27 ± 0.10	0.83 ± 0.17	3.44 ± 0.10
14	2.00 ± 0.53	2.84 ± 0.08	2.60 ± 0.40	1.33 ± 0.31	3.3 ± 0.26

Crecimiento bacteriano de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en plántulas.

En la siguiente gráfica se muestran las cargas iniciales al momento de la infección con los patógenos.

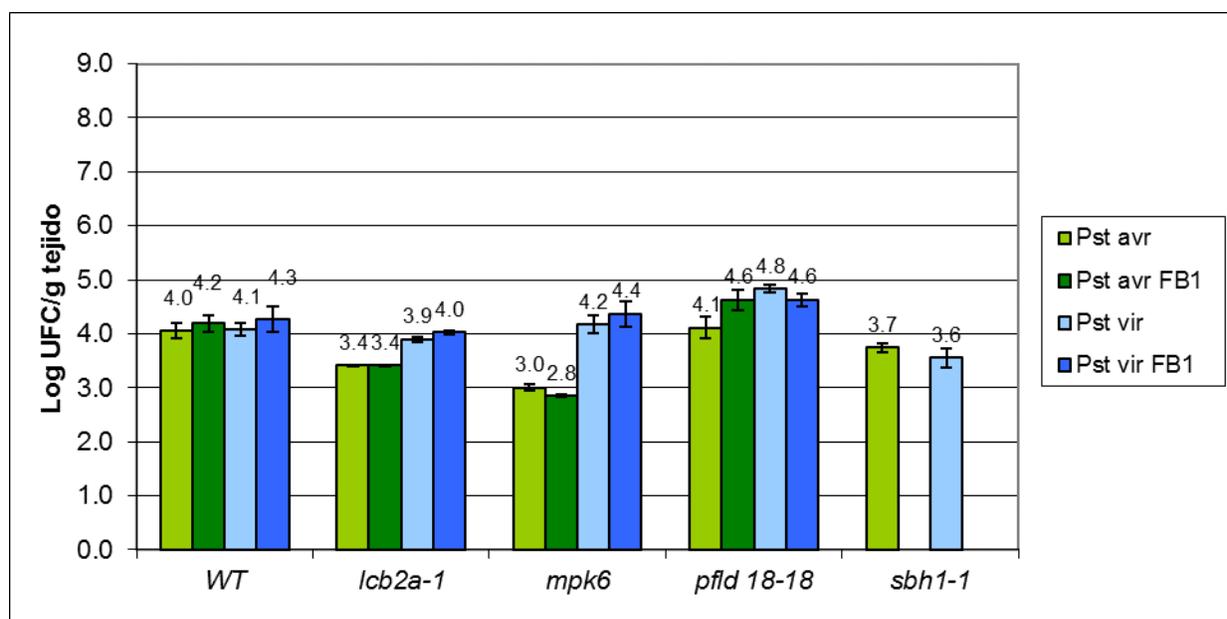


Figura 34. Crecimiento bacteriano de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en plántulas. Las plántulas de los genotipos indicados fueron expuestas por 12 h a la toxina FB1 y enseguida se les aplicó por aspersión un inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* cepa avirulenta DC3000 *avrRPM1* (*Pst avr*) o cepa virulenta DC3000 (*Pst vir*). El crecimiento bacteriano se determinó a las 0h (justo después de la infección). Se muestran los promedios ± ES, n=6.

Estadística del análisis de la expresión de genes de defensa. Se realizó el análisis estadístico ANOVA con el programa “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) comparando los resultados para cada gen y cada línea mutante. Se muestran los valores de significancia estadística para cada comparación ($p < 0.05$).

WT

ACS6

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.684	0.961	0.002
24 h	0.684		0.918	0.013
12h FB1	0.961	0.918		0.004
24 h FB1	0.002	0.013	0.004	

PDF1.2

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.999	0.995	0.000
24 h	0.999		1.000	0.000
12h FB1	0.995	1.000		0.000
24 h FB1	0.000	0.000	0.000	

β -CHI

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.928	0.660	0.769
24 h	0.928		0.334	0.427
12h FB1	0.660	0.334		0.997
24 h FB1	0.769	0.427	0.997	

PR1

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		1.000	0.949	0.057
24 h	1.000		0.954	0.055
12h FB1	0.949	0.954		0.022
24 h FB1	0.057	0.055	0.022	

Mutante *lcb2a-1*

PDF1.2

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.094	1.000	0.988
24 h	0.094		0.100	0.157
12h FB1	1.000	0.100		0.992
24 h FB1	0.988	0.157	0.992	

Mutante *mpk6*

ACS6

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.078	0.000	0.017
24 h	0.078		0.009	0.821
12h FB1	0.000	0.009		0.043
24 h FB1	0.017	0.821	0.043	

PDF1.2

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.416	0.222	0.434
24 h	0.416		0.967	1.00
12h FB1	0.222	0.967		0.959
24 h FB1	0.434	1.000	0.959	

β-CHI

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.854	0.998	0.888
24 h	0.854		0.923	1.000
12h FB1	0.998	0.923		0.947
24 h FB1	0.888	1.000	0.947	

PR1

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.430	0.004	0.100
24 h	0.430		0.059	0.758
12h FB1	0.004	0.059		0.287
24 h FB1	0.100	0.758	0.287	

Mutante *pflD 18-18*

ACS6

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.190	0.946	0.224
24 h	0.190		0.38	0.999
12h FB1	0.946	0.380		0.437
24 h FB1	0.224	0.999	0.437	

PDF1.2

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.402	1.000	0.520
24 h	0.402		0.395	0.995
12h FB1	1.000	0.395		0.512
24 h FB1	0.520	0.995	0.512	

β-CHI

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.221	0.677	0.452
24 h	0.221		0.045	0.935
12h FB1	0.677	0.045		0.102
24 h FB1	0.452	0.935	0.102	

PR1

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.057	0.695	0.998
24 h	0.057		0.013	0.073
12h FB1	0.695	0.013		0.598
24 h FB1	0.998	0.073	0.598	

Mutante *sbh1-1*

ACS6

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.013	0.999	0.262
24 h	0.013		0.011	0.206
12h FB1	0.999	0.011		0.219
24 h FB1	0.262	0.206	0.219	

PDF1.2

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.001	0.001	0.003
24 h	0.001		0.970	0.645
12h FB1	0.001	0.970		0.871
24 h FB1	0.003	0.645	0.871	

β-CHI

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.117	0.058	0.008
24 h	0.117		0.958	0.279
12h FB1	0.058	0.958		0.501
24 h FB1	0.008	0.279	0.501	

PR1

	12h	24h	12hFB1	24h FB1
12 h		0.105	0.652	0.997
24 h	0.105		0.020	0.137
12h FB1	0.652	0.020		0.548
24 h FB1	0.997	0.137	0.548	

Resultados de la secuenciación

Se muestran los alineamientos de las secuencias de los genes *ACS6*, *β-CHI* y *PR1* obtenidas, con las secuencias correspondientes depositadas en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

