



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS TRIHIDROXILADOS EN LA DEFENSA A
PATÓGENOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARÍA ANDREA CASTILLO RODRÍGUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., AGOSTO DE 2018





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: MARINA GAVILANES RUÍZ

VOCAL: LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN

SECRETARIO: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ

1ER. SUPLENTE: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

2º SUPLENTE: FÉLIX MORALES FLORES

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 101, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESORA:

DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ

SUSTENTANTE:

MARÍA ANDREA CASTILLO RODRÍGUEZ

RECONOCIMIENTOS

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

Al Dr. Edgar Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, USA), por proporcionar las semillas de la mutante *sbh1-1*.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra (Facultad de Química, UNAM), por su participación en los cultivos de plantas y en el uso de equipos durante este trabajo.

Al jurado asignado por la Maestra Luz del Carmen Castellanos Román y al Dr. Euclides Ávila Chávez por tomarse el tiempo y enriquecer el escrito de esta tesis.

Este trabajo de tesis estuvo financiado por:

* DGAPA, UNAM (PAPIIT IN22815, IN220618)

* Facultad de Química (PAIP 50009115)

* CONACYT (238368) que también otorgó una beca de licenciatura para este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Respuestas de defensa de las plantas ante patógenos.	10
1.2 Esquemas de inmunidad en las plantas: Inmunidad PTI y ETI	11
1.3 Mecanismos moleculares de defensa.	13
1.4 Respuesta de hipersensibilidad.....	13
1.5 Muerte celular programada.	14
1.6. Esfingolípidos	15
1.7 Biosíntesis de esfingolípidos en plantas	17
1.8 MAP cinasas: Señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. ...	19
1.9 MAPKs en la respuesta de las plantas contra patógenos.	22
1.10 Fumonisina B1 (FB1).....	22
2. ANTECEDENTES	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	26
5. OBJETIVOS PARTICULARES	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Material biológico.....	27
6.2 Cultivo de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
6.2.a Desinfección y siembra de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
6.2.b Germinación de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
6.2.c Crecimiento de las plantas adultas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
6.3 Cultivo de cepas bacterianas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC300 <i>avrRPM1</i> (<i>Pst</i> avirulenta) y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>Pst</i> virulenta).....	29

6.4 Exposición de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> wt y <i>sbh1-1</i> a FB1.	29
6.5 Exposición de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>Pst</i> avirulenta) y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>Pst</i> virulenta).	30
6.5.a Fase de sembrado del precultivo bacteriano fresco preservado en LB más glicerol y luego sembrado por estría de agotamiento.	30
6.5.b Fase de purificación de la cepa previamente aislada	30
6.5.c Preparación del inóculo bacteriano	30
6.5.d Condiciones de infección	31
6.6 Determinación del crecimiento bacteriano	32
6.7 Infiltración de las hojas adultas con MgCl ₂ , FB ₁ , a los patógenos <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>Pst</i> avirulenta) y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>Pst</i> virulenta)	33
6.7.a Determinación de Índice de Daño	34
7. RESULTADOS	35
7.1 Fenotipos de plántulas tipo silvestre y mutante <i>sbh1-1</i> expuesta a la FB1 y al patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>Pst</i> avirulenta) y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>Pst</i> virulenta).	36
7.2 Grado de deterioro de las plántulas provocado por los tratamientos con FB1, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>Pst</i> avirulenta) y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>Pst</i> virulenta).	49
7.3 Crecimiento del patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> genotipo silvestre y <i>sbh1-1</i>	52
7.4 Crecimiento del patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> cepas DC3000 <i>avrRPM1</i> y <i>Pst</i> DC3000 en condiciones de acumulación de BCL (adición de la FB1).	56
7.5 Integración de los resultados de crecimiento bacteriano en los dos genotipos y en todas las condiciones	60

7.6 Fenotipos e Índice de Daño de hojas de plantas adultas wt y <i>sbh1-1</i> expuestas a FB1 o a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>Pst</i> avirulenta) o <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>Pst</i> virulenta).....	68
8. DISCUSIÓN	74
8.1 Evaluación de la contribución de las BCL di- y tri-hidroxiladas en la HR en plantas wt y <i>sbh1-1</i> adultas	74
8.2 Evaluación de la contribución de las BCL di- y tri-hidroxiladas en el deterioro de las plántulas wt y <i>sbh1-1</i>	77
8.3 Evaluación de la contribución de las BCL di- y tri-hidroxiladas en la defensa contra el crecimiento bacteriano en plántulas wt y <i>sbh1-1</i>	81
9. CONCLUSIONES	84
10. PERSPECTIVAS	85
11. BIBLIOGRAFÍA	86
12. APÉNDICE	92

ABREVIATURAS

Avr	Gen de avirulencia
BCL	Bases de cadena larga
Cer	Ceramida
CS	Ceramida sintasa
dpi	Días post infección
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
ETI	Inmunidad inducida por efectores
FB1	Fumonisina B1
RH	Respuesta de hipersensibilidad
hpi	Horas post infección
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IE	Índice de Enfermedad
KSR	3 ceto esfinganina reductasa
MAP cinasa	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MAPK	MAP cinasa
MAPKK	Cinasa de la MAP cinasa
MAPKKK	Cinasa de la cinasa de la MAP cinasa
MCP	Muerte celular programada
O ₂ ⁻	Ión superóxido
OH ⁻	Radical hidroxilo
PAMPs	Patrones asociados a patógenos
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
<i>Pst</i> avirulenta	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i>
<i>Pst</i> virulenta	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000
PTI	Inmunidad inducida por PAMPs
R	Gen de resistencia
RE	Retículo endoplásmico

SAR	Sistema de resistencia adquirida
SAT	Esfingosina aciltransferasa
SPT	Serina palmitoiltransferasa
wt	Wild type, silvestre

RESUMEN

Los esfingolípidos complejos son lípidos muy abundantes en las membranas de las plantas, mientras que varias de las formas simples de esfingolípidos son segundos mensajeros. De estos, sus niveles aumentan en ciertos tipos de estrés para instrumentar una respuesta molecular a la situación de agobio. Hasta ahora se ha descrito que los esfingolípidos actúan en los estreses de sequía, las bajas temperaturas y los patógenos. En cuanto a la resistencia a patógenos, las bases de cadena larga (BCL), que son esfingolípidos simples y precursores biosintéticos de los esfingolípidos complejos, se acumulan ante la presencia de un patógeno biótrofo y producen una activación de muerte de las células que se limita a la región de entrada, evitando el avance del patógeno a las células vivas contiguas. Esta muerte está programada y se asocia a la respuesta de hipersensibilidad (RH), la estrategia de defensa más efectiva de las plantas contra los patógenos.

El objetivo en este trabajo fue establecer si las BCL di-hidroxiladas o tri-hidroxiladas contribuyen diferencialmente al proceso de inmunidad innata desencadenada por PAMPs (PTI) o la inmunidad inducida por efectores (ETI) de las plantas en contra de patógenos virulentos o avirulentos.

Para cumplir este objetivo se utilizaron plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre y de una mutante, *sbh1-1*. Ésta presenta una mutación en el gene de la hidroxilasa 1, enzima que introduce un tercer OH en las bases de cadena larga de los esfingolípidos. Con el propósito de inducir un aumento de los niveles endógenos de bases de cadena larga, a las plántulas silvestres y las mutantes se pre-expusieron a la toxina Fumonisina B1 (FB1). Posteriormente, las plántulas se infectaron con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). Después de 24 y 48 h (hpi) se evaluaron los cambios fenotípicos en las plántulas y el crecimiento bacteriano. Los resultados indican que tanto las bases di- como tri-hidroxiladas están involucradas en los esquemas de inmunidad PTI y ETI en *Arabidopsis*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Respuestas de defensa de las plantas ante patógenos.

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico.

El grado de patogenicidad se define como virulencia [Collinge et al., 2001]. De esta forma y dependiendo de su habilidad para causar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedero y levemente o no ser nocivo para otro.

El ataque de patógenos generalmente activa una serie de mecanismos de defensa, cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra el patógeno. Estos mecanismos se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos como por ejemplo: presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, y mecanismos de defensa químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales.

Las células vegetales atacadas por patógenos activan una serie de mecanismos de defensa para evitar el crecimiento y reproducción del agente invasor. Las principales reacciones que genera la planta son la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el incremento en el flujo de Ca^{2+} , la activación de cascadas de MAP cinasas y de genes de defensa y la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas como las fitoalexinas, con capacidad de reforzar la estructura de la pared celular, con compuestos como la callosa o la lignina [Agrios, 1997].

Cuando la activación de estas respuestas es suficiente para evitar el crecimiento y reproducción del patógeno en el sitio de penetración, se produce la respuesta de hipersensibilidad (HR), cuyo fenotipo característico es la muerte celular localizada en la región de invasión.

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como de resistencia inducida, se activan solamente con una respuesta al ataque de un patógeno específico [Collinge et al., 1994]. La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno [Hutcheson, 1998].

En las interacciones planta-patógeno, ambos organismos desarrollan diversos mecanismos de defensa y de ataque, y dependiendo de la intensidad, temporalidad y mecanismos estratégicos, se establece la enfermedad o la resistencia en el sitio de infección de la planta hospedera y eventualmente, en toda la planta.

En la defensa de las plantas contra patógenos existen dos tipos de interacciones: las incompatibles, las cuales se establecen entre un patógeno avirulento y una planta resistente originando generalmente la RH, y las compatibles, las cuales se establecen entre un patógeno virulento y una planta susceptible [Wit, 2007].

1.2 Esquemas de inmunidad en las plantas: Inmunidad PTI y ETI.

Existen dos modelos de inmunidad en plantas, la inmunidad innata desencadenada por patrones asociados a patógenos, también conocidas como PAMPs (PTI) y la inducida por efectores (ETI) [Jones et al., 2006].

La inmunidad innata es temporalmente corta y no muy robusta ni específica entre el patógeno y la planta. Está basada en la percepción y reconocimiento de las PAMPs [Kaffarnik, 2009], estas son moléculas conservadas de los microorganismos y son importantes para su ciclo de vida. Algunos ejemplos son la flagelina, el factor de elongación bacteriano EF-Tu, y el lipopolisacárido presentes en pared celular de bacterias Gram negativas, xilanasas, quitina y ergosterol, por mencionar algunos. Estos son capaces de inducir un nivel de defensa basal casi en cualquier planta [Newman et al., 2007].

La percepción de PAMPs se da por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) localizados en la membrana plasmática de células vegetales, que reconocen dominios particulares de PAMPs [Wit, 2007]. Se conoce que al reconocer a PAMPs se desencadena en la planta una serie de respuestas intracelulares de defensa con el objetivo de evitar la entrada y proliferación de microorganismos patógenos [Wit, 2007]. Es importante recalcar que la inmunidad por PAMPs es una respuesta de defensa no específica para el patógeno que infecta a la planta [Jones et al., 2006].

La inmunidad ETI es una respuesta de defensa muy específica, muy robusta y temporalmente más larga. Ésta involucra el reconocimiento de inductores, los cuales son proteínas codificadas por los genes Avr de avirulencia presentes en el patógeno, y que son capaces de inducir las respuestas de defensa en hospederos que poseen los correspondientes genes de resistencia (R) [Parker et al., 1997]. Por ende, el reconocimiento tiene lugar cuando ocurre la interacción entre las proteínas codificadas por los genes R y los correspondientes productos de los genes Avr del patógeno (modelo gen-por-gen, Figura 1). Esta interacción da origen a una cascada de señales y otras vías de transducción, las cuales finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa [Hammond-Kosack et al., 1996].

Las plantas que establecen una interacción compatible con el patógeno, son las que sucumben al patógeno. Esto se explica porque no poseen el segundo mecanismo (ETI), sin embargo, pueden llegar a reconocer la presencia del patógeno por evocadores endógenos o exógenos (mecanismo PTI), pero la respuesta de defensa resulta insuficiente para detener el crecimiento y reproducción del patógeno.

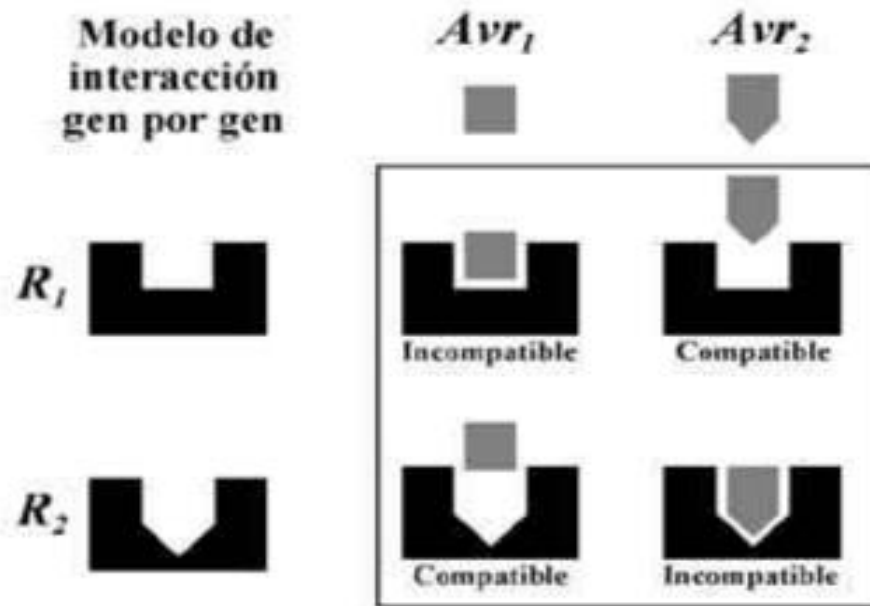


Figura 1. Representación del modelo gen-por-gen [Madriz, 2002]

1.3 Mecanismos moleculares de defensa.

Una vez que el patógeno ha sido reconocido, se activan una serie de mecanismos de defensa, mediados por cascadas de señales. Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento del patógeno, son los responsables de la resistencia o susceptibilidad, actuando muchas veces en conjunto para impedir el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente a la muerte celular programada (MCP) ocasionada por la RH, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad microbiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo, las cuales evitan el avance del patógeno [Collinge et al., 1994].

1.4 Respuesta de Hipersensibilidad.

La respuesta de defensa local contra el ataque de microorganismos patógenos está asociada a una RH caracterizada por una muerte rápida de las primeras células infectadas y la restricción de la expansión del microorganismo patógeno a células vecinas, aislándolo del resto de la planta [Hammond-Kosack et al., 1996].

Entre los eventos tempranos que se desencadenan junto con la RH están:

- ❖ La producción de las ERO's, tales como el superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ERO's pueden tener dos funciones, en la primera, debido a su toxicidad pueden aumentar el daño producido por el estrés, mientras que en la segunda, pueden actuar como una señal para la activación de las respuestas de defensa [Dat et al., 2000].
- ❖ La apertura de canales iónicos.
- ❖ Eventos de fosforilación y defosforilación de proteínas.

La RH está asociada a la expresión simultánea de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina y proteínas ricas en hidroxiprolina; también con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis, las cuales se asocian al sistema de resistencia adquirida (SAR) [Ryals et al., 1996].

La RH ocurre en la mayoría de las interacciones incompatibles que se establecen entre un patógeno avirulento y una planta resistente. De forma contraria, cuando la activación de las respuestas de defensa no logra detener el crecimiento y propagación del patógeno en el sitio de infección, se producen síntomas de enfermedad que durante su curso desarrollan la necrosis, la cual se inicia en el sitio de infección, pero que logra extenderse inclusive a la totalidad de la planta. Este tipo de interacción es de tipo compatible y se establece entre un patógeno virulento y una planta susceptible [Dangl et al., 1996].

Se ha planteado que la RH resulta de: a) la activación de un programa de muerte celular intrínseco, el cual es codificado dentro del genoma de la planta, y b) la activación de vías de señalización. Entre ellas, se ha demostrado la vía de MAP cinasas, ya que la MCP se relaciona la activación prolongada de MAPKs y por ende con la manifestación de RH [Meskiene et al., 2000].

1.5 Muerte celular programada.

La RH se considera como la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por patógenos biótrosos o hemibiótrosos. Durante la RH, las células que rodean el sitio en donde penetró el patógeno programan su muerte con la

intención de detener su avance y así, la infección. De esta manera, la RH forma parte de los mecanismos de defensa de la planta pero es además la forma más efectiva de contener la infección [Mur, 2008]. El fallecimiento de células que ocurre durante la RH se considera una muerte celular programada (MCP).

La MCP es fundamental también en procesos relacionados tanto con el crecimiento y desarrollo normal del organismo, como con la respuesta a estreses por factores bióticos y abióticos. La MCP es un fallecimiento genéticamente controlado, que requiere de una participación activa del organismo [Williams et al., 2008] e involucra una secuencia de eventos metabólicos que conducen a la destrucción de la célula [Guimarães et al., 2004].

Cuando se trata de microorganismos patógenos biótrofos, que requieren tejido vivo durante la infección, la muerte celular programada es un mecanismo que permite el control espacial y temporal de la muerte de cierta zona del tejido. En el caso de los patógenos necrótrofos ocurre una muerte indiscriminada de células o necrosis y el daño tisular abarca grandes extensiones llegando a la totalidad del órgano de la planta. La presencia de patógenos virulentos tiene el poder de reprimir el efecto que desencadena la inmunidad en un huésped de la planta.

1.6 Esfingolípidos.

Son compuestos de naturaleza anfipática presentes en todas las células eucariotas. Hasta la fecha se conoce que *Arabidopsis thaliana* contiene más de 200 clases de esfingolípidos diferentes [Markham et al., 2006].

Los esfingolípidos complejos son moléculas que contienen una cabeza polar y dos cadenas hidrofóbicas que forman la ceramida (cer). Una de las cadenas es una base de cadena larga (BCL) y la otra es un ácido graso. Ambos se unen por un enlace amida entre el grupo amino de la BCL y el grupo carboxilo del ácido graso [Chen et al., 2009] (Figura 2). En plantas, la mayoría de los ácidos grasos son ácidos grasos α -hidroxilados con una longitud en general de 14 a 26 carbonos [Lynch et al., 2004].

Glucosil ceramida

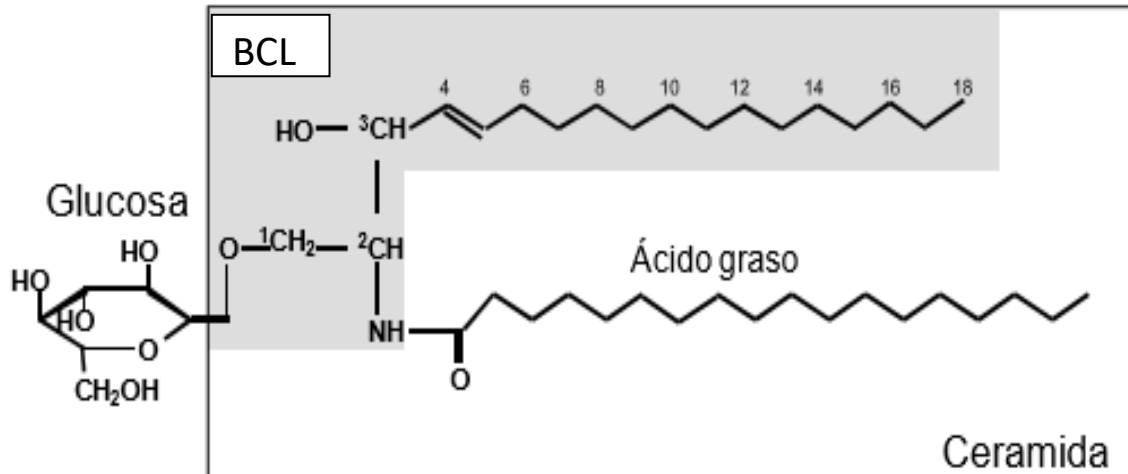


Figura 2. Estructura química de un esfingolípido complejo. [Markham et al., 2006]

El grupo hidroxilo (-OH) del C1 de las BCL puede unirse a cabezas polares constituidas por azúcares, fosfatos o inositol, dando lugar a esfingolípidos más complejos.

Se ha encontrado que en las hojas de *Arabidopsis thaliana* existen 6 tipos de BCL. Los isómeros 8-(E) y 8-(Z) de la t18:1 son las BCL predominantes, con un 57% y un 32% del total respectivamente, mientras que los isómeros d18:1 constituyen menos del 10% del total [Dunn et al., 2004].

Las BCL que son predominantes en plantas constan de una cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono, variando en el número de hidroxilaciones, así como también en la posición, número y configuración estereoquímica de dobles enlaces (Figura 3).

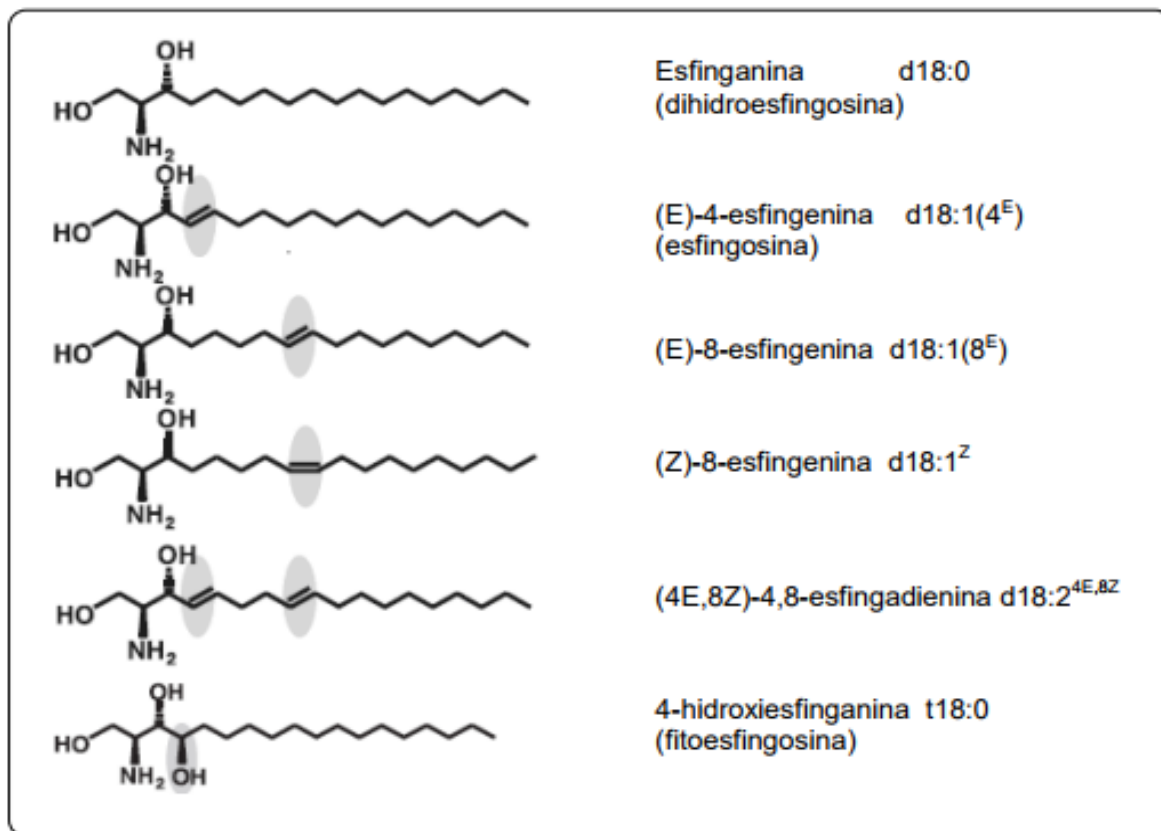


Figura 3. Estructuras de algunas BCL presentes en plantas [Adaptado de Sperling et al., 2003]
[González A, 2014]

1.7 Biosíntesis de esfingolípidos en plantas.

La biosíntesis de esfingolípidos se inicia en el Retículo Endoplásmico (RE) con la condensación de palmitoil-CoA y L-serina, la cual produce 3-cetoesfinganina, la cual es reducida para dar lugar a la esfinganina (precursora de la ceramida). Estas reacciones están catalizadas por las enzimas serina palmitoiltransferasa (SPT) y 3-cetoesfinganina reductasa (KSR), respectivamente. La actividad de la enzima SPT regula los niveles de otros compuestos como las ceramidas y las BCL [Zäuner et al., 2010]. Una vez sintetizada la esfinganina, ésta puede seguir 3 vías: puede ser fosforilada para formar esfinganina-1-fosfato; ser hidroxilada para dar 4-hidroxiesfinganina o bien para ser acilada para sintetizar ceramida. La síntesis de ceramida se obtiene a partir de la reacción de condensación entre el grupo amino de la esfinganina y el grupo ácido del ácido graso, catalizada por las enzimas CS (ceramida sintasa) o SAT (esfinganina aciltransferasa), dependiendo si el donante es un ácido graso libre o una molécula de CoA, después de este paso, las

ceramidas son transportadas al aparato de Golgi, en donde actúan como sustratos de otras enzimas y con ello se forman los esfingolípidos complejos (Figura 4).

En *Arabidopsis* se han encontrado tres ceramidas sintetasas, la LOH2 es específica para cadenas aciladas de 16 carbonos y tiene preferencia como sustrato a las BCL di-hidroxiladas, mientras que las ceramidas sintetasas LOH1 y LOH3 muestran mayor especificidad por cadenas aciladas de 20 a 26 carbonos y afinidad como sustrato a las BCL tri-hidroxiladas [Markham et al., 2011]. A partir de este punto, las ceramidas divergen hacia diferentes vías en donde serán modificadas, ya sea por hidroxilaciones, desaturaciones o condensaciones con otras moléculas para originar esfingolípidos complejos como las glucosilceramidas o la glicosilinositolfosforilceramidas [Sperling et al., 2003]. Asimismo, las ceramidas son utilizadas como sustratos para la síntesis de ceramida-fosfatos [Liang et al., 2003] o bien son degradadas por ceramidases, para formar BCL libres y ácidos grasos.

Se ha descrito que durante la interacción planta-patógeno [Raffaëlle et al., 2009], al interrumpir la síntesis de esfingolípidos se produce un aumento de la concentración de BCL libres, lo que produce una respuesta de hipersensibilidad asociada a los mecanismos de defensa por parte de la planta [Abbas et al., 1994; Wright et al., 2003].

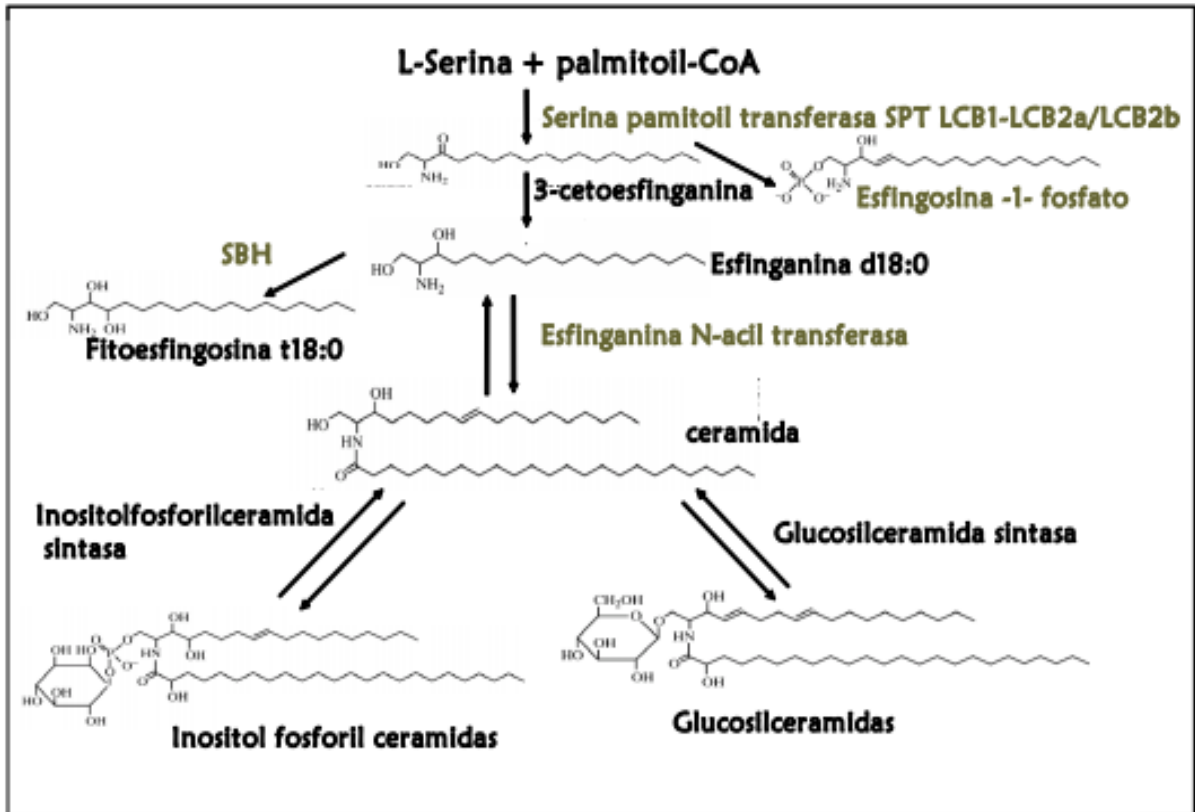


Figura 4. Síntesis de *novo* de esfingolípidos. [Adaptada de Sperling et al., 2003] [González A, 2014]

Otra función que se le ha asociado a los esfingolípidos es en el proceso de apertura estomática, en donde han desempeñado un papel clave como reguladores en dicho proceso [Ng et al., 2001; Coursol et al., 2005; Worrall et al., 2008; Nakagawa et al., 2012].

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso en el que también se ha evidenciado la acción de las ceramidas. La ceramida es un intermediario en la señalización molecular.

1.8 MAP cinasas: Señalización en la defensa de las plantas contra patógenos.

Las células vegetales han desarrollado evolutivamente diversos sistemas de transducción de señales, que les permiten responder de forma específica a los estímulos externos.

Las cascadas de MAP cinasas (cinasas de proteína activadas por mitógenos) se han asociado a diferentes procesos fisiológicos y con diferentes tipos de estrés biótico y abiótico; su función consiste en traducir los estímulos extracelulares reconocidos por los receptores de la célula, a un gran número de moléculas blanco que en relevo integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo inicial [Ichimura et al., 2002].

Las cascadas de MAP cinasas están integradas por tres elementos constitutivos: MAPKKK (cinasa de la cinasa de la MAP cinasa), MAPKK (cinasa de la MAP cinasa) y MAPK (MAP cinasa).

a) MAPKKKs

Su heterogeneidad estructural y la de sus dominios reguladores confieren una serie de características muy peculiares a las cascadas de MAP cinasas, como son la flexibilidad para responder a una gran variedad de estímulos y la capacidad de activar cascadas simultáneamente [Meskiene, et al., 2000].

b) MAPKKs

Se consideran proteínas de doble especificidad, ya que además de ser activadas por una MAPKKK, activan a una MAPK.

Con respecto al extremo N-terminal de las MAPKKs vegetales, éstas presentan un sitio común denominado dominio D, el cual se une a las MAPKs. Este dominio consiste en una región definida por la secuencia de residuos, los cuales son indispensables para la interacción con las MAPKs.

c) MAPKs

La activación de MAPKs requiere de la fosforilación de los residuos de Thr y Tyr localizados entre los subdominios VII y VIII del núcleo catalítico. Posee un dominio CD, el cual permite la unión con sus MAPKKs activadoras, con fosfatasa que la inactiven o bien, con los sustratos que la fosforilan.

En plantas, las MAPKs están involucradas en la regulación de crecimiento, la MCP y como respuesta a diversos tipos de estrés como frío, calor, ERO's, sequía o

patógenos [Colcombet et al., 2008]. Las MAPKs mejor caracterizadas de *Arabidopsis* son la MPK3, MPK4 y MPK6, las cuales son activadas por una diversidad de estímulos ya sea de estrés abiótico o biótico [Qiu et al., 2008].

En la Figura 5 se representa la inmunidad asociada a PAMPs, la cual necesita de receptores que lo reconozcan y con ello activar corriente abajo a las cascadas de MAP cinasas. La MAP3K es el primer elemento de la cascada en activarse, esta fosforila a la MAP2K, la cual de manera sucesiva fosforila a la MAPK, ésta activa corriente abajo la expresión de genes relacionados con la defensa, en muchos casos, se desconocen los factores de transcripción involucrados en la fosforilación mediada por la MAPK.

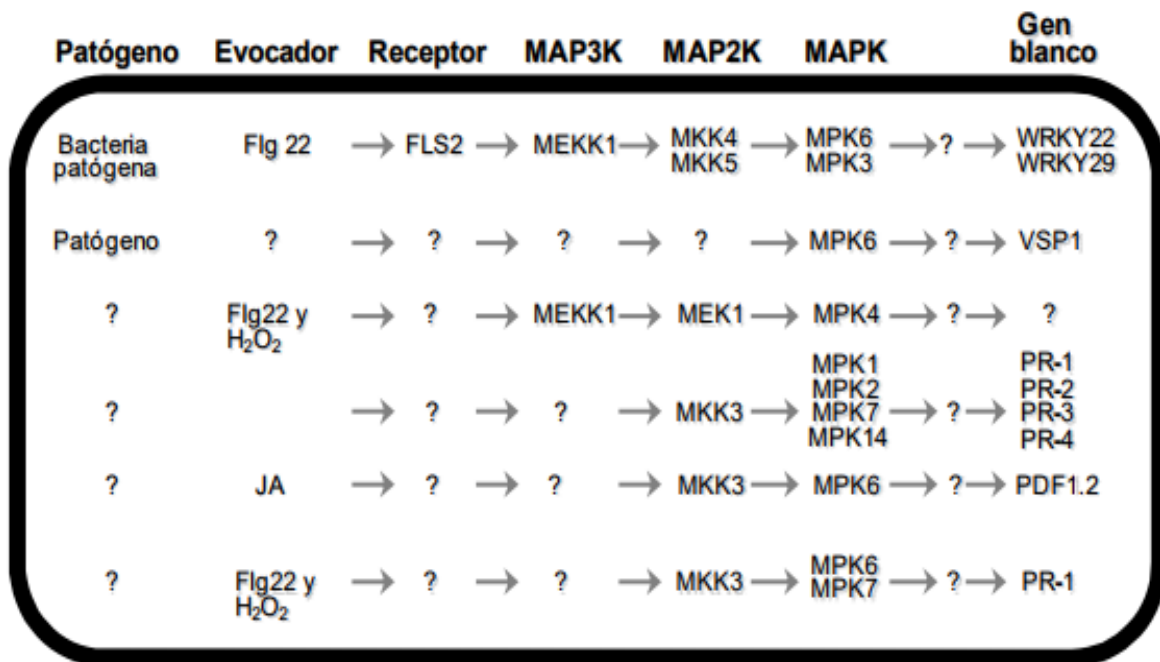


Figura 5. Cascadas de MAPKs de *Arabidopsis* inducidas por flg22, peróxido de hidrógeno, ácido jasmónico o patógenos. [Modificado de Colcombet et al., 2008] [Saucedo M, 2011].

1.9 MAPKs en la respuesta de las plantas contra patógenos.

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa, si la inducción de estas respuestas es lo suficientemente intensa y persistente, las plantas se modifican y se adaptan a su nuevo ambiente. Uno de los mecanismos que la planta activa como defensa es la cascada de MAP cinasas, la cual se caracteriza por responder a estímulos de tipo biótico y abiótico [Ichimura et al., 2002].

La activación de las MAP cinasas es fundamental en la señalización para la iniciación de la respuesta de defensa [Cardinale et al., 2000], además de que se sugiere que dichas cascadas amplifican las señales con el fin de incrementar la inducción de la resistencia de la planta dada por el reconocimiento R/Avr, el cual se considera es un mecanismo universal de las plantas [Romeis et al., 1999].

1.10 Fumonisina B1 (FB1)

Las fumonisina B1 (FB1) es una micotoxina producida por *Fusarium verticillioides*, hongo que afecta la productividad de los cultivos de maíz. La toxina FB1 es un aminopentol con dos ácidos tricarbálicos unidos por un enlace éster a la cadena hidrocarbonada (Figura 6).

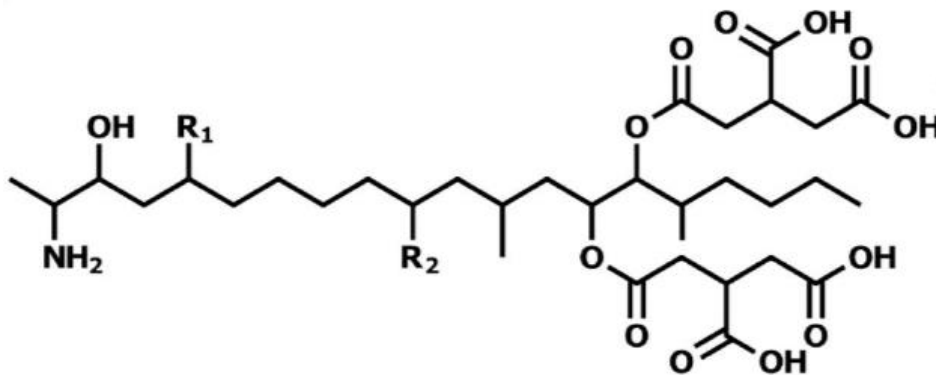


Figura 6. Estructura química de la micotoxina Fumonisina B1

La FB1 es un inhibidor de la ceramida sintasa, esta enzima tiene la función de catalizar la acilación de esfingina en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos, lo que conlleva a la inhibición en la síntesis de ceramida, incrementando los niveles de esfingina y esfingosina.

Existen varios modelos en plantas que evidencian la inhibición de la enzima celular ceramida sintasa por la presencia de FB1 y la consecuente modificación

del metabolismo de lípidos celulares [Abbas et al., 1994]. Los esfingolípidos tienen un papel estructural en las membranas biológicas, pero también poseen una función reguladora en la célula, como ser componentes iniciales en la señalización de la respuesta de defensa a patógenos.

Algunas toxinas como la FB1 son factores de virulencia, los cuales causan la muerte celular en varias especies de plantas. La FB1 por ejemplo, causa perturbaciones en los niveles de esfingolípidos de las plantas, propiciando la acumulación de BCL, especialmente de las esfinganinas y las fitoesfingosinas favoreciendo así el decremento de las ceramidas y esfingolípidos complejos, por estar corriente debajo de la reacción catalizada por la ceramida sintasa.

2. ANTECEDENTES

Se tiene como antecedente que la Fumonisina B1 actúa en la inhibición de la ceramida sintasa en la síntesis de esfingolípidos, provocando la acumulación de BCL endógenas, desencadenando la MCP como mecanismo de defensa en plantas [Wang et al., 1991]. Cuando plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a la FB1 se expusieron a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *avrRPM1* (cepa *Pst* Avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (cepa *Pst* Virulenta), éstas presentaron un efecto de inmunidad contra el crecimiento del patógeno [Saucedo et al., 2011].

En el laboratorio se han obtenido resultados en relación con la medición del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 *avrRPM1* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea silvestre (wt) y líneas mutantes en: síntesis de esfingolípidos, MAPKs y especies reactivas de oxígeno, después de haber sido expuestas a FB1 10 µM. La idea detrás de estos experimentos era que la adición de la toxina FB1 aumentaba el contenido de BCL endógenas, los segundos mensajeros que desencadenaban la respuesta de defensa. Lo observado en la línea silvestre expuesta a la FB1 indicó una disminución en el crecimiento bacteriano sugiriendo una activación de los mecanismos de defensa de la plántula contra el patógeno [Saucedo-García et al., 2011]. En relación con las líneas mutantes (dependiendo del gen modificado), se observó un patrón similar al de la wt, es decir, que la FB1 induce a la activación de los mecanismos de inmunidad, por ello esta estrategia experimental reveló ser una manera adecuada de evaluar la defensa contra estos patógenos bacterianos.

En el presente trabajo, se usó la línea mutante *sbh1-1*, la cual cuenta con una inserción de T-DNA en el gen que codifica para la hidroxilasa 1 de BCL [Chen et al., 2008]. Por ello, estas plantas muestran una disminución de hasta el 50% de BCL en sus hojas. Sin embargo, se encontró que estas plantas compensan la deficiencia de BCL tri-hidroxiladas con un aumento muy pronunciado de las bases di-hidroxiladas. Utilizando esta línea como herramienta y en combinación con la adición de la toxina FB1, lo que se quiso evidenciar fue si las BCL di-hidroxiladas o

tri-hidroxiadas están involucradas en la MCP como mecanismo de defensa ante patógenos.

3. HIPÓTESIS

- ❖ La acumulación de bases de cadena larga (BCL) tri-hidroxiladas o di-hidroxiladas endógenas contribuye a la defensa de *Arabidopsis thaliana* contra la proliferación de las cepas avirulenta y virulenta de *Pseudomonas syringae*.

4. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar el crecimiento bacteriano de las cepas virulenta o avirulenta de *Pseudomonas syringae*, en plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos wt y *sbh1-1* que han sido expuestas o no a la FB1.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Establecer las condiciones experimentales de exposición de plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* al patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *avrRPM1* (cepa *Pst* Avirulenta), y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (cepa *Pst* Virulenta).
- ❖ Determinar el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* cepas virulenta o avirulenta en plantas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos silvestre (wt) y mutante (*sbh1-1*), en presencia y ausencia de la toxina FB1, con la finalidad de inducir cambios en los niveles endógenos de BCL.
- ❖ Evaluar los fenotipos de las plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* wt y *sbh1-1* expuestas a las condiciones experimentales anteriores.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico.

Se utilizaron plántulas de tres semanas de edad de *Arabidopsis thaliana*, genotipo silvestre (ecotipo Col-0) y un genotipo mutante de la línea silvestre, la línea *sbh1-1* (Tabla 1).

Tabla 1. Características genóticas y fenotípicas de plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en el presente trabajo.

Genotipo de <i>A. thaliana</i>	Composición genética	Características	Contenido de esfingolípidos
Silvestre (wt)	No tiene modificaciones *Control	Normal	Basal
<i>sbh1-1</i>	Inserción de T-DNA en el gene que codifica para la hidroxilasa 1 de bases de cadena larga (SBH1) [Chen et al., 2008]	Menor contenido de BCL tri-hidroxiladas	30% menos de esfingolípidos tri-hidroxilados y 2 veces más en el contenido de esfingolípidos di-hidroxilados en comparación con la silvestre.

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

6.2 Cultivo de líneas de *Arabidopsis thaliana*.

6.2.a Desinfección y siembra de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Para que se lleve a cabo la germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*, éstas se colocan en un tubo estéril en una cantidad suficiente y se les añade 1 mL

de NaClO al 20% (estéril) y 1 μ L de Tween 20 (0.1% y estéril); posteriormente se agitan vigorosamente en un agitador eléctrico durante 20 min para después centrifugar los tubos anteriores por aproximadamente 10 s en una minicentrífuga. Una vez terminado este periodo, se retira el sobrenadante de cada tubo utilizando una micropipeta (puntas estériles). Posteriormente, se agrega nuevamente 1 mL de NaClO al 20% (estéril) y nuevamente una agitación vigorosa en un agitador eléctrico de bloque durante 10 min y se centrifuga aproximadamente 10 s, para volver a retirar el sobrenadante. Después, las semillas se enjuagan varias veces (un mínimo de 5), cada vez añadiendo 1 mL de agua estéril y agitando suavemente durante 30 s en el agitador eléctrico y eliminando el sobrenadante en cada uno de los lavados para asegurar la eliminación completa del NaClO y del Tween 20.

Una vez desinfectadas las semillas, éstas se siembran en la superficie del medio sólido depositado en cajas Petri desechables estériles. El medio sólido es Gamborg B-5/Agar/Sacarosa (ver Apéndice). La colocación de las semillas en la caja Petri se hace mediante una micropipeta de 1 mL con punta estéril, acomodándolas preferentemente en línea horizontal. Una vez sembradas las cajas, se envolvieron en papel aluminio y se mantuvieron durante 48 h a 4°C, para el rompimiento de la latencia de las semillas; transcurrido ese tiempo, se envolvieron las cajas Petri en plástico transparente autoadherente y se transfirieron a la cámara de incubación a 29°C con un fotoperiodo de 16 h de oscuridad/ 8 h de luz.

6.2.b Germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de las plantas utilizadas en este trabajo fueron germinadas en un sustrato de 3 partes de Mix 3 Agregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd), 1 parte de vermiculita Premium Grade (Sunshine, sun Gro Horticulture; Canada Ltd) y 1 parte de agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V., Tlalnepantla, Edo. de México). A dicho sustrato se le añadió agua para humedecerlo, y con ello llenar macetas de plástico de aproximadamente 100 mL de capacidad previamente lavadas y enjuagadas con NaClO al 30%. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* wt y la mutante *sbh1-1* fueron espolvoreadas con ayuda

de una espátula de metal sobre la superficie de las macetas. Una vez sembradas las semillas en las macetas, éstas se colocaron en una charola de plástico tapadas con un domo con el fin de conservar la humedad, posteriormente fueron colocadas en una cámara a 22°C con un fotoperiodo de 16 h de oscuridad/ 8 h de luz. Se regaron con una solución nutritiva llamada Hoagland cada tercer día.

6.2.c Crecimiento de las plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*.

Una vez germinadas las semillas de *Arabidopsis thaliana*, se dejaron crecer tres semanas, posterior a ello, las plántulas fueron trasplantadas a macetas con el sustrato previamente mencionado y se colocaron en cada maceta de 1 a 3 plántulas con ayuda de pinzas y espátulas de metal para separar cada una sin realizar algún daño y así poder enterrar la raíz en la tierra. Todas las macetas fueron colocadas en charolas de plástico y se cubrieron con un domo, posteriormente fueron colocadas en una cámara a 22°C con un fotoperiodo de 16 h de oscuridad/ 8 h de luz.

6.3 Cultivo de cepas bacterianas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta).

Las bacterias de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* se crecieron en medio B de King como medio base, suplementado diferencialmente con antibióticos: para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) con rifampicina (50 µg/mL) y tetraciclina (20 µg/mL), y para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 (*Pst* virulenta) únicamente rifampicina (50 µg/mL) (ver Apéndice) [Zipfel et al., 2004].

6.4 Exposición de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* wt y *sbh1-1* a FB1.

Una vez cultivadas las plántulas de *Arabidopsis* como se mencionó con anterioridad y con una edad de 3 semanas aproximadamente, éstas fueron asperjadas con un atomizador (estéril) con FB1 10 µM. A cada caja se le dieron 4 disparos. Los controles no se suplementaron con la toxina. La exposición de las cajas a FB1 se llevó a cabo en un tiempo de 12 h previas a la infección, transcurrido el tiempo con dicho tratamiento se continuó con la aspersión de

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

6.5 Exposición de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta).

La exposición de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* a las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) o de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) comprende desde la preparación de los cultivos bacterianos hasta su aspersión, como se describe a continuación.

6.5.a Fase de sembrado del precultivo bacteriano fresco preservado en LB más glicerol y luego sembrado por estría de agotamiento.

De la cepa original contenida en un tubo con medio LB/glicerol congelada a -70°C, se tomó una muestra bajo condiciones de esterilidad, es decir, con ayuda del mechero. Aquí se raspó con una punta estéril el tubo congelado tomando una muestra de la cepa y se colocó en un extremo de la caja, para que posteriormente con ayuda de un asa esterilizada se realice una estría por agotamiento y así obtener colonias aisladas. Después de la estría por agotamiento, la cepa original se regresó a las condiciones de congelación a -70°C, y se cubrió con Parafilm la orilla de la caja sembrada, ésto para evitar posibles contaminaciones. La caja se invirtió y se colocó en la incubadora a 29°C durante 36-48 h.

6.5.b Fase de purificación de la cepa previamente aislada.

Una vez que el precultivo ha crecido, se observó que las colonias aisladas presentaron una homogeneidad, se picaron una o dos colonias y se colocaron en otra caja en la cual se realizó una estría masiva, logrando un cultivo abundante el cual sirvió para realizar el inóculo que más adelante será detallado. Una vez que se realizó el estriado, la caja se volvió a tapar y se cubrió el borde con Parafilm, se invirtió y se incubó a una temperatura de 29°C por 36-48 h.

6.5.c Preparación del inóculo bacteriano.

Bajo condiciones de esterilidad, se colocaron aproximadamente 20 mL de MgCl₂ 10 mM estéril en un matraz Erlenmeyer (estéril) de 50 mL y con el asa previamente esterilizada se tomaron de la caja de dos a tres asadas del cultivo bacteriano y se introdujo el asa al matraz, en donde se frotó el contenido de la asada de cultivo en las paredes del matraz con la finalidad de que no haya daño al microorganismo, se agitó suavemente hasta obtener una suspensión homogénea.

Se tomó aproximadamente 1 mL de muestra de la suspensión resultante y se colocó en una celda de plástico para poder tomar la lectura de su absorbancia a una $\lambda = 600$ nm; el cultivo bacteriano se ajustó hasta la lectura de una absorbancia igual a 0.1 UDO, lo que corresponde a una concentración de 1×10^8 UFC/mL. Posteriormente, esta suspensión se diluyó [Zipfiel et al., 2004], tomando 1 mL de inóculo con 9 mL de MgCl₂ 10 mM estéril y se depositó en un atomizador (estéril), teniendo una nueva concentración de inóculo bacteriano igual a 1×10^7 UFC/mL, este paso se repitió para obtener la otra concentración de inóculo bacteriano empleado, el cual es igual a 1×10^6 UFC/mL.

6.5.d Condiciones de infección.

Con la finalidad de permitir una infección mayor, es decir, que más bacterias logren ingresar en los espacios intercelulares de la hoja de la plántula, al atomizador estéril, el cual ya contiene el inóculo bacteriano a la concentración deseada, se le añadieron 4 mL de una solución del detergente Silwet (0.01%) [Zipfiel et al., 2004]. Esta fue la solución que se roció a las cajas con las plántulas de *Arabidopsis thaliana* seleccionadas para el experimento (wt, *sbh1-1*).

La aspersión sobre cada una de las cajas con las plántulas fue de 10 a 12 disparos, lo que corresponde aproximadamente a un volumen total de 1 mL de inóculo bacteriano, manteniendo el atomizador a una distancia aproximada de 15 a 20 cm de altura de la caja, con la finalidad de que todas las plántulas quedaran rociadas por el mismo volumen. Las cajas asperjadas se envolvieron en plástico autoadherente con el fin de no tener posibles contaminaciones y se mantuvieron bajo fotoperiodo de 16 h de oscuridad/ 8 h de luz con una temperatura de 29°C durante el tiempo del experimento.

6.6 Determinación del crecimiento bacteriano.

Una vez expuestas las plántulas de *Arabidopsis thaliana* al patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta), se obtuvieron muestras por triplicado del cultivo de plántulas, con un peso total de entre 0.1 a 0.25 g de peso fresco aproximadamente.

Después de haber pesado las plántulas y de registrar los pesos en una tabla diseñada para dicha operación, cada una de las muestras fue lavada, primeramente con etanol al 70 % por 30 s y se dejó secar en una servitoalla, para posteriormente realizar el segundo lavado con agua estéril nuevamente por 30 s y se dejan secar [Zipfiel et al., 2004]. Inmediatamente, las plántulas se transfirieron a bolsas pequeñas de plástico (previamente rotuladas), de aproximadamente 10 cm de alto por 8 cm de ancho, procurando colocar la muestra de plántulas en la esquina del fondo de lado derecho, en donde se añadieron 400 μL de MgCl_2 10 mM (estéril) para llevar a cabo la trituración completa de los tejidos de la muestra con ayuda del pistilo de un mortero de porcelana. La fase de homogenización se llevó a cabo presionando alrededor de 26 veces la muestra con el pistilo.

Una vez que se realizó la trituración de la muestra se prepararon series de diluciones en tubos; en el primero se colocaron 800 μL de MgCl_2 10 mM y 200 μL de alícuota de la suspensión con el tejido macerado, la cual se tomó de la bolsa con una punta de micropipeta cortada, para que ésta no se obstruya de tejido vegetal y se colocó en el tubo; posteriormente se agitó con ayuda de un vórtex con la finalidad de homogeneizar la muestra. A partir de este tubo se realizó una serie de diluciones sucesivas, tomando alícuotas de 100 μL del tubo anterior y transfiriéndolas a otro tubo pero ahora con 900 μL de MgCl_2 10 mM hasta obtener un total de 5 tubos por muestra (equivalentes de diluciones de 1×10^7 o 1×10^6 a 1×10^3). Entre cada dilución es importante agitar vigorosamente con ayuda de un vórtex para que la alícuota sea homogénea.

Una vez concluidas las diluciones, se tomaron por triplicado, 5 μL de cada dilución (incluyendo la muestra contenida en la maceración) y se colocaron en una caja Petri desechable estéril, la cual contenía medio B de King como base,

suplementada con los antibióticos correspondientes a la cepa virulenta o avirulenta que se inoculó (dicho proceso debe llevarse a cabo bajo condiciones de esterilidad, por lo que es importante realizarlo en la campana de flujo laminar con la finalidad de que no haya contaminaciones en el conteo y se obtengan datos confiables).

Al terminar de colocar todas las alícuotas de la serie de diluciones en las cajas de Petri, se tuvo que esperar a que se secan por completo en la campana de flujo laminar, para que después fueran cubiertas las orillas con Parafilm, se invirtieron y se colocaron en la incubadora a 29°C por un periodo de 36-48 h. Después de dicho tiempo se realizó el conteo de colonias crecidas en cada una de las alícuotas sembradas (es importante tener en constante monitoreo el crecimiento de bacterias, para que no se obtengan datos erróneos, puesto que las colonias pueden crecer muy rápido alcanzando tamaños muy grandes que hacen colonias fusionadas que no se pueden contar).

Para finalizar, de cada muestra de plantas se tuvo un conteo por triplicado a los cuales se les realizó un tratamiento estadístico.

Debe tomarse en cuenta que todas las cajas con plántulas se mantienen en la cámara de incubación a 29°C, bajo fotoperiodo de 16 h de oscuridad/ 8 h de luz durante el periodo de experimentación.

6.7 Infiltración de las hojas adultas con MgCl₂, FB₁, a los patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta).

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de 10-14 semanas de edad con apariencia sana de la línea silvestre y la mutante *sbh1-1*. Se marcaron e infiltraron 15 hojas por planta por la parte media lateral derecha al revés, con aproximadamente 20 mL de las soluciones del tratamiento deseado (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos de infiltración utilizados en hojas adultas de *Arabidopsis thaliana*.

Tratamiento	Concentración
MgCl ₂	10 mM

FB ₁	10 µM
<i>Pst</i> avirulenta	1x10 ⁷ UFC/mL
<i>Pst</i> virulenta	1x10 ⁷ UFC/mL

6.7.a Determinación de Índice de Daño.

El progreso de la lesión o daño causado por los patógenos y la FB1 se evaluó de acuerdo al índice de daño, el cual se calculó asignando un valor conforme al tamaño e intensidad de la lesión producida por los patógenos o la FB1. Para ello, a la lesión en cada una de las hojas de la población infiltrada se le asignó un valor dentro de la escala mostrada en la Figura 7. Estos valores se sustituyeron en la ecuación de la cual se obtiene el índice de Daño.

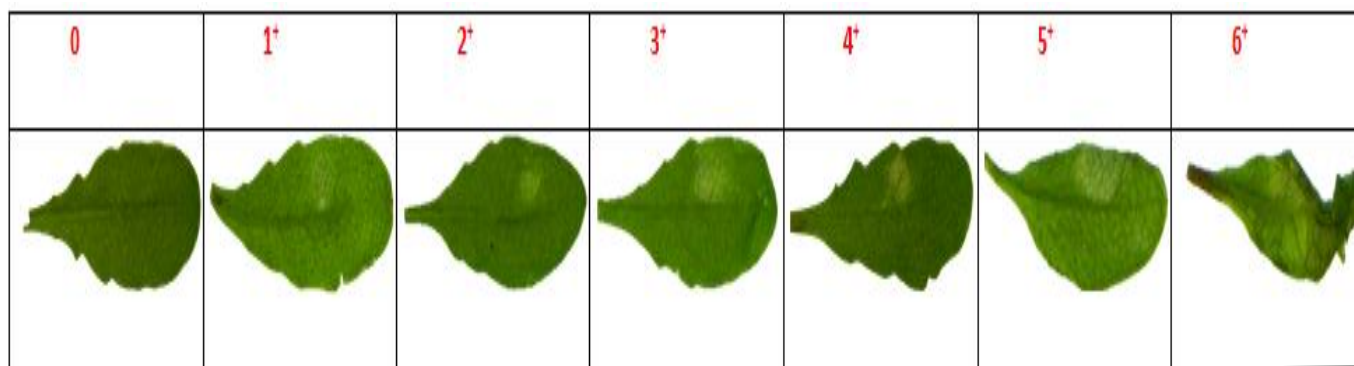


Figura 7. Escala que estima el Índice de Daño a través del grado de la lesión en hojas de *Arabidopsis thaliana* infiltradas con FB1 o *Pseudomonas syringae*. Los números indican el grado de progresión de la lesión en orden ascendente. Se muestran las fotografías representativas, las cuales ilustran el grado de la lesión que corresponde a cada punto de la escala.

El Índice de Daño se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$ID = \frac{(\#hojasgrado5 \times 5) + (\#hojasgrado4 \times 4) + (\#hojasgrado3 \times 3) + (\#hojasgrado2 \times 2) + (\#hojasgrado1 \times 1)}{\#total\ de\ hojas}$$

7. RESULTADOS

Para este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* en dos etapas de desarrollo, el primero corresponde a plántulas de 3 semanas de edad, las cuales fueron crecidas en cajas Petri, y el segundo corresponde a plantas adultas de 10-14 semanas de edad crecidas en macetas. Cada sistema presenta ventajas para evaluar la contribución de las BCL a los dos patrones de inmunidad más importantes en plantas.

El sistema de plántulas presenta las ventajas siguientes: el tiempo del crecimiento es menor, con lo cual se pueden hacer experimentos más frecuentemente; se logra tener un número mayor de individuos en menos espacio, pues se pueden crecer muchas plántulas en una caja de Petri. Sin embargo, si bien la respuesta de defensa se puede evaluar por el crecimiento bacteriano, en el fenotipo de las plántulas infectadas sólo se puede observar: clorosis, deshidratación o muerte de las plántulas. Una ventaja adicional del sistema de plántulas que fue fundamental en la realización de este trabajo es que se conoce la cinética de acumulación de BCL para el genotipo silvestre [Saucedo-García et al., 2011] y para el *sbh1-1* [Peer et al., 2010] a tiempos cortos, lo cual permite hacer correlaciones entre los niveles de estos compuestos y el crecimiento bacteriano. Todo ello permitió estudiar el crecimiento bacteriano en plántulas de las líneas wt y *sbh1-1* expuestas a la FB1 y luego infectadas con las cepas virulenta y avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* [Lozano, 2010].

El sistema de plantas adultas fue de gran utilidad para la observación de la respuesta tipo RH que presentan las plantas al infiltrar de manera directa en las hojas, a la FB1 y a los patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). Sin embargo, por razones técnicas, este modelo no permite hacer los experimentos de exposición tanto a la toxina como al patógeno en la misma hoja.

Para este trabajo, se obtuvieron los resultados que a continuación se presentan, los cuales están divididos en dos partes. La primera parte está enfocada en el análisis fenotípico de las plántulas y en la evaluación del crecimiento bacteriano a diferentes tiempos de muestreo en las diferentes condiciones. En la segunda parte

se presentan los resultados relacionados con el análisis fenotípico de las lesiones de plantas adultas ocasionadas por los tratamientos ya mencionados. Ambas formas de experimentos están enfocados a evaluar el papel que tienen las BCL en los dos tipos de inmunidad: PTI y ETI. Para ello, se usó a la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta), para evaluar la respuesta ETI, ya que este esquema de inmunidad se induce con la cepa avirulenta [Peer et al., 2010]. Para evaluar el esquema PTI se utilizó la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta).

7.1 Fenotipos de plántulas tipo silvestre y mutante *sbh1-1* expuesta a la FB1 y al patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta).

En la Figura 8 se presentan los fenotipos de las plántulas del genotipo wt a las 24 y 48 hpi con las cepas avirulenta y virulenta a una concentración de inóculo de 1×10^6 UFC/ mL.

Las plántulas wt con el tratamiento control (aspersión con $MgCl_2$) manifestaron características de completa integridad mencionadas en la Tabla 3B y por tanto presentaron un valor de grado de deterioro de 0 a las 24 y 48 hpi (Tabla 3C, Figura 16A). Para el caso de las plántulas infectadas con la cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* se presentó un grado de deterioro de 6 teniendo características de tipo severo, según la clasificación de la Tabla 3B desde las 24 hpi, el cual presentó un ligero incremento a un valor de 7 a las 48 hpi (Tabla 3C, Figura 16). En comparación, el deterioro tras la infección con la cepa virulenta de *Pseudomonas syringae* fue moderado, de 1 y 2 para 24 y 48 hpi, respectivamente (Tabla 3C, Figura 16A).

En la Figura 9 se presentan las plántulas del genotipo *sbh1-1* tras 24 y 48 hpi de exposición a los diferentes tratamientos. Con el tratamiento control ($MgCl_2$) las plántulas se mantuvieron en estado sano, como se había observado también con las plántulas wt. Con las cepas avirulenta y virulenta de *Pseudomonas syringae* a una concentración de inóculo de 1×10^6 UFC/ mL, las plántulas *sbh1-1*, manifestaron lesiones clasificadas como moderadas (Tabla 3B), ya que

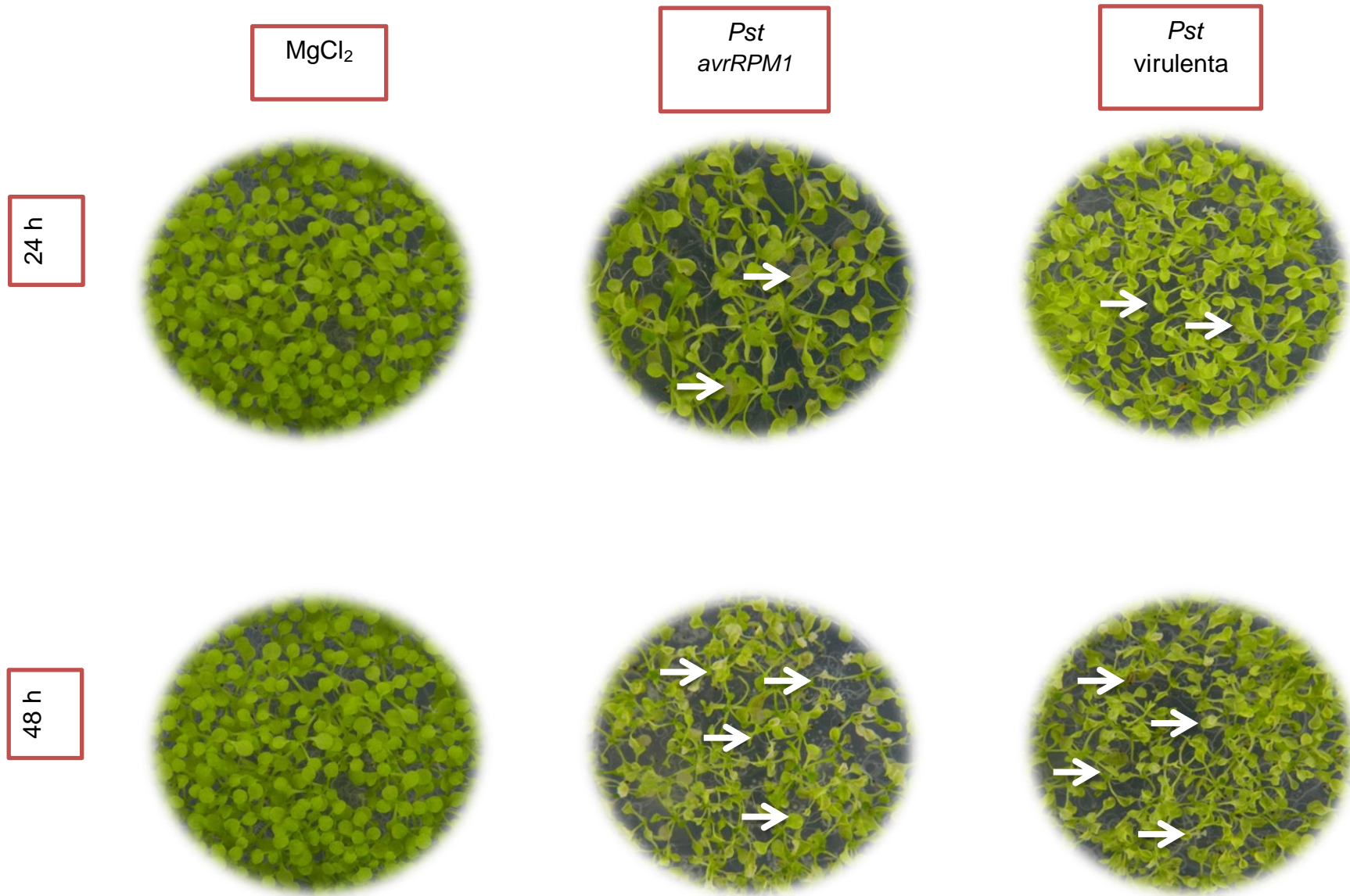


Figura 8. Efecto de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea wt. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con $MgCl_2$ 10 mM; la segunda columna representa a las plántulas las cuales fueron expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1×10^6 UFC/mL y la tercera columna representa a las plántulas que fueron infectadas con *Pst* DC3000 1×10^6 UFC/mL.

presentaron valores de deterioro de 2 y 3 a 24 y 48 hpi (Tabla 3C, Figura 16A) respectivamente para el caso de la infección con la cepa avirulenta, mientras que con la infección de la cepa virulenta, la mutante presentó valores de deterioro de 1 (Figura 16A) en sus respectivos tiempos de infección (24 y 48 hpi). Aquí macroscópicamente las plántulas de la mutante *sbh1-1* presentaron más resistencia ante la infección del patógeno, por lo que el grado de deterioro ocasionado por ambas cepas fue más discreto en comparación con el observado en las plántulas silvestres.

Con el fin de observar de forma más clara el grado de deterioro ocasionados tras la infección de las plántulas de ambos genotipos con ambas cepas, se aumentó la concentración del inóculo bacteriano a 1×10^7 UFC/ mL.

En la Figura 10 se presenta el registro fotográfico de las plántulas wt infectadas con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). Para las plántulas wt asperjadas con $MgCl_2$ a ambos tiempos de registro fenotípico presentaron un grado de deterioro de 0 (Figura 16B), es decir, las plántulas se encontraron sanas. Con la cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta), se observaron características macroscópicas correspondientes a una lesión moderada (Tabla 3B), ya que presentaron un grado de deterioro de 1 y 2 (Tabla 3C, Figura 16B) respectivamente, a los tiempos de muestreo (24 y 48 hpi). Para la infección con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta), las lesiones que presentaron las plántulas fueron de valor moderado (Tabla 3B), ya que el grado de deterioro alcanzado fue de 1 a las 24 hpi y 4 a las 48 hpi (Figura 16B). Estas características de daño en las plántulas se pueden derivar del ataque del patógeno y/o del proceso de muerte celular como mecanismo de defensa de la planta.

En la Figura 11 se presentan los fenotipos de las plántulas *sbh1-1* infectadas con el patógeno *Pseudomonas syringae* cepas avirulenta y virulenta a una concentración de inóculo de 1×10^7 UFC/ mL.

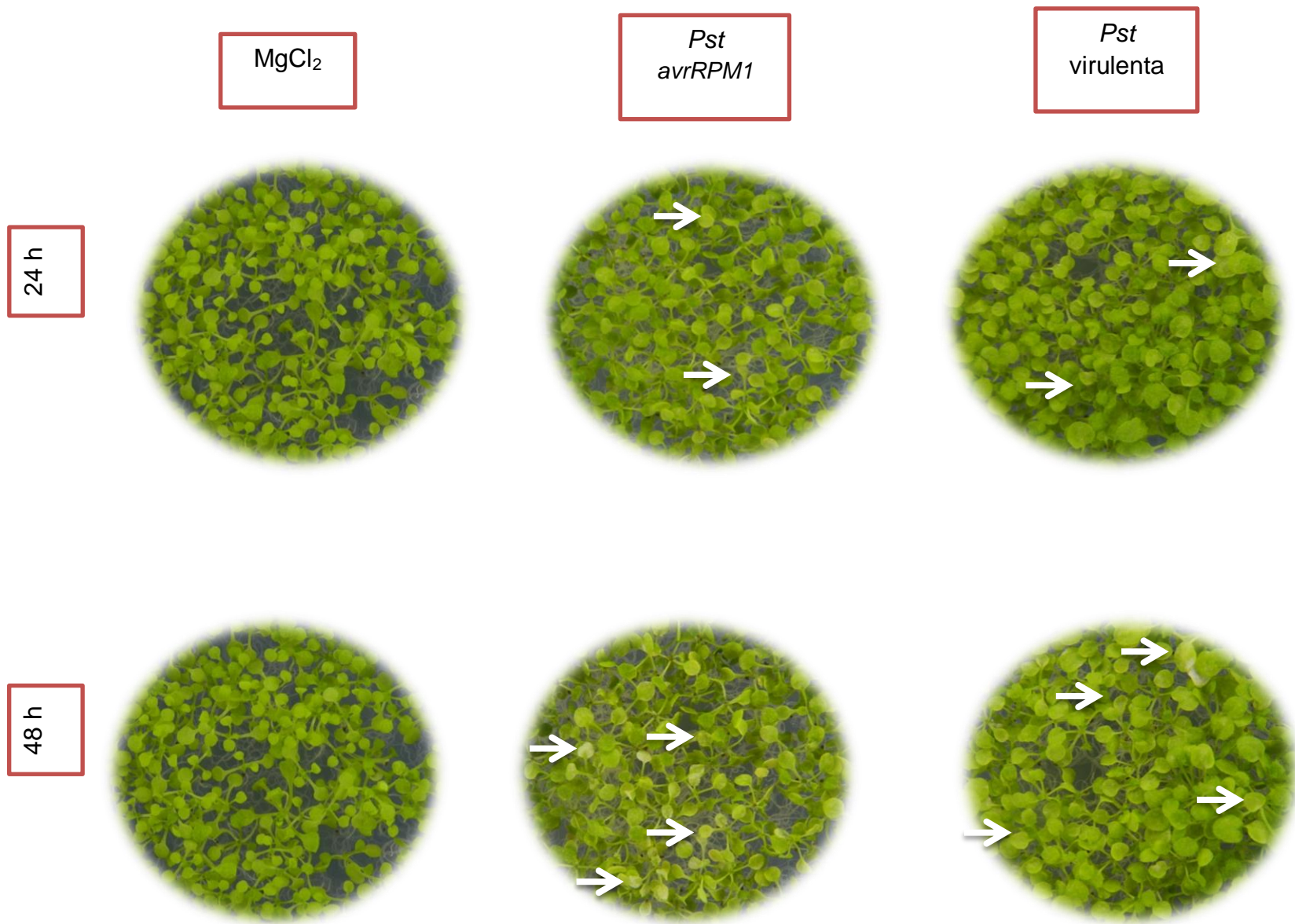


Figura 9. Efecto de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *sbh1-1*. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con MgCl₂ 10 mM; la segunda columna representa a las plántulas las cuales fueron expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1x10⁶ UFC/mL y la tercera columna representa a las plántulas que fueron infectadas con *Pst* DC3000 1x10⁶ UFC/mL.

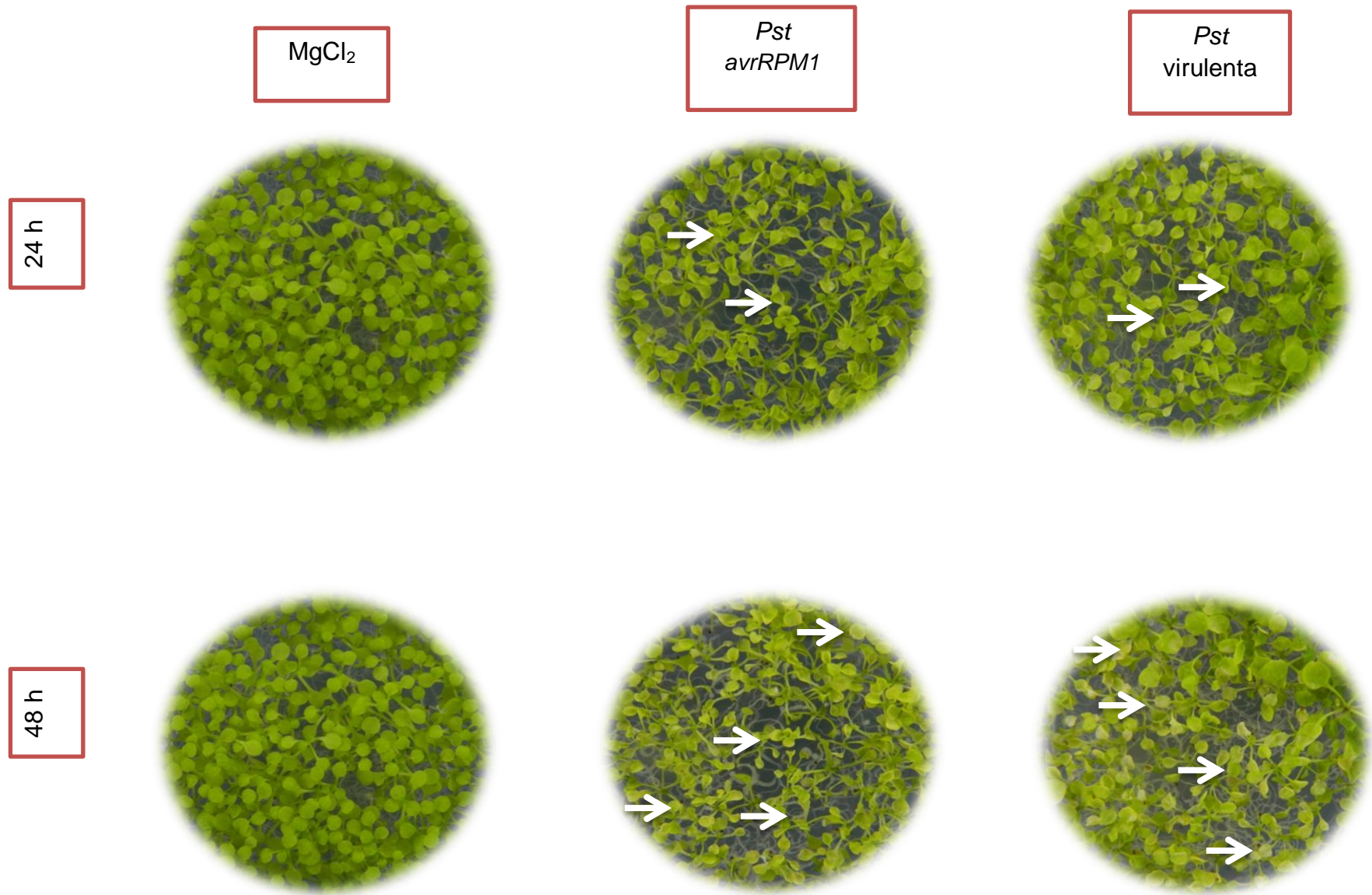


Figura 10. Efecto de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea wt. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con MgCl₂ 10 mM; la segunda columna representa a las plántulas las cuales fueron expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1x10⁷ UFC/mL y la tercera columna representa a las plántulas que fueron infectadas con *Pst* DC3000 1x10⁷ UFC/mL.

Para las plántulas *sbh1-1* expuestas a $MgCl_2$ (control), las características macroscópicas que se presentaron fueron plántulas sanas durante todo el tiempo del tratamiento. Se observó un grado de deterioro en las plántulas de 2 a las 24 hpi y de 8 a las 48 hpi con la infección de la cepa avirulenta (Tabla 3C, Figura 16B), manifestando lesiones moderadas a tiempos cortos, los cuales aumentaron a severas a tiempos más largos (Tabla 3B). También en la Tabla 3C se presentan los grados de deterioro de las plántulas *sbh1-1* infectadas ahora con la cepa virulenta de *Pseudomonas syringae*, en donde se muestra que el grado de deterioro aumentó de manera significativa de las 24 hpi a las 48 hpi con valores correspondientes de 4 a 8 (Figura 16B), con lo cual según la Tabla 3B se interpreta como plántulas que presentaron lesiones de tipo severas a tiempos cortos (24 hpi), las cuales aumentaron a moderadas a tiempos más largos después de la infección con el patógeno virulento.

En la Figura 12 se presentan los fenotipos para el genotipo wt, a las 24 y 48 hpi con la adición de FB1 más la infección con las cepas avirulenta y virulenta a una concentración de inóculo de 1×10^6 UFC/ mL.

En el control tratado con $MgCl_2$ se puede observar que el grado de deterioro fue 0, es decir (Figura 16A), las plántulas se mantuvieron sanas en todos los tiempos de registro fenotípico. En la Figura 12, también se presenta el efecto de la FB1, en el que el grado de deterioro tuvo valores de 1 a ambos tiempos de registro, o sea lesiones moderadas (Tabla 3B). La combinación de la FB1 y la infección con la cepa avirulenta presentó lesiones moderadas en las plántulas wt en ambos tiempos de registro, pero mostraron diferentes valores de grado de deterioro, ya que a las 24 hpi se observó un grado de deterioro con valor de 2, el cual aumentó de manera discreta a las 48 hpi, obteniendo un grado de deterioro de 5 (Tabla 3C, Figura 16A). Ahora con la combinación de la toxina FB1 más el patógeno de la cepa virulenta en ambos tiempos de registro fenotípico, se presentaron lesiones moderadas (Tabla 3B), pero el grado de deterioro fue diferente, dado que a las 24 hpi las plántulas wt presentaron un valor de 2, mientras que a las 48 hpi se obtuvieron valores de 4 (Tabla 3C, Figura 16A), presentando un discreto aumento en el grado de deterioro en relación a la exposición de la FB1 más el patógeno virulento.

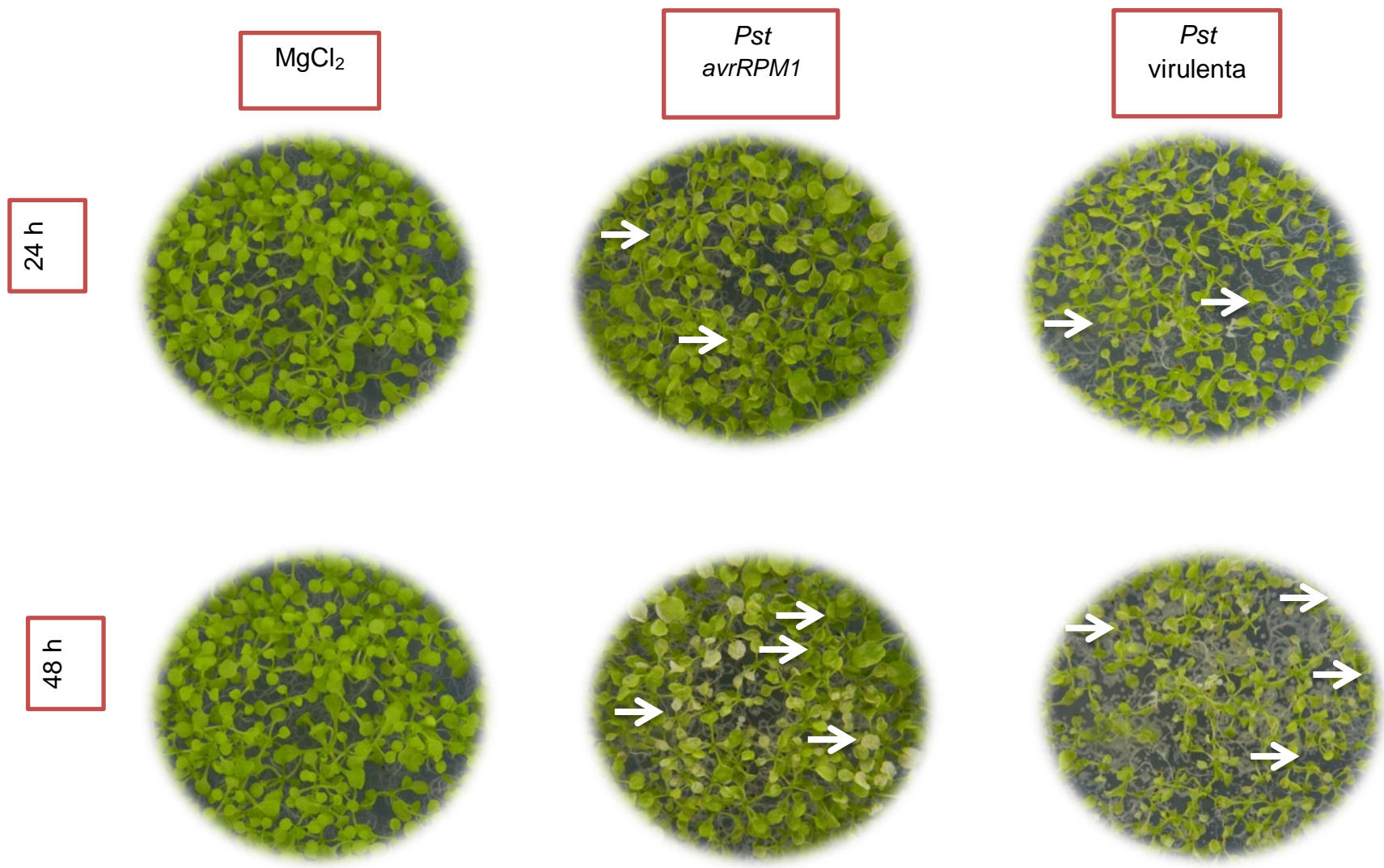


Figura 11. Efecto de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *sbh1-1*. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con MgCl₂ 10 mM; la segunda columna representa a las plántulas las cuales fueron expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1x10⁷ UFC/mL y la tercera columna representa a las plántulas que fueron infectadas con *Pst* DC3000 1x10⁷ UFC/mL.

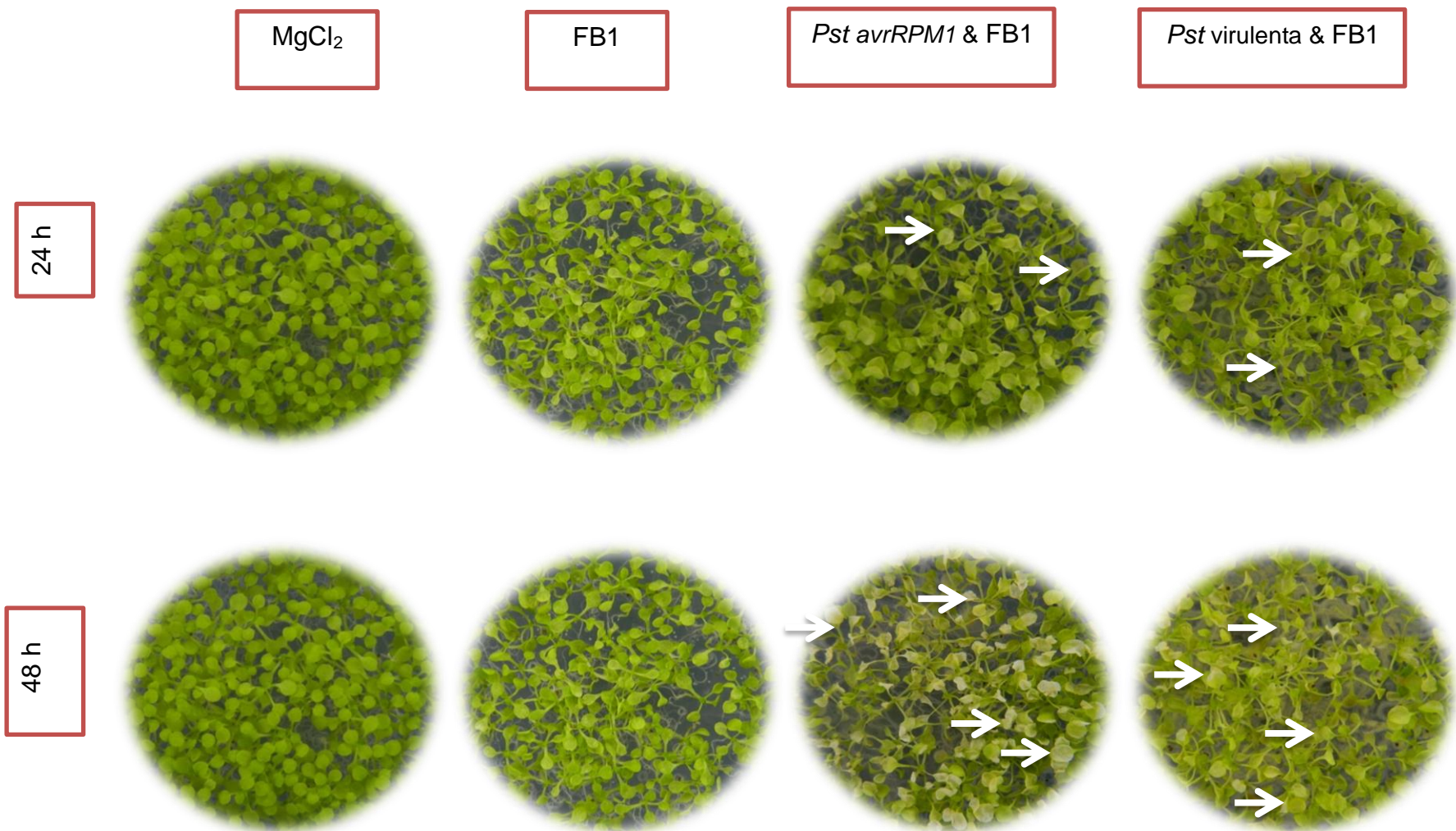


Figura 12. Efecto de la FB1 y de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea wt. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con MgCl₂ 10 mM; la segunda columna son plántulas que fueron únicamente expuestas con FB1 10 μM; la tercera columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1x10⁶ UFC/mL y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 1x10⁶ UFC/mL

En la Figura 13 se presentan los fenotipos para el genotipo *sbh1-1* a las 24 y 48 hpi con adición de FB1 más la infección con las cepas avirulenta y virulenta a una concentración de inóculo de 1×10^6 UFC/ mL.

En la primera columna se presenta el tratamiento de $MgCl_2$ que resultó inocuo en ambos tiempos de muestreo. En la siguiente columna se observa el segundo control, en el cual las plántulas están asperjadas únicamente con la toxina FB1; se pudo apreciar que las plántulas presentaron una apariencia sana a ambos tiempos de registro, por lo que a simple vista la FB1 no causa alguna perturbación en la mutante, ahora con la combinación del tratamiento de la FB1 más la infección con la cepa avirulenta a las 24 hpi produjo lesiones moderadas, las cuales se incrementaron de manera notoria a las 48 hpi, resultado letales (Tabla 3B y 3C y Figura 16 A). Para el caso de la FB1 y la cepa virulenta, el grado de deterioro y las características de las lesiones tuvieron un patrón muy similar al del tratamiento anterior.

En la Figura 14 se presenta el registro fotográfico para el genotipo wt a las 24 y 48 hpi con adición de la FB1 más la infección con las cepas avirulenta y virulenta de *Pseudomonas syringae* a una concentración de inóculo de 1×10^7 UFC/ mL.

El tratamiento con $MgCl_2$ presentó características de plántulas sanas a ambos tiempos de muestreo (grado de deterioro 0). Cuando las plántulas fueron asperjadas únicamente con FB1 presentaron un grado de deterioro de 1 con lesiones clasificadas como moderadas (Tabla 3B) para ambos tiempos de muestreo. En la siguiente columna se tiene el tratamiento con la FB1 y con el patógeno avirulento, en donde las plántulas a las 24 hpi presentaron un grado de deterioro con valor de 3 y lesiones moderadas, el cual tuvo un ligero incremento a las 48 hpi obteniendo un valor de 4 para el grado de deterioro con lesiones moderadas (Tabla 3B, Tabla 3C y Figura 16B). Finalmente se presenta el tratamiento con la toxina FB1 y la infección con la cepa virulenta, en donde se presentaron grados de deterioro similares al tratamiento anterior a ambos tiempos de registro (24 y 48 hpi). A tiempos cortos, macroscópicamente no se puede apreciar claramente la contribución de la FB1 a inducir a una muerte celular

programada, ya que la presencia de clorosis en hojas fue clasificada como moderada, es decir, con clorosis incipiente.

En la Figura 15 se presentan los fenotipos del genotipo *sbh1-1a* las 24 y 48 hpi con la adición de FB1 más la infección con el patógeno *Pseudomonas syringae* tanto de las cepas avirulenta como virulenta a una concentración de inóculo de 1×10^7 UFC/ mL.

Las plántulas que fueron asperjadas únicamente con $MgCl_2$ presentaron un grado de deterioro de 0 (Tabla 3C, Figura 16B). También se presentan las plántulas asperjadas únicamente con FB1, en donde se pudo apreciar que no presentaron lesiones para ambos tiempos de muestreo, es decir, presentaron un grado de deterioro de 0. En esta Figura también se presentan las plántulas tratadas con la toxina FB1 y la cepa avirulenta, observándose que el grado de deterioro fue moderado (2) a ambos tiempos de registro (Tabla 3C, Figura 16B). Para el tratamiento con FB1 y la infección con la cepa virulenta, las lesiones que presentaron las plántulas durante todo el tiempo de registro se caracterizaron como letales, pues el grado de deterioro para ambos tiempos alcanzó valores de 10 (Tabla 3C, Figura 16B).

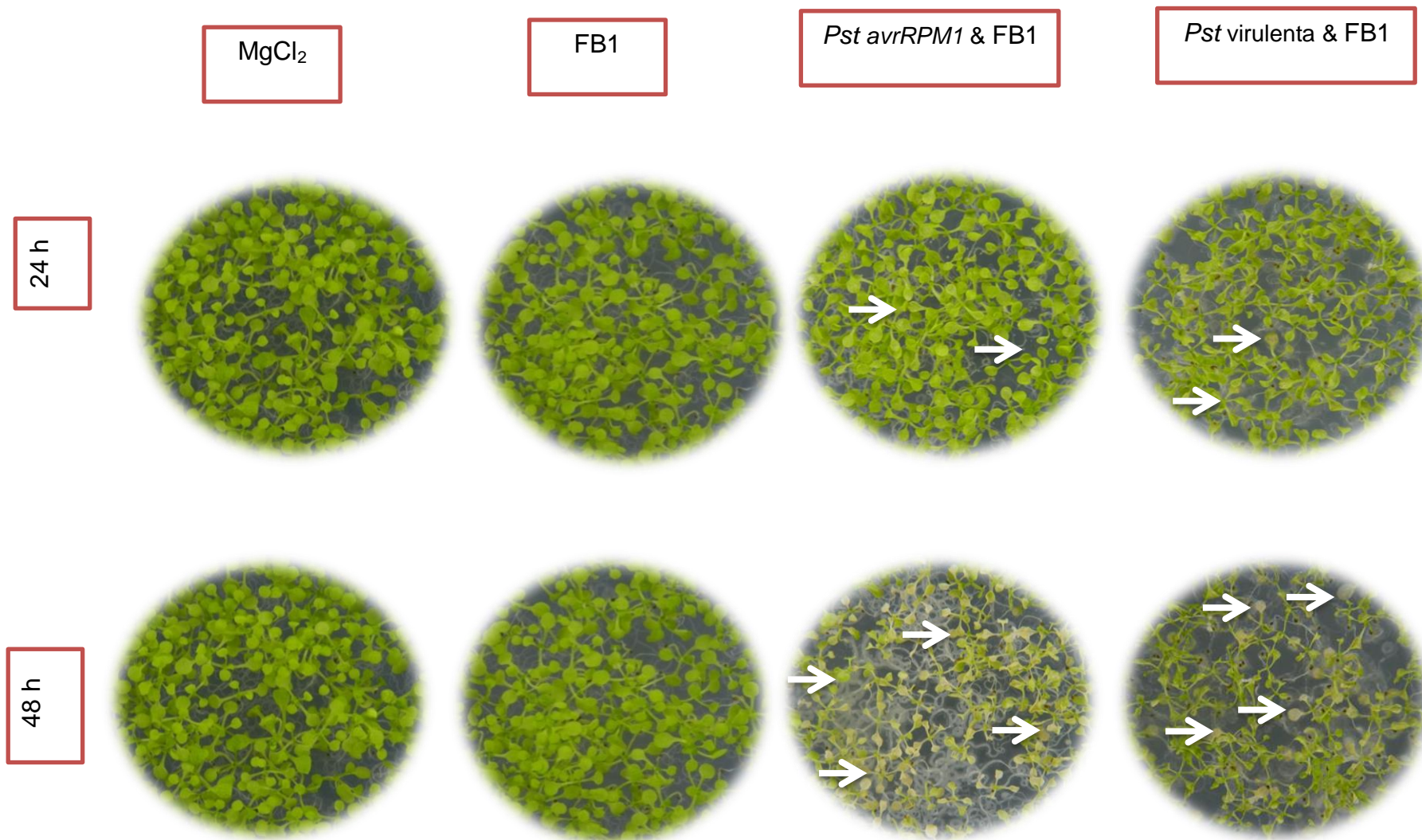


Figura 13. Efecto de la FB1 y de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *sbh1-1*. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con MgCl₂ 10 mM; la segunda columna son plántulas que fueron únicamente expuestas con FB1 10 μM; la tercera columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1x10⁶ UFC/mL y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 1x10⁶ UFC/mL

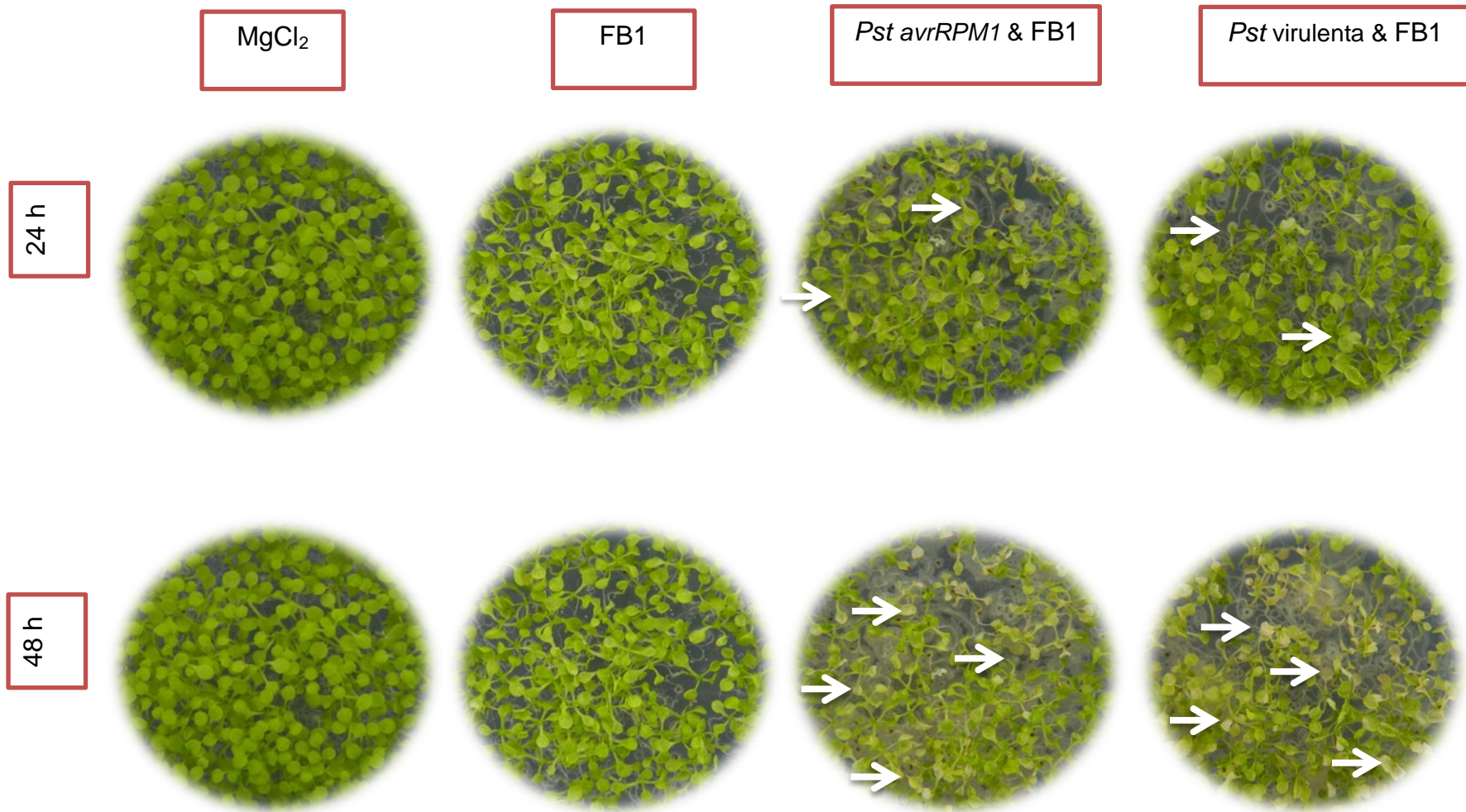


Figura 14. Efecto de la FB1 y de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea wt. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con MgCl₂ 10 mM; la segunda columna son plántulas que fueron únicamente expuestas con FB1 10 μM; la tercera columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1x10⁷ UFC/mL y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 1x10⁷ UFC/mL

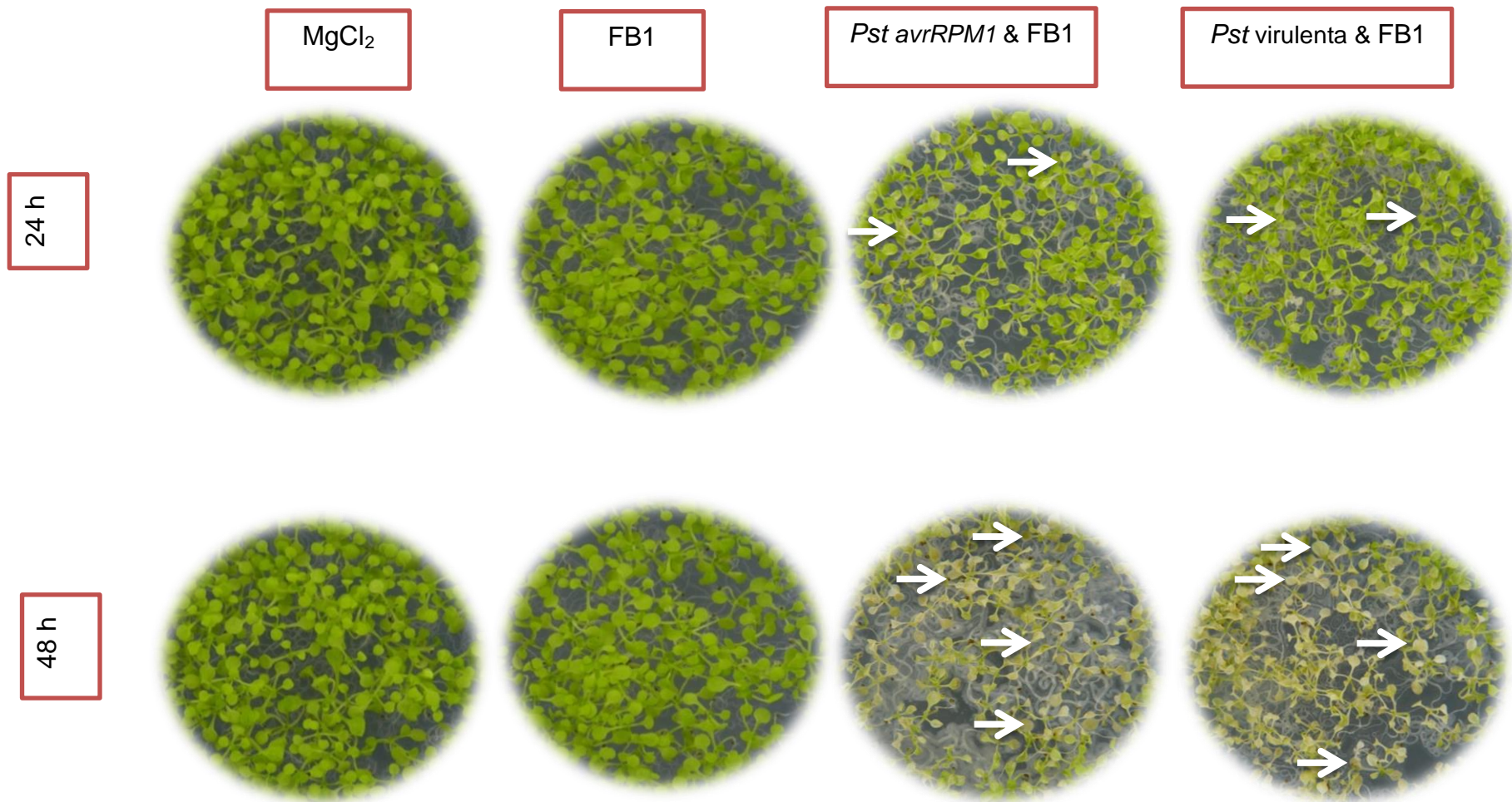


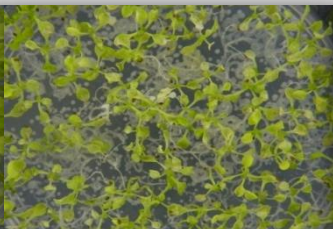
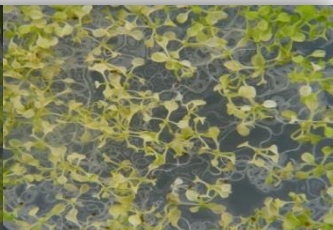


Figura 15. Efecto de la FB1 y de los patógenos *Pst* DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en el fenotipo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *sbh1-1*. Para cada condición se emplearon plántulas de 3 semanas de edad. En la primera columna de izquierda a derecha se presenta el control, el cual fue asperjado con MgCl₂ 10 mM; la segunda columna son plántulas que fueron únicamente expuestas con la la FB1 10 μM; la tercera columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 *avrRPM1* 1x10⁷ UFC/mL y la cuarta columna representa a las plántulas tratadas con FB1 10 μM 12 h previas y luego expuestas a la infección con *Pst* DC3000 1x10⁷ UFC/mL.

7.2 Grado de deterioro de las plántulas provocado por los tratamientos con FB1, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta).

Todos los fenotipos fueron analizados de acuerdo al grado de deterioro que presentaron tras el tratamiento. En la Tabla 3A se muestran los estadios de las plántulas al pasar por diferentes grados de deterioro que van desde el control, con un fenotipo saludable, hasta el grado letal. Estos fenotipos fueron obtenidos de la aplicación de los diferentes tratamientos y seleccionados de acuerdo a su grado de intensidad en cuatro fases que van de desde el saludable hasta el letal. Estos fenotipos se describieron de acuerdo a las características fenotípicas que involucran el tamaño y apariencia de las plántulas, asignándoseles valores numéricos (Tabla 3B). De acuerdo a lo anterior, se asignaron los grados de deterioro a las plántulas tratadas con FB1 y desafiadas con los patógenos avirulento y virulento (Tabla 3C).

Tabla 3. A) Plántulas con diferente grado de deterioro producido por cualquiera de los tratamientos. B) Descripción de los tratamientos anteriores y asignación de valores de daño. C) Asignación de grado de deterioro a cada genotipo, tratamiento y tiempo de exposición.

	Control	Moderado	Severo	Letal
A				
B	0	1 a 5 (moderado)	6 a 8 (severo)	9 y 10 (letal)
	Peciolos erguidos	Peciolos ligeramente alargados	Peciolos alargados e inclinados	Peciolos adelgazados y cloróticos
	Hojas muy verdes	Hojas verde pálido (clorosis incipiente)	Hojas con tamaño reducido y de color amarillento *Aumento de hojas blancas (clorosis media)	Hojas de color blanco y café (clorosis moderada)
	Población uniforme y densa	Población disgregada	Población disminuida	Población escasa

wt

C

1×10^6 UFC/mL

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
<i>Pst avrRPM1</i>	6	7
<i>Pst virulenta</i>	1	2

1×10^7 UFC/mL

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
<i>Pst avrRPM1</i>	1	2
<i>Pst virulenta</i>	1	4

sbh1-1

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
<i>Pst avrRPM1</i>	2	3
<i>Pst virulenta</i>	1	1

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
<i>Pst avrRPM1</i>	2	8
<i>Pst virulenta</i>	4	8

wt

1×10^6 UFC/mL

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
FB1	1	1
FB1+ <i>Pst avrRPM1</i>	2	5
FB1+ <i>Pst virulenta</i>	2	4

1×10^7 UFC/mL

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
FB1	1	1
FB1+ <i>Pst avrRPM1</i>	3	4
FB1+ <i>Pst virulenta</i>	3	4

sbh1-1

1×10^6 UFC/mL

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
FB1	0	0
FB1+ <i>Pst avrRPM1</i>	1	9
FB1+ <i>Pst virulenta</i>	3	9

1×10^7 UFC/mL

	24 h	48 h
MgCl ₂	0	0
FB1	0	0
FB1+ <i>Pst avrRPM1</i>	2	2
FB1+ <i>Pst virulenta</i>	10	10

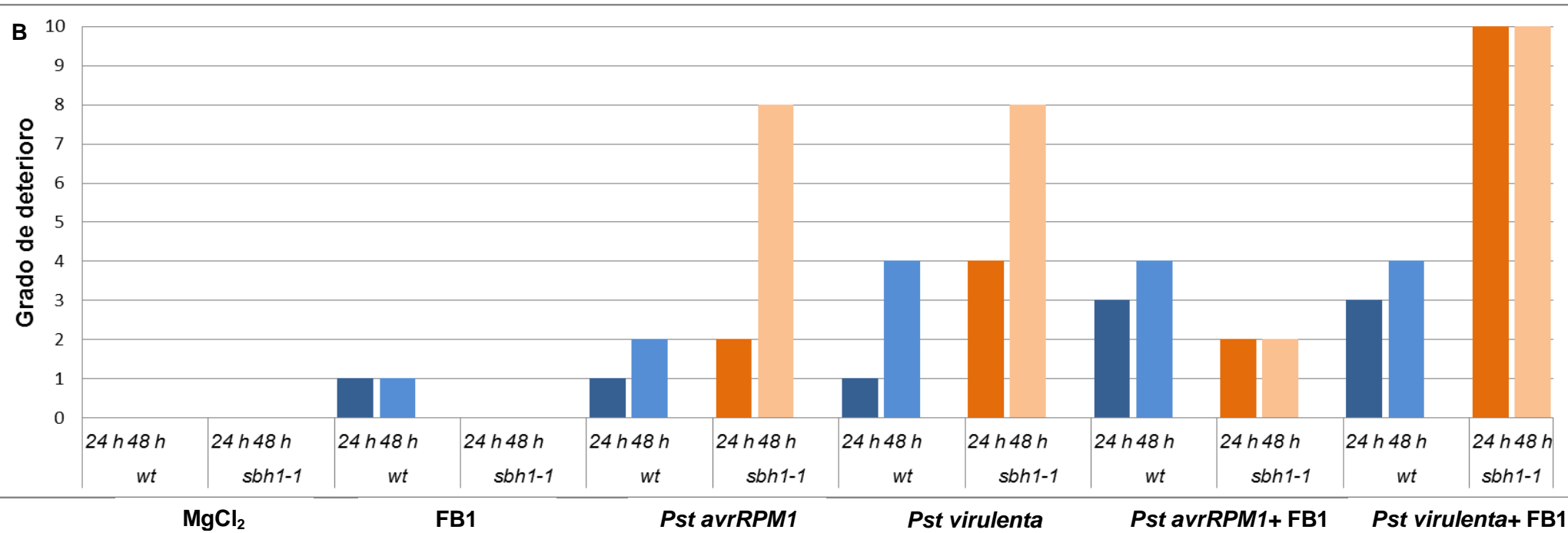
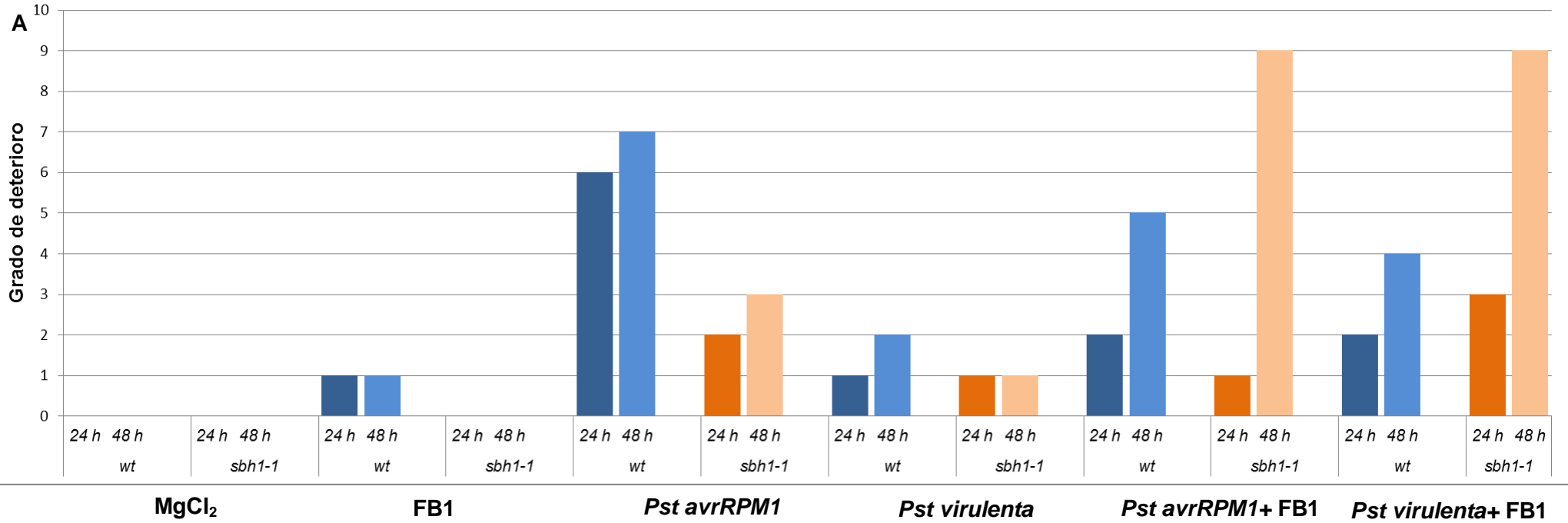


Figura 16. Estimación del grado de deterioro en plántulas de *Arabidopsis thaliana* asperjadas con FB1 y/o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst avirulenta*) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst virulenta*) empleando un inóculo de 1×10^6 (gráfica A) 1×10^7 UFC/mL (gráfica B). La escala evalúa el grado de progresión de las lesiones en orden ascendente. Cada barra representa los valores de las mediciones con 15 hojas.

7.3 Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre y *sbh1-1*.

En la Figura 17 se muestran los resultados del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* a las 24 y 48 hpi, utilizando una concentración de inóculo de 1×10^6 UFC/ mL. En el caso de las plántulas silvestres, el crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta presentó un aumento discreto pero significativo de las 24 a las 48 hpi de exposición al patógeno, mientras que para la línea *sbh1-1*, el crecimiento de las bacteria avirulenta se mantuvo constante de las 24 hasta las 48 hpi.

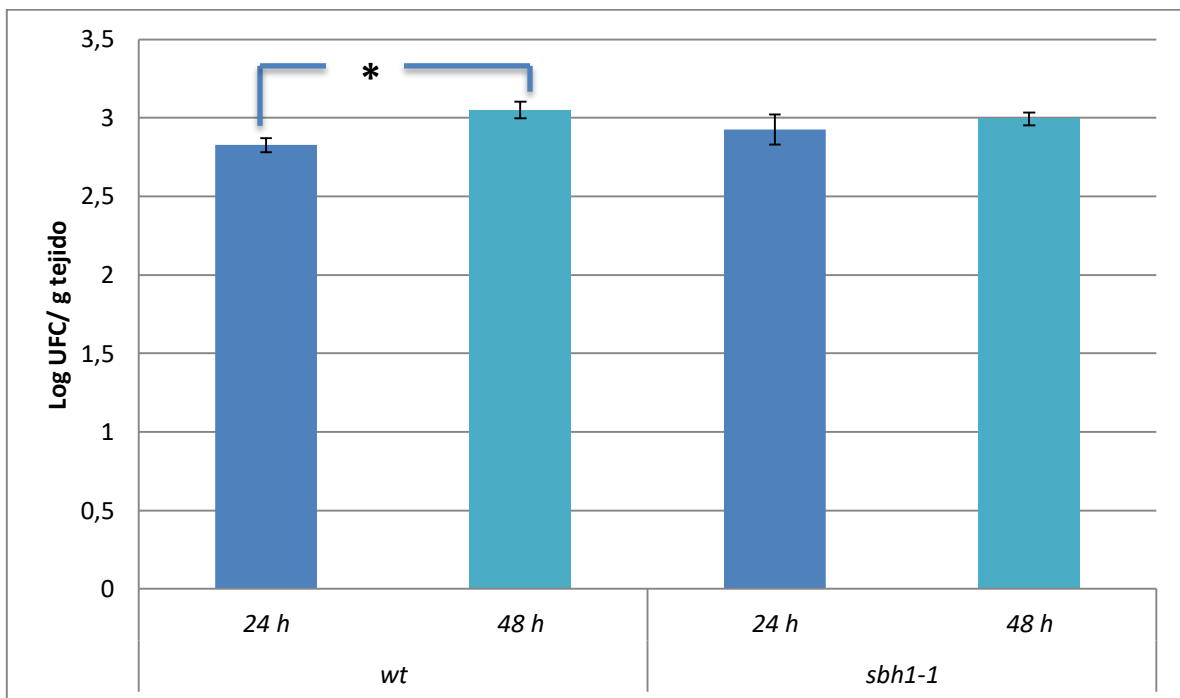


Figura 17. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron asperjadas con un inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, los asteriscos indican las diferencias significativas entre las barras en las que están situados.

En la Figura 18 se observa el crecimiento bacteriano a las 24 y 48 hpi con la cepa virulenta utilizando una concentración de inóculo de 1×10^6 UFC/ mL. Para las plántulas wt, la proliferación bacteriana de la cepa virulenta no presentó ningún cambio significativo a ambos tiempos de muestreo. Este comportamiento lo sostuvieron las plántulas *sbh1-1*, por lo que se puede considerar que la cepa virulenta alcanzó valores máximos de crecimiento bacteriano por lo menos desde las 24 hpi y por ello las plántulas de ambos genotipos no pueden operar de manera eficiente sus mecanismos de inmunidad aunque los expresen.

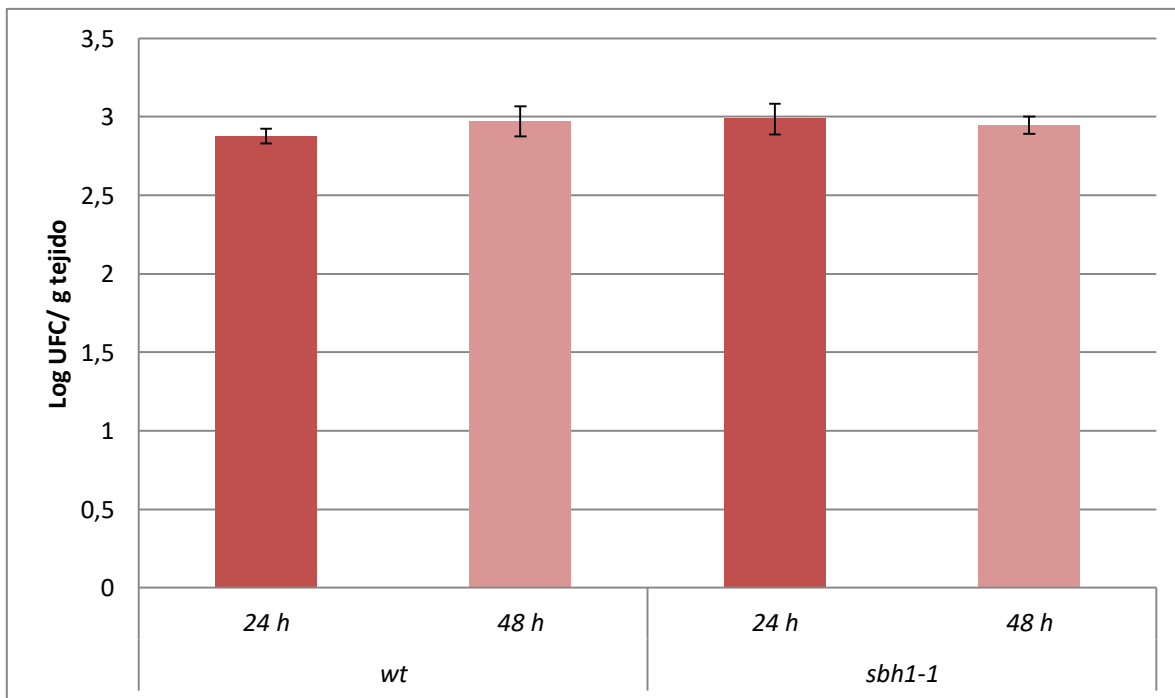


Figura 18. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. A las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* se les aplicó la aspersión del inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

En la Figura 19 se evaluó el crecimiento bacteriano a las 24 y 48 hpi con la cepa avirulenta utilizando una concentración de inóculo de 1×10^7 UFC/ mL. Se puede observar que la proliferación bacteriana de la cepa avirulenta tanto para el genotipo silvestre como para la mutante *sbh1-1* presentó un incremento discreto pero significativo de las 24 a las 48 hpi.

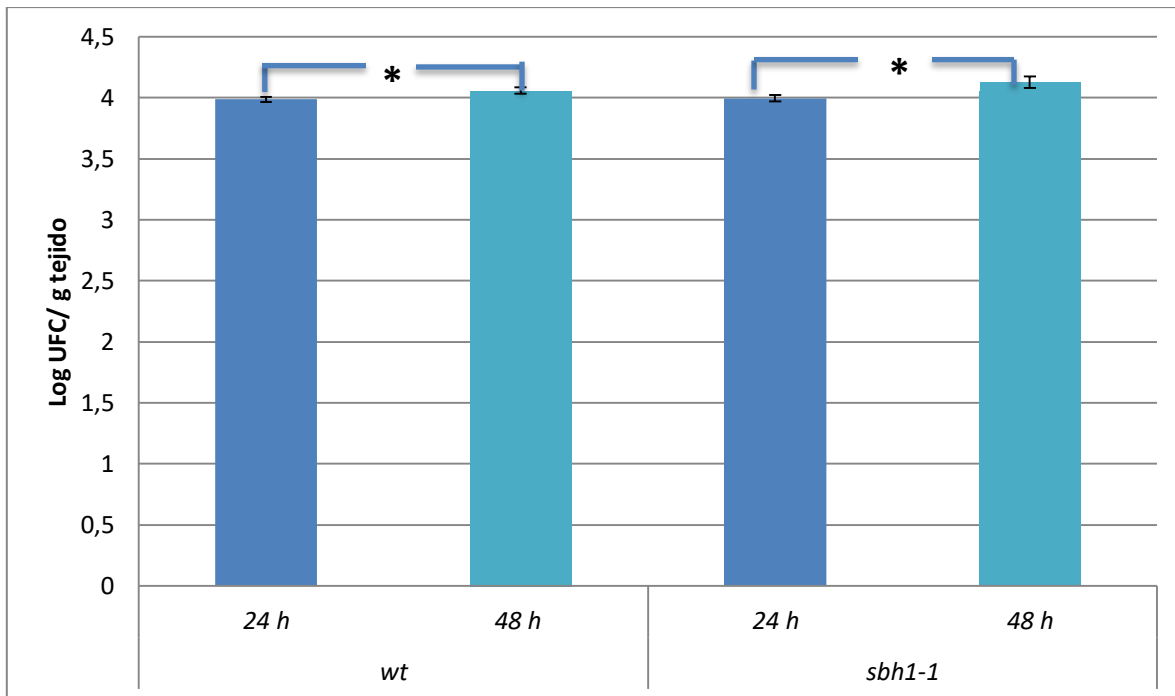


Figura 19. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. A las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* se les aplicó la aspersion del inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst avirulenta*). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, los asteriscos indican las diferencias significativas entre las barras en las que están situados.

En la Figura 20 se evaluó el crecimiento bacteriano a las 24 y 48 hpi con la cepa virulenta utilizando una concentración de inóculo de 1×10^7 UFC/ mL. Se puede observar que la proliferación bacteriana de la cepa virulenta para ambos genotipos fue similar su crecimiento bacteriano durante ambos tiempos de muestreo, además la población bacteriana alcanzada en planta fue una unidad logarítmica mayor.

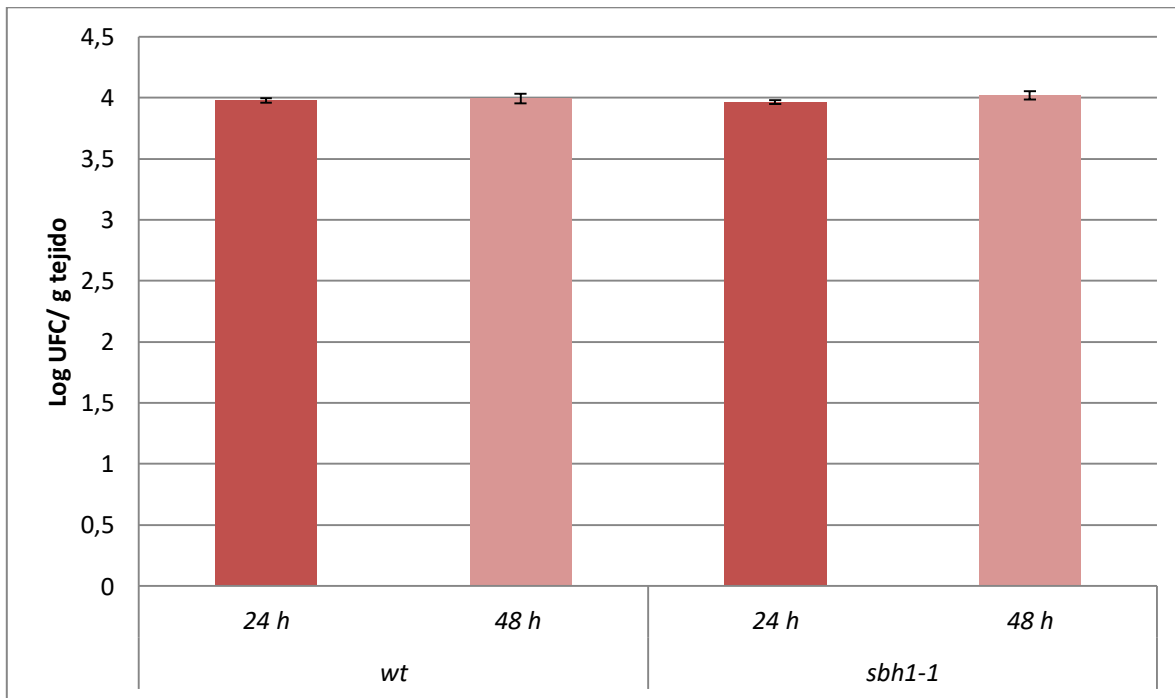


Figura 20. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. A las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* se les aplicó la aspersion del inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

7.4 Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cepas DC3000 *avrRPM1* y *Pst* DC3000 en condiciones de acumulación de BCL (adición de la FB1).

Los siguientes experimentos fueron diseñados para inducir farmacológicamente la acumulación de las BCL endógenas (por la adición de FB1), y ver este efecto en el crecimiento bacteriano de los patógenos avirulento y virulento en las plántulas y infectadas. Con ello se buscaba evidenciar el papel de las BCL en los dos diferentes tipos de inmunidad inducida por las dos cepas bacterianas.

Para estos experimentos de crecimiento bacteriano en las plántulas wt y *sbh1-1* se realizó la exposición previa con FB1 (12 h), para inducir la acumulación de BCL endógena y posteriormente se realizó la infección con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) o con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) [Lozano, 2010].

En la Figura 21 se observa que tanto para el genotipo wt como *sbh1-1*, el crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta (1×10^6 UFC/ mL) pre tratada con la FB1 fue el mismo a ambos tiempos de muestreo, encontrándose que la adición de la FB1 no contuvo la proliferación bacteriana del patógeno avirulento.

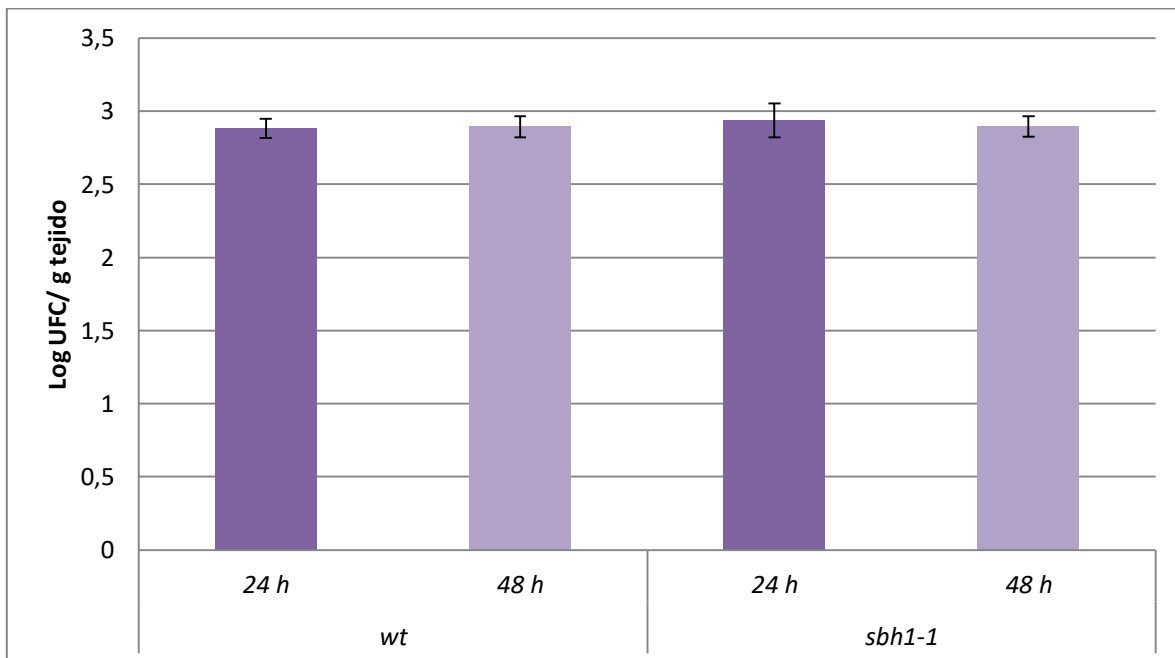


Figura 21. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron expuestas a la toxina FB1 por 12 h y enseguida se les asperjó el inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

En la Figura 22 se observa que para las plántulas wt, el crecimiento bacteriano de la cepa virulenta con previa exposición a la FB1 no presentó una reducción en la proliferación del patógeno virulento, mientras que para las plántulas *sbh1-1* sí hubo una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento bacteriano del patógeno virulento con la FB1 a las 48 hpi, por lo que aquí se observa el papel que tiene la FB1 como inductor en los mecanismos de defensa en las plantas.

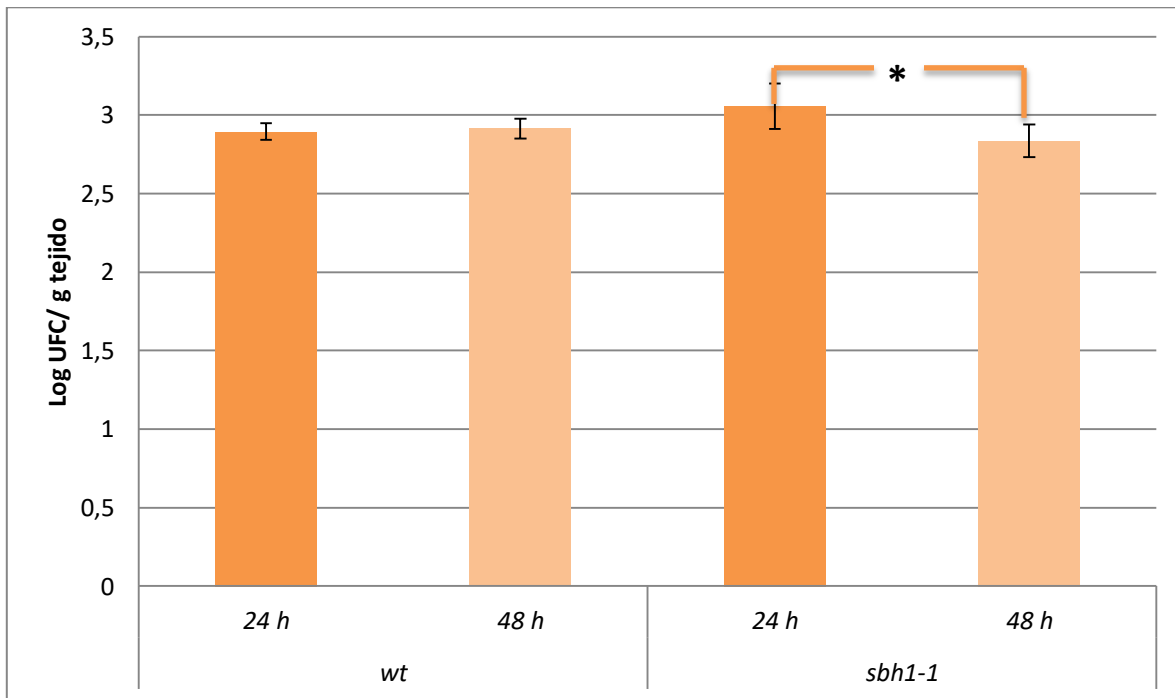


Figura 22. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron previamente expuestas por 12 h a la toxina FB1 y enseguida se les aplicó la aspersión del inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

Se realizó el mismo experimento usando un inóculo más concentrado, 1×10^7 UFC/mL. Se observa en la Figura 23 que el genotipo wt al ser expuesto primero a la FB1 y luego a la cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* no presentó una diferencia significativa en el crecimiento bacteriano de 24 a 48 hpi, este comportamiento fue muy parecido en el genotipo *sbh1-1*, ya que al igual que la wt, no presentó cambios en el crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta entre las 24 y las 48 hpi.

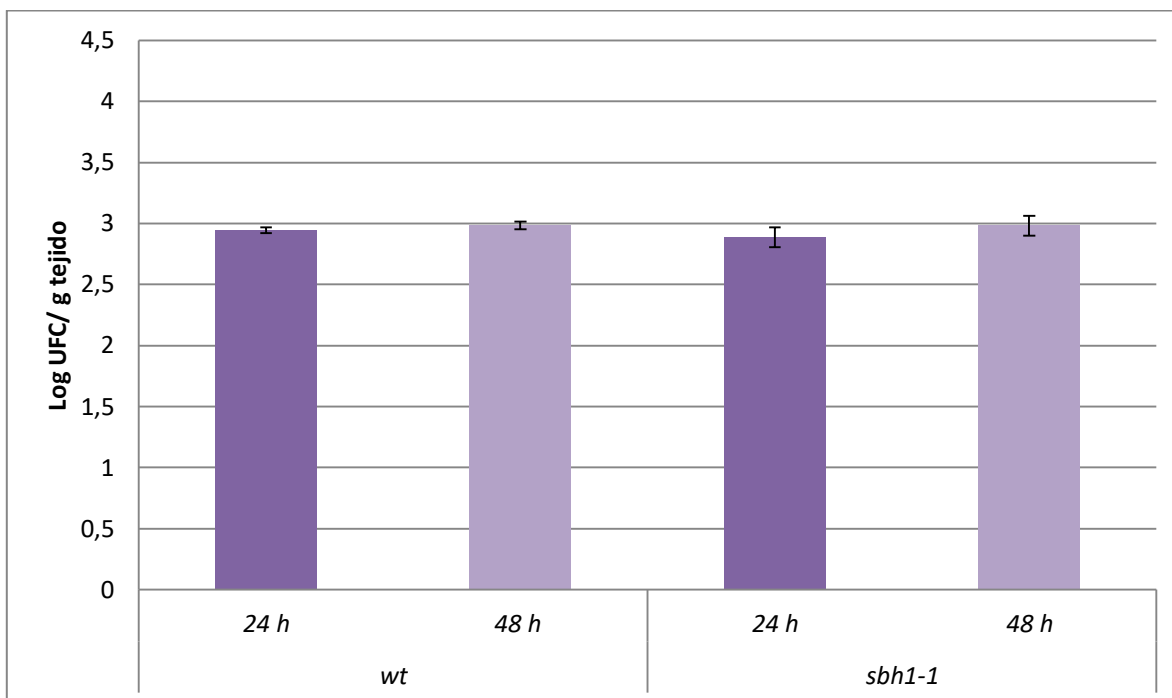


Figura 23. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron previamente expuestas por 12 h a la toxina FB1 y enseguida se les aplicó la aspersión del inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

En la Figura 24 se observa que tanto para el genotipo wt como para la mutante *shb1-1* no se presentó una reducción significativa en el crecimiento bacteriano del patógeno *Pseudomonas syringae* cepa virulenta con la adición previa de la FB1 en ambos tiempos de muestreo (24 y 48 hpi).

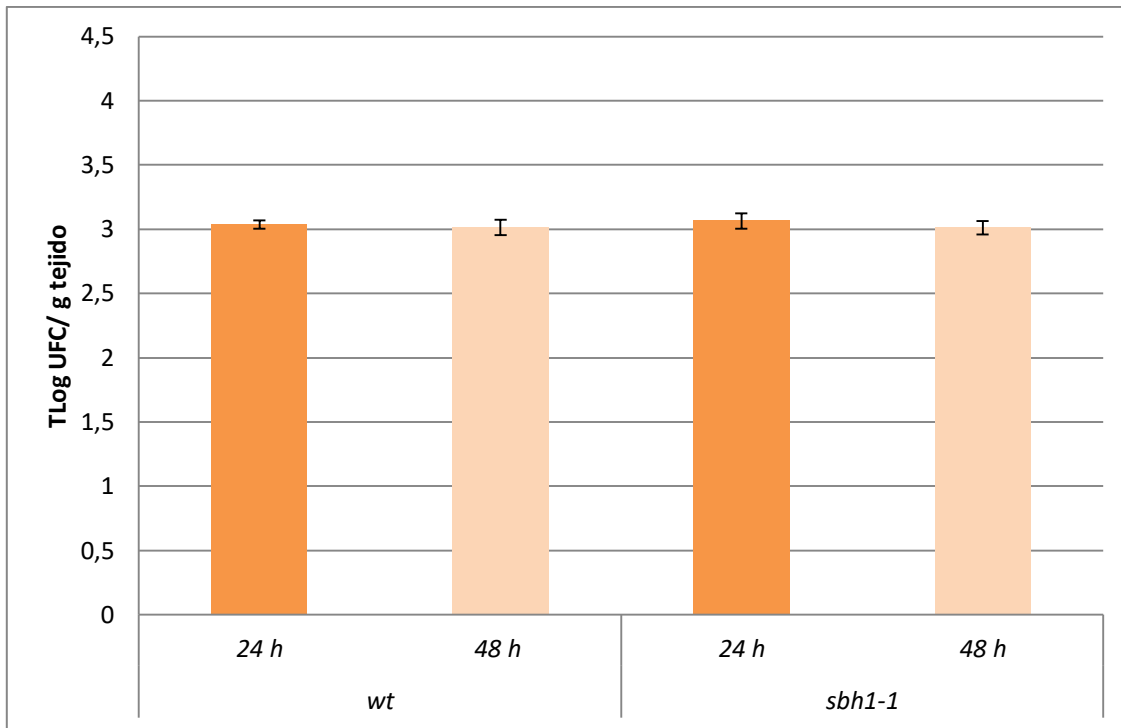


Figura 24. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *shb1-1* fueron previamente expuestas por 12 h a la toxina FB1 y enseguida se les aplicó la aspersión del inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 y 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

7.5 Integración de los resultados de crecimiento bacteriano en los dos genotipos y en todas las condiciones.

Los experimentos ya descritos en las Figuras 17, 18, 21 y 22 fueron graficados de manera conjunta para poder visualizar mejor las diferencias entre las plántulas de los dos genotipos, la infección con las cepas avirulenta y virulenta y el tratamiento previo con la FB1 a las 24 hpi (Figura 25) y 48 hpi (Figura 26) con un inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/ mL.

En la Figura 25 se muestran los resultados del crecimiento bacteriano a las 24 hpi empleando un inóculo de 1×10^6 UFC/ mL. A este tiempo, la línea wt presentó un crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta de 6.6×10^2 UFC/ g de tejido. Cuando las plántulas fueron tratadas con la FB1 previamente a la infección con el patógeno avirulento, el crecimiento bacteriano no presentó una reducción, sino que tuvo valores iguales a los del control. Con respecto al crecimiento de la cepa virulenta en la wt, el crecimiento de este patógeno mostró valores muy similares (7.4×10^2 y 7.7×10^2 UFC/ g de tejido) en las condiciones sin y con FB1 respectivamente. Estos niveles de crecimiento fueron también similares a los observados con la cepa avirulenta.

Con respecto a los mismos experimentos pero con la mutante *sbh1-1*, los resultados fueron prácticamente los mismos a los obtenidos con las plantas del genotipo silvestre. Se determinó un crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta muy similar en el control y con la FB1 (8.3×10^2 y 8.5×10^2 UFC/ g de tejido) respectivamente. Este comportamiento se repitió con el patógeno virulento en el control y con FB1 (9.5×10^2 y 1.1×10^3 UFC/ g de tejido). Y si bien pareció que la proliferación de la cepa virulenta fue ligeramente mayor con y sin FB1, esa diferencia no resultó ser estadísticamente significativa.

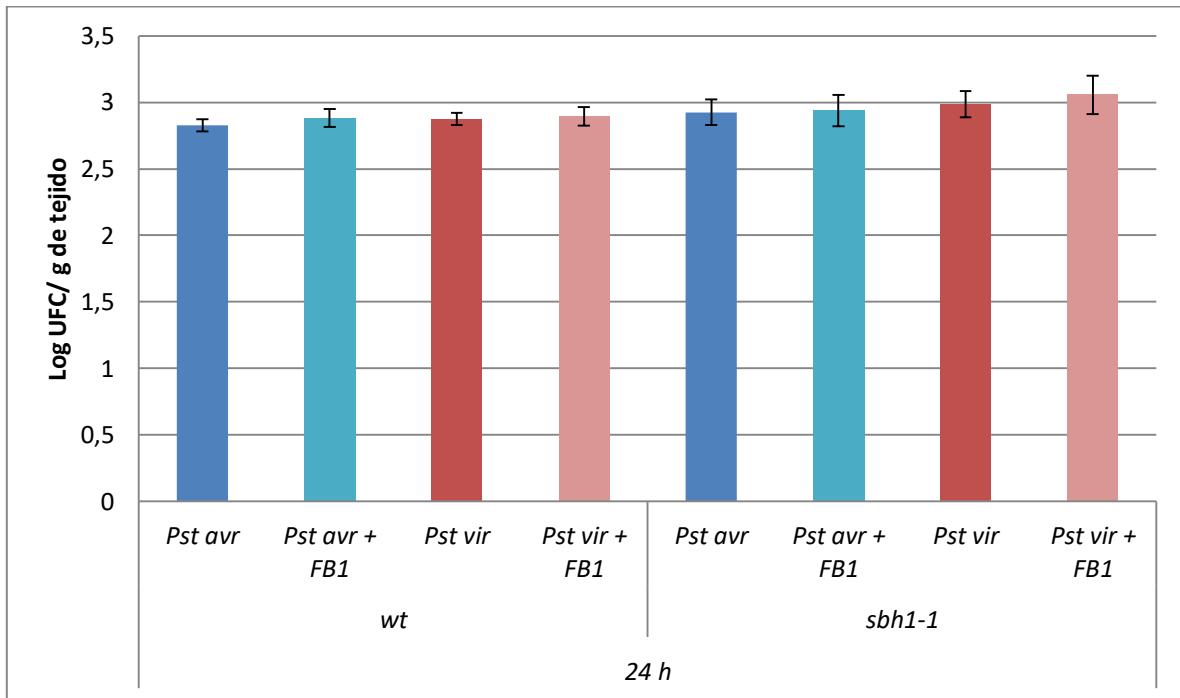


Figura 25. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron expuestas a la toxina FB1 previamente por 12 h y enseguida se les aplicó la aspersión del inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

En la Figura 26 se muestran los resultados del crecimiento bacteriano a las 48 hpi utilizando el mismo inóculo de 1×10^6 UFC/ mL. A diferencia de los experimentos a las 24 hpi, a 48 hpi, sí se observaron diferencias pequeñas pero significativas, en el crecimiento bacteriano entre las diferentes condiciones. La línea wt presentó un crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta de 1.0×10^3 UFC/ g de tejido y cuando las plántulas fueron tratadas con la FB1 previamente a la infección con el patógeno, el crecimiento bacteriano presentó una discreta reducción, pero estadísticamente significativa. Con respecto al crecimiento de la cepa virulenta en la wt, el crecimiento de este patógeno mostró valores de 9.3×10^2 UFC/ g de tejido, mientras que el crecimiento con el tratamiento previo de la FB1, el patógeno creció 8.1×10^2 UFC/ g de tejido, por lo que con la FB1 se presentó una reducción significativa y similar al de la cepa avirulenta.

La mutante *sbh1-1* presentó un crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta de 9.7×10^2 UFC/ g de tejido, y al igual que con el genotipo wt, también se presentó una reducción en el crecimiento bacteriano con la adición previa de la FB1 (7.7×10^2 UFC/ g de tejido). Para el caso del crecimiento de la cepa virulenta, se obtuvieron valores de 8.7×10^2 UFC/ mL, mientras que con la adición de la FB1, se presentó una ligera pero significativa reducción del crecimiento bacteriano, dado que los valores obtenidos fueron 6.7×10^2 UFC/ mL.

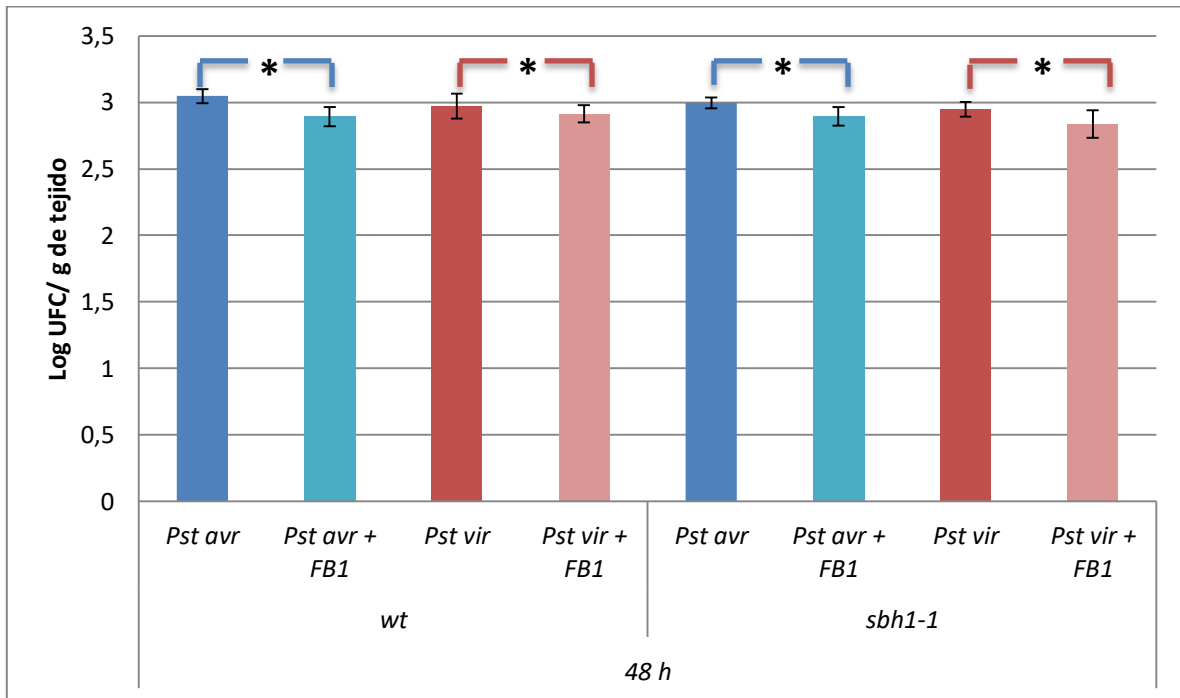


Figura 26. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron expuestas a la toxina FB1 previamente por 12 h y enseguida se les aplicó la aspersion del inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst avirulenta*) o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst virulenta*). El crecimiento bacteriano se determinó a las 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

A continuación se presentan los resultados de los experimentos descritos en las Figuras 19, 20, 22 y 24, los cuales fueron graficados de manera conjunta para poder analizar mejor las diferencias entre las plántulas wt y *sbh1-1*, la infección con las cepas avirulenta y virulenta y el tratamiento previo con la FB1 a las 24 hpi (Figura 27) y 48 hpi (Figura 28) con un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/ mL.

En la Figura 27 se muestran los resultados del crecimiento bacteriano a las 24 hpi empleando un inóculo de 1×10^7 UFC/ mL. A este tiempo, las plantas del genotipo wt presentaron un crecimiento bacteriano de la cepa avirulenta de 9.5×10^3 UFC/ g de tejido, sin embargo, cuando las plántulas fueron tratadas con la FB1 previamente a la infección con el patógeno, el crecimiento bacteriano resultó ser una orden de magnitud menor en comparación con el control (sin la toxina), siendo estadísticamente significativa la diferencia entre estas condiciones. Con respecto al crecimiento de la cepa virulenta en la wt se observó que el crecimiento bacteriano en el control (barra rojo fuerte) fue de 9.3×10^3 UFC/ g de tejido y que con el tratamiento de FB1 (barra rojo claro) hay una reducción en el crecimiento bacteriano de una unidad logarítmica y es estadísticamente significativa.

Para la mutante *sbh1-1* el crecimiento bacteriano en ambas cepas (avirulenta y virulenta) sin y con FB1 presentó un comportamiento similar al de la wt, ya que las plántulas que no fueron expuestas a la FB1 alcanzaron valores análogos de crecimiento bacteriano a los de los controles de la wt, mientras que las plántulas a las cuales sí se les asperjó previamente la FB1, mostraron una reducción del crecimiento bacteriano de una unidad logarítmica en comparación a sus controles, tal y como se observó en las plántulas wt.

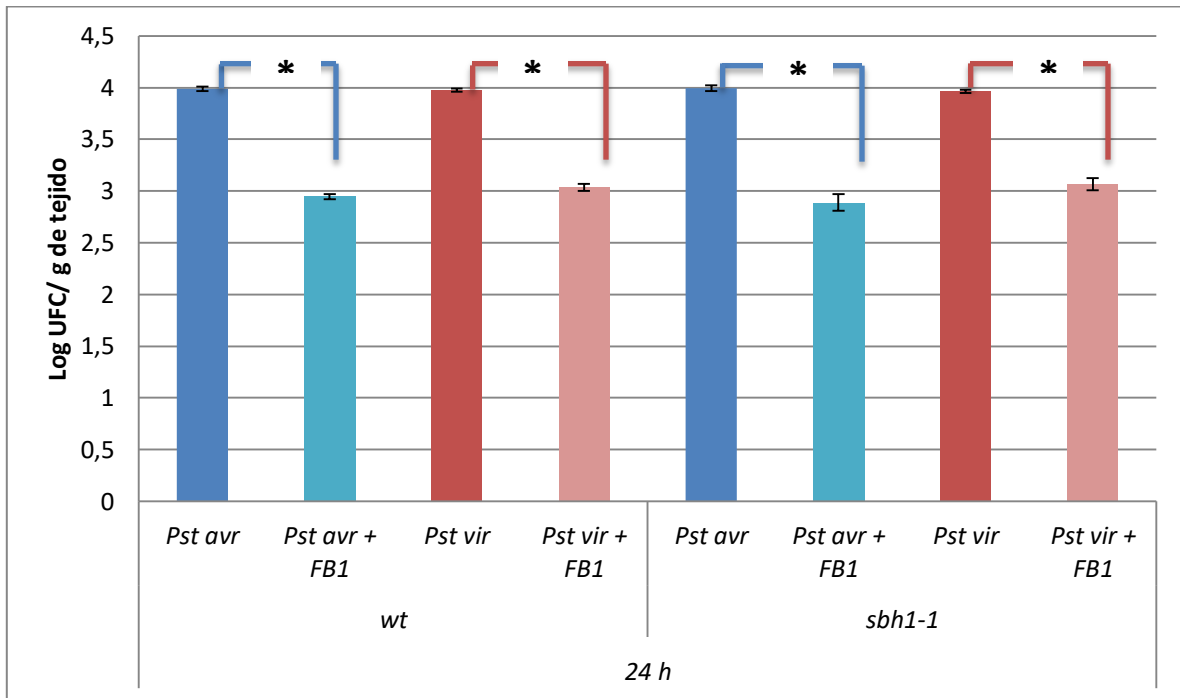


Figura 27. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron expuestas a la toxina FB1 previamente por 12 h y enseguida se les aplicó la aspersión del inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst avirulenta*) o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst virulenta*). El crecimiento bacteriano se determinó a las 24 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

En la Figura 28 se muestran los resultados del crecimiento bacteriano a las 48 hpi empleando un inóculo de 1×10^7 UFC/ mL. El patrón general de crecimiento de las dos cepas en los dos genotipos, fue el mismo que el observado a las 24 hpi. A este tiempo, en la wt la proliferación de la cepa avirulenta (barra azul fuerte) alcanzó valores de 1.1×10^4 UFC/ g de tejido, mientras que con la adición a la FB1 (barra azul claro) el crecimiento bacteriano disminuyó de manera significativa hasta dos unidades logarítmicas. Ahora, para el crecimiento de la cepa virulenta se observó que para el control (barra rojo fuerte) se alcanzaron valores de 9.7×10^3 UFC/ g de tejido, mientras que con la adición de la FB1, los niveles de la proliferación del patógeno virulento disminuyeron de manera drástica (una unidad logarítmica) en comparación con su control.

Para el genotipo *sbh1-1* se observó una tendencia similar en el crecimiento bacteriano de ambas cepas (avirulenta y virulenta) sin y con FB1, es decir, que la exposición previa a la FB1, promovió una disminución del crecimiento bacteriano en comparación de sus controles, tanto para el patógeno avirulento como del virulento.

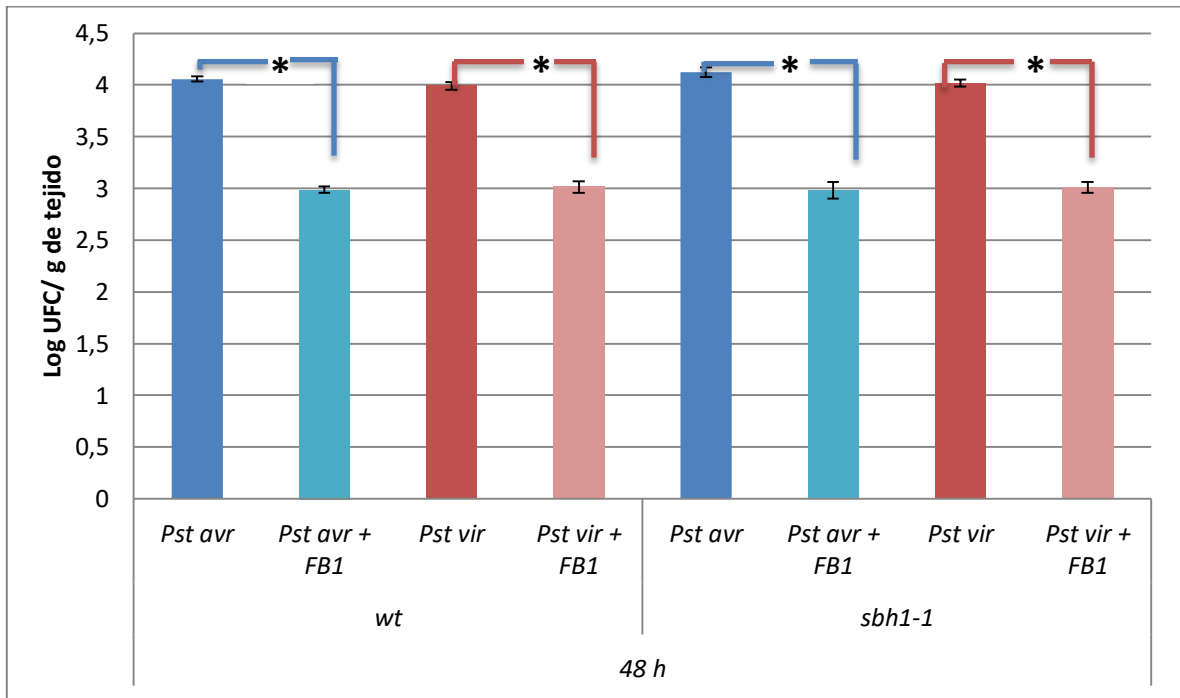


Figura 28. Crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con exposición previa a la FB1. Las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* fueron expuestas a la toxina FB1 previamente por 12 h y enseguida se les aplicó la aspersión del inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst avirulenta*) o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst virulenta*). El crecimiento bacteriano se determinó a las 48 hpi. Se muestran los promedios \pm ES, n= 9. Los datos se trataron con la prueba estadística ANOVA con $\alpha=0.05$, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de crecimiento.

7.6 Fenotipos e Índice de Daño de hojas de plantas adultas wt y *sbh1-1* expuestas a FB1 o a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta).

Con estos experimentos se evaluó la temporalidad y la magnitud del daño ocasionado por la muerte celular del tejido foliar, en respuesta a la infección localizada por las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *Pst* avirulenta o *Pst* virulenta.

Se infiltraron hojas de plantas adultas con una solución de $MgCl_2$ (control), FB1, el patógeno avirulento o el patógeno virulento. Después de transcurridos los tiempos de infiltración (1, 2, 3, 4 y 7 d), en cada tratamiento se realizó la observación de 15 hojas provenientes de tres plantas. Para realizar la evaluación del daño producido se calculó el Índice de Daño (ID). Este se calculó a partir del establecimiento de una escala conformada por hojas con grados sucesivos de daño, desde el mínimo hasta el máximo observados y se asignó un valor a cada grado de daño, correspondiendo el mayor daño a un mayor valor numérico. Con base en esta escala, se analizó el total de la población de hojas para cada tratamiento y se otorgó un valor numérico a cada hoja de acuerdo al grado de daño observado. Los valores se sustituyeron en una ecuación que considera el número de hojas afectadas con cada grado de daño con respecto al número total de hojas infiltradas, obteniéndose así el grado de daño. En la Figura 7 se presenta la escala de índice de daño. En las Figuras 29 y 30 se describe la morfología de las lesiones, los otros registros fenotípicos de las lesiones se encuentran en el Apéndice 2 (A1., A2. y A3.) y en la Figura 32 se presenta la estimación cuantitativa de la magnitud de las lesiones.

En la Figura 29 se presenta el registro fotográfico de hojas representativas de *Arabidopsis thaliana* a 4 días post-infección con los diferentes tratamientos que se emplearon para la determinación de Índice de Daño. Las hojas de las plantas wt y de la mutante *sbh1-1* que fueron infiltradas con MgCl₂ (control) no presentaron ninguna lesión, en contraste, a este tiempo se apreció un ligero daño en la wt con el tratamiento de FB1, que fue más notorio en la mutante *sbh1-1*, que presentó una lesión clorótica y una deshidratación en la zona de infiltración. En la infección con la cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta), las hojas de ambas líneas presentaron lesiones discretas, pero con la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta), las lesiones fueron de mayor magnitud en ambos genotipos. Estas lesiones presentaron características similares, como tejido deshidratado y una coloración amarillenta en el lugar de infección.

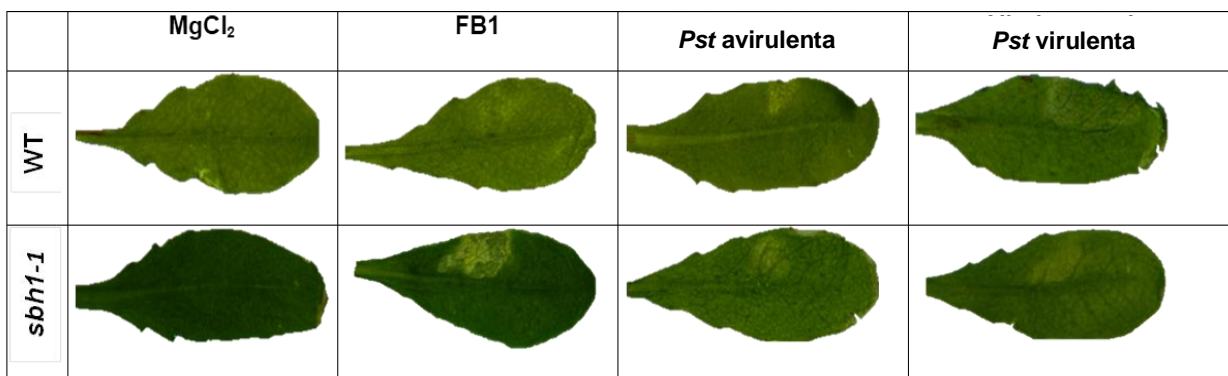


Figura 29. Efecto de la FB1 y las cepas avirulenta y virulenta en hojas de *Arabidopsis thaliana* adultas. Las hojas de *Arabidopsis thaliana* genotipos wt y *sbh1-1* fueron infiltradas con MgCl₂ (10 mM) como control, FB1 (10 µM), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) 1x10⁷ UFC/ mL o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) 1x10⁷ UFC/ mL. Las imágenes fueron obtenidas a los 4 dpi. Se muestra una imagen representativa de 15 hojas infiltradas.

En la Figura 30 se presentan los registros fotográficos de hojas representativas de *Arabidopsis thaliana* en un muestreo a un tiempo más largo (7 días post-infección). Aquí se pudo observar que las hojas de ambas líneas infiltradas con MgCl₂ no presentaron ningún daño, pero al infiltrar con FB1 la lesión tanto en la wt como en la *sbh1-1* presentó clorosis (*sbh1-1*) y deshidratación (wt). Por otra parte, las hojas infiltradas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) presentaron una contención del patógeno en ambas líneas con relación al tiempo 4 dpi, ya que la lesión que presentaron fue mínima, además de que no se presentó deshidratación en las hojas. El daño ocasionado por el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) fue más evidente en la mutante *sbh1-1*, ya que presentó mayor área de la hoja con coloración amarilla y deshidratación en comparación con la wt. Sin embargo, ambos genotipos contuvieron al patógeno virulento a los 7 dpi, ya que presentaron menor daño a este tiempo en comparación con los 4 dpi.

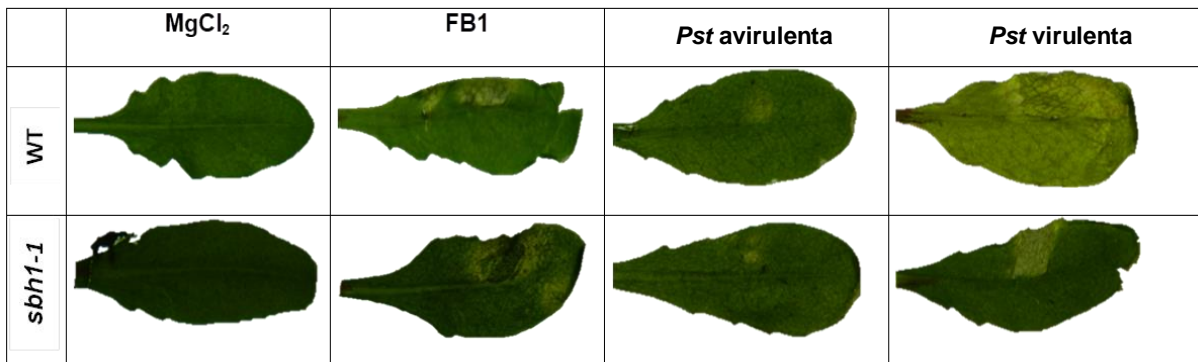


Figura 30. Efecto de la FB1 y las cepas avirulenta y virulenta en hojas de *Arabidopsis thaliana* adultas. Las hojas de *Arabidopsis thaliana* genotipos wt y *sbh1-1* fueron infiltradas con MgCl₂ (10 mM) como control, FB1 (10 μM), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) 1x10⁷ UFC/ mL o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) 1x10⁷ UFC/ mL. Las imágenes fueron obtenidas a los 7 dpi. Se muestra una imagen representativa de 15 hojas infiltradas.

En la Figura 31 se presenta la cuantificación de la magnitud de las lesiones a través de la evaluación del ID de la línea silvestre y mutante *sbh1-1*, a diferentes tiempos post-infección con la FB1. Se pudo observar que la cinética de la reacción del tejido a la FB1 fue diferente temporal y espacialmente en las hojas de las plantas silvestres y de mutante. Mientras a las 24 hpi no se presentó daño ocasionado por la toxina en ambas líneas, conforme fue aumentando el tiempo de registro el daño fue aumentando. Sin embargo, los valores de intensidad de la lesión aumentaron de manera diferente, ya que la wt tuvo un incremento lento de daño en las hojas a los 2 dpi, alcanzando el máximo a los 7 dpi. Mientras, en el caso de la mutante *sbh1-1*, la magnitud de la lesión en las hojas fue aumentando rápidamente, alcanzando su máximo valor a los 4 días post-infección.

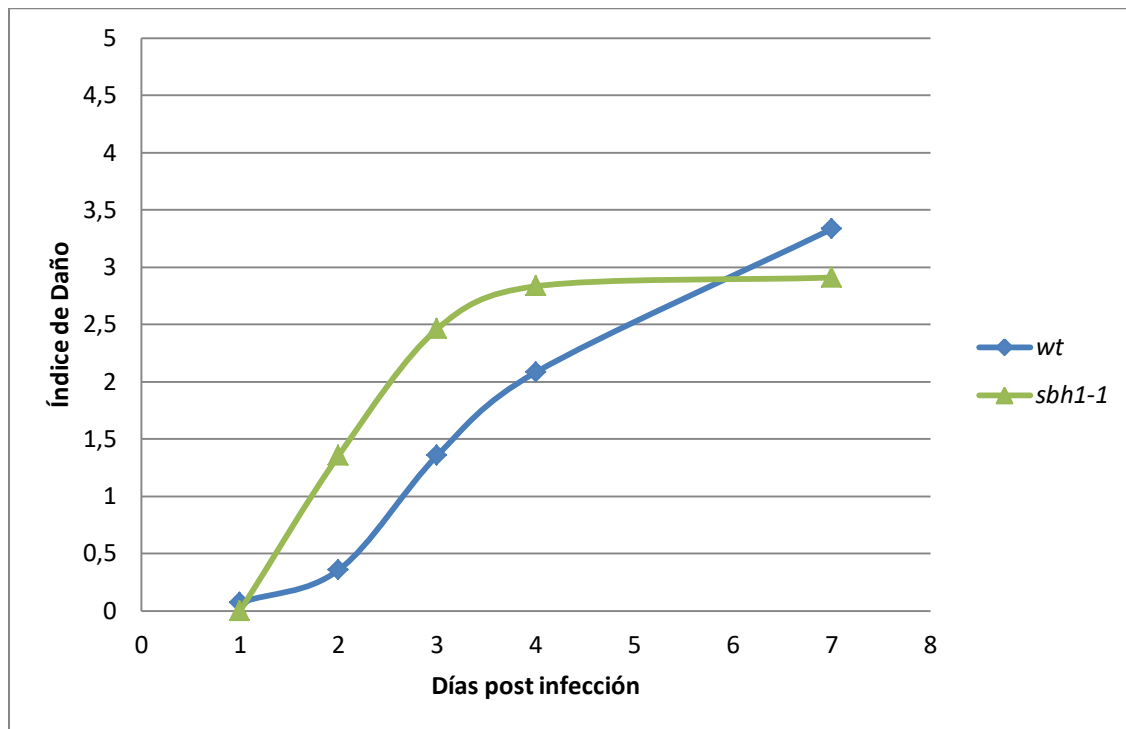


Figura 31. Progreso de la lesión inducida por la FB1. Se muestra el índice de daño en hojas de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* wt y *sbh1-1*. Las hojas de las plantas fueron infiltradas con FB1 10 μ M. A los 1, 2, 3, 4 y 7 dpi se calculó el Índice de Daño asignando valores de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión. n=15

De la misma manera se realizó en análisis del ID ahora para las hojas infectadas con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) (Figura 32), utilizando un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL, se puede observar que el desarrollo de las lesiones ocasionadas por el patógeno avirulento en ambas líneas fue a partir del día 1, y que la magnitud de las lesiones fue aumentando constantemente hasta los 2 dpi, cuando se presentó una ligera disminución progresiva en la cinética de lesión de tipo HR en ambas líneas de estudio.

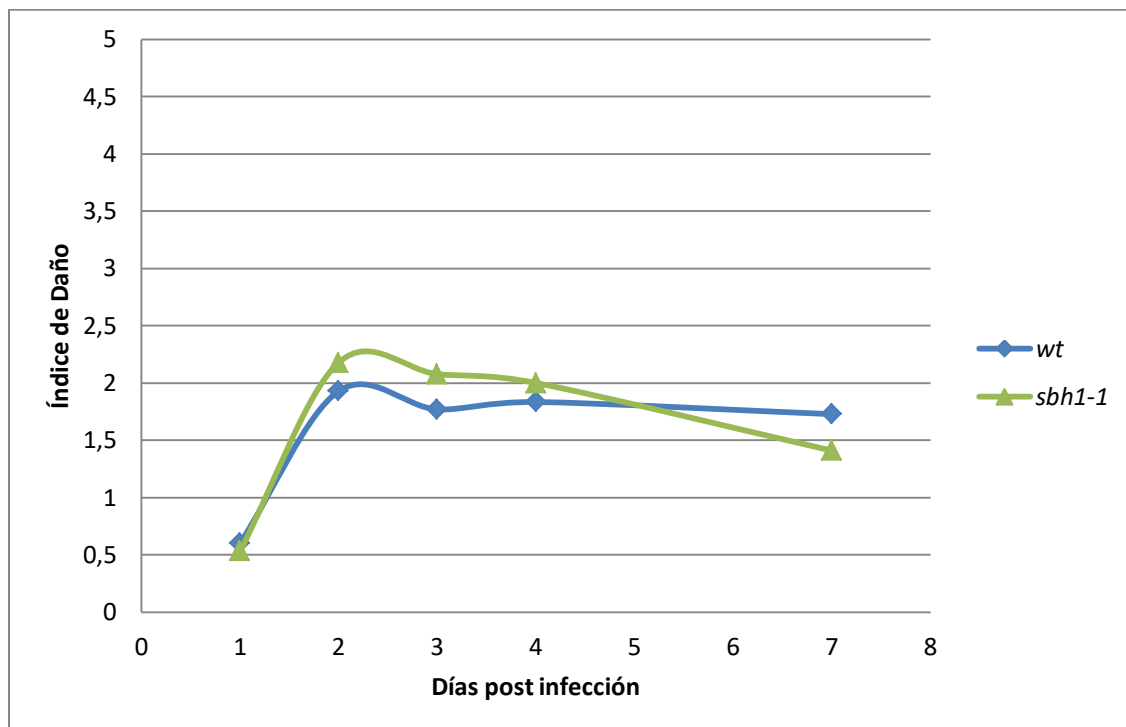


Figura 32. Progreso de la lesión inducida por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta). Se muestra el índice de daño en hojas de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* wt y *sbh1-1*. Las hojas de las plantas fueron infiltradas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) 1×10^7 UFC/mL. A los 1, 2, 3, 4 y 7 dpi se calculó el Índice de Daño asignando valores de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión. n=15

En la Figura 33 se analiza el crecimiento bacteriano del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) utilizando un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC/mL. En las hojas de las plantas tanto wt como *sbh1-1* se presentaron lesiones a partir del día 1, pero la magnitud de las lesiones fue aumentando más rápidamente en las hojas de la planta silvestre comparada con la mutante, la cual alcanzó un orden de magnitud menor que la wt.

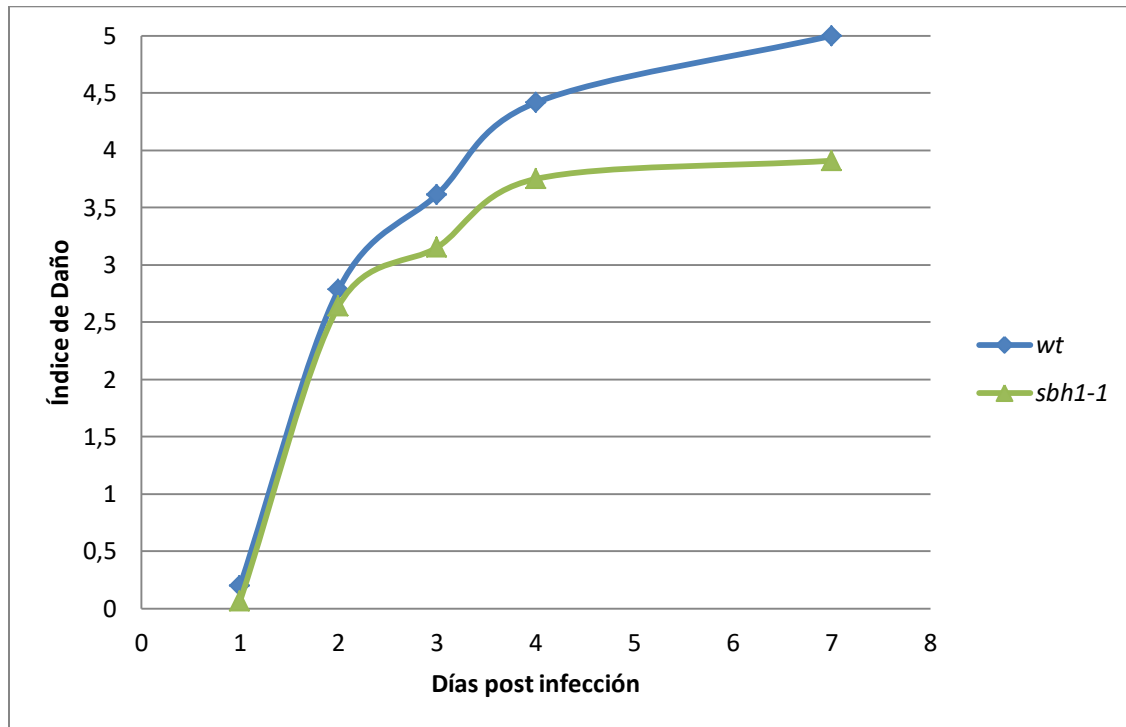


Figura 33. Progreso de la lesión inducida por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). Se muestra el índice de daño en hojas de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* wt y *sbh1-1*. Las hojas de las plantas fueron infiltradas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) 1×10^7 UFC/mL. A los 1, 2, 3, 4 y 7 dpi se calculó el índice de daño asignando valores de acuerdo al tamaño y coloración de la lesión. n=15

8. DISCUSIÓN

Varios estudios han reportado que las BCL tienen funciones de señalización durante procesos celulares como defensa contra patógenos, apertura de estomas, y respuesta a frío [Ng et al., 2001; Saucedo et al., 2011; Dutilleul et al., 2012]. *Arabidopsis thaliana* tiene aproximadamente 12 BCL que varían estructuralmente en cuanto a su número y posición de insaturaciones y de grupos OH [Markham et al., 2007]. De ellas, la esfinganina, una BCL di-hidroxiada y la fitoesfingosina, una BCL tri-hidroxiada, así como sus formas fosforiladas, han sido propuestas como las responsables del efecto de defensa contra patógenos [Shi et al., 2007; Peer et al., 2010; Saucedo et al., 2011]. Específicamente, este papel de las BCL se circunscribe a su papel mediador en la MCP, una efectiva estrategia de defensa ligada a una forma de inmunidad que es la desencadenada por efectores (ETI). Sin embargo, no está claro qué especies de BCL son las que inciden en la inmunidad de *Arabidopsis* y a qué tipo de inmunidad contribuyen. Este trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluar la participación de las BCL en las dos formas de inmunidad en plantas, las cuales son la inducida por PAMPs (PTI) y la desencadenada por efectores (ETI).

Para ello, se utilizaron tres herramientas: la FB1 como toxina que promueve una acumulación de BCL endógenas, la mutante de *Arabidopsis thaliana sbh1-1*, que produce bajos niveles de BCL tri-hidroxiadas y altos de di-hidroxiadas y las cepas *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta), inductoras de los esquemas ETI y PTI, respectivamente.

Experimentalmente, los anteriores instrumentos se combinaron y se evaluaron de tres formas: la manifestación de RH en hojas infiltradas en plantas de *Arabidopsis thaliana* adultas, la expresión del deterioro como forma de muerte celular programada en plántulas, y los niveles de crecimiento bacteriano en las plántulas desafiadas con los patógenos.

8.1 Evaluación de la contribución de las BCL di- y tri-hidroxiadas en la RH en plantas wt y *sbh1-1* adultas

La única forma en la que se evaluó la respuesta de defensa en las plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* en este trabajo fue la de analizar la reacción de RH en hojas infiltradas. Para ello, se exploraron la intensidad y el progreso de las lesiones macroscópicas ocasionadas por los tratamientos con $MgCl_2$, FB1, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta). Lo anterior se realizó considerando que en la manifestación de la RH y de respuestas de defensa, están implicadas las BCL [Merrill et al., 1996; Stone et al., 2000; Peer et al., 2010; Saucedo et al., 2011]. Es importante mencionar que las características de las lesiones fenotípicas variaron de acuerdo al tratamiento. Mientras la reacción macroscópica provocada por la FB1 es del “tipo-RH”, la producida por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) es una reacción RH y la producida por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) es una reacción de necrosis. Así, mientras la lesión provocada por la toxina FB1 presentaba una coloración de un tono amarillento y una notable deshidratación del tejido vegetal, en las lesiones provocadas por los patógenos, la coloración era grisácea (Figuras 29 y 30). Sin embargo, estas diferencias son muy sutiles y no es posible hacer una diferenciación cualitativa y menos cuantitativa de su expresión.

Por otra parte, la progresión de la lesión de RH en las plantas wt para el caso de la FB1 fue retardada en comparación con la inducida por los patógenos. Esto concuerda con lo encontrado en plántulas, en las que la letalidad de la toxina se da en tiempos de 9-15 días después de la exposición [Saucedo et al., 2011]. La adición de la toxina en los dos genotipos produjo una cinética diferente en el Índice de Daño. Este apareció ligeramente para ambos genotipos al mismo tiempo, pero fue mucho más intenso en la línea *sbh1-1* de manera muy clara. Esta mutante carece de una hidroxilasa de BCL (la SBH1), por lo que la cantidad de BCL tri-hidroxiladas disminuye un 40 %, si bien la otra hidroxilasa presente, la SBH2, contribuye menos a la producción de BCL tri-hidroxiladas; en esta mutante, la falta de BCL tri-hidroxiladas es compensada por un exceso de BCL di-hidroxiladas [Chen et al., 2008]. Considerando lo anterior y que la FB1 inhibe a la ceramida sintasa II que utiliza a las BCL tri-hidroxiladas (Luttgeharm et al., 2015²), en los

experimentos de infiltración de hojas, la toxina estaría promoviendo una gran acumulación de BCL di-hidroxiadas y una disminución de las tri-hidroxiadas, lo cual sugiere que la reacción “tipo RH” inducida por la FB1 se debe al mayor nivel acumulado de BCL di-hidroxiadas que al de tri-hidroxiadas. Con respecto al genotipo silvestre, la toxina estaría promoviendo acumulación tanto de BCL di- como tri-hidroxiadas. Los estudios de Saucedo-García et al. [2011], en plántulas de *Arabidopsis thaliana* wt con FB1 indicaron que si bien las BCL tri-hidroxiadas subieron en niveles 10 veces mayores que los de las di-hidroxiadas en el mismo tiempo, el número de veces que aumentaron las BCL di-hidroxiadas en presencia de FB1 que en su ausencia, fue mayor. Lo anterior, más el hecho de que la adición de BCL di-hidroxiadas produjera MCP en las plántulas wt y de que la mutante *sbh1-1* fuera sensible a la FB1, los llevó a postular que las di-hidroxiadas son las BCL promotoras de la MCP. Los resultados de esta tesis en cuanto a los ensayos de infiltración de FB1 en hojas coinciden con esta interpretación, pues las plántulas wt, que acumulan menos BCL di-hidroxiadas que las *sbh1-1*, mostraron una lesión “tipo RH” con una cinética más lenta y con menores magnitudes.

La temporalidad de las lesiones por los patógenos fue más rápida que con la FB1, en especial la inducida por la cepa avirulenta, ya que ésta se desencadenó desde el día 1 post-infección y en los últimos días presentó una reducción en su lesión. Esto último es lo que se espera de una interacción incompatible entre *Arabidopsis thaliana* y la cepa avirulenta, la cual desata una RH temprana. La RH es un tipo de MCP, estrategia de defensa consistente en el suicidio genéticamente controlado con el fin de evitar la proliferación del patógeno en la planta [Heath, 2000]. Las lesiones ocasionadas por la cepa virulenta también se presentaron a tiempos cortos después de la infección, pero progresaron de manera continua, consistentes con el tipo de interacción compatible, por lo que avanzaron necrosando el resto de la hoja a tiempos más largos [González A, 2014].

En el caso de la RH producida por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta), los perfiles de la lesión en ambos genotipos fueron muy similares en temporalidad y magnitud. Lo anterior indica que en el caso de las BCL tri-hidroxiadas que son minoritarias en la línea *sbh1-1*, éstas no fueron necesarias para producir la RH y que ésta se indujo por los niveles normales de BCL

producidos en las plantas wt. En éstas, el aumento de las BCL di-hidroxiadas no está comprometido (y de hecho están incrementadas en el genotipo *sbh1-1*). Esta interpretación disiente de lo reportado por Peer et al., (2010), trabajo en el cual determinaron que en las primeras 25 h de exposición de *Arabidopsis thaliana* wt a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta), hay un aumento sostenido de BCL tri-hidroxiadas, lo cual correspondería a que éstas fueran las que participan en el mecanismo de defensa de incompatibilidad en el modelo gen por gen o ETI, ya que las BCL di-hidroxiadas no aumentaron. Desgraciadamente, estos autores no midieron ningún parámetro asociado a una defensa inmunológica. Por otra parte, en nuestros experimentos no determinamos los niveles de BCL para poder correlacionarlos con los fenotipos observados, lo cual daría soporte a una correlación clara.

En el caso de los resultados con la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta), los perfiles de Índice de Daño tanto en los fenotipos wt como *sbh1-1* mostraron las mayores magnitudes de todos los tratamientos. Lo anterior es congruente con la muerte necrótica producida por la ausencia de genes de defensa específicos. Sin embargo, las plantas *sbh1-1* mostraron menores niveles de daño que las wt, lo cual sería consistente con que el mayor aumento de BCL di-hidroxiadas en la mutante, puede contener aún al patógeno virulento. En este caso, las BCL di-hidroxiadas se comportarían como respuesta a PAMPs y por tanto como parte de un mecanismo PTI. Nuevamente, esto está en desacuerdo con Peer et al., (2010), quienes encontraron que el patógeno virulento promueve un aumento de BCL tri-hidroxiadas y no de di-hidroxiadas. Ya se mencionaron los argumentos en contra de esta interpretación.

8.2 Evaluación de la contribución de las BCL di- y tri-hidroxiadas en el deterioro de las plántulas wt y *sbh1-1*

Con este ensayo se evaluó el efecto de la toxina FB1 o los patógenos de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) en las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1*. Es importante mencionar que el deterioro generalizado de la plántula ocasionado por el patógeno de la cepa avirulenta corresponde a una

expresión de MCP de RH a causa de una interacción incompatible entre la bacteria y la plántula hospedera, mientras que el deterioro producido por el patógeno virulento es una respuesta de enfermedad o necrosis generalizada como consecuencia de una interacción compatible.

Para conocer que BCL son la que tiene el rol de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos, se emplearon dos estrategias, en la primera se empleó a la FB1, la cual al ser un inhibidor competitivo de la ceramida sintasa en la síntesis de novo de esfingolípidos, aumenta las BCL endógenas [Merrill et al., 1996] y la segunda estrategia fue de utilizar una mutante (*sbh1-1*) la cual contiene mayor contenido de BCL di-hidroxiadas y menor de tri-hidroxiadas en comparación con la wt [Chen et al., 2008], ambos genotipos se infectaron con las cepas avirulenta y virulenta sin y con la FB1 (la cual se adicionó de manera previa a los patógenos).

Con la FB1, el deterioro fue mayor en la wt que en *sbh1-1*, tanto a las 24 como a las 48 h. Lo anterior implica que ambos son tiempos en los que la toxina ha desplegado las reacciones de la MCP. El hecho de que la reacción de la FB1 aunque modesta en la wt, no se haya expresado en la *sbh1-1*, implica que en esta última, las BCL di-hidroxiadas acumuladas por efecto de la toxina no fueron capaces de producir una respuesta de deterioro “tipo RH”, lo que sí fue logrado por el aumento endógeno de las BCL di- y tri-hidroxiadas en la wt. Este resultado contrasta con el observado en el experimento análogo de hojas infiltradas, en el que la *sbh1-1* presentó una mayor sensibilidad a la FB1. En este caso, pareciera que en plántulas, las BCL di-hidroxiadas no producen muerte celular. Los efectos fenotípicos de los tratamientos de la FB1 y los patógenos son difíciles de interpretar en las plántulas, pues a diferencia de los ensayos en hojas infiltradas en las que el tratamiento es local en una región de la hoja, en el caso de las plántulas el organismo completo está expuesto al tratamiento. Probablemente, los mecanismos de inmunidad que se presentan en ambos sistemas sean diferentes tanto cuantitativa como cualitativamente. Por ejemplo, los mecanismos de inmunidad sistémica podrían estar mucho más expresados en el modelo de plántula que en el de hoja de la planta adulta [Adam et al., 2018].

En los experimentos con un inóculo de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta), la cepa produjo un rápido efecto de deterioro mostrado desde las 24 h, lo que sugiere una reacción pronta de HR inducida por el patógeno avirulento y que fue aproximadamente tres veces menos en las plántulas *sbh1-1*. Estos resultados sugieren que las BCL endógenas di- y tri-hidroxiladas de la wt son capaces de montar una reacción de PCD de defensa más poderosa que las mayoritariamente BCL di-hidroxiladas de la *sbh1-1*. Este resultado es coincidente con el obtenido con la FB1 en plántulas, en las que aparentemente las BCL tri-hidroxiladas más que las di-hidroxiladas son requeridas para la respuesta de deterioro. Si se hiciera una equivalencia absoluta entre nivel fenotípico de deterioro y nivel de inmunidad, los resultados estarían de acuerdo con los experimentos de Peer et al., (2010), en los que las BCL tri-hidroxiladas son las que aumentan por infección con la cepa avirulenta.

El inóculo de 1×10^6 UFC/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta) indujo un leve aumento de deterioro a las 48 h en la wt, al mismo nivel que el de la FB1, sugiriendo que la cepa virulenta es capaz de inducir lentamente un deterioro, en este caso necrótico, debido a la interacción compatible, aunque también podría explicarse como una inmunidad incipiente PTI, que no está mediado por las BCL di-hidroxiladas, ya que no se presenta en las plántulas *sbh1-1*.

En los tratamientos con las cepas virulenta y avirulenta, los síntomas de deterioro no están correlacionados con la carga bacteriana, pues en ambos casos, el crecimiento bacteriano fue el mismo. Lo anterior implica que los fenotipos de deterioro no están relacionados con los esquemas de inmunidad.

Cuando las dos cepas bacterianas fueron aplicadas a plantas pretratadas con FB1, se pretendía que con ello la toxina elevara los niveles endógenos de BCL. De acuerdo a Saucedo-García et al., (2011), la adición de la FB1 al sustrato promueve esta acumulación desde las 4 hasta las 72 h en el genotipo silvestre. En el caso de la mutante *sbh1-1*, Peer et al., (2010) sólo documentó el contenido de BCL endógenas las primeras 25 h, de las cuales, en el caso de la cepa avirulenta, son las tri-hidroxiladas las que se mantienen en altos niveles a las 25 h. En el caso de

esta tesis, la FB1 se aplicó por atomización directa a las plántulas. Se puede asumir que a las 12 h la FB1 ya estaba teniendo efecto y que probablemente las BCL acumuladas ya estaban a altos niveles, a juzgar por los efectos claros en los que se aumentó el nivel de deterioro de una manera muy importante con ambas cepas bacterianas, si bien el efecto fue mayor en la *sbh1-1*. Este efecto sugiere que las BCL di-hidroxiladas contribuyen al efecto de deterioro a través de una inducción de MCP y defensa. En estos casos de combinación FB1-cepa bacteriana, el mayor deterioro fue encontrado a las 48 h, pero a este tiempo se presentó una ligera aunque significativa disminución de la carga bacteriana, por lo cual, tampoco hay una correlación entre fenotipo e inmunidad.

Resultó muy interesante que la mutante *sbh1-1* a las 48 h con FB1 y las dos cepas presentará valores exacerbados de deterioro, como si en este caso, el aumento de BCL di-hidroxiladas estuviera relacionado con una mayor capacidad de ETI y PTI, pero estos grandes aumentos no estuvieron asociados a un decremento proporcional de crecimiento bacteriano.

Los resultados con la dosis de inóculo de 1×10^7 UFC/mL de las cepas *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* virulenta), revelaron que el aumento en la dosis del patógeno tuvo un incremento discreto en el deterioro de la cepa wt tanto con la cepa avirulenta como con la virulenta y éste se observó principalmente al tiempo de 48 h. Sin embargo, en el caso de la línea *sbh1-1*, el aumento en el deterioro fue de hasta el doble y desde las 24 h. El caso más notable fue el del deterioro en presencia de la cepa virulenta y la FB1. Sin embargo, cuando se comparan los niveles de deterioro con los niveles de crecimiento bacteriano en los mismos tiempos, no hay ninguna correlación, pues en los dos genotipos el crecimiento de las cepas avirulenta y virulenta fue el mismo en ausencia de la FB1 y en todos los casos, éste disminuyó el mismo valor en presencia de la FB1. Lo anterior sugiere que el deterioro observado en las plántulas no está relacionado directamente ni con los aumentos de BCL, ni con la magnitud de la carga bacteriana, sino más bien con el tipo de patógeno que infecta y con la toxicidad de la FB1. Es decir, que los esquemas de defensa ETI y PTI tienen muchos otros mecanismos además de los orquestados por las BCL

como son la producción de callosa, las especies reactivas de oxígeno, las proteínas de defensa, etc, [Collinge et al., 1994; Agrios, 1997; Dat et al., 2000] y que se están manifestando independientemente de los aumentos de BCL, dando cuadros de necrosis o de MCP, los cuales son difíciles de distinguir entre sí fenotípicamente. En el caso de la FB1, además de tener su blanco de acción sobre la ceramida sintasa, promoviendo la acumulación de BCL [Merrill et., 1996], también afecta a otras estructuras como la membrana plasmática y proteínas membranales, alterando su permeabilidad y su función en la fisiología celular [Gutiérrez et al., 2005].

8.3 Evaluación de la contribución de las BCL di- y tri-hidroxiadas en la defensa contra el crecimiento bacteriano en plántulas wt y *sbh1-1*

La estrategia directa empleada en este trabajo para explorar la contribución de las BCL a los mecanismos de inmunidad en *Arabidopsis thaliana*, fue la de determinar la cinética del crecimiento bacteriano del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en sus formas avirulenta y virulenta, en plántulas wt y *sbh1-1*, pre-expuestas o no a la FB1, ya que según lo reportado por Stone et al., (2000), Peer et al., (2010) y Saucedo-García et al., (2011), las BCL activan respuestas de defensa que se evidenciarían por una reducción del crecimiento bacteriano. Estos experimentos se hicieron con dos dosis de patógenos: 1×10^6 UFC/mL y 1×10^7 UFC/mL.

Con la infección de los patógenos avirulento o virulento a una concentración de inóculo de 1×10^6 UFC/mL, ambos genotipos presentaron un crecimiento bacteriano similar a las 24 h y la FB1 no modificó estos valores de proliferación bacteriana. Sin embargo, a las 48 h, la FB1 sí promovió una disminución pequeña pero significativa en los dos genotipos y con las dos cepas bacterianas. Curiosamente, cuando la dosis desafiante de patógenos se incrementó 10 veces (1×10^7 UFC/mL), si bien los crecimientos bacterianos de los patógenos avirulento y virulento fueron iguales en las plántulas de los genotipos wt y *sbh1-1* en ausencia de la preexposición a FB1, cuando las plántulas se expusieron a la toxina, los crecimientos bacterianos disminuyeron en todos los casos desde las 24 h. Esta disminución fue de la misma magnitud en todas las condiciones. Los

resultados anteriores indican que: a) el contenido diferencial endógeno de BCL en las plantas *wt* y *sbh1-1*, no promovió una reacción de defensa diferencial. b) los patógenos avirulento y virulento no presentaron diferencias en la agresividad de su proliferación y c) la adición de la FB1 redujo el crecimiento del patógeno.

La interpretación a los resultados anteriores implica que sólo un aumento de BCL de forma dramática (adición de FB1), es lo único que incide en un aumento de las reacciones de defensa, ya que esta condición sí logra controlar la proliferación del patógeno. El hecho de que el desbalance de BCL endógenas en los genotipos *wt* y *sbh1-1* no tenga ningún efecto en el crecimiento bacteriano (en ausencia de FB1), apoya esta premisa. Sin embargo esto no es coincidente con el papel mediador de las BCL, las cuales, como segundos mensajeros, son requeridas en aumentos de concentración muy pequeños Saucedo et al., (2015). También, los resultados de crecimiento bacteriano están en desacuerdo con los resultados de Peer et al., (2010), en los que el patógeno avirulento promueve una mayor y sostenida producción de BCL tri-hidroxiladas en la *wt* y mucho menor de BCL di-hidroxiladas en la *sbh1-1*. Esto implicaría que sí hay una diferenciación entre las BCL que promueven la defensa en el mecanismo ETI, pero también sugiere que ante la falta de BCL tri-hidroxiladas (en la *sbh1-1*), la planta igual responde ante el patógeno avirulento produciendo las únicas que puede en este genotipo y que son las di-hidroxiladas. Si se interpretan así los resultados de Peer, los nuestros tienen sentido en cuanto a que en ambos genotipos que tienen diferentes capacidades de generar BCL, la FB1 potenció la generación de BCL a altos niveles, mismos que pudieron sostenerse por tiempos más largos y por tanto resultaron protectores (hubo menor crecimiento bacteriano), inclusive en las condiciones de la invasión del patógeno virulento. En este punto, cabría preguntarse si en el último caso las BCL están funcionando como factores inductores de ETI o de PTI.

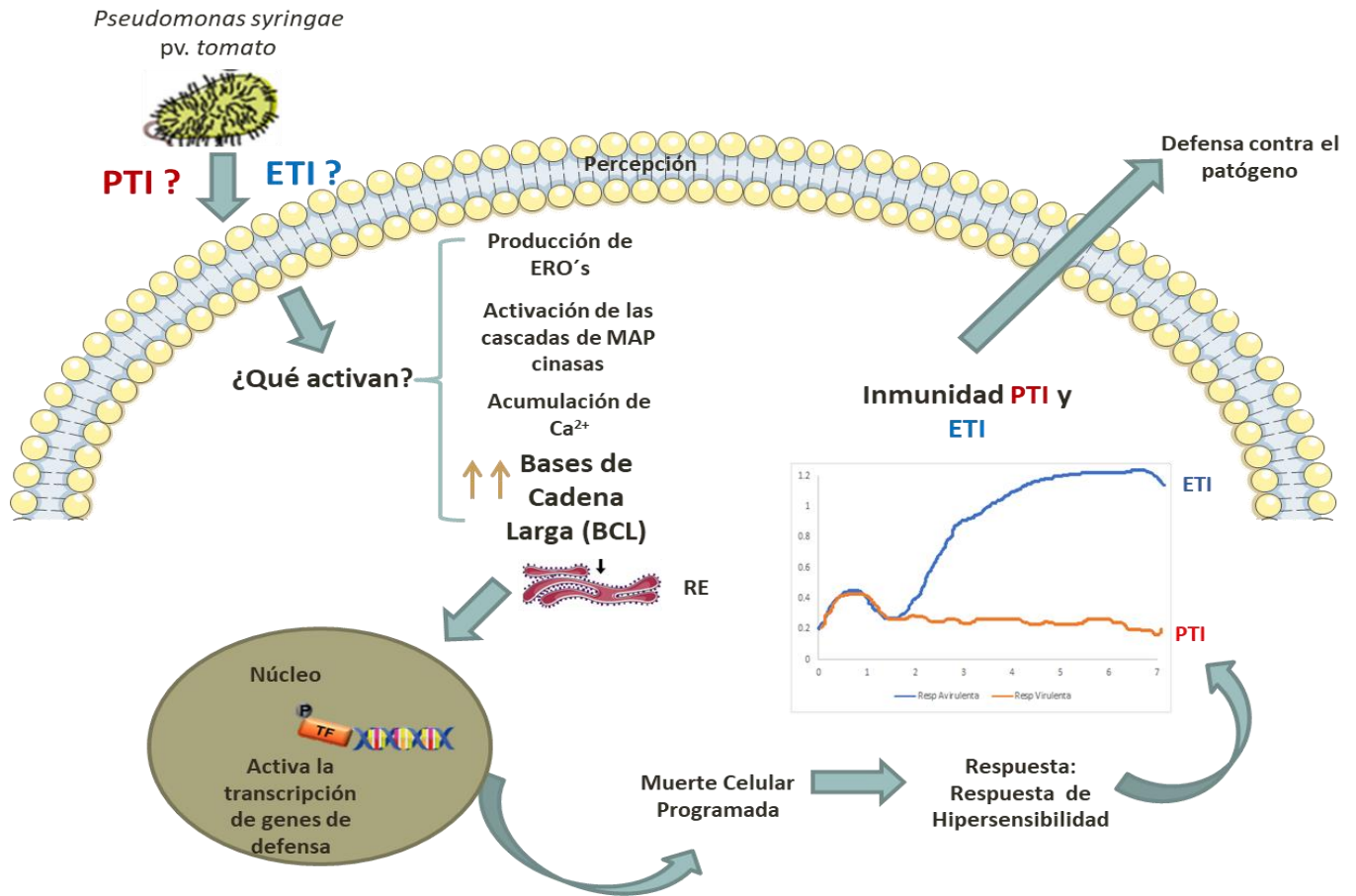


Figura 34. Modelo que asocia a las BCL con las formas de inmunidad en *Arabidopsis*. El patógeno ya sea avirulento o virulento promueve la acumulación de BCL di- y tri-hidroxiladas, lo cual activa mecanismos de defensa en la PTI y en la ETI.

9. CONCLUSIONES

*Las BCL di-hidroxiadas y tri-hidroxiadas podrían contribuir en los mecanismos de inmunidad en *Arabidopsis*.

*La manifestación de la RH en las hojas de plantas adultas indicó las respuestas clásicas de inmunidad. El patógeno avirulento produjo una RH dada por la interacción incompatible con la célula hospedera o inmunidad ETI. Para el caso del patógeno virulento, la planta fue incapaz de montar una defensa eficiente y se produjo necrosis en el tejido.

* El Índice de Daño estimado con la FB1 en las hojas de las plantas adultas de los genotipos wt y *sbh1-1* sugiere que las BCL di-hidroxiadas son las responsables de inducir la HR con el patógeno avirulento.

* El grado de deterioro de las plántulas inducido por la FB1 y los patógenos avirulento y virulento fue un parámetro muy complejo de interpretar debido a que la naturaleza del daño es diversa en las plántulas. Por lo mismo, no se apreció una correlación entre el grado de inmunidad y el grado de deterioro.

* El ensayo de crecimiento bacteriano reveló que la FB1 fue capaz de contener el crecimiento del patógeno avirulento y virulento en ambos genotipos, por lo que no se pudo apreciar si las BCL di-hidroxiadas o tri-hidroxiadas están involucradas en la inmunidad mejorada por la FB1.

10.PERSPECTIVAS

*Medir el contenido de BLC di-hidroxiladas y tri-hidroxiladas, así como de sus formas forforiladas en las condiciones empleadas en este estudio, con el objetivo de proponer inequívocamente la BCL específica que participa en la señalización a la respuesta ETI y PTI.

*Cuantificar crecimiento bacteriano a tiempos más largos para evaluar el comportamiento de los tratamientos con la FB1 o los patógenos esperando una mayor claridad sobre el rol de las BCL en la inmunidad en plantas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas K, Tanaka T, Duke O, Porter K, Wray M, Hodges L, Sessions E, Wang E, Merrill Jr A, Riley T. 1994. Fumonisin and AAL toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology* 106, 1085-1093.
- Ádám A, Zoltán Á, György K, Mergenthaler E, Viczián o. 2018. Signals of systemic immunity in plants: progress and open questions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1146.
- Agrios G, N. 1997. *Plant Pathology* 4th Edition Academic Press, New York. 63-77.
- Cardinale F, Jonak C, Ligterink W, Niehaus K, Boller T, Hirt H. 2000. Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *Journal of Biological Chemistry* 275, 3673-3674.
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworsky JB, Cahoon E. 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.
- Chen M, Cahoon E, Saucedo-García M, Plasencia J, Gavilanes M. 2009. Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis and Function. En *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. New York. 77-116.
- Colcombet J, Hirt H. 2008. Arabidopsis MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413, 217-226.
- Collinge D, Gregersen P, Thordal-Christensen H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. En *Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity*. New York, 391-433.
- Collinge D, Borch J, Madriz-Ordeñana K, Newman M. 2001. The responses of plants to pathogens. En *Molecular Analysis of Plant Adaptation to the Environment*. 131-158.
- Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S. 2005. Arabidopsis sphingosine kinase and effects of phytosphingosine 1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiology* 137, 724-737.

- Dangl JL, Dietrich R A, Richberg MH. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Dangl JL, Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411, 826-833
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.
- Dunn TM, Lynch DV, Michaelson LV, Napier JA. 2004. A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 93, 483-97.
- 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.
- González A. 2014. Expresión de genes de defensa en la muerte celular inducida por bases de cadena larga. Tesis de Maestro en Ciencias, Facultad de Química, UNAM.
- Guimarães C, Linden R. 2004. Programmed cell death. Apoptosis and alternative death styles. *European Journal of Biochemistry* 271, 1638-1650.
- Gutiérrez N, Muñoz R, Palacios S, Ramírez J, Sánchez S, Plasencia J, Gavilanes M. 2005. Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221, 589-596.
- Golapan S, Frederick A. 2008. A metasytem of framework model organisms to study emergence of new host-microbe adaptations. *Plos One* 3, 1-7.
- Hammond-Kosack K, Jones J. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Heath M. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44, 321-334
- Hutcheson S. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36, 59-90.
- 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 E, Morris P C, Innes R

- W, Ecker J R, Scheel D, Klessing D F, Machida Y, Munsy J, Ohashi Y, Walter J C. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plants Science* 7, 301-308.
- Jones J, Dangl J. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
 - Kaffarnik F, Jones A, Rathjen J, Peck S. 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.
 - Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT. 2003. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes & Development*. 17, 2636-41.
 - Lozano M. 2010. Crecimiento bacteriano en mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteración en la síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
 - Luttgeharm K, Chen M, Amit M, Cahoon R, Markham J, Cahoon E. 2015. Overexpression of *Arabidopsis* ceramide synthases differentially affects growth. Sphingolipid metabolism, programmed cell death and mycotoxin resistance. *Plant Physiology* 169, 1108-1117.¹
 - Luttgeharm K, Cahoon E. 2015. Substrate specificity, kinetic properties and inhibition by fumonisin B1 of ceramide synthase isoforms from *Arabidopsis*. *Biochemical Journal*. 593-603.²
 - Lynch D, Dunn T. 2004. An Introduction to plant sphingolipids and review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist* 161, 677-702.
 - Madriz K. 2002. Mecanismo de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo integrado de plagas Costa Rica* 63, 22-32.
 - Markham JE, Li J, Cahoon E, Jaworski JG. 2006. Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 22684-22694.
 - Markham JE, Jaworski JG. 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 JE, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hematy J, Marion K, Belcram K, Palauqui J, Satiat-Jeunemaitre B, Faure JD. 2011. Sphingolipids containing very-long chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 2362-2378.
- Merrill A, Liotta D, Riley R. 1996. Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends in Cell Biology* 6, 218-223
- Meskiene I, Hirt H. 2000. MAP kinase pathway: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Molecular Biology* 42, 791-806.
- Mur L, Laarhoven L, Harren F, Hall M, Smith A. 2008. Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiology* 148, 1537-1546.
- Nakagawa N, Kato M, Takahashi Y, Shimazaki K, Tamura K, Tokuji K, Kihara A, Imai H. 2012. Degradation of long-chain base 1-phosphate (LCBP) in *Arabidopsis*: functional characterization of LCBP phosphatase involved in the dehydration stress response. *Journal of Plant Research* 125, 439-49.
- Newman M, Dow J, Molinaro A, Parrilli M. 2007. Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research* 13, 69-84
- Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM. 2001. Drought-induced guard cell signal transduction involves shingosine-1-phosphate. *Nature* 410, 596-599.
- Parker J, Coleman M. 1997. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 291-296.
- Peer M, Stegmann M, Mueller M, Waller F. 2010. *Pseudomonas syringae* infection triggers *de novo* synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 18, 4043-4056.
- Qiu J, Zhou L, Yun B-W, Nielsen HB, Fill BK, Petersen K, MacKinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC. 2008. *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology* 148, 212-222.

- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, Retana G, Boubekour T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S. 2009. Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *The Plant Cell* 21, 1541-1555.
- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessing D F, Hirt H, Jones J D. 1999. Rapid Avr-9 and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and levels: convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 273-287.
- Ryals J, Neuenschwander U, Willits M, Molina A, Steiner H, Hunt M. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8, 1009-1819.
- Saucedo M, Guevara A, Gonzáles A, Cruz F, Vázquez S, Markham J, Lozano M, Dietrich C, Ramos M, Cahoon E, Gavilanes M. 2011. MPK6, sphinganine 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* 4, 943-957.
- Saucedo 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 la MPK6. Tesis en Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Saucedo M, Gavilanes M. 2015. Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 6, 1-14.
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun Ya. 2007. Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Research* 17, 1030–1040.
- Sperling P, Heinz E. 2003. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular and Cell Biology of Lipids* 1632, 1-15.

- Stone J, Heard J, Asai T, Ausubel F. 2000. Stimulation of fungal mediated cell death by fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *The Plant Cell* 12, 1811-1822.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AH. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 14486-14490.
- Williams B, Dickman M. 2008. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it, *Molecular Plant Pathology* 9, 531-544.
- Wit P. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves, *Cellular and Molecular Life Sciences* 2726-2732.
- Worrall D, Liang YK, Alvarez S, Holroyd GH, Spiegel S, Panagopoulos M, Gray JE, Hetherington AM. 2008. Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant Journal* 56, 64-72.
- Wright S, Snow J, O'Brien T, Lynch D. 2003. Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415, 184-192.
- Zäuner S, Ternes P, Warnecke D. 2010. Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Advances in Experimental Medicine Biology* 688:249-263.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley E, Jones J, Boller T, Felix G. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764-767.

12. APÉNDICE

1. Preparación de medios de cultivo

***Preparación del medio Gamborg B-5/Agar/Sacarosa para la germinación y cultivo de *Arabidopsis thaliana*.**

Preparación para 1 L de medio.

Reactivos	Concentración
Medio Gamborg B5	3.2 g/L
Agar	1%
Sacarosa	1%

****Preparación del medio base B de King para el cultivo de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) y DC3000 (*Pst* virulenta).**

Preparación del medio B de King para 100 mL.

Reactivos	Concentración
Proteasa peptona	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.15 g
Glicerol	1.2 mL
Agar	1.5 g

Para el cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *avrRPM1* (*Pst* avirulenta) a 100 mL suplementar al medio B de King.

Reactivos	Concentración final	Aforo a 100 mL
Rifampicina	50 µg/mL	Disolver 50 µg de rifampicina en 1 mL DMSO
Tetraciclina	20 µg/mL	Disolver 20 µg de tetraciclina en 1 mL H ₂ O

		estéril)
MgCl ₂	1 M	1 mL

Para el cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 (*Pst virulenta*) a 100 mL suplementar al medio B de King.

Reactivos	Concentración final	Aforo a 100 mL
Rifampicina	50 µg/mL	Disolver 50 µg de rifampicina en 1 mL DMSO
MgCl ₂	1 M	Disolver 20 µg de tetraciclina en 1 mL H ₂ O estéril)

Para la preparación de medios de cultivo se vertieron de 25 a 30 mL de medio en cajas Petri desechables, estériles y en condiciones estériles, es decir, en la campana de flujo laminar. Se mantienen en refrigeración hasta su uso.