



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Evaluación de la respuesta inmune  
inducida por flg22 en las mutantes *phr1* y  
*pho2* de *Arabidopsis thaliana* en  
condiciones de deficiencia de fósforo**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**Licenciado en Biología**

**P R E S E N T A**

Leslie Carolina Mosqueda Velázquez

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Oswaldo Valdés López



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatoria**

A mí abuelito Benito y a mi tío Beto, porque siempre me apoyaron, y aunque ya no están, han sido una parte importante de mi vida y estarían muy felices por este logro.

## **Agradecimientos**

A mamá y papá por el apoyo incondicional que siempre me han brindado y gracias a eso, he podido culminar este sueño.

A mi hermano por enseñarme a no rendirme y estar ahí cuando lo necesitaba.

A mis profesores de CCH Ariadna Pérez y Ricardo Guadarrama porque con ellos tuve mi primer acercamiento a la ciencia y por motivarme a estudiar Biología.

Al Dr. Oswaldo Valdés por su paciencia, consejos y enseñanza durante toda la carrera y por dirigir y asesorarme en este proyecto. A la Mtra. Socorro Sánchez por su apoyo en todo el desarrollo del proyecto y por hacer más amenas las horas de laboratorio. Y al Dr. Jorge Campos por el apoyo y la confianza para permitirme realizar un proyecto bajo su asesoría.

A todo mi comité asesor por su tiempo y enseñanza.

## Índice

Índice de figuras	1
Introducción	4
Marco teórico	6
<i>1.0 Respuesta inmune en plantas (ETI, PTI)</i>	6
1.1 Respuestas fisiológicas de la respuesta inmune	10
1.1.1 Inhibición del crecimiento	10
1.1.2 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	11
1.1.3 Deposición de calosa	11
2.0 Fósforo y plantas	12
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	17
<i>Objetivos particulares</i>	17
Materiales y métodos	17
<i>Material vegetal</i>	17
<i>Evaluación de la inhibición del crecimiento inducido por flg22</i>	18
<i>Medición de la producción especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	18
<i>Deposición de calosa</i>	19
Resultados	19
<i>Inhibición del crecimiento</i>	20
<i>Producción de ROS</i>	23
<i>Deposición de calosa</i>	25
Discusión	31
<i>Inhibición del crecimiento</i>	32
<i>Producción de ROS</i>	33
<i>Deposición de calosa</i>	34
Conclusión	35
Literatura citada	35

## Índice de figuras

Figura 1. Modelo zigzag de la respuesta inmune en las plantas	7
Figura 2. Señalización molecular del sistema PTI	8
Figura 3. señalización en condiciones óptimas y deficiencia de fosforo	14
Figura 4. Señalización molecular de la homeostasis del P	15
Figura 5. Señalización PSI	16
Figura 6. Inhibición del crecimiento en la mutante <i>phr1</i>	21
Figura 7. Inhibición del crecimiento en la mutante <i>pho2</i>	22
Figura 8. Producción de ROS en la mutante <i>phr1</i>	24
Figura 9. Producción de ROS en la mutante <i>pho2</i>	25
Figura 10. Deposición de calosa en la mutante <i>phr1</i>	27
Figura 11. Deposición de calosa en la mutante <i>pho2</i>	28
Figura 12. Fotografías en microscopio de epiflorescencia de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30

## **Lista de abreviaturas**

**ADR1** ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1

**APX** ASCORBATO PEROXIDASA

**Avr** Proteínas de avirulencia

**AvrRpm1** Proteínas de avirulencia de *Pseudomonas syringae*

**BAK1** BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1- ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1

**BIK1** BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1

**BR** Brasinoesteroides

**CAT** CATALASA

**CBP60G** CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE G

**CPK5** CALCIUM-DEPENDENT-PROTEIN KINASES

**EDS1** ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1

**ETI** del inglés: effector-triggered immunity

**flg22** Péptido conservado de la flagelina

**FSL2** FLAGELLIN-SENSITIVE 2

**GA** Giberelinas (Ácido giberélico)

**GSL** Genes que sintetizan calosa

**GST8** GLUTATION TRANSFERASA 8

**GST9** GLUTATION TRANSFERASA 9

**HR** Respuesta hipersensible

**IPS1** genes INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION 1

**JA** Jasmonatos

**LPR1** LOW PHOSPHATE ROOT

**LR** del inglés: lateral root

**MAPKs** MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES

**MCP** Muerte celular programada

**MEKK1** MAP KINASE KINASE KINASE

**MP** Membrana plasmática

**NB-LRR** del inglés: nucleotide binding leucine-rich repeat

**NLA** NITROGEN LIMITATION ADAPTATION

**NQR** NADPH QUINONA REDUCTASA

**PAD4** PHYTOALEXIN DEFICIENT 4

**PAMP** del inglés: pathogen-associated molecular pattern

**PCRK1** COMPROMISED RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASE

**PDR2** PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2

**PHF1** PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR

**PHO1** PHOSPHATE 1

**PHO2** PHOSPHATE 2

*pho2* mutante

**PHR1** PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1

*phr1* mutante

**PHT** PHOSPHATE TRANSPORTER

**PHT1** PHOSPHATE TRANSPORTER 1

**Pi** Fósforo inorgánico

**PO<sub>4</sub>** Fosfato

**PR** del inglés: principal root

**PR** del inglés: Pathogen Resistant

**PRRs** del inglés: pattern recognition receptors

**PTI** del inglés: PAMP-triggered immunity

**RBOHD** NADPH OXIDASE RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D

**RLCK** RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASES

**RLK** RECEPTOR LECTIN-KINASE

**ROS** del inglés: Reactive oxygen species

**RPM1** RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE

**SA** Ácido salicílico

**SARD1** SAR DEFICIENT 1

**WRKY75** WRKY DNA-binding protein 75

**ZAT6** ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIAN



## Introducción

Las plantas poseen un sistema de defensa que va desde barreras físicas hasta señales moleculares y sistémicas (Ojito-Ramos y Portal, 2010), lo que les permite conocer y responder ante diferentes estímulos como lo son el estrés biótico o abiótico. El estrés biótico puede ser causado por patógenos, los cuales son reconocidos por dos sistemas diferentes, inmunidad desencadenada por patrón (PTI) e inmunidad activada por efectores (ETI) (Bigerard *et al.*, 2015).

En el sistema PTI la planta a través de receptores membranales, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que actúan como elicitores capaces de activar y desencadenar una respuesta en la planta (Newman *et al.*, 2013). Mientras que el sistema ETI se activa cuando los efectores de un patógeno son reconocidos por las proteínas de resistencia (PR) a enfermedades (Nomura *et al.*, 2011). La respuesta es muy específica y en muchos casos culmina con la muerte celular localizada y programada, denominada HR (respuesta hipersensible) (Newman *et al.*, 2013)

Se ha reportado que *Arabidopsis thaliana* presenta un receptor (FSL2) indispensable para reconocer el péptido conservado de la flagelina (flg22) (Bauer *et al.*, 2001) que funciona como elicitador (Jelenska *et al.*, 2017) induciendo alteraciones en la membrana plasmática, la activación de la vía MAPKs (proteína quinasa activada por mitógenos), la deposición de callosa, la producción de etileno y de especies reactivas de oxígeno (Newman *et al.*, 2013, Smith *et al.*, 2014). Estas respuestas moleculares confieren resistencia contra patógenos.

Otro tipo de estrés al que normalmente se enfrentan las plantas es el estrés abiótico, que puede ser provocado por varios factores, por ejemplo, sequía, altas temperaturas y deficiencia nutrimental. En este último caso, la deficiencia de fósforo (P) es uno de los

principales factores que limita el crecimiento y producción de las plantas. Aunque el P es uno de los elementos más abundantes en el suelo, este no puede ser tomado directamente por la planta, ya que ésta lo toma preferencialmente en forma de fosfato ( $\text{PO}_4$ ). Sin embargo, el  $\text{PO}_4$  es de poca accesibilidad para la planta, ya que se distribuye de manera desigual en el suelo y no está tan disponible para la raíz de las plantas (Rubio *et al.*, 2001). A pesar de estas limitantes, el  $\text{PO}_4$  es importante en el desarrollo y productividad de las plantas, debido a que es necesario en distintos procesos fisiológicos como la fotosíntesis, el metabolismo energético, la respiración y la regulación de diversas enzimas. Así mismo, el P forma parte de biomoléculas como el ADN y ARN, así como también de los fosfolípidos que forman las membranas vegetales (Taiz y Zeiger, 2006).

La deficiencia de P en las plantas induce una serie de cambios a nivel morfológico, fisiológico y metabólico (Sánchez-Calderón, 2006), por lo que las plantas han desarrollado una serie de respuestas adaptativas para hacer frente a la deficiencia de  $\text{PO}_4$  (Rubio *et al.*, 2001). Se ha descrito una vía de señalización que controla las respuestas de *A. thaliana* a la deficiencia de P, en la cual PHR1 es un factor de transcripción crítico que se une en forma de dímero al promotor de los genes sensibles a la deficiencia de P (PSI). También, en deficiencia de P se induce el microRNA miR399 que se encarga de regular la expresión de PHO2, el cual controla la distribución de P entre la raíz y la parte aérea de la planta (Bari *et al.*, 2006).

También se ha trabajado con las mutantes de la ruta propuesta. En el caso de *phr1* en deficiencia de P el crecimiento de la planta se reduce (Rubio *et al.* 2001), mientras que *pho2* exhibe síntomas de toxicidad de P cuando el suministro de este nutrimento es alto (Liu *et al.*, 2012).

Se ha reportado que la fosforilación de proteínas tiene un papel importante en la señalización de defensa, dado que los receptores asociados a la membrana (PRRs) presentan varios sitios de fosforilación, que en condiciones de P suficiente se activan e inducen la respuesta inmune (Benschop *et al.*, 2007). Sin embargo, se desconoce la respuesta de las mutantes relacionadas con la deficiencia de P. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar si la deficiencia de P afecta la respuesta inmune de dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* (*phr1* y *pho2*)

## **Marco teórico**

### **1.0 Respuesta inmune en plantas (ETI, PTI)**

Las plantas al ser organismos sésiles presentan un mecanismo de defensa innato que va desde barreras físicas hasta señales moleculares y sistémicas. Este sistema actúa de dos formas: la primera se denomina PTI (del inglés: PAMP-triggered immunity) y la segunda se denomina ETI (del inglés: effector-triggered immunity) (Figura 1) (Ojito-Ramos y Portal, 2010).

Figura 1. Modelo zigzag de la respuesta inmune en las plantas

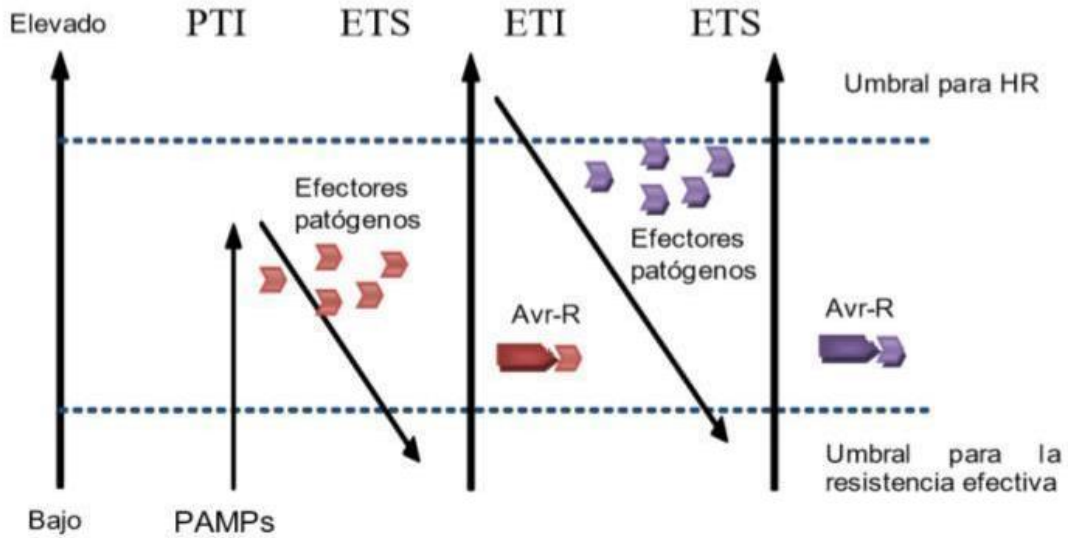


Figura 1. Modelo zigzag que ilustra la respuesta inmune en plantas (Jones y Dangl, 2006; Ojito-Ramos y Portal, 2010).

En la PTI las células de las plantas presentan receptores PRRs (del inglés: pattern recognition receptors) que reconocen epítopes de moléculas conservadas indispensables para organismos patógenos conocidos como PAMPs (del inglés: pathogen-associated molecular pattern) ( Zipfel *et al.*, 2004; Heese *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010; Ojito-Ramos y Portal, 2010).

La percepción de PAMPs mediante los PRRs induce la formación del complejo receptor inmune en la membrana plasmática (MP), formado por el mismo PRR conocido como FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2) y el RECEPTOR LECTIN-KINASE (RLK) conocido como BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1- ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1), también se encuentra asociada la NADPH OXIDASE RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D (RBOHD), se fosforilan y mandan una señal a BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1 (BIK1), el cual es un RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASES (RLCK) que

activa la respuesta inmune. BIK1 activa dos cascadas de MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPK o MPK); la primera cascada incluye MAP KINASE KINASE KINASE (MEKK1), MAP KINASE KINASE (MKK1 y MKK2) y MAP KINASE 4 que promueven la resistencia basal, mientras que la segunda cascada incluye MAP KINASE KINASE KINASE (MPKKK), MAP KINASE KINASE (MPKK4 Y MPKK5) que activan MPK3 y MPK6 promoviendo la biosíntesis de etileno y glucosinolatos (Figura 2) (Zipfel *et al.*, 2004; Heese *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010; Dingzhong *et al.*, 2017 y Peng *et al.*, 2018).

Figura 2. Señalización molecular del sistema PTI

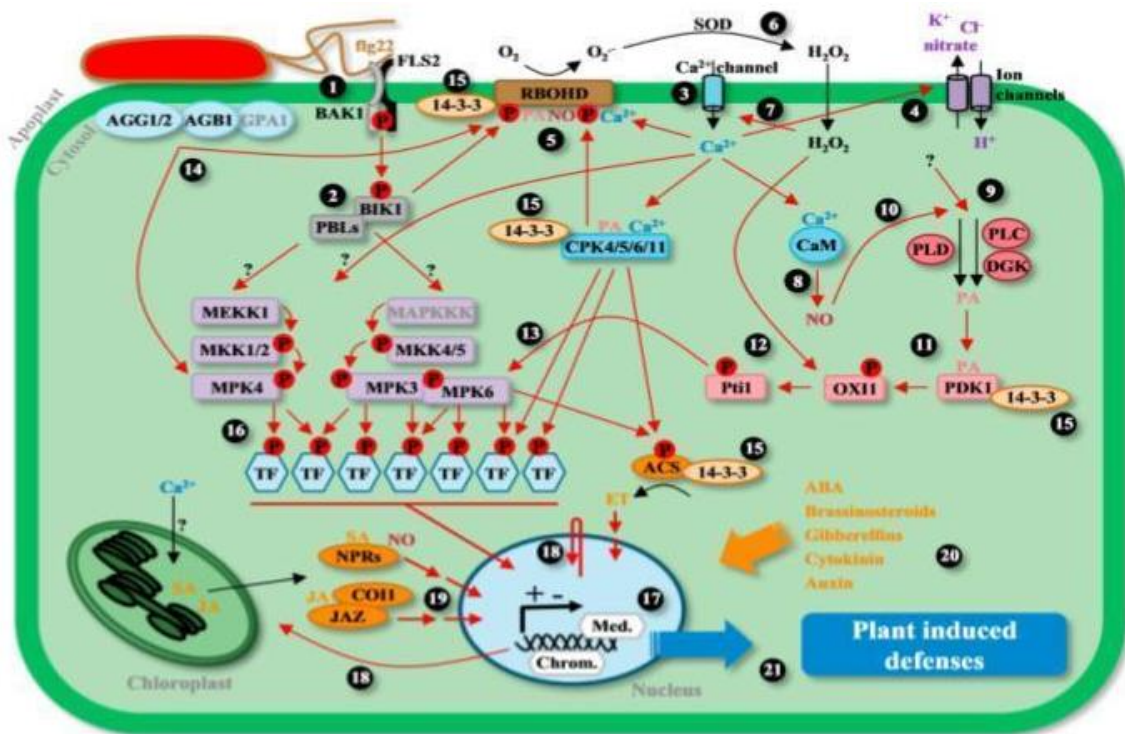


Figura 2. Modelo que representa la señalización molecular del sistema PTI (Bigerard *et al.*, 2015)

Otros RLCKs que se activan son COMPROMISED RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASE (PCRK1 y PCRK2) los cuales promueven la síntesis de ácido salicílico (SA por sus siglas en inglés), que contribuye a la resistencia a patógenos, mediante los genes SAR

DEFICIENT 1 (SARD1) y CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE G (CBP60G) que también regulan BAK1, BIK1, MKK4 y MPK3 (Peng *et al.*, 2018).

Otra de las respuestas asociadas a la resistencia de las plantas contra patógenos, es la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) que abre los canales de la membrana (entra  $\text{H}^+$ , mientras sale  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ). Existen reportes que demuestran que los flujos de  $\text{Ca}^{+2}$  pueden inducir los estallidos de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Sin embargo, para la producción de ROS, la enzima RBOH tiene que ser fosforilada en sitios específicos por la CALCIUM-DEPENDENT-PROTEIN KINASES (CPK5) (Dingzhong *et al.*, 2017).

A pesar de estas respuestas moleculares, hay patógenos que producen proteínas efectoras que inhiben la PTI. Sin embargo, a través de procesos co-evolutivos, algunas plantas han logrado activar receptores citoplasmáticos capaces de detectar las proteínas efectoras. Estos receptores son codificados por los genes PR (Pathogen Resistant) (Heese *et al.*, 2007). Una vez detectados los efectores por los receptores PR, se activan una serie de respuestas moleculares que constituyen la segunda forma de actuación de la inmunidad innata y se denomina ETI (del inglés: effector-triggered immunity) (Ojito-Ramos y Portal, 2010).

Los receptores de la ETI son proteínas intracelulares de tipo NB-LRR (del inglés: nucleotidebinding leucine-rich repeat), una de ellas es RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE (RPM1) que detecta proteínas efectoras producidas por patógenos en el citoplasma de la célula huésped, que se denominan proteínas de avirulencia (Avr), en este caso de *Pseudomonas syringae* (AvrRpm1). La señalización en cascada consta de una rápida activación de las MAPK e involucra un complejo molecular que controla la estabilización de las proteínas NB-LRR. También se sugiere que AvrRpm1 regula negativamente la función de algunas enzimas de óxido-reducción así como la NADPH QUINONA REDUCTASA (NQR) y la peroxiredoxina cisteína 2, mientras regula

positivamente la GLUTATION TRANSFERASA (GST8 y GST9) (Gouveia *et al.*, 2017) La acumulacion de ROS puede oxidar ácidos grasos (peroxidación lipídica) que podría ser reparada por la NQR, pero al estar regulada negativamente podría implicar que la peroxidación lipídica tiene un papel importante en la señalización ETI, adicionalmente se daña la cadena transportadora de electrones del fotosistema II durante la fotosíntesis (Hurley *et al.*, 2014).

Las respuestas asociadas con la ETI son muy específicas y en muchos casos culminan con la muerte celular localizada y programada, denominada HR (respuesta hipersensible, por sus siglas en Inglés), mediada por los genes ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) y PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) (Newman *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 2017). También dispara los niveles de AS, mediante los genes SARD1 y CBP60G que al igual que la PTI regulan algunos genes como EDS1, PAD4 y ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1 (ADR1) (Peng *et al.*, 2018).

## **1.1 Respuestas fisiológicas de la respuesta inmune**

### **1.1.1 Inhibición del crecimiento**

Las plantas usan la fotosíntesis para convertir la energía luminosa en energía química en forma de carbohidratos, esa fuente de recursos después es destinada a crecimiento o defensa según el estrés (Huot *et al.*, 2014). La defensa implica un gasto de energía, donde se ha visto que el crecimiento se reduce (Navarro y Zipfel, 2004).

Otro costo es la defensa constitutiva, la cual es la inhabilidad de responder apropiadamente a condiciones ambientales que limitan la energía de producción y la susceptibilidad aumenta cuando las plantas son atacadas por algún patógeno como *Pseudomonas syringae* (Huot *et al.*, 2014).

Los recursos usados para el crecimiento, son destinados a la respuesta de defensa, las hormonas parecen regular el “*trade off*” entre crecimiento y defensa. Esas hormonas son (BR) brasinoesteroides, (GA) giberelinas, (SA) ácido salicílico y (JA) jasmonatos (Huot *et al.*, 2014; Jiménez-Góngora *et al.*, 2014).

### **1.1.2 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan por la ruptura o la excitación del oxígeno molecular ( $O$ ,  $O_3$ ,  $^1O_2$ ) o por la reducción parcial del mismo ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$ ) (Halliwell y Gutteridge, 2015). Juegan un papel importante en las vías de señalización de varios procesos biológicos como crecimiento, desarrollo y respuesta a estímulos bióticos y abióticos (Baxter *et al.*, 2013).

Una de las respuestas celulares más rápida de la defensa, después del reconocimiento del patógeno, es la conocida explosión oxidativa. En ella se produce  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en el sitio de invasión, las cuales son producidas por la RBOH en la membrana plasmática, peroxidasas unidas a la pared celular y por aminooxidasas en el apoplasto (Rivera-Cabrera *et al.*, 2008). La función de la ola de ROS es alertar a los tejidos sobre estímulos localizados (Baxter *et al.*, 2013).

El  $O_2^-$  puede dismutar a  $H_2O_2$  para hacer más fácil su paso a través de la membrana plasmática (Junhuan *et al.*, 2017), también se difunde el ácido salicílico (SA) y el  $NO^{\cdot}$ , estos inhiben la actividad de enzimas antioxidantes como la ASCORBATO PEROXIDASA (APX) por una regulación postraduccional y la CATALASA (CAT) a nivel de mRNA, así la planta produce más ROS mientras disminuye su capacidad para remover  $H_2O_2$ , resultando en una sobreacumulación de ROS que puede oxidar diversas biomoléculas, alterar el metabolismo e inducir apoptosis o muerte celular programada (MCP) (Rivera-Cabrera *et al.*, 2008).

### **1.1.3 Deposición de calosa**



La calosa es un polisacárido con estructura  $\beta$ - 1,3 glucano con algunas ramificaciones  $\beta$ - 1,6 (Xiong-Yan *et al.*, 2009) que se deposita entre la membrana plasmática y la pared celular, actúa como una barrera física que detiene o vuelve lenta la invasión por patógenos (Ellinger y Voigt 2014)

La deposición de calosa es una respuesta de defensa controlada por distintas vías de señalización, dependiendo de las condiciones ambientales y el patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs) (Estrella *et al.*, 2011). En *A. thaliana* existen 12 genes que codifican para la síntesis de calosa, GLUCAN SYNTHASE-LIKE (GSL), de los cuales GSL5 induce la síntesis de calosa en tejido foliar en respuesta a patógenos (Xiong-Yan *et al.*, 2009).

La deposición de calosa es una respuesta multifacética de defensa que es controlada por distintas vías de señalización, dependiendo de las condiciones ambientales y el PAMP (Estrella *et al.*, 2011). La fosforilación y translocación directa de la calosa sintasa parece ser la clave postraduccional de mecanismos de regulación enzimática, mientras que el control transcripcional de genes GSL puede ser solo una función menor en respuesta al estrés biótico o abiótico (Ellinger y Voigt, 2014).

## **2.0 Fósforo y plantas**

Las plantas requieren de ciertos nutrimentos ( $\text{Fe}^{+3}$ , N, P,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$  entre otros) para crecer y desarrollarse. Sin embargo, algunos de estos minerales se encuentran de manera limitada, por ejemplo, la concentración aproximada de P en el suelo es de 0.05ppm, además de que se puede encontrar reaccionando con otros elementos como nitrógeno, hierro, zinc y calcio (Fernández *et al.*, 2007), por lo que las plantas han desarrollado una serie de respuestas adaptativas para facilitar la toma de P y la regulación interna de este (Lin 2009).

En respuesta a la deficiencia de P, las plantas inhiben la elongación de la raíz principal (PR por sus siglas en inglés), lo cual es regulado por los genes *PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (PDR2)*, el cual modula la actividad meristemática de la PR en respuesta a la disponibilidad de P y *LOW PHOSPHATE ROOT (LPR1)* que bloquea la comunicación con otras células, e induce la producción de ROS y la deposición de calosa (Figura 3) (Sánchez-Calderón *et al.*, 2006; Ham *et al.*, 2017). También se estimula la iniciación de raíces laterales (LR por sus siglas en inglés), regulado por los FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (TFs) *WRKY DNA-BINDING PROTEIN 75 (WRKY75)* que se encarga de la producción de la raíz lateral y pelos radicales y *ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA (ZAT6)* que modula la estructura radicular y la formación de dedos de zinc (Zn), así como también la expresión de la proteína *PHOSPHATE TRANSPORTER (PHT)* (Lin *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2014).

Figura 3. señalización en condiciones óptimas y deficiencia de fosforo

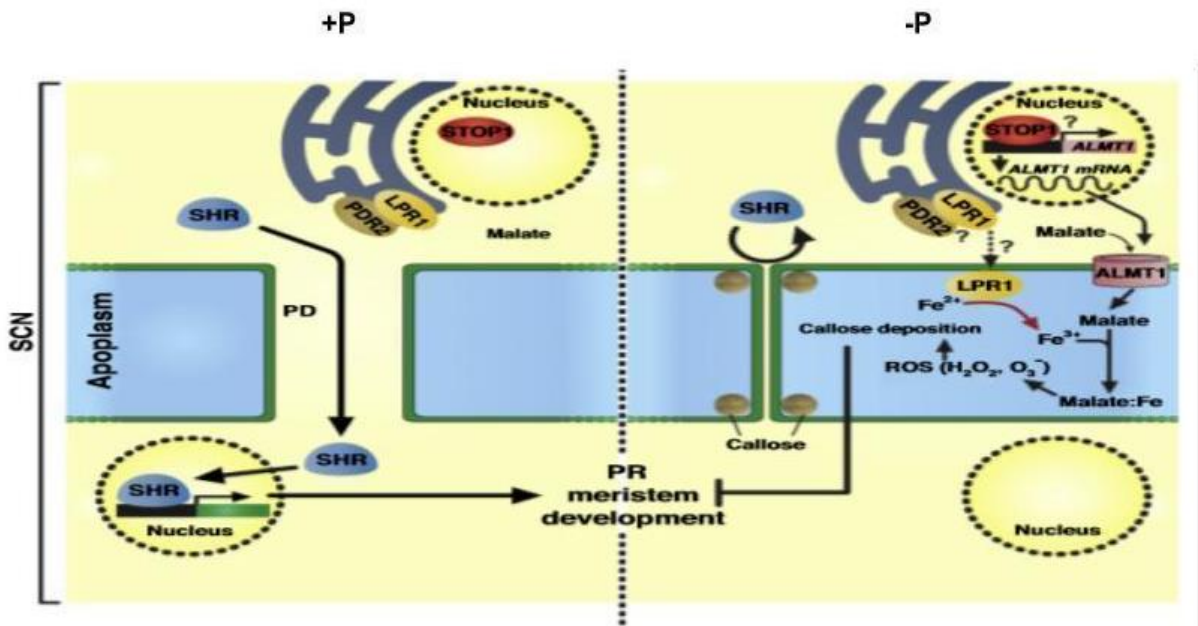


Figura 3. Comparación entre la señalización en células en condiciones óptimas y en deficiencia de P (Ham *et al.*, 2017)

Al mismo tiempo las células de la raíz secretan iones ( $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $HCO_3^-$ ) para dar cambios en el pH y poder obtener el P a partir del  $PO_4$  (Fernández *et al.*, 2007), el cual es absorbido por las plantas en forma de ion ortofosfato primario ( $H_2PO_4^-$ ) (Shen *et al.*, 2011), por lo cual es necesario un receptor de alta afinidad al que se le conoce como PHOSPHATE TRANSPORTER 1 (PHT1). PHT1 transporta el P a la MP mediado por PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR (PHF1) (Figura 4), también puede ser ubiquitinado y dirigido a la vacuola por PHOSPHATE 2 (PHO2) y por NITROGEN LIMITATION ADAPTATION (NLA). En la vacuola PHT1 se degrada y la vacuola permanece como una fuente de P que contiene proteínas con dominio SPX-MFS que se encargan de translocar el P (Lin *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2014; Ham *et al.*, 2017).

Figura 4. Señalización molecular de la homeostasis del P

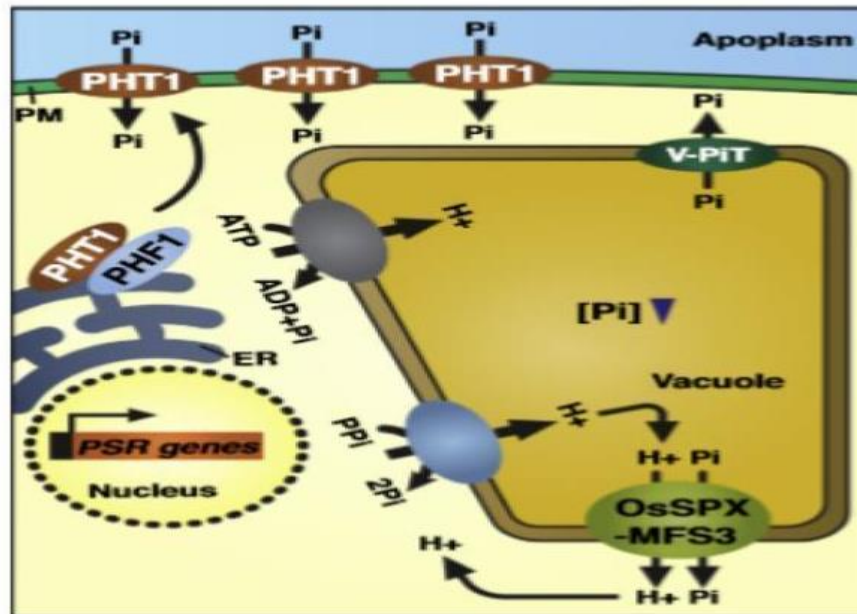


Figura 4. Modelo de la señalización molecular para la homeostasis de P (Ham *et al.*, 2017)

Ya en el núcleo los genes INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION 1 (IPS1) empiezan a transcribirse, uno de ellos es PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) que codifica un factor de transcripción, el cual se une en forma de dímero a la región promotora de otros genes (IPS), también induce la transcripción del miR399 que se encarga de regular la expresión de PHO2, e indirectamente regula la expresión de PHT1 y PHOSPHATE 1 (PHO1) ( Figura 5), este último encargado del transporte de P al xilema y en la distribución del P a las hojas (Rubio *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2012).

Figura 5. Señalización PSI

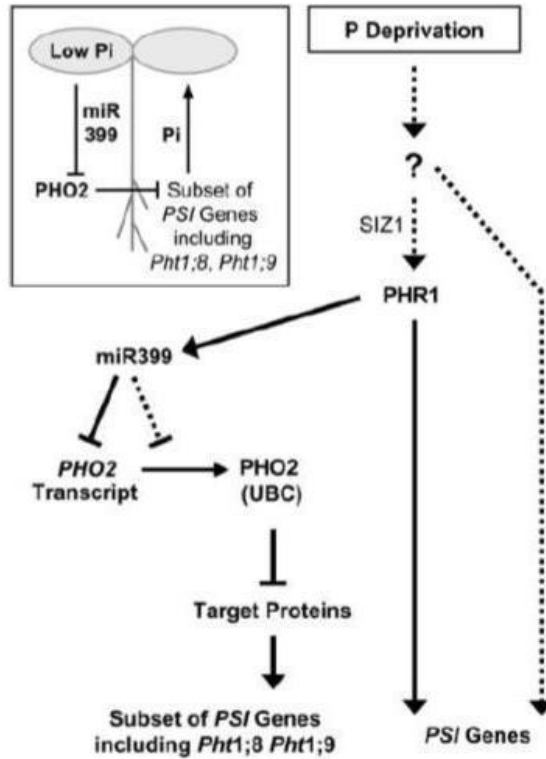


Figura 5. Señalización de genes PSI

### Justificación

Teóricamente se sabe que la respuesta inmune inducida por algún patógeno puede verse afectada por la deficiencia de algún nutrimento, en este caso se evaluó si la deficiencia de fósforo afecta la respuesta inmune de dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* que expresan dos fenotipos diferentes respecto a la acumulación de fósforo *phr1* (no acumula P) y *pho2* (sobre acumula P).

## Hipótesis

La deficiencia de fósforo afectará la respuesta inmune de las dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* (*phr1* y *pho2*) inducida por flg22.

## Objetivos

Evaluar si la deficiencia de P afecta la respuesta inmune de dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* (*phr1* y *pho2*)

## Objetivos particulares

- Determinar si la reducción del crecimiento de *A. thaliana* inducido por el péptido flg22 es afectada por la deficiencia de P
- Determinar si la deficiencia de P afecta la producción de ROS inducida por flg22
- Determinar si la deficiencia de P afecta la deposición de calosa inducida por flg22

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizaron semillas silvestres (Wt) de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col. O, y las mutantes por inserción de tDNA *phr1* y *pho2*, las cuales fueron generadas en el fondo genético Col. O y fueron obtenidas de la colección de mutantes del “The Arabidopsis Information Resource” <https://www.arabidopsis.org/> Las semillas se desinfectaron sumergiéndolas en etanol al 70% durante 1 minuto y con cloro comercial durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. Ya desinfectadas, se colocaron en cajas Petri que contenían medio sólido Murashige y Skoog (MS): MS+P [1mM] y MS - P [5µM] a ¼ de concentración, posteriormente se escarificaron incubándolas a 4°C por tres

días. Finalmente se colocaron a temperatura ambiente con un fotoperíodo de 16 horas durante siete días.

### **Evaluación de la inhibición del crecimiento inducido por flg22**

Después de siete días de crecimiento a 25 °C y con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, las plantas se pasaron a una placa de 12 pozas, las cuales tenían 1ml de medio líquido MS (MS +P y MS -P) y 1µl de flg22. Con este tratamiento, las plantas se mantuvieron creciendo durante 10 días bajo las condiciones ambientales ya descritas. Al término de este tiempo, se midió la longitud (cm) de las raíces y los datos fueron analizados aplicando la prueba de Anova. Se realizaron tres réplicas biológicas, cada una con tres plantas para cada tratamiento.

### **Medición de la producción especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Después de siete días de crecimiento a 25 °C y con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, las plantas se pasaron a una placa con 96 pozas. Cada poza contenía 150µl de medio líquido MS (MS +P o MS -P), las plántulas se mantuvieron en estas condiciones por un día. Después se taparon con papel aluminio, aproximadamente por cuatro horas y posteriormente se retiró el medio líquido y se realizaron dos tratamientos, uno con flagelina +flg22 (0.5µl de flg22) (Genescript, USA) y sin flagelina -flg22. Ambos con la solución reveladora la cual contiene 7.5µl de luminol (Waco, Japan), 2µl de HRP (Peroxidase from horseradish, Sigma, USA) por cada ml de agua ultrapura, inmediatamente después se midió la quimioluminiscencia utilizando un contador de fotones de baja intensidad marca UVITEC durante 25 minutos. Finalmente, las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa IMAGEJ, utilizando los píxeles como unidades relativas de luminiscencia, los datos obtenidos fueron analizados con una prueba de Anova. Se realizaron seis réplicas biológicas y cada réplica tenía una planta para cada tratamiento.

## Deposición de calosa

Después de 7 días de crecimiento, con mucho cuidado se transfirió una plántula de cada genotipo (ecotipo Wt Col. O, *phr1* y *pho2*) y de cada tratamiento (+P y -P) a 1 ml de medio líquido MS (0.25X) adicionado con sacarosa al 1% y se dejaron reposando a 22°C para evitar daño mecánico. Posteriormente se agregó una concentración 10nM de flg22 y se dejó actuar por 24 horas a 22 °C. Después se lavaron las plántulas en 1ml de etanol al 50% por 30-60 minutos, en seguida se lavaron con una solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 67mM (pH 12) por 30-60 minutos. Posteriormente el tejido fue teñido con azul de anilina al 0.01% en K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 67 mM (pH 12) por una hora y se lavaron de nuevo con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 67 mM pH 12. Luego se montaron las plantas en portaobjetos usando como medio de montaje una solución compuesta de 7ml de glicerol al 70%, 1ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 67 mM y 2ml de agua destilada y se almacenaron a 4°C Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia ultravioleta; Ampliación 4x (filtro DAPI), se tomaron fotografías y se contó cada punto de deposición de calosa por cada hoja, los datos fueron analizados con una prueba Anova. Se realizaron tres réplicas biológicas con una planta para cada tratamiento.

## Resultados

Las plantas pueden estar sometidas a diferentes tipos de estrés, uno de ellos es producido por el ataque de patógenos. La situación de estrés se agrava cuando la planta presenta deficiencia de nutrimentos (Navarro y Zipfel, 2004; Huot *et al.*, 2014). En este trabajo se utilizaron dos mutantes de *A. thaliana* que presentan un fenotipo que no acumula Pi (*phr1*) y otro que sobreacumula Pi (*pho2*), dadas estas características se usaron estas mutantes para evaluar la respuesta inmune inducida por flg22 bajo dos condiciones nutricionales: +P [1mM] y -P [5µM]. Se evaluó la reducción del crecimiento, así como también se cuantificaron



las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas y la deposición de calosa, todas estas respuestas inducidas por el péptido sintético flg22.

En los siguientes apartados se describen los efectos de la deficiencia de P en cada una de las respuestas características de la respuesta inmune

### **Inhibición del crecimiento**

Una de las consecuencias de la activación prolongada de la respuesta inmune es la inhibición o reducción del crecimiento (Navarro y Zipfel, 2004; Huot et al 2014). Para determinar si la respuesta inmune inducida por flg22 en dos mutantes de *A. thaliana* (*phr1* y *pho2*), inhibe el crecimiento de las plantas, se mantuvieron durante diez días plantas en medio MS +P [1mM] y en medio MS -P [5μM] con flg22 y se midió la longitud total.

Se encontró que para la mutante *phr1*, la cual no acumula P (figura 6), estadísticamente con una  $p < 0.001$  existen diferencias significativas respecto a la inhibición del crecimiento en los tratamientos representados por la clase a (Col. O +P), b (Col. O -P y *phr1* +P) y c (Col. O +P flg22, Col. O -P flg22, *phr1* +P flg22 y *phr1* +P flg22), siendo la clase c la que presenta una mayor inhibición en el crecimiento, resaltando que en ella se encuentran los tratamientos con flg22 y que sin importar si está en +P o -P, el crecimiento se reduce. Estos datos sugieren que la deficiencia de P en el caso de la mutante *phr1* si reduce el crecimiento, lo mismo sucede con Col. O, sin embargo cuando se agrega el péptido flg22 en plantas con y sin deficiencia de P, el crecimiento estadísticamente es el mismo, no se reduce.

Figura 6. Inhibición del crecimiento en la mutante *phr1*

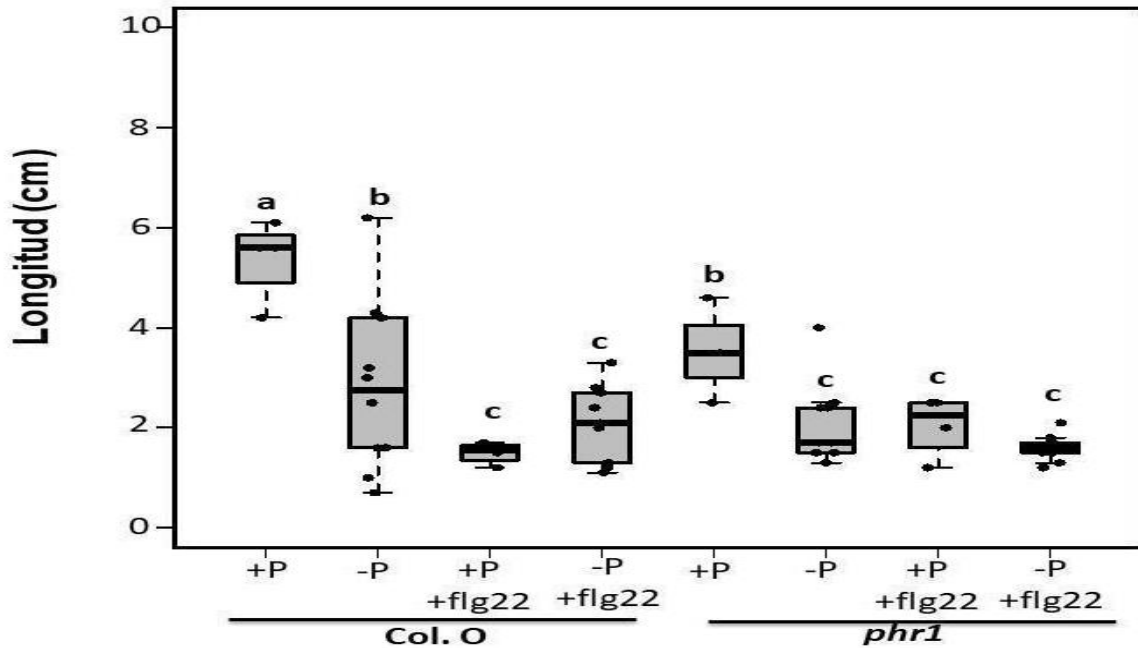


Figura 6. Gráfica de la inhibición del crecimiento en Wt y la mutante *phr1* en presencia y ausencia de flg22 en condiciones de +P [1mM] y -P [5µM]. Los datos fueron analizados mediante un análisis de Varianza seguido de una prueba de Tukey. Las letras representan las diferentes categorías estadísticas. Tratamientos compartiendo la misma categoría estadística indica que no hay diferencia significativa con una  $p < 0.001$ .

Para la mutante *pho2* (figura 7), la cual acumula de 2-5 veces más P que una planta silvestre (Delhaize y Randall, 1995), se encontró que estadísticamente con una  $p < 0.001$  existen diferencias significativas respecto a la inhibición del crecimiento en los tratamientos representados por la clase a (Col. O +P), b (Col. O -P, Col.O +P flg22, Col. O -P flg22 y *pho2* +P flg22) y c (*pho2* +P), existe también una clase bc (*pho2* +P y *pho2* -P flg22). Estos datos sugieren que la deficiencia de P aumenta el rango de tamaño que puedan presentar las plantas, estadísticamente es diferente al presentado por las plantas sin deficiencia de P. Sin embargo, el crecimiento se ve comprometido en las plantas con condiciones óptimas

de P cuando se agrega el péptido flg22 y su crecimiento es estadísticamente similar al de las plantas deficientes de P

Figura 7. Inhibición del crecimiento en la mutante *pho2*

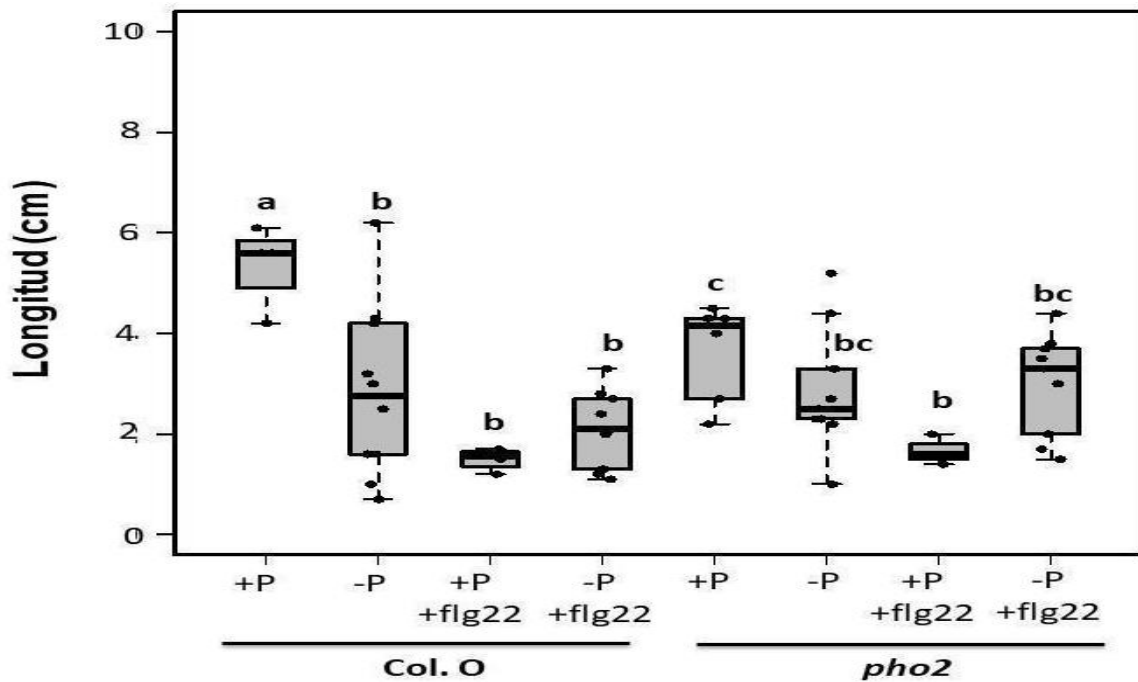


Figura 7. Gráfica de la inhibición del crecimiento en Wt y la mutante *pho2* en presencia y ausencia de flg22 en condiciones de +P [1mM] y -P [5µM]. Los datos fueron analizados mediante un análisis de Varianza seguido de una prueba de Tukey. Las letras representan las diferentes categorías estadísticas. Tratamientos compartiendo la misma categoría estadística indica que no hay diferencia significativa con una  $p < 0.001$ .

## Producción de ROS

Las ROS juegan un papel importante en la señalización molecular en la regulación de numerosos procesos biológicos como crecimiento, desarrollo y respuesta a estímulos bióticos y abióticos (Baxter *et al.*, 2013). Para evaluar la respuesta inmune inducida por flg22 en mutantes de *A. thaliana* (*phr1* y *pho2*), bajo dos condiciones: +P [1mM] y -P [5μM], se cuantificaron las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas, ya que es una de las respuestas frente al ataque por patógenos (Smith et al 2014).

Para la mutante *phr1* (Figura 8) se encontró que estadísticamente con una  $p < 0.001$  existen diferencias en la producción de ROS en los tratamientos representados por la clase a (Col. O +P, Col. O -P, *phr1* +P y *phr1* -P) y la clase b (Col. O +P flg22, Col. O -P flg22, *phr1* +P flg22 y *phr1* -P flg22), representada por los tratamientos con flg22 sin importar si son deficientes o no en Pi, siendo esta la clase que presenta un incremento en la producción de ROS. Tanto para la mutante *phr1* como para Col. O el aumento en la producción de ROS se debe a la interacción con el péptido flg22 y no a la deficiencia de P, sin embargo la cantidad de ROS producida en +P y -P, +P flg22 y -P flg22 son estadísticamente similares.

Figura 8. Producción de ROS en la mutante *phr1*

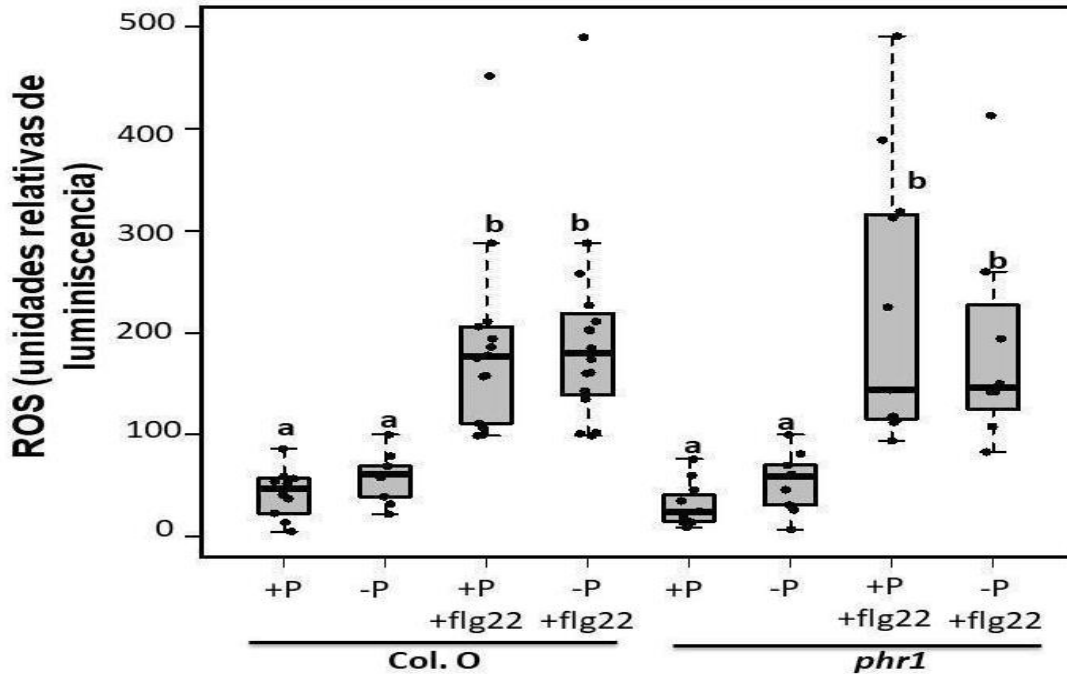


Figura 8. Gráfica de la producción de ROS en Wt y la mutante *phr1* en presencia y ausencia de flg22 en condiciones de +P [1mM] y -P [5µM]. Los datos fueron analizados mediante un análisis de Varianza seguido de una prueba de Tukey. Las letras representan las diferentes categorías estadísticas. Tratamientos compartiendo la misma categoría estadística indica que no hay diferencia significativa con una  $p < 0.001$ .

Para la mutante *pho2* (Figura 9), se encontró que estadísticamente con una  $p < 0.001$  existen diferencias en la producción de ROS en los tratamientos representados por la clase a (Col. O +P, Col. O -P), la clase b (Col. O +P flg22, Col. O -P flg22 y *pho2* +P flg22), también existe una clase ab (*pho2* -P y *pho2* -P flg22) y ac (*pho2* +P), siendo la clase b la que tiene una mayor producción de ROS. La deficiencia de P en Col. O produce estadísticamente la misma cantidad de ROS que en las condiciones suficientes de P. En el caso de la mutante *pho2*, en deficiencia de P la producción de ROS es diferente a la producción de ROS por la

misma mutante en condiciones suficientes de P, sin embargo estadísticamente se produce la misma cantidad de ROS en condiciones deficientes de P, incluso si el tratamiento es con flg22.

Figura 9. Producción de ROS en la mutante *pho2*

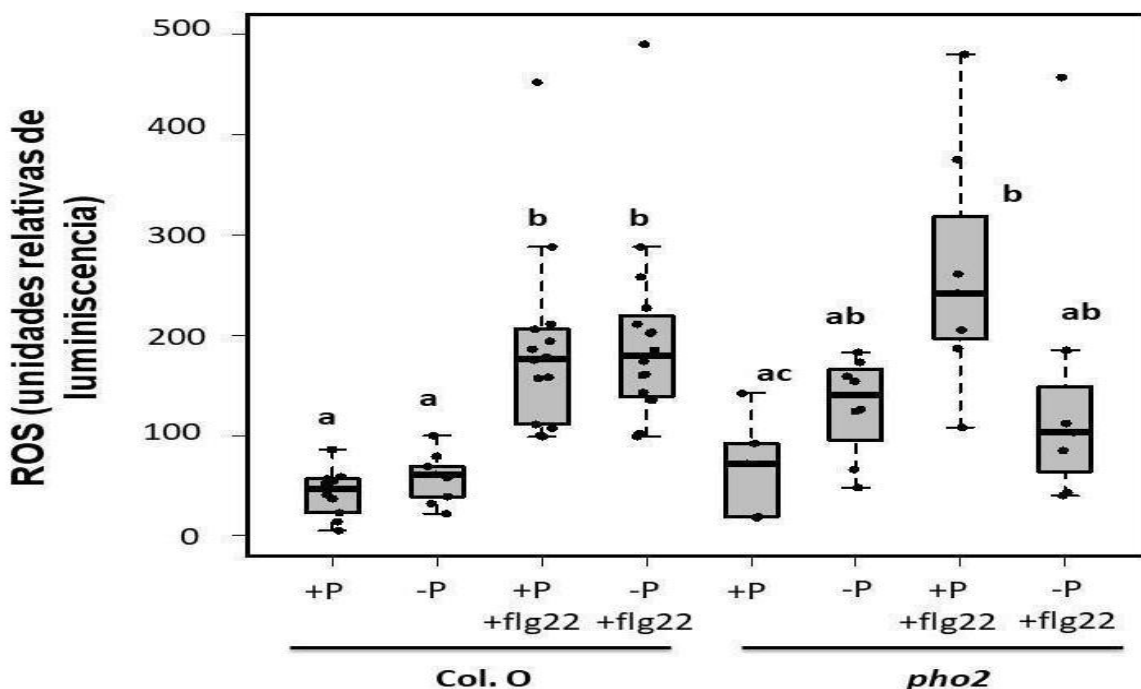


Figura 9. Gráfica de la producción de ROS en Wt y la mutante *pho2* en presencia y ausencia de flg22 en condiciones de +P [1mM] y -P [5µM]. Los datos fueron analizados mediante un análisis de Varianza seguido de una prueba de Tukey. Las letras representan las diferentes categorías estadísticas. Tratamientos compartiendo la misma categoría estadística indica que no hay diferencia significativa con una  $p < 0.001$ .

### Deposición de calosa

La calosa es un polisacárido que se deposita en la pared celular de células vegetales en procesos importantes como el desarrollo y la respuesta a estrés biótico y abiótico (Xion-Yan

y Jae-Yean, 2009). Para evaluar la respuesta inmune inducida por flg22 en mutantes de *A. thaliana* (*phr1* y *pho2*), bajo dos condiciones: +P [1mM] y -P [5µM], se evaluó la deposición de calosa, ya que es una de las respuestas frente al ataque por patógenos (Nishimura *et al.*, 2003).

Para la mutante *phr1* (Figura 10) se obtuvo que estadísticamente, con una  $P < 0.001$  existen diferencias significativas en la deposición de calosa entre los tratamientos representados por la clase a (Col. O +P), la clase b (Col. O -P y Col-O +P +flg22) y la clase c (Col. O -P +flg22, *phr1* +P +flg22 y *phr1* -P + flg22). Sin embargo, se muestra una clase mixta bc (*phr1* +P y *phr1* -P), siendo estas las que presentaron más puntos de deposición de calosa. Los resultados indican que la deposición de calosa es mayor en la mutante *phr1* respecto a Col. O, sin embargo la deposición es similar en el caso de Col. O -P con flg22 y la mutante *phr1* +P y -P ambos con flg22. En el caso de Col. O la deposición de calosa es mayor en las plantas que presentaron deficiencia de P, aun si fueron tratadas con el péptido flg22, mientras que para la mutante *phr1* la deposición de calosa no mostró diferencias significativas respecto a si presentaron deficiencia de P o no.

Figura 10. Deposición de calosa en la mutante *phr1*

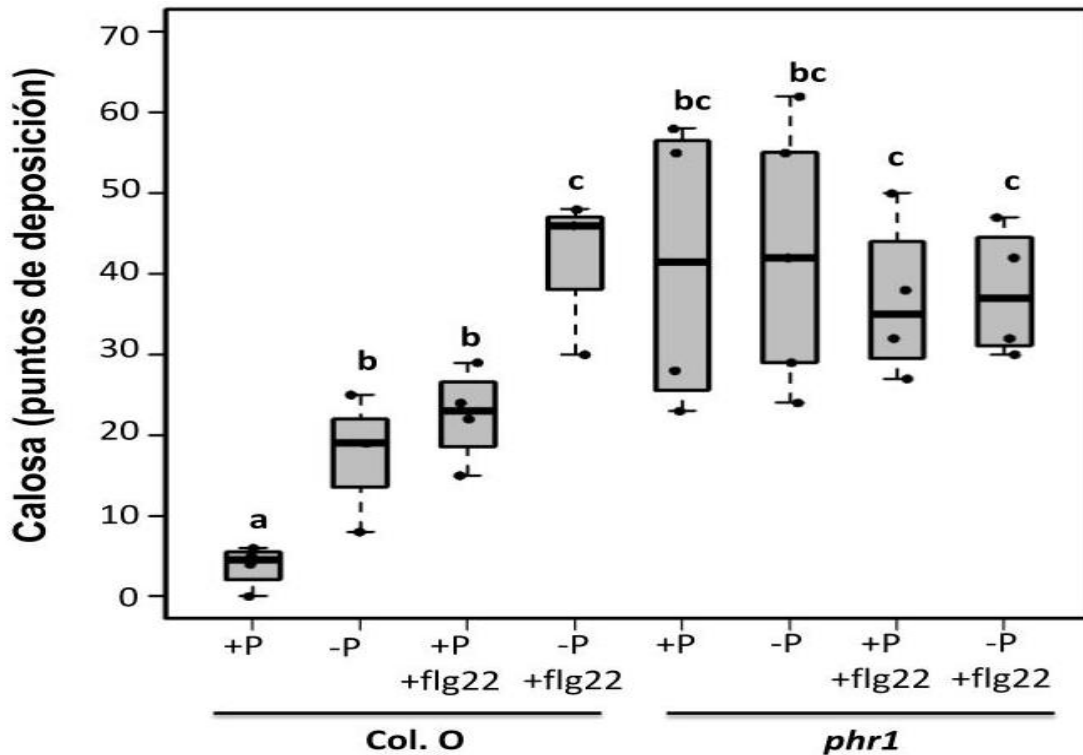


Figura 10. Gráfica de la deposición de calosa en Wt y la mutante *phr1* en presencia y ausencia de flg22 en condiciones de +P [1mM] y -P [5µM]. Los datos fueron analizados mediante un análisis de Varianza seguido de una prueba de Tukey. Las letras representan las diferentes categorías estadísticas. Tratamientos compartiendo la misma categoría estadística indica que no hay diferencia significativa con una  $p < 0.001$ .

Mientras que para la mutante *pho2* (Figura 11), se obtuvo estadísticamente con una  $P < 0.001$  existen diferencias significativas en la deposición de calosa entre los tratamientos representados por la clase a (Col. O +P), la clase b (Col. O -P, Col. O +P +flg22, *pho2* +P, *pho2* -P, *pho2* +P +flg22 y *pho2* -P + flg22) y la clase c (Col. O -P +flg22), siendo las clases b y c las que presentaron más puntos de deposición de calosa. Estadísticamente la deposición de calosa es similar en Col. O y la mutante *pho2*, excepto por Col. O +P y *pho2*



+P, donde este último presenta una mayor deposición de calosa y Col. O -P con flg22 y la mutante *pho2* -P con flg22, siendo Col. O la que presenta mayor deposición de calosa. En el caso de Col. O la deposición de calosa es mayor en las plantas que presentaron deficiencia de P, aun si fueron tratadas con el péptido flg22, mientras que para la mutante *pho2* la deposición de calosa no mostró diferencias significativas respecto a si presentaron deficiencia de P o no.

Figura 11. Deposición de calosa en la mutante *pho2*

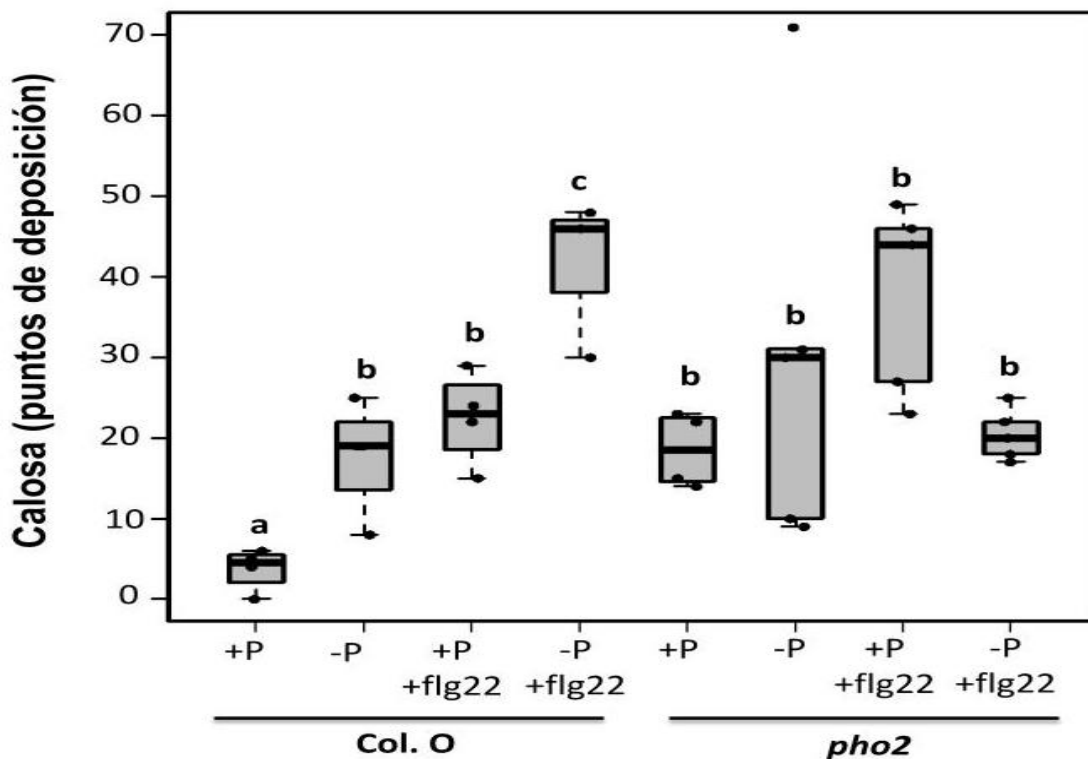


Figura 11. Gráfica de la deposición de calosa en Wt y la mutante *pho2* en presencia y ausencia de flg22 en condiciones de +P [1mM] y -P [5µM]. Los datos fueron analizados mediante un análisis de Varianza seguido de una prueba de Tukey. Las letras representan las diferentes categorías estadísticas. Tratamientos compartiendo la misma categoría estadística indica que no hay diferencia significativa con una  $p < 0.001$ .

La calosa es un polisacárido de la forma  $\beta$ - 1,3 glucano con algunas ramas  $\beta$ - 1,6 (Xiong-Yan y Jae-Yean, 2009), que se deposita entre la membrana plasmática y la pared celular, actúa como una barrera física que detiene o vuelve lenta la invasión por patógenos (Ellinger y Volgt, 2014). En la figura 12 se muestran fotografías que se tomaron en este trabajo, donde a) Col. O +P, b) Col. O +P +flg22, c) Col. O -P, d) Col. O -P +flg22, e) *phr1* +P +flg22, f) *phr1* -P +flg22, g) *pho2* +P +flg22 y h) *pho2* -P +flg22. Se puede observar que la deposición de calosa es evidente en las hojas de Col. O que fueron tratadas con flg22 (b, d) respecto a las que no fueron tratadas con el péptido (a, c). Interesantemente, observamos que la deficiencia de P aumentó la deposición de calosa en plantas Wt. Esta tendencia de acumular más calosa en respuesta a la deficiencia de P fue confirmada en la mutante *phr1*, la cual es incapaz de tomar P aún en condiciones control. La mutante *phr1* siempre acumuló más calosa, esto sin importar si crecía en condiciones óptimas (e) o deficientes de P (f). Caso contrario a la mutante *pho2*, la cual es considerada como hiperacumuladora de P. La mutante *pho2* (g, h) acumuló menos calosa que la Wt y la mutante *phr1*.

Figura 12. Fotografías en microscopio de epifluorescencia de *Arabidopsis thaliana*

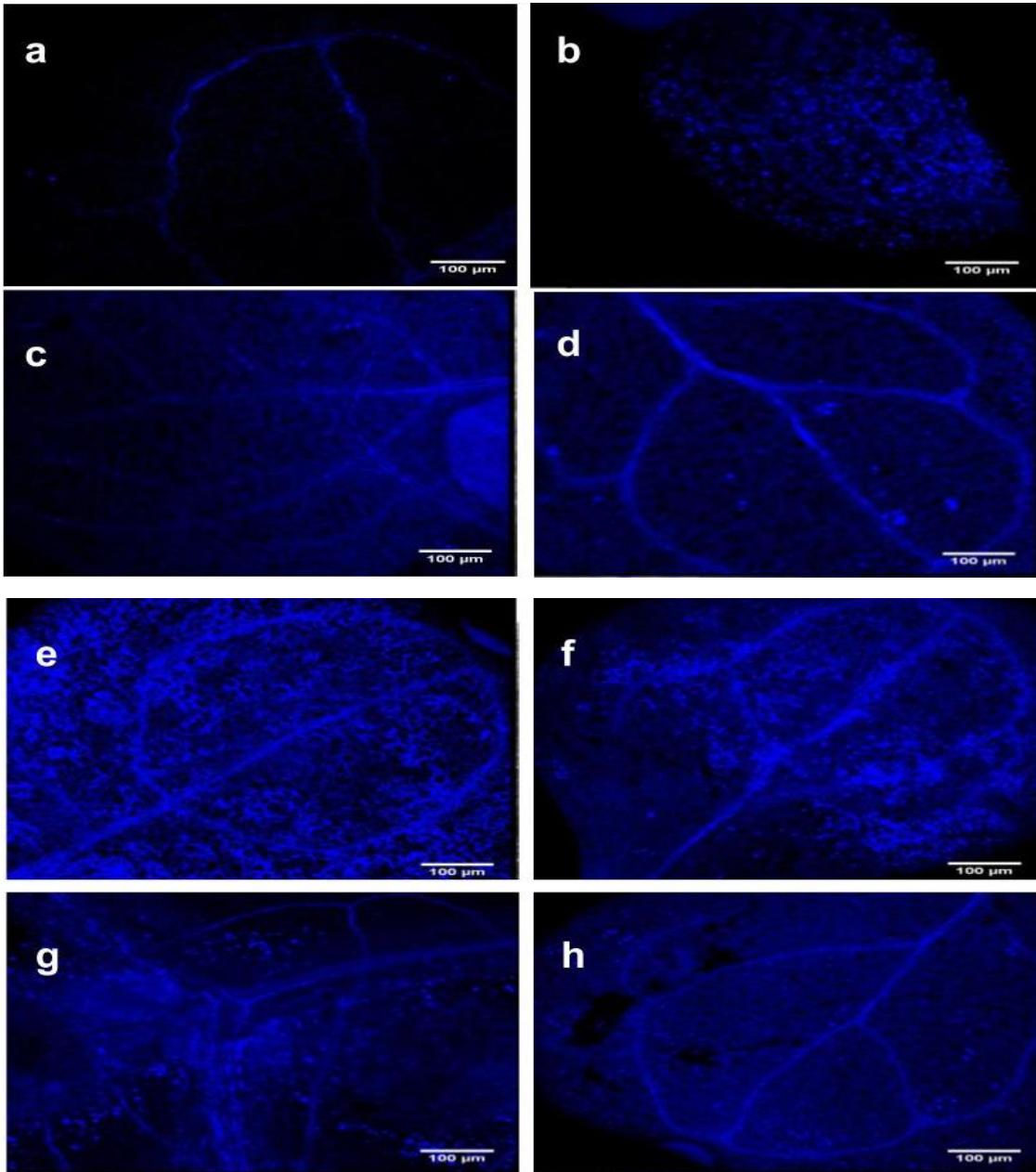


Figura 12. Fotografías en microscopio de epifluorescencia de *Arabidopsis thaliana* donde, ecotipo Col. O (izquierda) +P (a) y -P (c) y ecotipo Col. O con flg22 (derecha) +P (b) y -P (d). Para las mutantes phr1 (e, f) y pho2 (g, h) +P (izquierda) y -P (derecha) ambos con flg22.

## Discusión

Las plantas pueden estar sometidas a diferentes tipos de estrés, uno de ellos es producido por el ataque de patógenos. La situación de estrés se agrava cuando la planta presenta deficiencia de nutrimentos (Navarro y Zipfel, 2004; Huot et al 2014). En este trabajo se evaluó si la deficiencia de P afecta la respuesta inmune de dos mutantes de *A. thaliana*, una que no acumula P (*phr1*) y otra que sobre acumula P (*pho2*).

Los datos obtenidos en este trabajo revelan que para la mutante *phr1* la deficiencia de fósforo si reduce el crecimiento. Sin embargo, el crecimiento de las plantas cuando se les agregó el péptido flg22 no se redujo, sin importar si se trataba de +P o -P. Mientras que la producción de ROS se ve potenciada por la activación de la respuesta inmune, a pesar de ello la producción de ROS es estadísticamente similar cuando se trata de +P y -P ambos con flg22. En el caso de la deposición de calosa, las plantas tratadas con flg22 no presentaron diferencias significativas respecto a si tenían deficiencia de P o no.

Para la mutante *pho2* se demostró que la deficiencia de P aumenta el rango de tamaño que puedan presentar las plantas, estadísticamente es diferente al presentado por las plantas con +P, pero el crecimiento se ve comprometido en las plantas con +P flg22 y su crecimiento es estadísticamente similar al de las plantas con -P flg22. La producción de ROS en -P es diferente a la producción de ROS por la misma mutante en condiciones suficientes de P. Sin embargo, estadísticamente se produce la misma cantidad de ROS en condiciones deficientes de P, incluso si el tratamiento es con flg22. En contraste, observamos que la deficiencia de P incrementó la deposición de calosa en plantas Wt. Este efecto fue más evidente en las mutantes *phr1*, las cuales no son capaces de absorber P, esto a pesar de que exista en el medio.

En conclusión, la deficiencia de P parece afectar ciertos procesos de la respuesta inmune, en nuestro caso, observamos que esta condición nutricional contribuye a incrementar la deposición de calosa.

### **Inhibición del crecimiento**

Una de las consecuencias de la activación prolongada de la respuesta inmune es la inhibición o reducción del crecimiento, se sugiere que la respuesta inmune reduce o inhibe el crecimiento ya que requiere una mayor demanda de recursos y por lo tanto los recursos destinados al crecimiento se desvían para apoyar a la defensa (Navarro y Zipfel, 2004; Huot *et al.*, 2014). Se ha reportado que la respuesta inmune en *A. thaliana* en condiciones de deficiencia de nutrimentos reduce drásticamente el crecimiento, se explica que, en condiciones óptimas de nutrimentos, la respuesta inmune parece no afectar el crecimiento (Eichmann y Schäfer, 2015). Sin embargo, en este trabajo para las mutantes *phr1* y *pho2* al ser tratadas con flg22 en deficiencia y sin deficiencia de P, el tamaño no cambió significativamente.

Plantas con la activación de la respuesta constitutiva también son enanas y con pocas semillas, demostrando el costo de la activación de defensa (Albrecht y Argüeso, 2017). La activación de la PTI por flg22 reduce la expresión de genes asociados a la biosíntesis de la hormona BR, de 15-20 minutos después del tratamiento. Lo anterior sugiere que la síntesis de algunas hormonas es importante para regular la respuesta inmune. (Jiménez-Góngora *et al.*, 2014). En este estudio, a pesar de que se activó la respuesta inmune no se observó una disminución de crecimiento, sugiriendo que en las mutantes *phr1* y *pho2* la expresión de los genes asociados a la biosíntesis de BR no es afectada.

Se ha reportado que una de las adaptaciones de las plantas frente a la deficiencia de algún nutrimento es la reducción en el crecimiento (Rubio *et al.*, 2001). Con esta adaptación la planta desarrolla una geometría adecuada para adaptarse a la baja disponibilidad de nutrimentos (Rajulu *et al.*, 2014). Reportes previos indican que el crecimiento de las mutantes *phr1* y *pho2* es reducido en condiciones de deficiencia de P (Rubio *et al.*, 2001;

Liu et al., 2012), coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo. Además, se observó que la presencia de *flg22* solo contribuyó a la reducción del crecimiento en las plantas +P, en las demás no se observaron diferencias significativas.

La acumulación de P en plantas que crecieron en condiciones suficientes de P es menor en la mutante *phr1* respecto a Wt (Bustos *et al.*, 2010). Después de la deficiencia de P las plantas Wt muestran un aumento significativo en la relación de crecimiento de raíz a brote, este aumento se redujo significativamente en *phr1*. También mencionan que en medio deficiente de P cambia la longitud de los pelos radicales en esa misma mutante (Bustos *et al.*, 2010).

La mutante *pho2* acumula más P en las hojas, respecto a la Wt, sin embargo el peso seco de la raíz de estas dos plantas no es diferente (Shen *et al.*, 2016). Análisis cinéticos demostraron que la  $V_{max}$  de la mutante *pho2* incrementa (Aung *et al.*, 2006), también se ha reportado que el nivel de la familia de las proteínas transportadoras PHT aumentan en la raíz respecto a Wt (Huang *et al.*, 2013).

## **Producción de ROS**

Una de las respuestas celulares más rápida a la defensa después del reconocimiento del patógeno, es la conocida explosión oxidativa que produce  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en el sitio de invasión, las cuales son producidas por la RBOH en la membrana plasmática, peroxidasas unidas a la pared celular y por aminooxidasas en el apoplasto (Rivera-Cabrera *et al.*, 2008).

Por otra parte se ha reportado que la deficiencia de nutrimentos es una señal que está asociada con la producción y acumulación de ROS (Pérez-Pérez *et al.*, 2012), Shin *et al.*, (2005), mencionan que las plantas con deficiencia de nutrientes presentan más ROS que las plantas que no se encuentran bajo deficiencia de nutrimentos, lo cual no concuerda con

los resultados obtenidos en este trabajo. Estos autores también indican que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa en la deficiencia de P, lo que sugiere que es un elemento en esa señal. Sin embargo, en este trabajo las mutantes produjeron la misma cantidad de ROS estando en deficiencia y condiciones óptimas de P. Yuan *et al.*, (2016) especulan que en deficiencia de P se evita la excesiva producción de ROS, la deficiencia de P en brotes causa una estrategia adaptativa para reducir la expresión de genes PS (phosphorus starvation, por sus siglas en inglés), también se suprimen algunos genes fotosintéticos en los brotes, lo cual puede evitar el exceso de producción de ROS causado por la actividad aberrante de PS que daña las células.

Si se agotan los recursos de P, *phr1* suprime la respuesta inmune y prioriza la respuesta al estrés de P (Motte y Beeckman, 2017). La expresión de miRNA 399 es reducida, mientras que la de otros genes es reprimida en la mutante *phr1* cuando tiene deficiencia de P; sin embargo son regulados positivamente en la mutante *pho2* sin deficiencia de P (Bari *et al.*, 2006).

### **Deposición de calosa**

La cuantificación de la deposición de calosa es una medida de la actividad de la respuesta inmune y crecimiento del patógeno usando imágenes fluorescentes (Zhou, 2012). Estrella y colaboradores (2011) mostraron diferencias significativas en la deposición de calosa de una planta Wt respecto a una tratada con flg22, siendo esta última la que tuvo mayor deposición de calosa. Aunque en este estudio no observamos diferencias significativas en la producción de ROS, observamos un claro incremento de la deposición de calosa tanto en plantas Wt como en la mutante *phr1*. Esta acumulación de calosa no fue tan evidente en la mutante *pho2*, la cual hiperacumula P. Estos resultados sugieren que la deficiencia de P puede incrementar los mecanismos de defensa mecánico, en este caso la deposición de calosa, contra patógenos. Sin embargo, se requieren más experimentos para conocer los

mecanismos genéticos que activa la deficiencia de P y que conlleva al incremento de esta defensa mecánica.

## **Conclusión**

Con base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la deficiencia de fósforo parece incrementar las barreras físicas (deposición de calosa) contra patógenos.

A pesar de que la deficiencia de fósforo incrementa la acumulación de calosa, los resultados sugieren que esta condición nutrimental no afecta la reducción del crecimiento y producción de ROS, ambos activados por el péptido flg22.

## **Literatura citada**

Aung, K., Shu-I Lin., Chia-Chune W., Yu-Ting H., Chun-lin S.,, and Tzyy-Jen C. 2006. *pho2*, a Phosphate Overaccumulator, Is Caused by a Nonsense Mutation in a MicroRNA399 Target Gene. *Plant Physiology* 141: 1000–1011.

Albrecht, T. y Argüeso, C. 2017. Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Annals of Botany* 119: 725–735.

Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M. y Scheible, W. 2006. PHO2, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants. *Plant Physiology* 141: 988-999.

Bauer, Z., Gómez- Gómez, L., Boller, T. y Félix, G. 2001. Sensitivity of Different Ecotypes and Mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the Bacterial Elicitor Flagellin Correlates with



the Presence of Receptor-binding Sites. *The journal of biological chemistry*. 276: 45669–45676

Baxter, A., Mittler, R. y Suzuki, N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65: 1229–1240.

Benschop, J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A., Slijper, M., y Menke, F. 2007. Quantitative Phosphoproteomics of Early Elicitor Signaling in Arabidopsis. *Molecular & Cellular Proteomics* 1198-1214.

Bigeard J, Colcombet J, y Hirt H. 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* 8 (4): 521–39.

Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Puga, M., Rubio, V., Pérez, J, Solano, R., Leyva, A. y Paz-Ares, J. 2010. A Central Regulatory System Largely Controls Transcriptional Activation and Repression Responses to Phosphate Starvation in Arabidopsis. *PLoS Genetics* 6 (9): 102-117.

Delhaize E. y Randall P. 1995. Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107: 207-213.

Dingzhong, T., Guoxun, W. y Jian-Min, Z. 2017. Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant Cell* 29: 618–637.

Ellinger, D. y Voigt, C. 2014. Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany* 114: 1349–1358.

Estrella, L., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. y Ton, J. 2011. Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *The American Phytopathological Society* 24 ( 2): 183–193.

Eichmann, R. y Schäfer, P. 2015. Growth versus immunity a redirection of the cell cycle?. *Current opinion in Plant Biology* 26: 106-112.

Fernández, M. 2007. Fósforo: amigo o enemigo. *Redalyc* 41 (2): 51-57.

Gouveia, B., Calil, L., Machado, J., Santos, A., y Fontes, E. 2017. Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Frontiers in Microbiology* 7: 2139-2153.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. 2015. Capítulo 1. Oxygen: boon yet bane—introducing oxygen toxicity and reactive species. En *Free Radicals in Biology and Medicine* (pp.1-29). Nueva York, Estados Unidos, 5ta ed.

Ham, B., Chen, J., Yan. Y. y Lucas, W. 2017. Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Current Opinion in Biotechnology* 49:1–9.

Heese, A., Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC y Rathjen JP. 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (29): 12217-22.

Huang, T., Han, C., Lin, S., Chen, Y., Tsai, Y., Chen, Y., Chen, J., Lin, W., Chen, P., Liu, T., Chen, Y., Sun, C. y Chiou, T. 2013. Identification of Downstream Components of Ubiquitin-Conjugating Enzyme PHOSPHATE2 by Quantitative Membrane Proteomics in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell* 25: 4044–4060.

Huot, B., Yao. J., Beronda, L., Montgomery-c, and Sheng Yang Hea. 2014. Growth Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Molecular Plant* 7: 1267–1287.

Hurley, B., Subramaniam, R., Guttman, D. y Desveaux, D. 2014. Proteomics of effector-triggered immunity (ETI) in plants. *Virulence* 5 7: 752–760.

Jelenska, J., Davern, S., Standaert, R., Mirzadeh, S. y Greenberg, J. 2017. Flagellin peptide flg22 gains access to long-distance trafficking in Arabidopsis via its receptor, FLS2. *Journal of Experimental Botany* 68 (7): 1769–1783.

- Jiménez-Góngora, T., Kim, S., Lozano-Durán, R. y Zipfel, C. 2014. Flg22-Triggered Immunity Negatively Regulates Key BR Biosynthetic Genes. *Frontiers in Plant Science* 6: 981-988.
- Junhuan, X., Thu, T., Padilla, C. y Braun, D. 2017. Superoxide-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry* 117: 51-60.
- Liang, C., Wang, J., Zhao, J., Tian, J. y Liao, H. 2014. Control of phosphate homeostasis through gene regulations in crops. *Current Opinion in Plant Biology* 21: 59-66.
- Lin, W., Lin, S. y Chiou, T. 2009. Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *Journal of Experimental Botany* 60 (5): 1427–1438.
- Liu, T., Huang, T., Tseng, C., Lai, Y., Lin, S., y Lin, W. 2012. PHO2-Dependent Degradation of PHO1 Modulates Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24: 2168–2183.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L. y He, P. 2010. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (1): 496–501.
- Motte, H. y Beeckman, T. 2017. PHR1 Balances between Nutrition and Immunity in Plants. *Developmental Cell* 41: 6-7.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Bollería, T. Andrea Jones, J. 2004. The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiology* 135: 1113–1128.
- Newman, M., Sundelin, T.,Nielsen, J., y Erbs, G. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-14.
- Nishimura, M., Stein1, M., Hou, B., Vogel, J., Edwards, H. y Some, S. 2003. Loss of a Callose Synthase Results in Salicylic Acid-Dependent Disease Resistance. *Science* 301.

Nomura, K., Mecey, C., Lee, Y., Imboden, L., Chang, J., y Hea, S. 2011. Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (26): 10774–10779.

Ojito-Ramos, K. y Portal, O. 2010. Introducción al sistema inmune en plantas. *Biología Vegetal* 10: 3 - 19.

Peng, Y., Van Wersch, R. y Zhang, Y. 2018. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and Effector-triggered immunity. *Molecular plant-microbe interactions* 31 (4): 403-409.

Pérez-Pérez, M., Lemaire, S. and Crespo, J. 2012. Reactive Oxygen Species and Autophagy in Plants and Algae. *Plant Physiology* 160: 156-164.

Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W. y Zhang, F. 2011. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology* 156: 997-1005.

Shen, Q., Bourdais, G., Pan, H., Robatzek, S. y Dingzhong, T. 2016. *Arabidopsis* glycosylphosphatidylinositol-anchored protein LLG1 associates with and modulates FLS2 to regulate innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (22): 5749–5754

Rajulu, C. 2014. Control of phosphate starvation responses in *Arabidopsis thaliana*. New regulators and regulatory interaction Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid.

Rivera-Cabrera F., Buentello-Volante, B., Díaz de León-Sánchez, F. Y Pérez-Flores, L. J. 2008. Cap 34 Las especies reactivas de oxígeno en plantas. En *Radicales libres y estrés oxidativo* (pp 493-516). México, Ed Manual Moderno.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A., Iglesias, J., Leyva, A. y Paz-Ares, J. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15 (16): 2122–2133.

Sánchez-Calderón, L. 2006. Caracterización genética de las respuestas morfo-fisiológica del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a la deficiencia de fósforo. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados Campus Guanajuato Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética.

Shin, R., Berg, H. and Schachtman, D. 2005. Reactive Oxygen Species and Root Hairs in Arabidopsis Root Response to Nitrogen, Phosphorus and Potassium Deficiency. *Plant Cell Physiology* 46 (8): 1350–1357.

Smith, J., Salamango, D., Leslie, M., Colins, C., y Heese, A. 2014. Sensitivity to Flg22 Is Modulated by Ligand-Induced Degradation and de Novo Synthesis of the Endogenous Flagellin-Receptor FLAGELLIN-SENSING2. *Plant Physiology* 164: 440-454.

Taiz, L., y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I, 3 Ed. 118-128pp.

Xiong-Yan, C. y Jae-Yean, K. 2009. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior* 4 (6): 489-492

Yuan, J., Zhang, Y., Dong, J., Sun, Y., Lim, B., Dong Liu, D. and Lu, Z. 2012. Systematic characterization of novel lncRNAs responding to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 17:655.

Zhou, J., Spallek, T., Faulkner, C. y Robatzek. 2012. CalloseMeasurer: a novel software solution to measure callose deposition and recognise spreading callose patterns. *Plant methods* 8:49.