



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El silenciamiento de la serina palmitoil-transferasa revela la importancia de los esfingolípidos en la respuesta de defensa a hongos necrótrofos en *Nicotiana benthamiana*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Doctor en Ciencias

PRESENTA
Lorena Mariana Rivas San Vicente

TUTOR PRINCIPAL
Dr. F. Javier Plasencia de la Parra
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay
Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Felipe Cruz García
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México

Noviembre 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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección del **Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra**. Se contó con apoyo de proyectos de CONACYT (50503) y de la Facultad de Química, UNAM (PAIP 6290-08). Durante los estudios de Doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT (No. de registro 170394).

Se agradece al Dr. Arturo Guevara (IBT) por las semillas de *N. benthamiana*, al Dr. David Baulcombe (Sainsbury Laboratory, Norwich, UK) por el vector TRV y las cepas de *Agrobacterium*. Al Dr. Liancheng Du (Universidad de Nebraska) por la cepa de *A. alternata* f. sp. *lycopersici* y a la Dra. Helena Porta (IBT) por la cepa de *A. brassicicola*.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, Dr. Felipe Cruz García y Dr. Javier Plasencia de la Parra, por su asesoría en la realización de esta tesis.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz y al Dr. Javier Plasencia de la Parra, por su invaluable apoyo y asesoría durante mi formación profesional en la Licenciatura y el Posgrado.

A la M.C. Manuela Nájera Martínez y Dra. Diana Sánchez Rangel por su asesoría técnica y apoyo.

Se agradece a la Q. Laurel Fabila Ibarra por apoyo y mantenimiento del Invernadero.

Al Jurado de Examen, por la revisión y excelentes observaciones a la presente tesis, el cual estuvo integrado por:

| | | |
|------------|---|----------------------------|
| PRESIDENTE | Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova | Facultad de Química |
| VOCAL | Dra. Rocío Cruz Ortega | Instituto de Ecología |
| VOCAL | Dra. Gladys Cassab López | Instituto de Biotecnología |
| VOCAL | Dra. Adriana Garay Arroyo | Instituto de Ecología |
| SECRETARIO | Dr. Eleazar Martínez Barajas | Facultad de Química |

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| A. Mecanismos de defensa de las plantas contra microorganismos patógenos..... | 10 |
| A.1. Los dos tipos de inmunidad en las plantas: PTI y ETI..... | 12 |
| A.2. Estrategias utilizadas por los patógenos para suprimir la PTI..... | 12 |
| Efectores proteicos..... | 13 |
| Exopolisacáridos..... | 14 |
| Toxinas..... | 15 |
| A.3. Activación de ETI y genes de resistencia (genes <i>R</i>)..... | 16 |
| A.4. Eventos de señalización durante la respuesta de defensa..... | 17 |
| Señalización por Ca ²⁺ | 18 |
| Producción de EROs..... | 19 |
| Activación de MPKs..... | 21 |
| Biosíntesis de hormonas de defensa..... | 21 |
| Vía de señalización del SA..... | 22 |
| Vía de señalización del JA..... | 26 |
| Vía de señalización del ET..... | 27 |
| Antagonismo SA/JA..... | 28 |
| Manipulación de la señalización hormonal por patógenos..... | 31 |
| B. Esfingolípidos..... | 31 |
| B.1. Diversidad estructural de los esfingolípidos en plantas..... | 32 |
| B.2. Biosíntesis de esfingolípidos..... | 34 |
| Síntesis de LCB..... | 34 |
| Modificaciones a las LCBs..... | 36 |
| Síntesis de ceramida y esfingolípidos complejos..... | 37 |
| Fosforilación de LCBs y ceramidas..... | 38 |
| B.3. Importancia de la serina palmitoil transferasa (SPT) en la regulación de la biosíntesis de <i>novo</i> de los esfingolípidos..... | 39 |
| B.4. Función biológica de los esfingolípidos en plantas..... | 41 |
| B.5. Importancia de los esfingolípidos en la respuesta de defensa contra patógenos..... | 45 |

| | |
|--|------------|
| II. ANTECEDENTES | 48 |
| III. HIPÓTESIS..... | 50 |
| IV. OBJETIVOS. | 50 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 51 |
| VI. RESULTADOS. | 62 |
| Clonación de un fragmento de cDNA de <i>NbLCB2</i> | 62 |
| El VIGS de <i>NbLCB2</i> fue eficaz y causó alteraciones morfológicas en las plantas..... | 62 |
| El VIGS de la SPT en <i>N. benthamiana</i> alteró la composición de LCBs de los esfingolípidos..... | 65 |
| El VIGS de la SPT en <i>N. benthamiana</i> activó la vía de señalización dependiente de SA. | 68 |
| La esfinganina y la FB1 restringieron el crecimiento de plántulas de <i>N. benthamiana</i> y activaron la expresión del gen <i>NbPR-1</i> inducible por SA. | 68 |
| El VIGS de la SPT comprometió la resistencia de <i>N. benthamiana</i> contra el hongo patógeno necrótrofo <i>Alternaria alternata</i> | 71 |
| Las plantas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas en la expresión de la SPT se volvieron susceptibles al hongo <i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , y mostraron una expresión de genes de defensa alterada.... | 73 |
| VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. | 77 |
| VIII. CONCLUSIONES. | 89 |
| IX. PERSPECTIVAS. | 89 |
| X. BIBLIOGRAFÍA..... | 90 |
| XI. ANEXOS | 107 |
| Anexo A. Secuencias de cebadores usados para la construcción de vectores virales y ensayos de RT-PCR semicuantitativos..... | 107 |
| Anexo B. Composición del medio nutritivo para <i>A. tumefaciens</i> C58C1, soluciones y antibióticos usados para el VIGS de la SPT. | 108 |
| Anexo C. Comparación de las regiones del cDNA de <i>LCB2</i> usadas para el VIGS de la SPT en <i>Nicotiana benthamiana</i> | 109 |
| Anexo D. Movimiento sistémico del virus TRV durante el VIGS de la subunidad <i>LCB2</i> de la SPT en <i>N. benthamiana</i> | 111 |
| Anexo E. Susceptibilidad de tallos de plantas de <i>N. benthamiana</i> TRVSPT a <i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | 112 |
| Anexo F. Publicaciones derivadas durante los estudios de Doctorado..... | 113 |
| Anexo G. Referencias que han citado a: | 156 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Mecanismos celulares activados en respuesta a patógenos en plantas. | 20 |
| Figura 2. Fitohormonas que participan en la respuesta inmune de las plantas. | 23 |
| Figura 3. Representación esquemática de las vías de señalización dependientes de SA, JA y ET. | 26 |
| Figura 4. Modelo simplificado del antagonismo de la vía del SA sobre la señalización dependiente de JA. | 30 |
| Figura 5. Estructura de algunas LCBs y esfingolípidos en plantas. | 33 |
| Figura 6. Representación esquemática de la biosíntesis de esfingolípidos en plantas. | 35 |
| Figura 7. La serina palmitoil transferasa (SPT) es un complejo enzimático localizado en el retículo endoplásmico (RE). | 40 |
| Figura 8. Estructura de micotoxinas análogas a la esfinganina (SAMs) que inhiben la biosíntesis <i>de novo</i> de los esfingolípidos e inducen PCD. | 46 |
| Figura 9. Organización de los plásmidos de transformación binarios pBINTRA6 y pTV00. | 55 |
| Figura 10. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de <i>NbLCB2</i> con secuencias de solanáceas y <i>Arabidopsis thaliana</i> . | 63 |
| Figura 11. VIGS de la subunidad LCB2 de la SPT en <i>N. benthamiana</i> . | 64 |
| Figura 12. Perfiles de las LCBs extraídas por hidrólisis de esfingolípidos de hojas de plantas de <i>N. benthamiana</i> TRV y TRSPT. | 66 |
| Figura 13. Contenido total (nmol/g tejido) de fitoesfingosina (t18:0), esfingosina (d18:1) y esfinganina (d18:0) en hojas de plantas de <i>N. benthamiana</i> TRV y TRVSPT, a las 4 semanas posteriores a la agroinfiltración. | 67 |
| Figura 14. El VIGS de la SPT en <i>N. benthamiana</i> activó la vía de señalización dependiente de SA. | 69 |
| Figura 15. La FB1 y la esfinganina activaron al gen inducible por SA <i>NbPR1</i> en plántulas silvestres de <i>N. benthamiana</i> . | 70 |
| Figura 16. El VIGS de la SPT confirió susceptibilidad al hongo patógeno necrótrofo <i>Alternaria alternata</i> . | 72 |

| | |
|--|------------|
| Figura 17. El VIGS de la SPT en <i>N. benthamiana</i> comprometió su resistencia contra <i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . | 74 |
| Figura 18. Las plantas de <i>N. benthamiana</i> TRVSPT tienen una respuesta atenuada al MeJA. | 76 |
| Figura 19. Modelo experimental. | 87 |
| Figura 20. Secuencias reportadas en GenBank del cDNA de <i>NbLCB2</i> indicando los fragmentos empleados para el VIGS de la SPT. | 109 |
| Figura 21. Replicación y movimiento sistémico de TRV a los 20 días posteriores a la agroinfiltración. | 111 |
| Figura 22. Desarrollo y proliferación de <i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i> , asociados al VIGS de la SPT. | 112 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Funciones fisiológicas, regulación de procesos de desarrollo y respuestas a estrés por esfingolípidos. | 43 |
| Tabla 2. Contenido de LCBs totales (nmoles/g tejido) en hojas de <i>N. benthamiana</i> control TRV y TRVSPT. | 67 |
| Tabla 3. Asociación entre el metabolismo de esfingolípidos, niveles de ácido salicílico y expresión del gen <i>PR1</i> (Modificado de Sánchez-Rangel et al., 2015). | 82 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| AAL | toxina producida por <i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> |
| cDNA | DNA complementario |
| Cer | ceramida |
| d18:0 | esfinganina |
| d18:1(Δ 4) | esfingosina |
| DAMP | patrones moleculares asociados a daño (en la célula vegetal) |
| DEPC | dietil pirocarbonato |
| dNTPs | mezcla de desoxirribonucleótidos |
| dpi | días post-inoculación |
| EROS | especies reactivas de oxígeno |
| ET | etileno |
| ETI | inmunidad activada por efectores |
| FB1 | fumonisina B1 |
| GIPC | glucosil inositol fosforilceramida |
| GlcCer | glucosilceramida |
| GRX | glutarredoxina |
| hpi | horas post-inoculación |
| HR | respuesta de hipersensibilidad |
| IPC | inositol fosforilceramida |
| JA | ácido jasmónico |
| LAR | resistencia local adquirida |
| LCB | base de cadena larga |
| LCBP | fosfato de base de cadena larga |
| MPK | proteína cinasa activada por mitógeno |
| NO | óxido nítrico |
| PAMP | patrones moleculares asociados a patógenos |
| pb | pares de bases |
| PCD | muerte celular programada |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PR | gen o proteína asociada a patogénesis (pathogenesis-related) |
| PTI | inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RT | transcripción reversa |
| SA | ácido salicílico |
| SAM | micotoxina análoga a esfinganina |
| SAR | resistencia sistémica adquirida |
| SPT | Serina palmitoil transferasa |
| t18:0 | fitoesfingosina |
| TRV | virus de la sonaja del tabaco (<i>tobacco rattle virus</i>) |
| VIGS | silenciamiento génico inducido por virus |

RESUMEN

Los esfingolípidos tienen un papel importante en las vías de transducción de señales que regulan tanto funciones fisiológicas como respuestas a estrés en eucariontes. En plantas, evidencias recientes sugieren que sus metabolitos precursores, las bases de cadena larga (LCBs), actúan como moléculas bioactivas en la respuesta inmune. Interesantemente, la virulencia de dos hongos necrótrofos no relacionados, *Fusarium verticillioides* y *Alternaria alternata*, que son patógenos del maíz y jitomate, respectivamente, depende de la producción de micotoxinas análogas a la LCB esfinganina (SAMs). Estos metabolitos inhiben la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos en sus hospederos causando acumulación de LCBs, que son reguladores clave en la muerte celular programada. Por tanto, para profundizar en el papel que tienen los esfingolípidos en la respuesta inmune contra hongos necrótrofos productores de SAMs, interrumpimos el metabolismo de esfingolípidos en *Nicotiana benthamiana* mediante silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de la serina palmitoil transferasa (SPT). Esta enzima cataliza la primera reacción en la síntesis de LCBs. El VIGS de la SPT afectó profundamente el desarrollo de *N. benthamiana*, así como la composición de LCBs de sus esfingolípidos. Mientras que los niveles totales de fitoesfingosina disminuyeron, los niveles de esfinganina y esfingosina se incrementaron en plantas silenciadas en la SPT, comparadas con plantas control. La respuesta inmune también fue afectada dado que las plantas silenciadas acumularon ácido salicílico (SA), expresaron constitutivamente al gen *NbPR-1* que es inducible por SA, y mostraron mayor susceptibilidad al hongo necrótrofo *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. En contraste, la expresión de los genes de defensa *NbPR-2* and *NbPR-3* se retrasó en las plantas silenciadas ante la infección por el hongo. Nuestros resultados sugieren que las LCBs modulan las respuestas de defensa dependientes de SA y proveen un modelo sobre el papel potencial de las SAMs producidas por hongos necrótrofos para alterar la respuesta de defensa del hospedero y permitir su colonización.

ABSTRACT

Sphingolipids play an important role in signal transduction pathways that regulate physiological functions and stress responses in eukaryotes. In plants, recent evidence suggests that their metabolic precursors, the long chain bases (LCBs) act as bioactive molecules in the immune response. Interestingly, the virulence of two unrelated necrotrophic fungi, *Fusarium verticillioides* and *Alternaria alternata*, which are pathogens of maize and tomato plants, respectively, depends on the production of sphinganine-analog mycotoxins (SAMs). These metabolites inhibit *de novo* biosynthesis of sphingolipids in their hosts causing accumulation of LCBs, which are key regulators of programmed cell death. Therefore, to gain more insight into the role of sphingolipids in plant immunity against SAM-producing necrotrophic fungi, we disrupted sphingolipid metabolism in *Nicotiana benthamiana* through virus-induced gene silencing (VIGS) of the serine palmitoyltransferase (SPT). This enzyme catalyzes the first reaction in LCB synthesis. VIGS of SPT profoundly affected *N. benthamiana* development as well as LCB composition of sphingolipids. While total levels of phytosphingosine decreased, sphinganine and sphingosine levels increased in SPT-silenced plants, compared with control plants. Plant immunity was also affected as silenced plants accumulated salicylic acid (SA), constitutively expressed the SA-inducible *NbPR-1* gene and showed increased susceptibility to the necrotroph *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. In contrast, expression of *NbPR-2* and *NbPR-3* defense genes was delayed in silenced plants upon fungal infection. Our results strongly suggest that LCBs modulate the SA-dependent responses and provide a working model of the potential role of SAMs from necrotrophic fungi to disrupt the plant host response to foster colonization.

I. INTRODUCCIÓN.

A. Mecanismos de defensa de las plantas contra microorganismos patógenos.

Las plantas están expuestas a un gran número de microorganismos patógenos como bacterias, hongos y nemátodos. Sin embargo, a pesar de ser organismos sésiles, las plantas no se comportan como hospederos pasivos frente a los patógenos con los que interactúan, sino que se defienden con todo un arsenal de mecanismos de defensa. Estos mecanismos de defensa se han clasificado en pasivos/constitutivos, representados por barreras estructurales como la cutícula y reservorios de compuestos antimicrobianos (fitoanticipinas) que se localizan estratégicamente, y en activos/inducibles, los cuales se dan en respuesta a la presencia del patógeno invasor y que requieren del metabolismo activo de la célula vegetal. La resistencia de las plantas contra los patógenos depende de la capacidad de éstas para reconocer a los patógenos en una fase temprana de la infección y en la activación eficaz de las respuestas de defensa, que generalmente termina en una forma de muerte celular programada conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR) (Greenberg, 1997; Jones & Dangl, 2006; Balint-Kurti, 2019).

Las estrategias de defensa pasivas o constitutivas en conjunto permiten a las plantas detener la entrada de la gran mayoría de los microorganismos patógenos a los que están expuestas en la naturaleza. Sin embargo, algunos patógenos pueden infectarlas a través de aberturas naturales como los estomas, o por heridas generadas por daño mecánico. En estas circunstancias las plantas pueden activar mecanismos de defensa para detener y prevenir el progreso de la infección (Agrawal et al., 1999; Freeman & Beattie, 2008).

Cuando la célula vegetal detecta la presencia de un patógeno, se activan las respuestas de defensa inducibles. Como se mencionó anteriormente, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno se desarrolla una reacción severa a nivel local conocida como HR, y otras reacciones de menor intensidad a nivel sistémico, es decir, en los tejidos no infectados de la planta. La HR tiene como consecuencia la muerte de las células infectadas, y es resultado de varios eventos bioquímicos como la producción de altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (EROs), óxido nítrico (NO), fitohormonas como el ácido salicílico (SA) y la inducción

de genes asociados con la patogénesis (*PR*). También se activan estrategias estructurales como el reforzamiento de la pared celular para impedir la proliferación y diseminación del patógeno hacia el resto de la planta. Esto ocurre principalmente por lignificación (aumento de la producción de fenoles precursores de lignina y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la pared, lo que permite su polimerización) y aumento en la síntesis y entrecruzamiento de glicoproteínas estructurales de la pared. La HR es un mecanismo muy eficaz para delimitar al patógeno en el tejido infectado (Jones & Dangl, 2006).

En los tejidos que rodean al sitio de entrada del patógeno ocurre una reacción denominada de resistencia local adquirida (LAR). En estos tejidos también se acumulan EROs, SA y otras fitohormonas, pero en concentraciones más bajas que en las células infectadas. Estos compuestos provocan la activación de un gran número de genes de defensa. Un grupo de estos genes codifica para enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas, provocando un aumento sostenido en la producción de estos compuestos antimicrobianos y de fenoles precursores de la lignina. Un segundo grupo de genes de defensa codifica para proteínas estructurales de la pared celular, contribuyendo a su reforzamiento. Un tercer grupo codifica para enzimas encargadas de la destoxificación y protección del tejido vegetal del daño oxidativo. Finalmente, otro grupo de genes de defensa codifica para proteínas asociadas con la patogénesis (*PR*) que degradan la pared celular de hongos y bacterias (β -1,3-glucanasas y quitinasas). En consecuencia, se protege al tejido circundante al sitio de infección potenciando las barreras químicas y estructurales (Chisholm et al., 2006; Jones & Dangl, 2006).

En los tejidos distantes al sitio de infección se produce una reacción de resistencia sistémica adquirida (SAR), que es similar a la LAR pero más atenuada. La SAR permite proteger o inmunizar al resto de la planta frente a una segunda infección por el mismo u otro agente patógeno, durante varias semanas después de la infección primaria. Uno de los aspectos interesantes de la SAR es la translocación de señales químicas del tejido infectado hacia el resto de la planta para que esta reacción se active, y durante mucho tiempo se consideró que el SA era la señal sistémica. Sin embargo, se ha encontrado que se requieren otras señales de naturaleza lipídica para establecer la SAR (Durrant & Dong, 2004; Gao et al., 2015; Ádám et al., 2018).

A.1. Los dos tipos de inmunidad en las plantas: PTI y ETI.

El sistema inmune de las plantas comparte algunas similitudes con el sistema inmune de los mamíferos, pero también tiene características específicas. Las plantas tienen un sistema inmune basal que reconoce patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en la membrana plasmática. Los PRRs se han clasificado en dos grupos con base en sus características estructurales. Los RLKs (receptor like kinases) poseen una estructura modular que consiste en un dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRR), un dominio transmembranal, y otro citosólico con actividad de cinasa de serina/treonina. Los RLPs (receptor like proteins) carecen de LRRs, o del dominio citosólico con actividad de cinasa, o de ambos (Zipfel, 2008). Los PAMPs son elementos estructurales esenciales de los patógenos, como la flagelina de las bacterias o la quitina de la pared celular de los hongos, y son reconocidos por un gran número de especies vegetales. Las plantas también responden a moléculas endógenas liberadas por la invasión del patógeno, como fragmentos de la cutícula o pared celular vegetal, denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs; Boller & Felix, 2009). La estimulación de los PRRs conduce a la inmunidad activada por PAMPs, conocida como PTI (PAMP-triggered immunity).

El segundo mecanismo de percepción involucra el reconocimiento de moléculas de virulencia secretadas por el patógeno denominados efectores, a través de receptores intracelulares. Este reconocimiento conduce a la inmunidad activada por efectores, ETI (effector triggered immunity). A diferencia de los PAMPs, los efectores son diversos y dispensables. Generalmente los dos tipos de inmunidad, PTI y ETI, provocan respuestas similares (flujos iónicos, estallido oxidativo, activación de MPKs, expresión de genes de defensa, etc.) aunque difieren en temporalidad y magnitud, siendo más rápidas y de mayor intensidad durante la ETI (Katagiri & Tsuda, 2010). Sin embargo, la PTI es la primera línea de defensa y es efectiva para combatir a la gran mayoría de patógenos (Dodds y Rathjen, 2010).

A.2. Estrategias utilizadas por los patógenos para suprimir la PTI.

Debido a la eficiencia de la PTI como primera línea de defensa y a la coevolución que ha ocurrido entre plantas y microorganismos, muchos patógenos han desarrollado factores de

virulencia para evadir o suprimir este tipo de inmunidad. Estos factores de virulencia tienen estructuras químicas muy diversas incluyendo proteínas (también llamadas efectores), polisacáridos extracelulares y toxinas, lo que permite afectar distintos blancos celulares del hospedero, y en consecuencia, proliferar y colonizarlo.

Efectores proteicos.

Los efectores proteicos de bacterias patógenas (originalmente llamados proteínas de avirulencia, Avr) son inyectados al citoplasma de la célula hospedera a través de sistemas de secreción tipo II o III (Cianciotto, 2005; Göhre & Robatzek, 2008). Las proteínas Avr secretadas por la bacteria *Pseudomonas syringae* han sido las más estudiadas, entre ellas AvrPto y AvrPtoB, que interactúan físicamente con los dominios de cinasa de los receptores FLS2, EFR y BAK1 e inhiben su actividad de cinasa (Xiang et al., 2008, Shan et al., 2008; Göhre et al., 2008), y también interfieren en la formación del complejo funcional FLS2-BAK1 suprimiendo la respuesta de defensa (Shan et al., 2008). Además, AvrPtoB tiene actividad de ubiquitin ligasa E3 que cataliza la poliubiquitinación del dominio de cinasa de FLS2 y CERK1, promoviendo su degradación (Göhre et al., 2008; Gimenez-Ibanez et al., 2009).

Los hongos y oomicetos también expresan efectores proteicos que son secretados por exocitosis al apoplasto o al citoplasma de la célula vegetal (Göhre & Robatzek, 2008). Los efectores de estos patógenos son generalmente proteínas pequeñas (generalmente <200 aminoácidos) muy ricas en residuos de cisteínas (2 a 20%) que forman puentes disulfuro para protegerlas contra proteasas presentes en el apoplasto de la célula vegetal (Kamoun, 2006; Stergiopoulos & de Wit, 2009). Sus mecanismos de acción para suprimir la respuesta inmune de las plantas también son muy diversos. Por ejemplo, las proteínas Avr2 y Avr4 del hongo patógeno del jitomate *Cladosporium fulvum*, poseen 58 y 86 aminoácidos respectivamente, de los cuales 8 son residuos de cisteína. Avr2 inhibe proteasas de cisteína del hospedero que son importantes para la respuesta de defensa (Rooney et al., 2005), mientras que Avr4 se une a la quitina de la pared celular del hongo protegiendo las hifas contra la hidrólisis por quitinasas secretadas por la célula vegetal (van den Burg et al., 2006). El efector Ecp6 también secretado por *C. fulvum*, suprime la activación de la respuesta de defensa de la planta al secuestrar

fragmentos de quitina que son percibidos por los receptores CeBiP y CERK1 en la célula vegetal. Sorprendentemente Ecp6 contiene dominios de lisina (LysM) al igual que CeBiP y CERK1 (Bolton et al., 2008; de Jonge et al., 2010).

Exopolisacáridos.

Las bacterias y hongos producen polisacáridos extracelulares (EPS) que pueden formar una cápsula para envolver a la célula microbiana, produciendo una masa amorfa que es secretada al medio de crecimiento. Los EPS tienen múltiples funciones como prevenir la desecación del microorganismo, acumular minerales y nutrientes, y protegerlo contra macromoléculas dañinas del hospedero (Denny et al., 1995).

Los EPS, aunque difieren en su composición y estructura, tienen una función conservada en los patógenos como factores de virulencia (Denny, 1995). Inicialmente se observó una correlación directa entre los síntomas de infección y la producción de EPS por distintos patovares de *P. syringae* (Fett y Dunn, 1989), mientras que mutaciones en los genes que participan en la biosíntesis de EPS tales como *gum*, *alg* y *ams* (para xantano, alginato y amilovorano, respectivamente) comprometen la capacidad del patógeno para infectar y colonizar al hospedero (Bugert & Geider, 1995; Kemp et al., 2004). Los EPS también suprimen las respuestas de defensa del hospedero. El xantano producido por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, suprime la respuesta de defensa local de *Arabidopsis* y *Nicotiana benthamiana* al inhibir la deposición de calosa, que es importante para el reforzamiento de la pared celular (Yun et al., 2006). Además, los EPS bacterianos suprimen el sistema inmune de las plantas al quelar el Ca^{2+} e inhibir la señalización mediada por este catión (Aslam et al., 2008).

Los hongos patógenos como *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotium*, *Alternaria solani* y *A. alternata*, también secretan exopolisacáridos (Seviour et al., 1992; Selbmann et al., 2003). El EPS producido por *Botrytis cinerea* (β -(1,3)(1,6)-glucano) promueve la infección en las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) al manipular la señalización dependiente de las fitohormonas como el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico

(JA), que son reguladores importantes de la respuesta de defensa contra patógenos (El Oirdi et al., 2011).

Toxinas.

Tanto las bacterias como los hongos patógenos producen metabolitos que son tóxicos para las células hospederas en muy bajas concentraciones. Las toxinas reproducen algunos o casi todos los síntomas de enfermedad causados por el patógeno que la produce.

La bacteria *Pseudomonas syringae* produce una gran variedad de toxinas y la mayoría carece de especificidad por el hospedero (Bender et al., 1999). Una de éstas, la coronatina, provoca síntomas de clorosis en diversas especies vegetales como *Arabidopsis*, jitomate y *N. benthamiana* (Mittal & Davis, 1995; Uppalapati et al., 2007; Wangdi et al., 2010), y tiene un papel clave en la virulencia de *P. syringae*. Esta toxina facilita la entrada de la bacteria a las hojas de *Arabidopsis* al suprimir el cierre de los estomas, que es una respuesta de defensa basal inducida por patógenos (Melotto et al., 2008). Además, la coronatina altera el balance hormonal del hospedero mimetizando al JA para suprimir la respuesta de defensa dependiente de SA (Brooks et al., 2005; Uppalapati et al., 2007).

La mayoría de los hongos también producen toxinas, que por su diversidad estructural pueden interactuar con distintos blancos celulares (Möbius & Hertweck, 2009). El patógeno foliar *Alternaria* spp. tiene un amplio rango de hospederos debido a que produce muchas fitotoxinas, con diversos mecanismos de acción (Thomma, 2003). La brefeldina A y la tentoxina han sido las fitotoxinas no específicas más estudiadas, y sus mecanismos de acción afectan la secreción de proteínas y la síntesis de ATP en el cloroplasto, respectivamente (Fujiwara et al., 1988; Steele et al., 1978). Otra toxina muy estudiada por su mecanismo de acción molecular es la toxina AAL producida por el hongo patógeno del jitomate *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. Inicialmente se consideró hospedero-específica (Wolpert et al., 2002; Thomma, 2003), pero se ha demostrado que también es tóxica para otras especies vegetales incluyendo a *Arabidopsis* (Gechev et al., 2004). La toxina AAL posee similitud estructural a la esfinganina, por lo que forma parte de un grupo conocido como micotoxinas análogas a la esfinganina (SAMs) en el que

también se incluyen a las fumonisinas producidas principalmente por el patógeno del maíz *Fusarium verticillioides* y otras especies de *Fusarium* (Sánchez-Rangel y Plasencia, 2010). Las toxinas AAL y fumonisina B1 inhiben a la ceramida sintasa (esfinganina-N-acetiltransferasa), interrumpiendo la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos complejos, y provocando acumulación de esfinganina (Abbas et al., 1994). El incremento en los niveles de esfinganina induce muerte celular en jitomate, *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana* (Spassieva et al., 2002; Gechev et al., 2004; Shi et al., 2007, Takahashi et al., 2009a; Lachaud et al., 2010).

A.3. Activación de ETI y genes de resistencia (genes R).

La respuesta en plantas a la producción de efectores que inhiben la PTI, es la síntesis de receptores para percibirlos e iniciar la segunda línea de defensa, la inmunidad activada por efectores (ETI), también conocida como interacción gen a gen (Jones y Dangl, 2006). La ETI se activa cuando una proteína de resistencia (R) de la planta reconoce específicamente a un efector (proteína de avirulencia, Avr) secretado por el patógeno, desencadenando una respuesta de defensa efectiva que puede limitar la propagación de la infección y se establece una interacción incompatible desfavorable para el patógeno. Debido a esta especificidad de reconocimiento, los genomas de las plantas codifican un gran número de proteínas R que les confieren resistencia contra muchos patógenos diferentes. El genoma de *Arabidopsis* codifica más de 100 genes R, y el genoma del arroz codifica poco más de 500 (Meyers et al., 2003; Zhou et al., 2004). Cuando la planta carece del gen R para reconocer al patógeno se produce una reacción compatible entre el hospedero y el patógeno, es decir, no se activa una respuesta de defensa eficiente en la planta permitiendo la penetración y proliferación del patógeno en sus tejidos que manifiestan síntomas de enfermedad.

La mayoría de las proteínas R intracelulares poseen estructuras modulares y pertenecen a la familia NB-LRR, pues poseen un dominio central de unión a nucleótidos (NB) y otro dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina (LRR). Las proteínas R se subdividen en dos grupos de acuerdo a la estructura de su dominio N-terminal. El primer grupo lo conforman proteínas TNL (TIR-NB-LRR) que son estructural y funcionalmente similares al receptor Toll de *Drosophila* y al de interleucina de humanos, mientras que el segundo grupo CNL (CC-NB-LRR) posee en

su extremo N-terminal una estructura enroscada '*coiled coil*', (Ausubel, 2005; Jones y Dangl, 2006). En *Arabidopsis* las proteínas TNL forman el grupo más numeroso, pero en monocotiledóneas no se han encontrado, y en solanáceas la mayoría de las proteínas R son del tipo CNL (Meyers et al., 2003; Ooijen et al., 2007).

También se han encontrado otras proteínas R que no se pueden incluir en alguna de las clasificaciones anteriores porque su estructura carece de los dominios descritos, como las proteínas Asc-1 del jitomate y Hm-1 de maíz (Ooijen et al., 2007).

Existen dos mecanismos de reconocimiento molecular de los efectores patogénicos por las proteínas R del tipo NB-LRR. El primero consiste en la interacción física directa del efector con su proteína R correspondiente, similar a la unión de un ligando con su receptor. El segundo mecanismo consiste en la interacción indirecta mediada por proteínas accesorias que la proteína R monitorea por modificaciones inducidas por el efector del patógeno (Jones & Dangl, 2006).

A.4. Eventos de señalización durante la respuesta de defensa.

El reconocimiento de los patógenos por receptores del sistema inmune activa diversas vías de señalización intracelular como el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} , flujos iónicos, activación de MPKs, estallido oxidativo, biosíntesis de hormonas de defensa, reprogramación transcripcional, expresión de genes de defensa y producción de compuestos antimicrobianos (Fig. 1). Algunas de estas respuestas ocurren instantáneamente, desde los primeros segundos y minutos de percibir al patógeno hasta horas o días posteriores. En conjunto, estas respuestas contribuyen a la resistencia de las plantas contra una gran diversidad de patógenos. Sin embargo, su magnitud y temporalidad difieren durante la PTI y la ETI (Peng et al., 2018). Por lo general, la activación de la respuesta inmune antagoniza los programas de crecimiento y desarrollo de la planta, lo que resulta en una reconfiguración de la señalización en la que participan varias fitohormonas (Reitz et al., 2015).

Señalización por Ca^{2+} .

El incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) es una de las respuestas más tempranas y se considera inmediata al reconocimiento de PAMPs o efectores (Fig. 1). La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal se mantiene entre 100 y 200 nmol, aproximadamente 100 veces menor que en apoplasto u organelos celulares. La percepción del patógeno aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ entre los primeros 30-40 seg, con un pico a los 2-6 min que se mantiene por al menos 30 min antes de regresar a la concentración basal (Ranf et al., 2011). Los cambios espaciales y temporales de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ varían en términos del tiempo de aparición de los picos, amplitud y duración de la respuesta a diferentes patógenos o PAMPs. La criptogeína, flg22 y el β -glucano provocan un incremento bifásico de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, mientras que la quitina provoca un solo pico (Seybold et al., 2014). La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se debe principalmente al influjo de Ca^{2+} extracelular del apoplasto, pero también podría haber movilización desde los organelos (Seybold et al., 2014).

Las alteraciones en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ son percibidas por proteínas de unión a Ca^{2+} que transmiten o decodifican las señales en respuestas específicas, incluyendo la calmodulina (CaM), proteínas parecidas a CaM (CMLs), cinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM (CCaMKs), cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) y proteínas parecidas a calcineurina B (CBLs). Las CDPKs y CCaMKs transducen directamente la señal por su actividad cinasa, mientras que CaMs, CMLs y CBLs son sensores sin actividad catalítica que interactúan y modulan la actividad de proteínas blanco (Thuleau et al., 2013). Mediante todos estos intermediarios la señalización por Ca^{2+} activa diversas respuestas de defensa. La CaM está involucrada en la producción de EROs mediante la activación de MPKs (Takahashi et al., 2011), así como en la expresión génica a través de activadores transcripcionales de unión a CaM: CAMTAs (Poovaiah et al., 2013). CBP60g es un CAMTA que regula positivamente la biosíntesis de SA vía corismato al unirse al promotor del gen que codifica la isocorismato sintasa (*ICS1*) y activar su expresión (Wang et al., 2009; 2011). Por otro lado, las CDPKs también promueven la producción de EROs al fosforilar a la NADPH oxidasa RBOHD en la membrana plasmática, y otras se mueven al núcleo para fosforilar factores transcripcionales WRKY que activan la expresión de genes de defensa (Gao et al., 2013).

Producción de EROs.

El Ca^{2+} funciona de manera concertada con otros mensajeros importantes como las EROs. El rápido incremento en su producción se conoce como estallido oxidativo (Fig. 1), y las EROs que participan en cascadas de señalización son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el anión superóxido (O_2^-) (Gadjev et al., 2006).

En el estallido oxidativo participan peroxidasas de pared celular y NADPH oxidasas de la membrana plasmática. Éstas últimas transfieren electrones del NADPH o NADH en el citosol al oxígeno del apoplasto, produciendo superóxido que es convertido a H_2O_2 por la superóxido dismutasa (Torres et al., 2006). Generalmente el estallido oxidativo se inicia ~4-6 min después de la percepción del patógeno, alcanza un pico ~10-15 min y declina gradualmente ~30 min posteriores (Jabs et al., 1997).

Las EROs inducen PCD y el H_2O_2 se mueve a células vecinas para promover la producción de compuestos que prevengan daño oxidativo (Levine et al., 1994). Además de su participación en la HR, las EROs inhiben la supervivencia y reproducción del patógeno (Lamb et al., 1997). Por tanto, las EROs están directamente involucradas tanto en la transducción de señales como en la respuesta de defensa inhibiendo la germinación de esporas. Además de las peroxidasas y NADPH oxidasas, otras enzimas participan en la producción de EROs como la amina- y oxalato-oxidasas (Kärkönen & Kuchitsu, 2015). Algunos hongos necrótrofos producen ácido oxálico para suprimir el estallido oxidativo en etapas tempranas de la infección, pero incrementan la producción de EROs después del establecimiento. Las plantas producen oxalato oxidasas también conocidas como germinas para degradar el ácido oxálico a CO_2 y H_2O_2 , e incrementar su resistencia al patógeno (Dumas et al., 1995; Berna & Bernier, 1999).

Las EROs también promueven el entrecruzamiento de glicoproteínas que fortalecen la pared celular para restringir el movimiento del patógeno y limitar su acceso a los nutrientes necesarios para completar su reproducción (Bradley et al., 1992; Lamb et al., 1997).

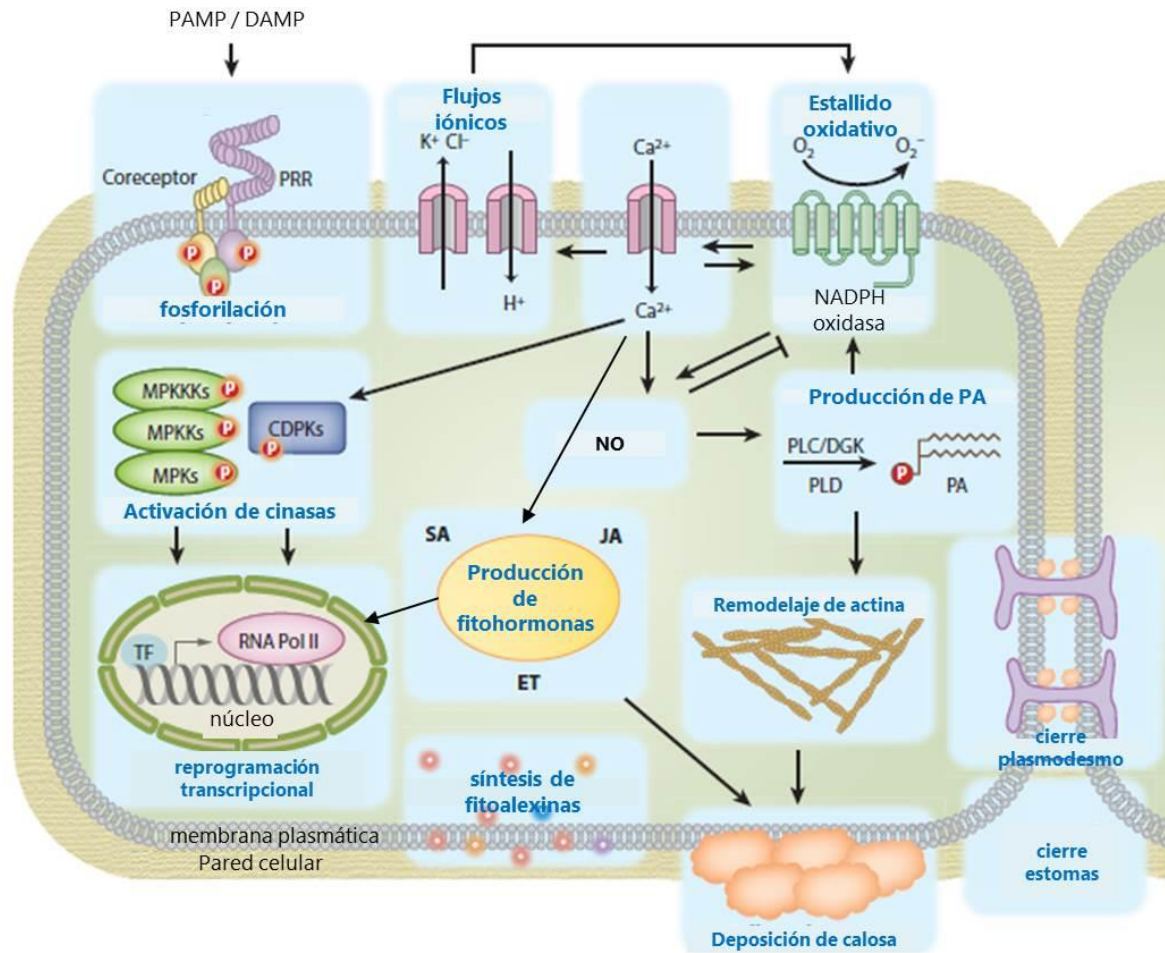


Figura 1. Mecanismos celulares activados en respuesta a patógenos en plantas. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) perciben patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), lo que activa una serie de respuestas fisiológicas. Los PRRs interactúan con proteínas adicionales que actúan como adaptadores o amplificadores para una funcionalidad completa. La formación de este complejo activa rápidos eventos de fosforilación mediados por cascadas de MPKs, cinasas dependientes de calcio (CDPKs), etc., que regulan cambios transcripcionales que activan la expresión de genes de defensa y otras respuestas. Las principales características de la respuesta de defensa contra patógenos son: influjo de Ca^{2+} , flujos iónicos, producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), óxido nítrico (NO), ácido fosfatídico (PA) y fitohormonas. Otras respuestas de defensa son la remodelación de filamentos de actina, cierre de plasmodesmos y estomas, síntesis de fitoalexinas y deposición de calosa. Abreviaturas: DGK, diacilglicerol cinasa; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; ET, etileno; JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico; TF, factor de transcripción (Modificada de Yu et al., 2017).

Activación de MPKs.

Las cascadas MPK son módulos de señalización activados por la percepción de estímulos externos (PAMPs, efectores, estrés abiótico, etc). Típicamente contienen tres cinasas que se activan secuencialmente (Fig. 1). Las MPKKK (también denominadas MEKK) fosforilan a proteínas MPKK (o MKK), conduciendo a la fosforilación de MPK (Meng & Zhang, 2013). El genoma de *Arabidopsis* contiene 60 MPKKK, 10 MPKK y 20 MPK (Ichimura et al., 2002). Sin embargo, se han identificado solo algunas cascadas canónicas de MPK involucradas en la respuesta de defensa. En *Arabidopsis* la cascada MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 regula positivamente la respuesta inmune contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) y el hongo *Botrytis cinerea* (Asai et al., 2002; Menke et al., 2004; Brader et al., 2007; Gao et al., 2008; Thulasi et al., 2018). Por el contrario, la MPKKK EDR1 regula negativamente la resistencia contra *Pst* DC3000 y los hongos *Erysiphe cichoracearum* y *Golovinomyces cichoracearum*. EDR1 interactúa con MKK4/MKK5 y regula negativamente las actividades de MPK3 y MPK6 (Zhao et al., 2014). Otra MPKKK, CTR1, suprime la respuesta a etileno inactivando la cascada MKK9-MPK3/MPK6 (Colcombet & Hirt, 2008).

Las cascadas MPK están involucradas en la señalización de múltiples respuestas de defensa, incluyendo la generación de EROs, cierre de estomas, biosíntesis y señalización de fitohormonas, activación de genes de defensa, biosíntesis de fitoalexinas, reforzamiento de pared celular y HR (Meng & Zhang, 2013). Por ejemplo, la rápida activación de MPK3 y MPK6 estimula la generación de EROs dependiente de la NADPH oxidasa RBOHD, que promueve la deposición de calosa (Zhang et al., 2007). Por otro lado, MPK3 y MPK6 promueven la biosíntesis de etileno (ET) al fosforilar a las enzimas ACS2 y ACS6, promoviendo su estabilización y mayor producción de ET (Liu & Zhang, 2004). Las cascadas MPK también conducen a la activación de factores transcripcionales de la familia WRKY que interactúan con el motivo TTGACC/T (caja W) presente en los promotores de genes de defensa tempranos (Ishihama & Yoshioka, 2012).

Biosíntesis de hormonas de defensa.

Las fitohormonas son moléculas pequeñas producidas y percibidas por las plantas para regular diversos procesos fisiológicos incluyendo el crecimiento, desarrollo, respuestas a estrés

biótico y abiótico (Fig. 2). En particular, el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) son las principales fitohormonas de defensa contra patógenos (Pieterse et al., 2009; Berens et al., 2017), aunque otras como el ácido abscísico (ABA), auxinas (AUX), brasinoesteroides (BR), citocininas (CK), giberelinas (GA) y estrigolactonas (SL) también participan en la regulación de la respuesta inmune de las plantas (Pieterse et al., 2009; Wang et al., 2015). Las vías de señalización mediadas por fitohormonas interactúan de manera antagónica o sinérgica (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Pieterse et al., 2012; Verma et al., 2016; Li et al., 2019), permitiendo a la planta activar respuestas de defensa efectivas contra el patógeno y lograr un balance entre defensa y crecimiento.

El SA además de regular múltiples aspectos fisiológicos de las plantas (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011), tiene un papel central en la resistencia local y sistémica contra patógenos biotrófos como *Pseudomonas syringae*, que se alimentan del hospedero y lo colonizan manteniéndolo vivo (Glazebrook et al., 2005; Vlot et al., 2009; Berens et al., 2017; Palmer et al., 2017). Por otro lado, el JA y ET controlan la defensa contra insectos herbívoros y patógenos necrótrofos como *Botrytis cinerea*, que invaden y matan a su hospedero para extraer nutrientes (Glazebrook et al., 2005; Pieterse et al., 2009; Berens et al., 2017; Li et al., 2019).

Vía de señalización del SA.

El SA es un compuesto fenólico (Fig. 2) que se sintetiza a partir del corismato a través de dos rutas enzimáticas, una involucra a la fenilalanina amonio liasa (PAL), y la otra a la isocorismato sintasa (ICS1/SID2) (Dempsey et al., 2011). El SA inducido por patógenos es sintetizado principalmente por la ICS1 en los cloroplastos (Wildermuth et al., 2001; Seyfferth, 2014). La señalización por Ca^{2+} regula al factor transcripcional CBP60g (calmodulin binding protein 60g) que activa la expresión de *ICS1* en etapas tempranas de la infección. También su homólogo SARD1 (systemic acquired resistance deficient 1) controla la transcripción de *ICS1* en etapas tardías y no es una proteína de unión a CaM (Wang et al., 2009; Wang et al., 2011).

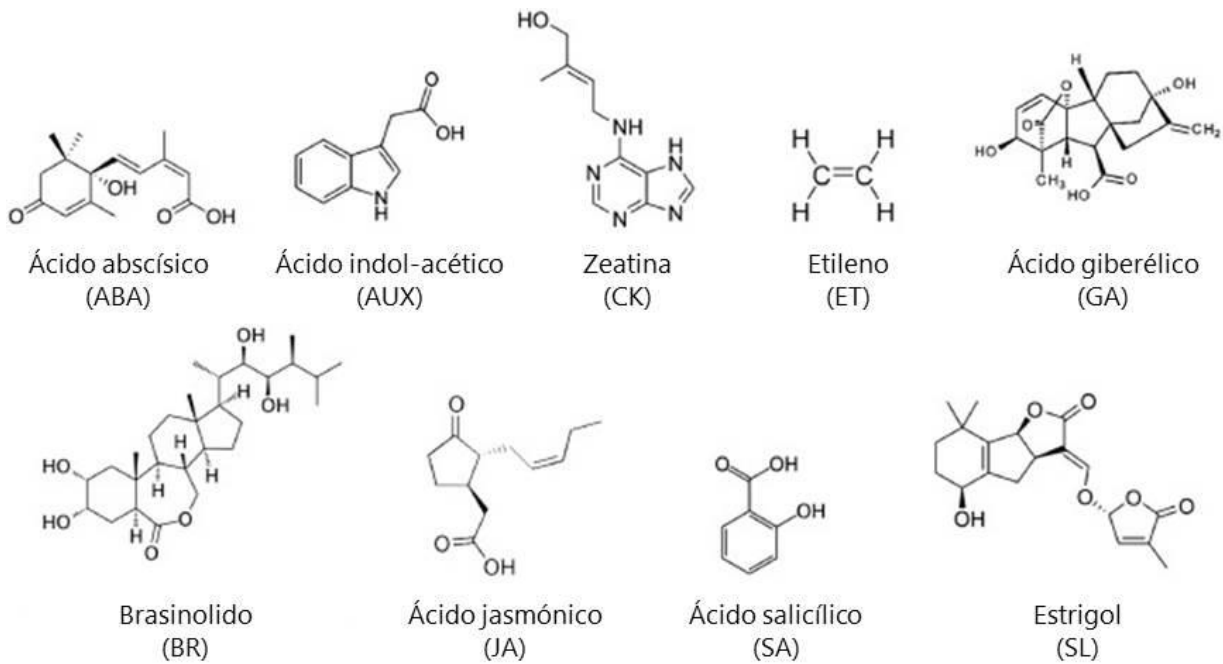


Figura 2. Fitohormonas que participan en la respuesta inmune de las plantas.

La síntesis, percepción e integridad de la vía de SA es esencial para ciertas respuestas de defensa. Las plantas de *Arabidopsis* que no acumulan SA, como la mutante *ics1* y la transgénica *nahG*, o que son insensibles a SA como la mutante *npr1*, son susceptibles a patógenos biótropos (Wildermuth et al., 2001; Delaney et al., 1994; Cao et al., 1994; Shah et al., 1997). La exportación de SA desde los cloroplastos está mediada por el transportador EDS5 (enhanced disease susceptibility 5), y este mecanismo también es muy importante pues la acumulación de SA y la respuesta de defensa están comprometidas en la mutante *eds5* (Nawrath et al., 2002; Ishihara et al., 2008).

El SA activa una extensa reprogramación transcripcional a través de sus receptores NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related gene 1) y NPR3/NPR4, que actúan como reguladores de factores transcripcionales de la familia TGA (Fu et al., 2012; Wu et al., 2012; Ding et al., 2018). El SA es un potente inductor de genes asociados con la patogénesis conocidos como *PR* (pathogenesis related) que codifican proteínas con actividad antimicrobiana cuya acción concertada establece resistencia contra el patógeno (van Loon et al., 2006). El gen *PR-1* es un marcador canónico de la activación de la vía del SA. El gen *PR-1a* de tabaco codifica a una

proteína ácida de secreción que se une al ergosterol en membranas de hongos (Gamir et al., 2017). La familia de proteínas PR-2 tienen actividad de β -1,3-glucanasas y las PR-3, -4, -8 y -11 de quitinasas (van Loon et al., 2006).

Por otro lado, muchos factores transcripcionales WRKY son inducibles por SA. Estos factores activan o reprimen respuestas dependientes de SA, por lo que participan tanto en la resistencia mediada por SA, como en mecanismos de regulación de la vía por retroalimentación (Wang et al., 2006; Rushton et al., 2010). Por ejemplo, en *Arabidopsis* WRKY50 actúa sinérgicamente con factores transcripcionales TGA para incrementar la expresión de *PR-1* (Hussain et al., 2018). Asimismo, WRKY70 actúa como activador de genes inducibles por SA, pero también es un represor de genes inducibles por JA, integrando señales de estas vías de señalización antagónicas (Li et al., 2004).

NPR1 es el regulador central de la vía del SA (Fig. 3a). Las plantas que carecen de este receptor son incapaces de expresar al gen de defensa *PR-1*, son más susceptibles a patógenos biótrosos y no pueden establecer la SAR (Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995). NPR1 posee dos dominios de interacción proteína-proteína: en su extremo N-terminal un dominio BTB/POZ autoinhibitorio, y un dominio central de repeticiones de ankirina que permite la interacción con los factores de transcripción TGA2, TGA5 y TGA6 (Fig. 3a) que se unen a promotores de genes de defensa (Zhang et al., 1999). En el C-terminal tiene un dominio de transactivación y una secuencia de localización nuclear (Cao et al., 1997; Rochon et al., 2006). La unión de SA (con cobre como cofactor) a los residuos Cys⁵²¹ y Cys⁵²⁹ en el extremo C-terminal provoca un cambio conformacional que reduce su afinidad por el dominio autoinhibitorio BTB/POZ, y permite a NPR1 funcionar como coactivador transcripcional en complejo con las proteínas TGA (Wu et al., 2012).

En el genoma de *Arabidopsis* existen 5 parálogos a *NPR1* (Liu et al., 2005). NPR3 y NPR4 presentan el 34 y 36% de identidad con NPR1 y poseen estructuras muy similares (Liu et al., 2005). Sin embargo, NPR3/NPR4 funcionan redundantemente como reguladores negativos de la respuesta inmune. La doble mutante *npr3 npr4* presenta una elevada expresión constitutiva de los genes *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*, así como mayor resistencia contra bacterias patógenas y un oomiceto, que no se asocian a niveles elevados de SA (Zhang et al., 2006). Estas respuestas no

las presentan las mutantes nulas *npr3* o *npr4*, y la complementación de la doble mutante ya sea con NPR3 o NPR4 suprime su fenotipo de mayor resistencia a patógenos (Zhang et al., 2006). En ausencia de infección por un patógeno, NPR3/NPR4 actúan como represores transcripcionales de los genes *SARD1* y *WRKY70* mediante su interacción con los factores transcripcionales TGA2/TGA5/TGA6 (Zhang et al., 2006; Ding et al., 2018). En la doble mutante *npr3 npr4* hay sobreexpresión de *SARD1* y *WRKY70*, en comparación con plantas silvestres, y por el contrario la sobreexpresión de NPR3 o NPR4 en protoplastos de *Arabidopsis* reprime su expresión (Ding et al., 2018). Por otra parte, la mutación de ganancia de función *npr4-4D* reprime constitutivamente la respuesta de defensa dependiente de SA en *Arabidopsis* y compromete su resistencia basal contra patógenos (Ding et al., 2018). El SA inhibe la actividad de NPR4 como represor transcripcional dado que la aspersion de plántulas silvestres de *Arabidopsis* con SA (200 μ M) induce rápidamente (1 h) la expresión de *SARD1* y *WRKY70*, pero en plántulas *npr4-4D* su inducción es mínima debido a que la proteína mutante NPR4-4D no puede unir al SA y se mantiene como represor transcripcional (Ding et al., 2018).

La percepción de SA por los receptores NPR1 y NPR3/NPR4 activa dos vías de señalización paralelas e independientes que promueven la expresión de genes de defensa e inmunidad. La unión de SA a NPR3/NPR4 inhibe su actividad como represores transcripcionales, mientras que su percepción por NPR1 incrementa su actividad como coactivador transcripcional, contribuyendo ambas vías a la expresión de genes de defensa (Ding et al., 2018).

La actividad de NPR1 está regulada por cambios en el estado redox celular mediados por SA (Fig. 3a), así como por modificaciones post-traduccionales. En ausencia de patógeno, la mayor proporción de NPR1 está secuestrada en el citoplasma en forma oligomérica mediante puentes disulfuro entre residuos de cisteína conservados. La formación de esta estructura evita que NPR1 entre al núcleo, inhibiendo su potencial interacción con factores transcripcionales que promueven la expresión de genes *PR* (Mou et al., 2003). El incremento en los niveles de SA cambia el estado redox celular y promueve la monomerización de NPR1 que entra al núcleo a través de proteínas en los poros nucleares e interactúa con factores transcripcionales TGA que se unen a promotores de genes inducibles por SA como *PR-1*, activando su expresión (Cheng et al., 2009). Durante este proceso NPR1 es fosforilada y ubiquitinada por una ubiquitin ligasa

E3 para ser degradada por el proteasoma. La remoción de NPR1 fosforilada de los promotores de los genes blanco es requerida para la inducción completa de genes dependientes de SA, probablemente porque permite a nuevos monómeros reiniciar el ciclo de transcripción (Spoel et al., 2009).

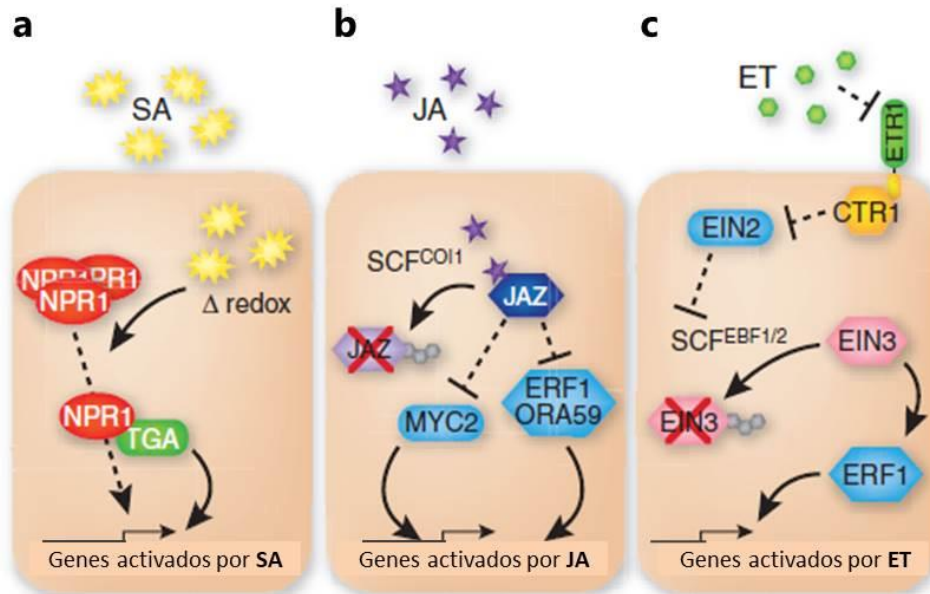


Figura 3. Representación esquemática de las vías de señalización dependientes de SA, JA y ET. **a)** El SA cambia el estado redox de la célula que promueve un cambio en el estado de oligomerización de NPR1 a su forma monomérica activa que es translocada al núcleo. **b)** En la señalización mediada por JA, su forma activa (JA-Ile) promueve la unión de COI1 con proteínas represoras JAZ para que sean degradadas, lo que permite la activación de la expresión de genes de defensa inducibles por JA por los factores transcripcionales MYC2, ERF1 y ORA59. **c)** El ET es una hormona gaseosa que es percibida por receptores en la membranales como ETR1. La percepción de ET inactiva a los receptores, desactivando a su vez a CTR1 y se elimina la represión de EIN2, un regulador positivo de la familia de factores transcripcionales EIN3 localizados en el núcleo. EIN3 activa la transcripción de factores como ERF1 y se expresan genes que responden al ET (Modificada de Pieterse et al., 2009).

Vía de señalización del JA.

El JA (Fig. 2) y sus derivados (jasmonatos) son compuestos derivados de lípidos que son sintetizados rápidamente por la ruta de las oxilipinas (Gfeller et al., 2010). La biosíntesis de JA

inicia con la liberación de ácido α -linolénico de los lípidos de membrana. Una vez sintetizado, el JA puede ser rápidamente metabolizado a metil jasmonato (MeJA), o conjugado a aminoácidos como la isoleucina para generar a la forma activa jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) (Fonseca et al., 2009).

El JA también se incrementa ante la percepción de un patógeno e induce la expresión de genes de defensa como *PDF1.2* (*plant defensin 1.2*) y *VSP1* (*vegetative storage protein 1*) que proveen resistencia contra necrótrofos (Ellis et al., 2001; Brown et al., 2003; Guerineau et al., 2003). Los mediadores importantes de la señalización por JA son su receptor COI1, que es una subunidad de E3 ubiquitin ligasa tipo SCF; las proteínas JAZ (*jasmonate ZIM-domain*) que son represores transcripcionales de genes dependiente de JA, y los factores de transcripción MYC2 (Fig 3b). La forma activa JA-Ile promueve la interacción de COI1 con las proteínas JAZ, promoviendo su ubiquitinación y degradación por el proteasoma para liberar a los factores transcripcionales MYC2 (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007; Fonseca et al., 2009). La degradación de proteínas JAZ permite la activación de una gran cantidad de genes que responden a JA, incluyendo al gen marcador *VSP2* y a genes que codifican a factores transcripcionales AP2/ERF (*APETALA2/ethylene response factor*), tales como ERF1 y ORA59 que activan al gen *PDF1.2* (Berrocal-Lobo et al., 2002; Lorenzo et al., 2003; Pré et al., 2008; Moffat et al., 2012).

Vía de señalización del ET.

El ET (Fig. 2) es una hormona gaseosa que es percibida por receptores en el retículo endoplásmico como ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4 (Lacey & Binder, 2014). El precursor para la biosíntesis de ET es el ácido 1-aminociclopano-1-carboxílico (ACC), que se deriva de la S-adenosilmetionina en una reacción catalizada por la ACC sintasa (ACS), la reacción limitante para la biosíntesis de ET (Wang et al., 2002). MPK3 y MPK6 regulan positivamente la producción de ET mediante la fosforilación y estabilización de las isoformas ACS2 y ACS6 (Liu & Zhang, 2004; Joo et al., 2008).

En ausencia de ET, los receptores activan a la proteína CTR1 (constitutive triple response 1), una cinasa de serina/treonina parecida a Raf que funciona como regulador negativo. CTR1 fosforila a EIN2 (ethylene insensitive 2), proteína unida al retículo endoplásmico para reprimir su capacidad de inducir respuestas a ET (Fig. 3c). Durante la respuesta inmune de la planta, la percepción de ET inactiva a los receptores, desactivando a su vez a CTR1 y eliminando la represión de EIN2 que por proteólisis libera su dominio C-terminal que migra al núcleo para activar factores transcripcionales EIN3 localizados en el núcleo (Fig. 3c). EIN3 activa la transcripción de factores como ERF1 y se expresan genes que responden al ET (Ju et al., 2012; Qiao et al., 2012; Wen et al., 2012). Los niveles de EIN3 son bajos en ausencia de ET debido a la degradación por la vía de ubiquitina-proteosoma 26S (An et al., 2010).

La señalización dependiente de ET actúa coordinada con SA o JA para activar las respuestas de defensa apropiadas contra los patógenos. Cuando funciona en conjunto con JA, la señalización de ET activa a factores transcripcionales ERF, mientras que la señalización del JA sin la influencia del ET activa a los factores de transcripción MYC. Las vías de ERF y MYC son antagónicas, los ERFs activan la respuesta de defensa contra hongos, mientras que la familia MYC activa defensas contra insectos herbívoros (Fernández-Calvo et al., 2011; Verhage et al., 2011). El ET puede ser también antagónico para la señalización del SA bloqueando su producción al reprimir la expresión de *ICS1/SID2* (Chen et al., 2009). La doble mutante de *Arabidopsis ein3 eil1* expresa constitutivamente a *ICS1/SID2* y un gran número de genes de defensa, acumulan SA y presentan mayor resistencia a *P. syringae*. Por el contrario, las plantas que sobreexpresan a *EIN3* son más susceptibles a la bacteria (Chen et al., 2009a).

Antagonismo SA/JA.

Las vías de señalización del SA y JA/ET son generalmente antagónicas y, en consecuencia, una prevalece sobre la otra dependiendo del patógeno (Spoel et al., 2003; 2007; Leon-Reyes et al., 2010). La aplicación exógena de SA, así como la infección por *P. syringae* (que induce la vía del SA) suprime la respuesta de defensa dependiente de JA en *Arabidopsis* e incrementa su susceptibilidad al patógeno necrotrofo *Alternaria brassicicola* (Spoel et al., 2007). Experimentos farmacológicos con *Arabidopsis* mostraron que los genes inducibles por JA como *PDF1.2* y *VSP2*

son suprimidos por aplicación de SA (Koornneef et al., 2008). Sin embargo, el tratamiento con bajas concentraciones de JA y SA (10-100 μ M) provoca un efecto sinérgico en los genes *PDF1.2* y *PR-1*, aunque con altas concentraciones (250 μ M) el efecto es antagónico, indicando que la respuesta depende de la concentración relativa de cada hormona (Mur et al., 2006). Además, el tiempo y la secuencia de iniciación de la señalización de SA y JA también son determinantes (Koornneef et al., 2008). Por lo tanto, la cinética de la biosíntesis de las fitohormonas y la activación de sus vías de señalización son decisivas para definir cuál debe controlar la respuesta de defensa contra el patógeno invasor (Pieterse et al., 2009).

La proteína NPR1 es el principal regulador de este antagonismo (Fig. 4) pues en la mutante *npr1* no se presenta el efecto supresor del SA en la expresión de los genes *PDF1.2* y *VSP2*. La supresión del SA sobre la vía del JA no requiere la localización nuclear de NPR1 (Spoel et al., 2003; Dong et al., 2004). Algunos factores transcripcionales WRKY, TGA y ORA59 (Li et al., 2006; Gimenez-Ibanez & Solano, 2013; Van der Does et al., 2013), así como las glutarredoxinas GRX480 y GRXS13 también son importantes para la integración de señales entre SA y JA (Ndamukong et al., 2007; Camera et al., 2011; Zander et al., 2012). El SA induce la expresión de GRX480 y GRX13, que son glutaredoxinas tipo CC que existen exclusivamente en plantas y regulan procesos de desarrollo y respuestas a estrés (Gutsche et al., 2015). La sobreexpresión de *GRX80* en *Arabidopsis* bloquea la inducción de *PDF1.2* por JA, y la de *GRX135* provoca susceptibilidad al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* (Ndamukong et al., 2007; Camera et al., 2011). Por otro lado, diez GRXs más de este grupo (también denominadas ROXYs) son capaces de suprimir la activación del promotor de *ORA59* (Zander et al., 2012). Es probable que su efecto antagónico sobre la vía del JA sea río abajo de NPR1 pues la expresión de *GRX480* es reducida en la mutante *npr1-1*, mientras que su sobreexpresión en la misma mutante mantiene la supresión de la expresión de *PDF1.2* (Zander et al., 2012). Los posibles blancos de GRX480 son los factores transcripcionales TGA (Fig. 4B) que participan en la vía dependiente del SA ya que GRX interacciona con TGA2 en ensayos de doble híbrido en levadura, y la sobreexpresión de *GRX480* no suprime la expresión del gen *PDF1.2* en la triple mutante *tga2 tga5 tga6* (Ndamukong et al., 2007).

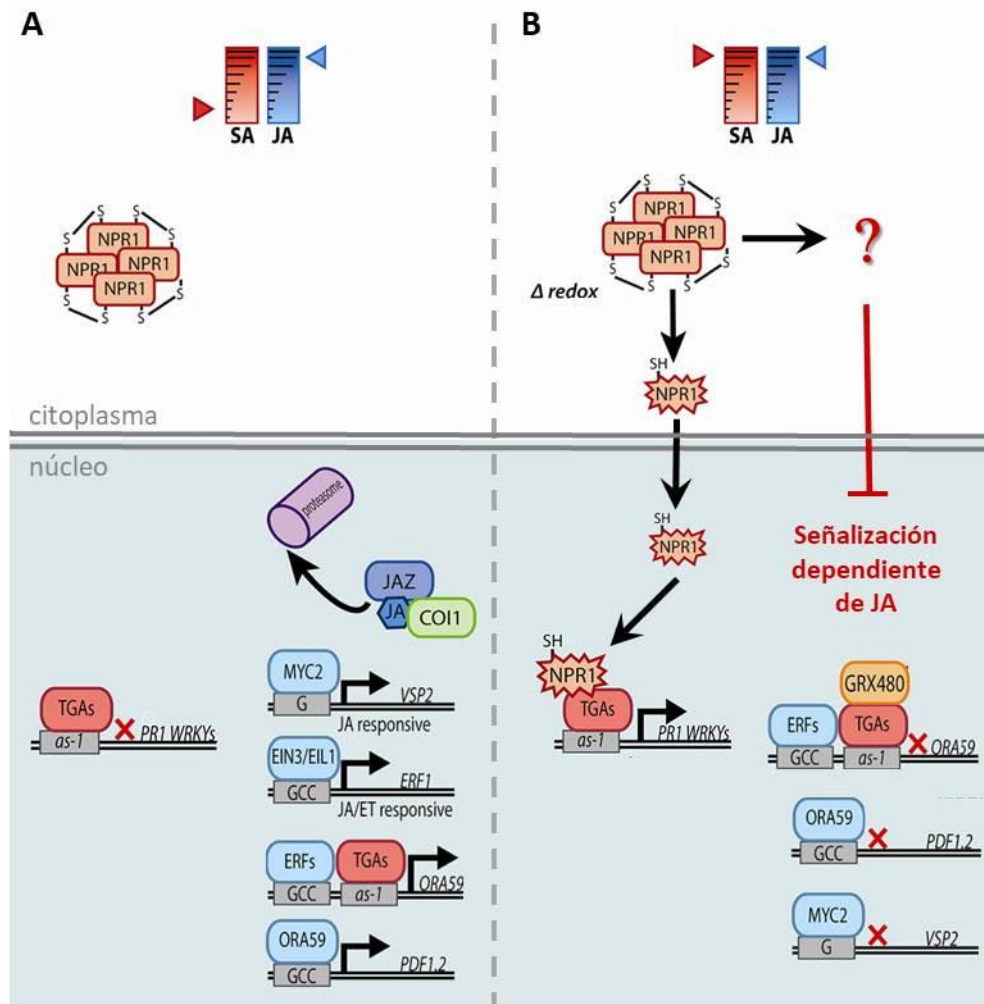


Figura 4. Modelo simplificado del antagonismo de la vía del SA sobre la señalización dependiente del JA. **A)** Cuando la concentración de SA es baja, la vía del JA se activa en respuesta a patógenos necrótrofos y la degradación de las proteínas JAZ elimina la represión de genes de defensa inducibles por JA como *VSP2*, *PDF1.2*, *ERF* y *ORA59*. **B)** La activación de ambas vías de señalización provoca un efecto antagónico del SA sobre la vía del JA. Algunos reguladores del antagonismo son NPR1, GRX480 y factores transcripcionales TGA. La localización nuclear de NPR1 es esencial para la expresión de genes de defensa inducibles por SA, pero no para la supresión de los genes dependientes de JA. GRX480 impide la activación del promotor de *ORA59* al interactuar con factores transcripcionales TGA, y afecta la activación del gen *PDF1.2* (Modificada de Caarls et al., 2015),

Manipulación de la señalización hormonal por patógenos.

La biosíntesis y las vías de señalización mediadas por fitohormonas en la respuesta inmune de las plantas constituyen un blanco de algunos efectores secretados por patógenos, lo que facilita la colonización del tejido del hospedero (Pieterse et al., 2012; Han & Kahmann, 2019).

Anteriormente se mencionó que algunas cepas de *P. syringae* producen la toxina coronatina (COR) que posee una estructura química similar a JA-Ile, por lo que activa respuestas de defensa dependientes de JA para suprimir las que son dependientes de SA y efectivas para combatirla (Laurie-Berry et al., 2006; Zheng et al., 2012). La COR se une directamente al receptor COI1 y es mucho más activa que la molécula endógena JA-Ile (Katsir et al., 2008).

La estrategia de interferir con la respuesta de defensa mediada por SA también es explotada por hongos patógenos. El patógeno biótrofo de maíz *Ustilago maydis* secreta una corismato mutasa que convierte al corismato en preferato para evitar la activación de la vía del SA (Djamei et al., 2011). Una forma alternativa de reducir los niveles de SA es utilizada por el oomiceto *Phytophthora sojae* y el hongo *Verticillium dahliae* que secretan isocorismatasas que convierten el corismato a 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato y piruvato, provocando que no exista isocorismato disponible en el hospedero para la biosíntesis de SA (Liu et al., 2014).

Los patógenos también son capaces de sintetizar hormonas. El ascomiceto hemibiótrofo *Fusarium oxysporum* produce jasmonatos como parte de su estrategia de virulencia (Cole et al., 2014). También el hongo necrótrofo patógeno de la vid *Lasiodiplodia mediterranea* activa la vía de señalización del JA produciendo un éster de JA (lasiojasmonato A), el cual puede ser convertido a JA-Ile que es un fuerte inductor de muerte celular (Chini et al., 2018).

B. Esfingolípidos.

Los esfingolípidos son un grupo de moléculas diversas en estructura, solubilidad, carga, forma y tamaño (Markham et al., 2013). En células de plantas componen aproximadamente el 40% de los lípidos de la membrana plasmática y están enriquecidos en la cara externa. También son abundantes en otras endomembranas, como retículo endoplásmico, Golgi y tonoplasto (Cacas et al., 2016; Michaelson et al., 2016). Además, los esfingolípidos son componentes

importantes de las balsas lipídicas, microdominios de la membrana plasmática indispensables en procesos celulares como la transducción de señales, tráfico membranal, organización del citoesqueleto e interacción con patógenos (Berkey et al., 2012; Cacas et al., 2016; Michaelson et al., 2016).

B.1. Diversidad estructural de los esfingolípidos en plantas.

Los esfingolípidos de plantas se clasifican en 4 clases principales: **bases de cadena larga (LCBs)**, **ceramidas (Cer)**, **glucosilceramidas (GlcCers)** y **glucosil inositol fosfoceramidas (GIPCs)**, siendo estos últimos los más abundantes en tejidos vegetales (Markham et al., 2006; Michaelson et al., 2016).

A diferencia de los fosfolípidos que poseen un esqueleto de diacilglicerol, los esfingolípidos tienen como esqueleto hidrofóbico a la **ceramida** que está unida a residuos polares de azúcar para formar los componentes lipídicos anfipáticos de las membranas (Fig. 5d; Lynch & Dunn 2004; Chen et al. 2009b).

La ceramida está formada por un aminoalcohol de cadena larga denominado base de cadena larga (LCB) unido por un enlace amida a un ácido graso. Las LCBs de plantas generalmente contienen 18 átomos de carbono y pueden contener insaturaciones en las posiciones $\Delta 4$ y $\Delta 8$ (Fig. 5a). La insaturación en $\Delta 4$ existe únicamente en configuración *trans*, mientras que en $\Delta 8$ puede encontrarse en configuraciones *cis* o *trans*. Tras su síntesis inicial, las LCBs contienen dos grupos hidroxilo en C1 y C3 denominándose **LCBs dihidroxiladas (d18:0, d18:1 Δ 4, d18:1 Δ 8, etc.; Fig. 5a)**, y pueden ser blanco de una hidroxilación adicional en C4 para producir **LCBs trihidroxiladas (t18:0, t18:1 Δ 8; Fig. 5a)**. Las LCBs también pueden ser fosforiladas en la posición C1 para producir LCB-fosfatos (LCBPs). Las LCBs libres y fosforiladas son muy poco abundantes en las células vegetales (Markham et al., 2006; Markham & Jaworski 2007).

La mayoría de las LCBs se unen a ácidos grasos para formar ceramidas (Fig. 5b). La longitud de los ácidos grasos presentes en las ceramidas varía de 16 a 26 átomos de carbono y la mayoría contiene un grupo hidroxilo en la posición α o C2. La ceramida es el componente hidrofóbico

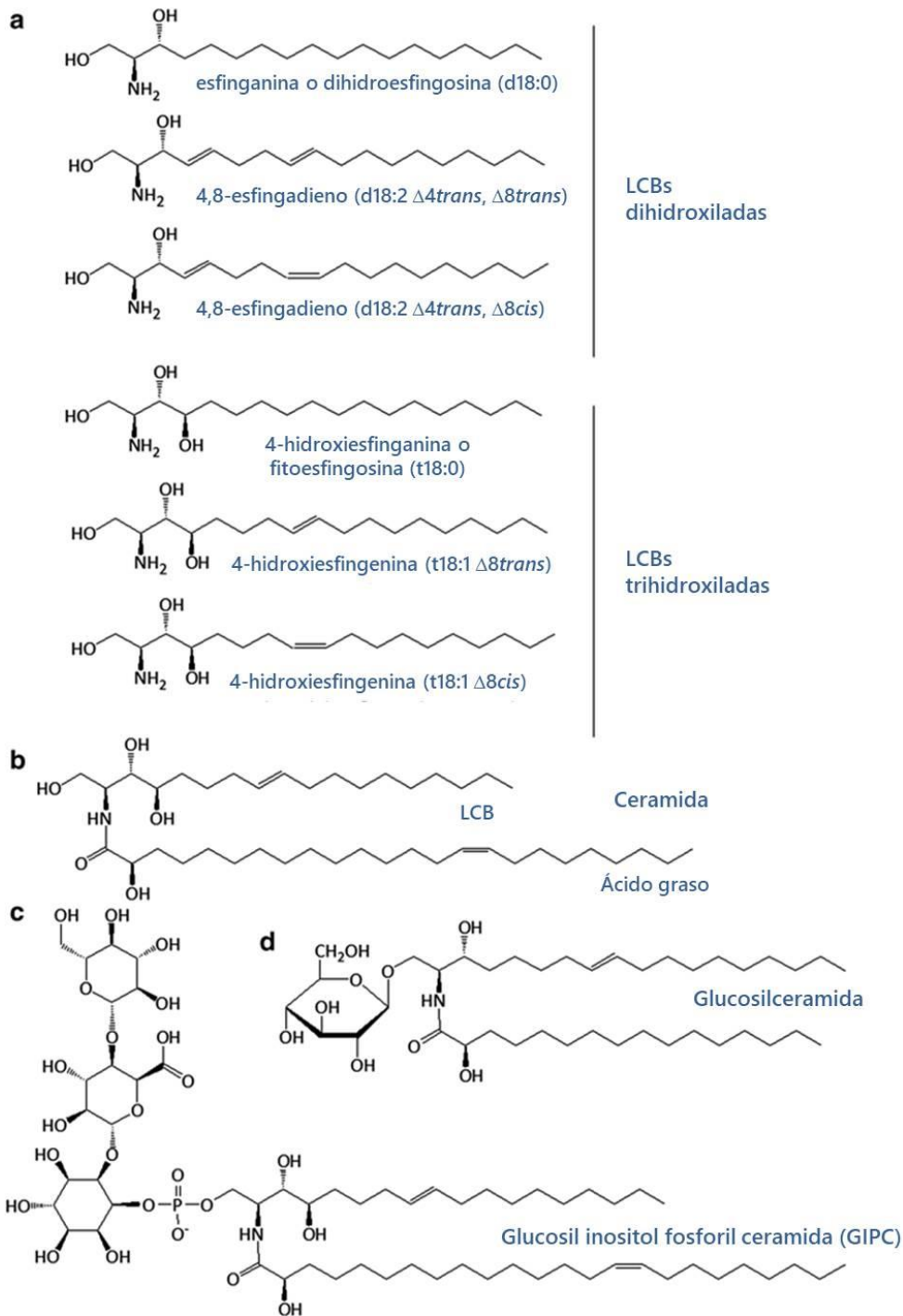


Figura 5. Estructura de algunas LCBs y esfingolípidos en plantas. **a)** Ejemplos de modificaciones a LCBs en plantas. Se muestran LCBs dihidroxiladas y trihidroxiladas. Las nomenclaturas **d18:0** y **t18:0** indican que la LCB tiene dos o tres grupos hidroxilo respectivamente, 18 carbonos y no tiene enlaces dobles. **b)** Hidroxiceramida formada por la LCB t18:1 Δ 8*trans* y el ácido graso 24:1 ω 9*cis* y que está hidroxilada en C2. **c)** Glucosil inositol fosforil ceramida (GIPC) más abundante en hojas de *Arabidopsis*. **d)** Glucosilceramida (Tomada de Luttgeharm et al., 2016).

de los esfingolípidos complejos. Los grupos polares se añaden a la ceramida en el C1 siendo un grupo fosfato o una variedad de residuos de azúcar (Chen et al., 2009b).

La GlcCer es el esfingolípido más simple en plantas (Fig. 5d) pues contiene una molécula de glucosa. Las GIPCs son los esfingolípidos más complejos al contener un grupo inositol fosfato unido a la ceramida con hasta siete residuos adicionales de hexosas y pentosas (Fig. 5c).

Dada la diversidad química de LCBs, ácidos grasos y grupos polares que conforman a las ceramidas, existen cientos de esfingolípidos en las plantas. En *Arabidopsis thaliana* se han podido identificar 168 esfingolípidos distintos, siendo los más abundantes las GIPCs y GlcCers (Markham & Jaworski, 2007). Es importante denotar que la composición de esfingolípidos difiere entre especies vegetales y de manera tejido-específica (Markham et al., 2006; Luttgeharm et al., 2015b).

B.2. Biosíntesis de esfingolípidos.

Las LCBs, libres y fosforiladas, existen en las células vegetales en concentraciones fisiológicas muy bajas. Las plantas mantienen su biosíntesis altamente regulada para asegurar que existan suficientes esfingolípidos para regular el crecimiento y desarrollo, así como para limitar la acumulación de sus intermediarios que inducen PCD.

Los esfingolípidos complejos se sintetizan por dos rutas principales: la biosíntesis *de novo* que inicia con la condensación de serina y palmitoil-CoA (Fig. 6), y la ruta de salvamento donde ceramidas y LCBs que provienen del catabolismo de esfingolípidos complejos son reincorporados a la ruta biosintética (Chen et al., 2009b).

Síntesis de LCB.

La biosíntesis *de novo* de esfingolípidos inicia en el retículo endoplásmico donde se produce el precursor de la LCB por condensación de serina y palmitoil-CoA. Esta reacción es catalizada por la **serina palmitoil transferasa (SPT)** produciendo 3-cetoesfinganina (Fig. 6). De manera similar a otros eucariontes, la SPT de *Arabidopsis* funciona como heterodímero formado por las subunidades LCB1 y LCB2 (Chen et al., 2009b; Luttgeharm et al., 2016). La SPT

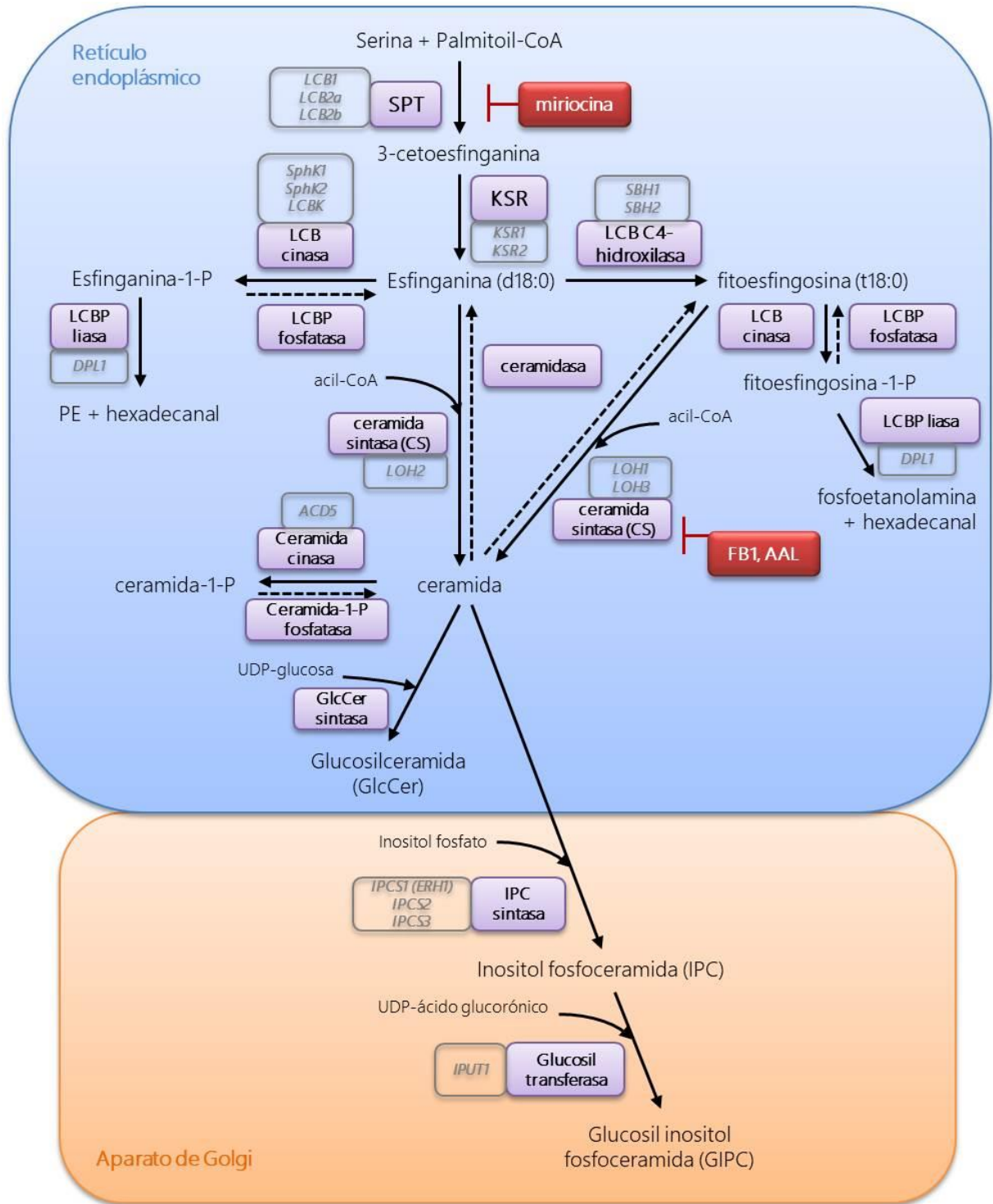


Figura 6. Representación esquemática de la biosíntesis de esfingolípidos en plantas. La síntesis *de novo* de la ceramida ocurre en el retículo endoplásmico y la síntesis de esfingolípidos más complejos en el Aparato de Golgi. Los nombres de las enzimas están en cuadros morados y el de sus genes en cuadros grises. En rojo se indican inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos y sus blancos (Modificada de Berkey et al., 2012).

es considerada como el principal punto regulatorio para la homeostasis de esfingolípidos (Li et al., 2016; Kimberlin et al., 2016).

La 3-cetoesfinganina es reducida por la **cetoesfinganina reductasa (KSR)** para producir esfinganina (d18:0; Fig. 6). La KSR es codificada por dos genes en *Arabidopsis*, *KSR-1* (*At3g06060*) y *KSR-2* (*At5g19200*). Aunque ambos genes contribuyen a la actividad reductasa y son esenciales, *KSR-1* se expresa en mayor proporción en la planta (Chao et al., 2011).

La esfinganina (d18:0) puede ser usada directamente por la ceramida sintasa, o ser modificada por hidroxilación o insaturación en posición C4 antes de usarse para la síntesis de ceramida.

Modificaciones a las LCBs.

Tres enzimas son responsables de generar ocho LCBs a partir de la esfinganina (d18:0): la **LCB C4 hidroxilasa**, **LCB Δ 8 desaturasa** y la **LCB Δ 4 desaturasa** (Chen et al., 2009b; Luttgeharm et al., 2016; Michaelson et al., 2016).

Las LCBs dihidroxiladas presentan grupos hidroxilo en C1 y C3, mientras que la tercera hidroxilación que predomina en LCBs de plantas ocurre en el C4 y es catalizada por la **LCB C4 hidroxilasa** (Fig. 6). En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican LCB C4 hidroxilasas: *SBH1*, *At1g69640* y *SBH2*, *At1g14290* (Chen et al., 2008). Es probable que la hidroxilación en el C4 de las LCBs ocurra antes de su incorporación a las ceramidas debido a que la fitoesfingosina (t18:0) es la LCB libre predominante en hojas de *Arabidopsis* (Chen et al., 2008; Markham et al., 2006). La síntesis de LCBs trihidroxiladas es crítica para la regulación del crecimiento así como para el contenido y composición de esfingolípidos en las plantas. Las mutantes dobles *sbh1 sbh2* carecen de LCBs trihidroxiladas y son demasiado pequeñas, no progresan del estado vegetativo al reproductivo y su contenido de esfingolípidos es de 2.5 a 3 veces mayor que en plantas silvestres (Chen et al., 2008).

La insaturación de LCBs ocurre en C4 o en C8, predominando en la segunda posición. La **LCB Δ 8 desaturasa** es una enzima bifuncional en relación con la estereoespecificidad de la inserción del doble enlace. En la mayoría de las plantas los isómeros *trans* de LCBs Δ 8

insaturadas predominan en el extracto de esfingolípidos totales. Sin embargo, el isómero *cis* de t18:1 Δ 8 está más enriquecido en GlcCers comparado con las GIPCs en *Arabidopsis* (Sperling et al., 2005; Markham et al., 2006; Markham & Jaworski, 2007). En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican a esta enzima: *SLD1*, *At3g61580* y *SLD2*, *At2g46210*. Sin embargo, todavía se desconoce si las LCBs Δ 8 insaturadas son esenciales en plantas y tampoco se sabe si el sustrato de la LCB Δ 8 desaturasa es una LCB libre, ceramida o esfingolípidos complejos (Chen et al., 2009b).

La **LCB Δ 4 desaturasa** utiliza como sustrato LCBs libres dihidroxiladas y Δ 8 insaturadas e introduce el doble enlace exclusivamente en configuración *trans* (Ternes et al., 2002). Las LCBs dihidroxiladas y con doble insaturación (d18:2) que produce se encuentran casi exclusivamente en GlcCers y no en GIPCs (Sperling et al., 2005; Markham et al., 2006; Markham & Jaworski, 2007). *Arabidopsis* posee un solo gen LCB Δ 4 desaturasa, *At4g04930*, cuya expresión casi se limita a flores, específicamente en polen, y es muy baja en hojas (Michaelson et al., 2009). Sin embargo, en otras especies como jitomate y soya, la producción de LCBs d18:2 ocurre en toda la planta y es la LCB más abundante en GlcCers (Sperling et al., 2005; Markham et al., 2006).

Síntesis de ceramida y esfingolípidos complejos.

La síntesis de ceramida es catalizada por la **ceramida sintasa**, también llamada esfinganina-N-acil transferasa, encargada de la acilación del grupo amino de la esfinganina con un ácido graso (Fig. 6). Existen 3 genes para la ceramida sintasa en *Arabidopsis*, *LOH1* (*At3g25440*), *LOH2* (*At3g19260*) y *LOH3* (*At1g13580*). Las ceramidas sintasas se dividen en dos clases con base a la especificidad por sus sustratos. La clase I está representada por *LOH2* y tiene una estricta especificidad por ácidos grasos de 16C y LCBs dihidroxiladas. La clase II incluye a *LOH1* y *LOH3*, y tiene especificidad por ácidos grasos de cadena muy larga y LCBs trihidroxiladas (Markham et al., 2011).

Posterior a su síntesis por las ceramida sintasas, las ceramidas pueden ser glicosiladas en su grupo hidroxilo en el C1 para generar glucosilceramidas (GlcCers) o glucosil inositol fosforilceramidas (GIPCs, Fig. 6). La síntesis de GlcCers es catalizada por la **glucosil ceramida**

sintasa (GCS), también localizada en retículo endoplásmico y que en *Arabidopsis* es codificada por el gen esencial *At2g19980* (Melser et al., 2010). Al parecer, las ceramidas sustrato para la GCS provienen de la ceramida sintasa clase I debido a que las GlcCers están enriquecidas en ceramidas con LCBs dihidroxiladas y ácidos grasos de 16C en comparación con las GIPCs (Markham et al., 2006).

Por otro lado, las GIPCs son sintetizadas por tres **inositol fosfoceramida sintasas (IPCs)** y varias glucosil transferasas o glucoronil transferasas (Mina et al., 2010; Rennie et al., 2014). Las IPCs se localizan en el aparato de Golgi (Fig. 6) y son codificadas por los genes *IPCS1* o *ERH1*, *At2g37940*; *IPCS2*, *At3g54020*; *IPCS3*, *At2g29525* (Wang et al., 2008; Mina et al., 2010). Posterior a la síntesis de inositol fosfoceramidas, se pueden añadir hasta 7 residuos de glucosa a la cabeza polar para formar las distintas GIPCs (Cacas et al., 2013). El primer residuo que se añade al grupo inositol fosforilo es el UDP-ácido glucorónico, reacción catalizada por la **glucosil transferasa** *IPUT1*, *At5g18480* (Rennie et al., 2014). El resto de las glucosil transferasas que intervienen en la síntesis de las distintas GIPCs todavía no se han identificado (Luttgeharm et al., 2016). Las GIPCs están enriquecidas en ceramidas con LCBs trihidroxiladas y ácidos grasos de cadena muy larga que provienen de las ceramida sintasas clase II (Markham et al., 2006).

Fosforilación de LCBs y ceramidas.

Esta modificación es relevante para los mecanismos de señalización en respuestas a estrés biótico, abiótico y muerte celular que involucran a los esfingolípidos. La fosforilación de LCBs ocurre en su grupo hidroxilo en el C1 y es catalizada por la **LCB cinasa** (Fig. 6). En *Arabidopsis* existen 3 genes que la codifican: *SPHK1*, *At4g21540*; *SPHK2*, *At2g46090* y *LCBK1*, *At5g23450b*. Mientras que la remoción del grupo fosfato de las LCB-P es catalizada por la **LCBP fosfatasa** codificada por dos genes, *At3g58490* y *At5g03080* (Luttgeharm et al., 2016). La ceramida es convertida a ceramida-1-fosfato (Cer-1P) por la **ceramida cinasa** codificada por el gen *ACD5*, *At5g51290* (Liang et al., 2003; Bi et al., 2014).

B.3. Importancia de la serina palmitoil transferasa (SPT) en la regulación de la biosíntesis de *nov*o de los esfingolípidos.

Como se mencionó anteriormente, la SPT cataliza la primera reacción para la síntesis de LCBs. La SPT de plantas, como la de todos los eucariontes, existe como un heterodímero formado por las subunidades LCB1 y LCB2 localizado en el retículo endoplásmico y que interactúa con varias proteínas reguladoras (Fig. 7). Las subunidades LCB1 y LCB2 presentan similitud con las α -oxoamina sintasas; y el residuo catalítico de lisina que forma la base de Schiff con piridoxal fosfato se encuentra en la subunidad LCB2 (Tamura et al., 2001; Chen et al., 2006; Dietrich et al., 2008). En *Arabidopsis*, LCB1 es codificada por un solo gen *AtLCB1* (*At4g36480*), mientras que LCB2 es codificada por dos genes redundantes: *AtLCB2a*, *At5g23670* y *AtLCB2b*, *At3g48780* (Chen et al., 2006; Dietrich et al., 2008).

La SPT es regulada a través de mecanismos transcripcionales y post-traduccionales (Hanada et al., 2003); estos últimos involucran interacciones físicas con proteínas asociadas a membrana que afectan la actividad de SPT (Han et al., 2009; 2010; Breslow et al., 2010).

Una de las proteínas reguladoras, ssSPT (small subunit of Serine Palmitoyl Transferase), tiene 56 aminoácidos y carece de actividad enzimática, contiene un dominio transmembranal que ayuda a estabilizar al complejo (Fig. 7). Aunque la SPT puede funcionar como heterodímero con mínima actividad enzimática, su interacción con ssSPT la activa de tal forma que se producen LCBs en cantidades suficientes para mantener la viabilidad celular en *Arabidopsis*. La ssSPT es codificada por dos genes: *ssSPTa*, *At1g06515* y *ssSPTb*, *At2g30942*, teniendo mayor expresión *ssSPTa* en todos los órganos (Kimberlin et al., 2013). La caracterización de mutantes de *Arabidopsis lcb1*, *lcb2* y *ssSPT* ha demostrado que la actividad de la SPT es esencial para la viabilidad de las células vegetales (Teng et al., 2008; Dietrich et al., 2008; Kimberlin et al. 2013). Se desconoce si los niveles de ssSPT se modifican ante respuestas intracelulares que influyan en la homeostasis de esfingolípidos, o si la SPT es regulada por modificaciones post-traduccionales a los polipéptidos ssSPT.

Por otra parte, las proteínas orosomucoides (ORM, Fig. 7) actúan como reguladores negativos de la SPT en respuesta a los niveles intracelulares de esfingolípidos (Breslow et al.,

2010; Han et al., 2010; Roelants et al., 2011). En levadura, las proteínas ORM1p y ORM2p son fosforiladas en respuesta a bajos niveles intracelulares de esfingolípidos, lo que restaura la actividad de la SPT e incrementa la síntesis de LCBs. En este circuito regulatorio la defosforilación de las ORM reestablece la inhibición de la SPT en respuesta al exceso intracelular de esfingolípidos (Roelants et al., 2011; Muir et al., 2014). Sin embargo, la regulación de la SPT

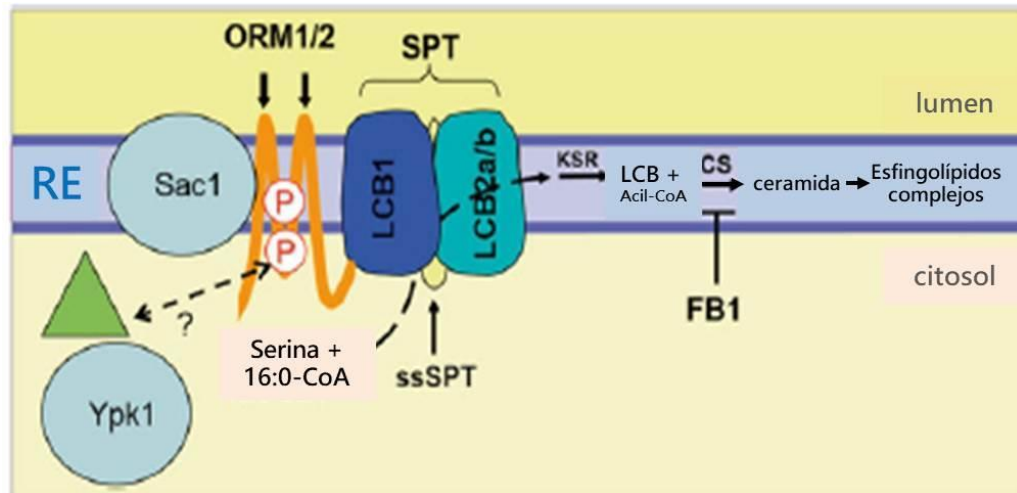


Figura 7. La serina palmitoil transferasa (SPT) es un complejo enzimático localizado en el retículo endoplásmico (RE) conformado por el heterodímero catalítico LCB1/LCB2 y la subunidad pequeña activadora ssSPT. En levadura, LCB1 tiene tres dominios transmembranales (TM) con su extremo N-terminal en el lumen del RE y el extremo C-terminal en el citosol. LCB2 tiene dos dominios TM con los extremos N- y C-terminal en el citosol, mientras que ssSPT tiene un solo dominio TM. La SPT está sujeta a regulación negativa por las proteínas ORM en respuesta a los niveles de esfingolípidos. Las proteínas ORM tienen cuatro dominios TM e interactúan con el primer dominio TM de LCB1. La regulación involucra la fosforilación de ORMs por Ypk1 para aliviar gradualmente la supresión de la SPT e incrementar la síntesis de esfingolípidos en respuesta a niveles intracelulares sub-óptimos, y la defosforilación reversible de la ORMs por la fosfatasa SAC1 para suprimir nuevamente la actividad de la SPT en respuesta a un exceso intracelular de esfingolípidos. Las LCBs producidas por la SPT y la 3-cetoesfingánina reductasa (KSR) son utilizadas por la ceramida sintasa (CS) con acil-CoA para producir ceramidas. La FB1 es una micotoxina que inhibe a la CS y provoca muerte celular (Modificada de Luttgeharm et al., 2016).

en plantas y mamíferos parece ser más compleja que en levadura porque sus proteínas ORM carecen del extremo N-terminal que es fosforilado (Roelants et al., 2011). En *Arabidopsis* existen dos genes *ORM*, *ORM1* (*At1g01230*) y *ORM2* (*At5g42000*), que se expresan constitutivamente en toda la planta, pero la expresión de *ORM1* es mayor en raíz, tallo, hoja y flores, mientras que la de *ORM2* es más abundante en polen. La sobreexpresión de *ORM1* y *ORM2* provoca una disminución en el crecimiento de las plantas. El efecto en los bajos niveles de LCBs se refleja también en una disminución en la actividad de la ceramida sintasa clase I, e incrementa la actividad de la clase II. Por otro lado, la supresión de las ORM por RNAi incrementa la actividad de la ceramida sintasa clase I y reduce la actividad de la clase II. Estos resultados sugieren que las ORMs podrían ejercer una regulación coordinada de la SPT y también de las ceramida sintasas (CS), posiblemente a través de los niveles de LCBs (Kimberlin et al., 2016).

B.4. Función biológica de los esfingolípidos en plantas.

Anteriormente se mencionó que los esfingolípidos tienen funciones críticas al ser componentes estructurales de la membrana plasmática y otras endomembranas, contribuyendo a la integridad y estabilidad membranal. Además, al formar parte de los microdominios en membrana plasmática tienen funciones importantes en la transducción de señales (Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005; Cacas et al., 2016). Los estudios de Genética Funcional han revelado que los esfingolípidos participan y regulan una gran variedad de procesos celulares (Tabla 1) incluyendo el crecimiento y la muerte celular programada (PCD) que ocurre tanto en el desarrollo como en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico (Chen et al., 2009b; Luttgeharm et al., 2016; Ali et al., 2018; Huby et al., 2019).

De todos los procesos mencionados en la Tabla 1, la participación de los esfingolípidos en la PCD ha sido una de las funciones más estudiadas (Berkey et al., 2012). Los niveles fisiológicos de los esfingolípidos (especialmente de LCBs libres) son bajos y se mantienen bajo una estricta regulación al igual que sus derivados fosforilados para controlar el destino de la célula. La acumulación de LCBs y ceramidas induce PCD, mientras que las LCBs fosforiladas (LCBPs) y la ceramida-1-fosfato (Cer1P) la inhiben (Shi et al., 2007; Saucedo-García et al., 2011; Hou et al., 2016). Las LCBs esfinganina, fitoesfingosina y esfingosina inducen de manera dosis-

dependiente la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) seguida de PCD, mientras que estos efectos son inhibidos por la esfingalina-1-fosfato (Shi et al., 2007). También la expresión de LCB cinasas (LCBK) y de la ceramida cinasa (CerK) que catalizan la producción de LCBPs y Cer1P respectivamente, inhibe la PCD (Hou et al., 2016).

Se conocen pocos elementos que participan en la PCD inducida por LCBs. La MAP cinasa MPK6 de *Arabidopsis* fue la primera proteína caracterizada como transductor esencial de los esfingolípidos en la inducción de PCD, y es rápidamente activada (~15 min) por adición de esfingalina o fitoesfingosina (Saucedo-García et al., 2011). Otro regulador positivo es la cinasa dependiente de calcio CPK3, que es regulada por proteínas 14-3-3. En extractos proteicos de plantas silvestres CPK3 está unida a proteínas 14-3-3. Ante la elevación de los niveles de fitoesfingosina se incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} activando a CPK3, y la fitoesfingosina también modula a las proteínas 14-3-3 para permitir su fosforilación por la CPK3 activada. La fosforilación provoca la disociación del complejo y la CPK3 es degradada durante la PCD inducida por la fitoesfingosina (Lachaud et al., 2013).

El estado de fosforilación de LCBs y ceramida es crucial para el proceso fisiológico que deben regular. Como se indica en la Tabla 1, las LCBPs también regulan la apertura de los estomas. La esfingosina-1-fosfato (S1P) participa en la ruta de señalización mediada por ácido abscísico (ABA) que controla la apertura estomatal elevando los niveles de Ca^{2+} en el citosol, los cuales activan canales iónicos en las membranas de las células guarda, y el eflujo de K^+ causa pérdida de la presión de turgor y cierre estomatal (Kim et al., 2010). En condiciones de sequía la planta *Commelina communis* incrementa los niveles de S1P en las hojas, y cuando se le aplica S1P exógena se observa un aumento de Ca^{2+} intracelular seguido de cierre estomatal (Ng et al., 2001). La fitoesfingosina-1-fosfato provoca la misma respuesta pero la esfingalina-1-fosfato no, indicando que existe cierta especificidad en la regulación de la apertura de los estomas (Coursol et al., 2003). El tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con ABA activa a la LCBK y se considera que el blanco de la S1P podría ser un receptor acoplado a proteínas G, ya que mutantes de *Arabidopsis* carentes de la subunidad α de la proteína G (*gpa1*) no responden a la aplicación de S1P (Coursol et al., 2005).

Tabla 1. Funciones fisiológicas, regulación de procesos de desarrollo y respuestas a estrés por esfingolípidos.

| Proceso / Función | Estrategia | Referencia |
|--|---|---|
| Crecimiento y desarrollo | <p>La supresión de <i>AtLCB1</i> por RNAi reduce el crecimiento y altera la morfología de las hojas.</p> <p>La mutante <i>sbh1 sbh2</i> carente de LCBs trihidroxiladas crece muy poco y no progresa del estado vegetativo al reproductivo.</p> <p>La sobreexpresión de la ceramida sintasa LOH2 provoca enanismo, mientras que la de LOH1 o LOH3 promueve el crecimiento al incrementar la división celular.</p> <p>La mutante <i>gcs1</i> carente de GlcCer presenta enanismo y se desarrolla hasta plántula.</p> <p>Las mutantes <i>iput1</i>, <i>gonst1</i> y <i>gmt1</i> afectadas en la síntesis de GIPC también presentan enanismo severo.</p> | <p>Chen et al., 2006 Chen et al., 2008</p> <p>Luttgeharm et al., 2015a</p> <p>Msanne et al., 2015</p> <p>Mortimer et al., 2013 Fang et al., 2016 Tartaglio et al., 2017</p> |
| Reproducción, desarrollo de polen | <p>Las mutantes (heterocigotas) <i>lcb1</i> o <i>ssSPTa</i> (afectadas en la actividad de la SPT) producen polen inviable.</p> <p>La mutante nula <i>lcb2a lcb2b</i> presenta letalidad gametofítica.</p> <p>La mutación <i>iput1</i> interfiere con el direccionamiento del tubo polínico a los óvulos.</p> <p>Las LCBPs modulan el desarrollo del tubo polínico por activación de corrientes de Ca²⁺ mediada por proteínas G heterotriméricas.</p> | <p>Chen et al., 2006 Kimberlin et al., 2013 Dietrich et al., 2008 Tartaglio et al., 2017</p> <p>Wu et al., 2014</p> |
| Organización celular y secreción de proteínas | <p>La interrupción de la biosíntesis de GlcCer induce cambios críticos en la morfología del Aparato de Golgi e interrumpe el transporte de proteínas solubles y de secreción a la superficie celular.</p> | <p>Melser et al., 2010 Msanne et al., 2015</p> |
| Diferenciación celular y organogénesis | <p>Callos no diferenciados generados de la mutante de <i>Arabidopsis gcs1</i> son incapaces de desarrollar órganos en medio de diferenciación, pero sí forman raíces y hojas en medio suplementado con esfinganina glicosilada.</p> | <p>Msanne et al., 2015</p> |
| Formación de pared celular | <p>La mutante <i>gmt1</i> (afectada en la glicosilación de GIPC) tiene un contenido reducido de celulosa (22 al 45%) en la pared celular de hojas y tallo, y un incremento (50%) en el contenido de lignina.</p> | <p>Fang et al., 2016</p> |

| | | |
|--|--|--|
| Apertura estomatal dependiente de ácido abscísico (ABA) | Los niveles de algunas LCBPs se incrementan en estrés por sequía. La esfingosina-1-P promueve el cierre estomatal mediante el incremento de Ca ²⁺ en el citosol de células guarda. | Ng et al., 2001 Coursol et al., 2003 Coursol et al., 2005 Guo et al., 2012 |
| Muerte celular programada (PCD) | <p>La perturbación del metabolismo esfingoideo mediante inhibidores (toxina AAL y FB1) induce acumulación de LCBs y PCD en <i>Arabidopsis</i> y otras especies vegetales. La aplicación de LCBs también induce PCD y generación de EROs, mientras que las LCBPs la suprimen.</p> <p>Mediante la caracterización de mutantes que desarrollan PCD espontánea se identificaron genes involucrados en el metabolismo esfingoideo como <i>acd5</i> (ceramida cinasa), <i>acd11</i> (transportador de esfingolípidos) y <i>erh1</i> (IPC sintasa). La PCD en <i>acd5</i> y <i>acd11</i> se asocia a la acumulación de ceramidas. También la adición de ceramida C2 (50 µM) a células en cultivo de <i>Arabidopsis</i> induce PCD precedida por incremento de Ca²⁺ citosólico y producción de H₂O₂.</p> <p>Estudios dirigidos de genética reversa con la mutante <i>loh1</i>, así como las dobles mutantes <i>loh2 loh3</i> y <i>sbh1 sbh2</i>, corroboran la participación de los esfingolípidos en la regulación de PCD.</p> <p>La sobreexpresión de <i>LCB2</i> en <i>N. benthamiana</i> induce PCD (posiblemente por acumulación de LCBs y mayor actividad SPT), así como la sobreexpresión de <i>LOH2</i> en <i>Arabidopsis</i> debido a la acumulación de ceramidas.</p> | Abbas et al., 1994 Shi et al., 2007 Saucedo-García et al., 2011 Greenberg et al., 2000 Liang et al., 2003 Brodersen et al., 2002 Wang et al., 2008 Townley et al., 2005. Chen et al., 2008 Markham et al., 2011 Ternes et al., 2011 Takahashi et al., 2009b Luttgeharm et al., 2015a |
| Respuesta de defensa contra patógenos | Mutantes de <i>Arabidopsis</i> afectadas en distintos genes del metabolismo esfingoideo como <i>acd5</i> , <i>acd11</i> , <i>erh1</i> , <i>gonst1</i> , <i>iput1</i> y <i>gmt1</i> desarrollan HR espontánea relacionada con la acumulación de SA entre 1.5 y 200 veces, así como expresión constitutiva de genes de defensa. Además, algunas de las mutantes presentan alteraciones en la respuesta de defensa contra patógenos como la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> , y el hongo <i>Botrytis cinerea</i> . | Wang et al., 2008 Mortimer et al., 2013 Bi et al., 2014 Magnin-Robert et al., 2015 Fang et al., 2016 Tartaglio et al., 2017 |

B.5. Importancia de los esfingolípidos en la respuesta de defensa contra patógenos.

La participación de los esfingolípidos en la respuesta inmune de las plantas fue revelada por diversos estudios realizados con micotoxinas análogas a la esfinganina (SAMs), la fumonisina B1 (FB1) y la toxina AAL (Fig. 8a). Las SAMs inhiben a la ceramida sintasa (Fig. 6) y causan rápidamente (en horas) elevación de LCBs induciendo PCD (Abbas et al., 1994). Las SAMs son producidas por hongos productores de toxinas hospedero selectivas. La FB1 es producida por *Fusarium verticillioides*, un importante patógeno del maíz que causa varias enfermedades que afectan distintas etapas del desarrollo de la planta (Fig. 8b), y que además es tóxica para animales y humanos (Sánchez-Rangel & Plasencia, 2010). La toxina AAL es producida por el hongo necrótrofo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* y causa cáncer de tallo en jitomate (Fig. 8c) provocando importantes pérdidas económicas (Grogan et al., 1975). La patogenicidad de *A. alternata* f. sp. *lycopersici* depende de la producción de toxina AAL, dado que mutantes deficientes en la biosíntesis de la toxina no colonizan ni causan síntomas de infección en cultivos susceptibles (Akamatsu et al., 1997). La resistencia a *A. alternata* f. sp. *lycopersici* y a la toxina AAL es controlada por el gen *Asc* (*Alternaria stem canker*; Gilchrist & Grogan, 1976). El análisis cuantitativo de LCBs demostró que el genotipo de jitomate resistente *Asc/Asc* acumula la mitad de los niveles de esfinganina y fitoesfingosina en comparación con el genotipo susceptible *asc/asc* (Abbas et al., 1994). Los síntomas de muerte causados por la toxina AAL pueden suprimirse por aplicación de miriocina, un potente inhibidor de la SPT que reduce la acumulación de LCBs (Spassieva et al., 2002).

Comparada con la toxina AAL, la FB1 ha sido más utilizada para analizar la PCD debida a la perturbación del metabolismo esfingoideo y la activación de la respuesta de defensa en las plantas. La PCD inducida por la FB1 en *Arabidopsis* se asocia con generación de EROS, deposición de compuestos fenólicos y calosa, acumulación de fitoalexinas y expresión de genes *PR* (Stone et al., 2000). Además, la PCD inducida por FB1 requiere de las vías de señalización dependientes de las fitohormonas SA, JA y ET (Asai et al., 2000). La FB1 también induce acumulación de LCBPs (Markham et al., 2011; Saucedo-García et al., 2011) que ayudan a suprimir la PCD y la generación de EROS (Shi et al., 2007).

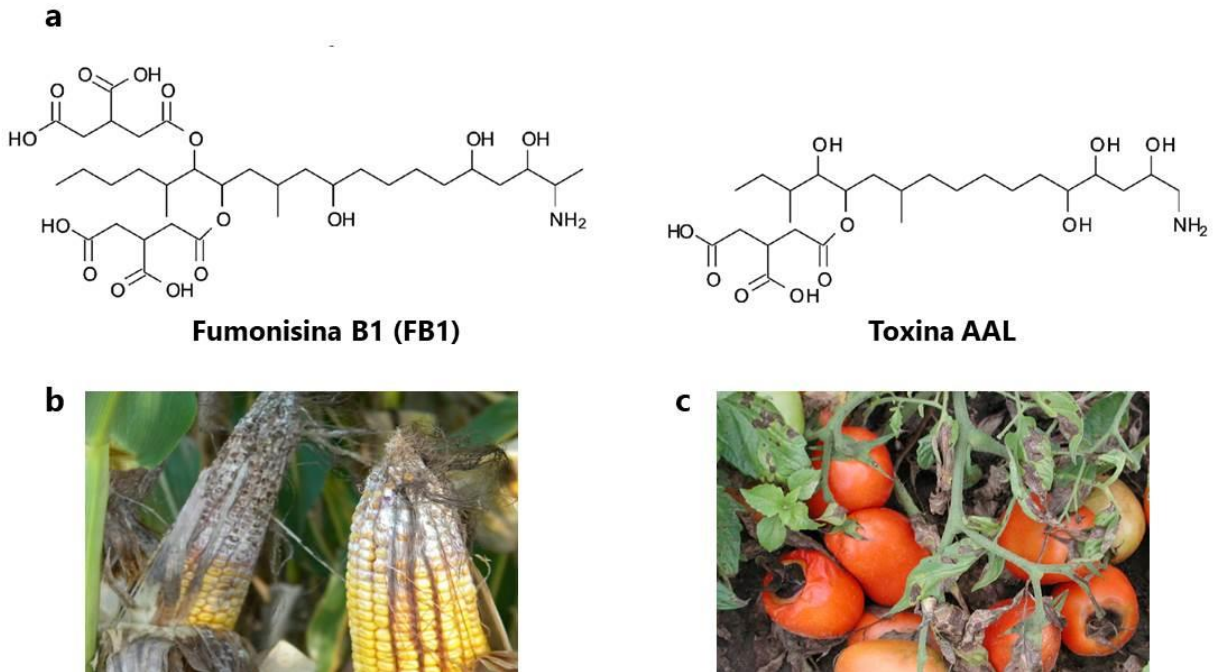


Figura 8. a) Estructura de micotoxinas análogas a la esfinganina (SAMs) que inhiben la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos e inducen PCD. **b)** Planta de maíz infectada por *Fusarium verticillioides*. **c)** Infección de plantas de jitomate por *Alternaria alternata*. Las fotografías fueron tomadas de <https://agronomag.com> y www.omafra.gov.on.ca

En interacciones planta-patógeno se ha encontrado que las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) acumulan rápidamente fitoesfingosina desde la primera hora posterior a la inoculación (hpi) tanto con la cepa virulenta como con la avirulenta. Sin embargo, solo las hojas inoculadas con ésta última mantienen una acumulación sostenida de fitoesfingosina durante 24 h, que corresponde con la manifestación de HR desde las 8 a las 15 horas post-inoculación (Peer et al., 2010). Al parecer la fitoesfingosina es un regulador positivo de la HR, pero se desconoce cómo la percepción del patógeno induce su acumulación.

Por otro lado, la expresión de la subunidad LCB2 de la SPT se incrementa en plantas de papa ante la infección por el hongo *Phytophthora infestans* (Birch et al., 1999), así como en *N. benthamiana* por la bacteria *Pseudomonas cichorii* (Takahashi et al. 2009b). Además, la resistencia de *N. benthamiana* contra *P. cichorii* se compromete por el silenciamiento de los genes *NbLCB1* o *NbLCB2* de la SPT, así como por su inhibición con miriocina (Takahashi et al.,

2009b). Estos resultados indican que la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos se requiere para la activación de la respuesta de defensa de las plantas. Interesantemente, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la subunidad LCB2 de arroz tienen acumulación de LCBs y ceramidas, así como de calosa y deposición de ceras, mayor expresión de genes de defensa inducidos por SA, represión de genes dependientes de JA y se inhibe la infestación por insectos (Begum et al., 2016).

Otra evidencia de la participación de los esfingolípidos en la respuesta de defensa de las plantas es el impacto que tienen en la vía del SA. Como se indica en la Tabla 1, numerosas mutantes de *Arabidopsis* afectadas en el metabolismo esfingoideo presentan además de PCD espontánea, acumulación de SA y expresión constitutiva de genes de defensa. La mayoría de las mutaciones (*acd5*, *acd11*, *erh1*, *gonst1* e *iput1*) afectan el metabolismo de ceramidas provocando su acumulación (Bi et al., 2014; Simanshu et al., 2014; Wang et al., 2008; Tartaglio et al., 2017). Asimismo, la sobreexpresión de las ceramidas sintetas también provoca acumulación de SA. Las plantas que sobreexpresan a LOH1 o LOH3 presentan niveles de SA 3 veces más altos que las silvestres sin desarrollar PCD espontánea, mientras que la sobreexpresión de LOH2 incrementa 16 veces la acumulación de SA, reduce el crecimiento e induce PCD y expresión de genes de defensa (Luttgeharm et al., 2015a).

Además de LCBs y ceramidas, los esfingolípidos más complejos (GIPCs y GlcCers) también son relevantes en la respuesta de defensa dado que en la membrana plasmática se inicia la transducción de señales. Las GIPCs de plantas eudicotiledóneas actúan como receptores de citolisinas NLP (necrosis and ethylene-inducing peptide 1-like protein) que son producidas por patógenos de plantas bacterianos, fúngicos y oomicetos. El residuo de azúcar de la GIPC está expuesto en la superficie de la membrana plasmática y es por tanto accesible a la unión de NLP. Si la GIPC tiene solo dos hexosas (como en las eudicotiledóneas), la NLP se une y causa lisis. En monocotiledóneas la presencia de una tercera unidad de hexosa impide la inserción de NLP a la membrana plasmática, por lo que no desarrollan lesiones necróticas. Aunque se ha demostrado la importancia de las GIPCs en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos, aún se desconocen los eventos moleculares posteriores a este reconocimiento (Lenarcic et al., 2017).

Finalmente, los esfingolípidos fosforilados también son relevantes en la respuesta inmune de las plantas. La mutante de *Arabidopsis acd5* carente de actividad ceramida cinasa (CerK) y que acumula ceramidas, es más susceptible al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* (Bi et al., 2014). Por otro lado, la mutante *lcbpl* afectada en la liasa de LCBPs es más tolerante al mismo hongo, pero susceptible a la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae* (Magnin-Robert et al., 2015), denotando la importancia del balance entre LCBs y ceramidas y sus derivados fosforilados en las interacciones planta-patógeno para iniciar la cascada de señalización de la respuesta de defensa.

II. ANTECEDENTES

En el grupo de investigación se ha estudiado la respuesta de las plantas de maíz ante la infección por el hongo *Fusarium verticillioides*. Este hongo es productor de una gran variedad de toxinas, entre ellas las fumonisinas, que se caracterizan por poseer una estructura química análoga a las bases esfingoideas (o bases de cadena larga, LCBs). Debido a esa similitud uno de sus mecanismos de acción molecular incide en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos. En particular, la fumonisina B1 (FB1) es un potente inhibidor de la esfinganina-N-acil-transferasa, enzima que cataliza la síntesis de ceramidas, por lo que interrumpe la biosíntesis de esfingolípidos complejos y provoca acumulación de LCBs libres no sólo en maíz (Rivas-San Vicente, 2001), sino también en diversas especies vegetales incluyendo a *Arabidopsis thaliana* (Abbas et al., 1994; Saucedo-García et al., 2011).

La FB1 provoca muerte celular asociada a la pérdida en la integridad del DNA genómico (Alcántara-Sánchez, 1998), y a la activación de nucleasas específicas (De la Torre-Hernández et al., 2010). Sin embargo, también activa una serie de respuestas de defensa como la expresión de genes asociados con la patogénesis (San Juan, 2001), acumulación de SA, (Rivas-San Vicente, 2004), la activación de una β -1,3-glucanasa ácida que hidroliza la pared celular del hongo, así como la inhibición de dos isoformas básicas (Sánchez-Rangel, 2012).

El SA es una de las moléculas de señalización más relevantes en la respuesta de defensa (Vlot et al., 2009; Verma et al., 2016). En los embriones de maíz en germinación la FB1 (10 μ M)

provocó que los niveles de SA libre se duplicaran a las 36 horas y se observó un efecto dosis-respuesta cuando se probaron concentraciones mayores de la toxina. Para determinar si la acumulación de SA inducida por la FB1 era debida al incremento de LCBs (también provocado por la toxina) se germinaron embriones en presencia de esfinganina o fitoesfingosina (10 μ M). Ambas causaron incremento de los niveles de SA; la esfinganina provocó un incremento de 4 a 6 veces en 16 horas, mientras que la fitoesfingosina triplicó los niveles de SA a las 24 horas (Rivas San Vicente, 2004). Además, una ceramida-C6 provocó el mismo efecto que la fitoesfingosina en los niveles de SA de embriones en germinación (Rivas San Vicente, 2004).

Se ha propuesto que el balance entre los compuestos esfingoideos bioactivos (bases esfingoideas y ceramida) y sus derivados fosforilados modulan la respuesta de defensa y muerte celular en plantas (Berkey et al., 2012; Huby et al., 2019). Además de las LCBs, las ceramidas también pueden inducir muerte celular pues el tratamiento de protoplastos de *Arabidopsis* con ceramida-C2 indujo fragmentación nuclear característica de células apoptóticas. El derivado fosforilado (ceramida-C2-1-PO₄) bloqueó parcialmente la inducción de muerte celular por la ceramida-C2, lo cual sugiere que la ceramida modificada diferencialmente tiene distintas actividades biológicas (Liang et al., 2003).

Por otro lado, distintas mutantes de *Arabidopsis* afectadas en genes del metabolismo esfingoideo (*acd5*, *acd11*, *erh1*, *gonst1*, *gmt1*, *iput1*) presentan además de muerte celular espontánea, acumulación de SA (entre 3 y 200 veces más que el ecotipo silvestre) y expresión constitutiva de genes de defensa (Sánchez-Rangel et al., 2015).

Dada la asociación entre esfingolípidos, SA y muerte celular en las plantas, consideramos que esto podría ser aprovechado por hongos productores de micotoxinas análogas a la esfinganina (SAM) para favorecer su establecimiento y proliferación en el hospedero. Por tanto, para profundizar en el papel que tienen los esfingolípidos en la respuesta inmune contra hongos necrótrofos productores de SAMs, interrumpimos la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en *Nicotiana benthamiana* por silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de la serina palmitoil transferasa (SPT) y analizamos el fenotipo y la respuesta de defensa de las plantas silenciadas contra el hongo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*.

III. HIPÓTESIS.

Dado que las bases esfingoideas son compuestos que tienen funciones de señalización en células vegetales, la alteración del metabolismo de esfingolípidos repercutirá en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos necrótrofos.

La interrupción de la biosíntesis de esfingolípidos en *Nicotiana benthamiana* por el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de la SPT modificará su contenido de LCBs afectando la vía de señalización mediada por ácido salicílico (SA) y comprometerá la respuesta de defensa contra patógenos necrótrofos.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la alteración de los niveles de bases esfingoideas en *Nicotiana benthamiana* sobre la respuesta de defensa contra un hongo necrótrofo.

Objetivos particulares:

1. Clonar el cDNA total o parcial de la de la subunidad LCB2 de la SPT de *N. benthamiana*.
2. Silenciar transitoriamente la expresión de la subunidad LCB2 de la SPT en plantas de *N. benthamiana* por VIGS.
3. Analizar el efecto del silenciamiento de la SPT en la composición de LCBs esfinganina, esfingosina y fitoesfingosina en tejidos de *N. benthamiana*.
4. Determinar el efecto del silenciamiento de la SPT sobre la vía de señalización del SA.
5. Evaluar el efecto del silenciamiento de la SPT en la interacción entre *N. benthamiana* y hongos necrótrofos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

Condiciones de crecimiento de *Nicotiana benthamiana*.

Las semillas de *N. benthamiana* fueron proporcionadas por el Dr. Arturo Guevara García (IBT, UNAM). Las plantas se cultivaron en macetas de plástico que contenían una mezcla del sustrato Sunshine Mix 4 y vermiculita (2:1), mantenidas en el invernadero a una temperatura de 25°C bajo fotoperiodo natural.

Para el tratamiento de plántulas de *N. benthamiana* con FB1, esfinganina o SA, las semillas silvestres de *N. benthamiana* se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% que contenía 0.05% de Tween20, agitando vigorosamente durante 2 min y posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua estéril. Las semillas desinfectadas se colocaron sobre un papel filtro estéril y después se distribuyeron en cajas de Petri con medio GB-5 suplementado con 0.75% de sacarosa y 0.8% de agar. Las semillas se germinaron y crecieron durante 10 días en una cámara de crecimiento Lab-Line (Mod. Biotronette) a 22°C bajo un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h en oscuridad (lámpara GE, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las plántulas se transfirieron a medio nuevo suplementado con FB1 (5 μM), esfinganina (25 μM) o SA (0.5 mM). Las plántulas control se transfirieron a medio GB5 con metanol al 0.1% o etanol al 0.05%, solventes que se emplearon para la preparación de soluciones estándar de SA y esfinganina, respectivamente. Previamente realizaron ensayos dosis-respuesta con diversas concentraciones de FB1 y esfinganina (1 a 25 μM) y se seleccionaron las que causaron un efecto significativo en la disminución de la elongación radicular. Las plántulas se mantuvieron en las condiciones antes descritas durante 24 y 48 horas, se colectaron las hojas e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido para la extracción de RNA.

Reactivos.

La FB1, las LCBs (fitoesfingosina, esfinganina, y esfingosina), y el SA se adquirieron en Sigma. Las soluciones stock de estos reactivos se prepararon de la siguiente manera: una

solución de FB1 1 mM en agua estéril; para cada LCB un stock 50 mM en etanol absoluto, y el stock de SA 125 mM en metanol al 50%.

Para el análisis por HPLC se utilizaron solventes grado HPLC (J.T. Baker), y naftaleno-2,3-dicarboxialdehído (NDA; Fluka) como agente derivatizante. Se preparó una solución de NDA 20 mM en acetonitrilo. Todas las soluciones stock se protegieron de la luz y se almacenaron a -20°C, excepto la solución de FB1 en refrigeración (4°C).

Extracción de RNA total.

Para la extracción y manejo del RNA total el material se esterilizó durante 1 h en autoclave y los reactivos se prepararon con H₂O-DEPC estéril. Se colectaron 200 mg de discos de hojas con un sacabocados e inmediatamente se congelaron en un mortero con nitrógeno líquido para pulverizarlos. Se añadió 1 mL de TRIzol™ (Invitrogen) y la muestra se transfirió con una espátula a un tubo eppendorf, después se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 min. El tubo se centrifugó a 13,400 rpm en una microfuga (Minispin eppendorf) durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio, se le añadieron 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, Sigma), se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. El tubo se centrifugó nuevamente a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, el RNA se precipitó por adición de 500 µL de isopropanol frío y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. El tubo se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se eliminó por decantación. El botón de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío (preparado con H₂O-DEPC), se centrifugó a 6,400 rpm durante 5 min a 4°C para compactar nuevamente al botón y el sobrenadante se eliminó por decantación. El botón se resuspendió en 500 µL de H₂O-DEPC, se agregaron 167 µL de cloruro de litio (8 M) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación. Posteriormente el RNA total se resuspendió en 100 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 10 µL de acetato de sodio 3 M y 200 µL de etanol frío para después incubar a -70°C durante toda la noche. Se centrifugó a

13,400 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y finalmente se resuspendió el RNA en 100 µL de H₂O-DEPC.

El RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría determinando la absorbancia de una dilución 1:100 a una λ de 260 nm.

$$(\mu\text{g}_{\text{RNA total}}/\mu\text{L}) = \text{Abs}_{260\text{nm}} \frac{(40 \mu\text{g}/\mu\text{L})}{1 \text{ DO}} (\text{Factor de dilución}) \frac{(1 \text{ mL})}{1000\mu\text{L}}$$

La integridad del RNA se confirmó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5µg/mL) utilizando como amortiguador TAE 1X. El RNA teñido se visualizó en un transiluminador de luz UV Hoefer Sientific Instruments modelo UVTM-10.

Transcripción reversa (RT) y amplificación del cDNA por PCR.

Se empleó 1 µg de RNA total como molde para sintetizar a los cDNAs con 1 µL de oligo dT (500 µg/µL) y la transcriptasa reversa ImProm-II™ (Promega). En un tubo eppendorf de 0.5 mL estéril se mezcló el RNA total con el oligo dT y H₂O-DEPC en un volumen total de 5 µL. El RNA se linearizó a 70°C durante 5 min e inmediatamente se enfrió en hielo durante 5 min. Después se añadieron 10 µL de la mezcla de reacción (4 µL buffer ImProm-II™ 5X, 2.4 µL MgCl₂ 25 mM, 1 µL dNTPs 10 mM, 1 µL transcriptasa reversa ImProm-II™, 1.6 µL H₂O-DEPC), se incubó a 25°C durante 5 min para el alineamiento y posteriormente a 42°C durante 1 h para la transcripción reversa. La enzima se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 min y los cDNAs se almacenaron a -20°C.

Las reacciones de PCR se prepararon con 1 µL de cDNA en un volumen total de 15 µL utilizando GoTaq® DNA polimerasa (Promega). La composición de la mezcla de reacción fue: buffer GoTaq® 1X (MgCl₂ 1.5 mM), dNTPs 0.2 mM, primer Fw 0.2 µM, primer Rv 0.2 µM y GoTaq® DNA polimerasa 1 u. Las condiciones de amplificaciones fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido por 30 ciclos de amplificación del fragmento con desnaturalización a 94°C durante 15 seg, alineamiento de cebadores a 58°C por 40 seg y extensión a 72°C por 40 seg. Finalmente se realizó un ciclo de extensión a 72°C por 5 min. Las reacciones se hicieron en un termociclador marca Applied Biosystems, modelo

GeneAmp9700. Los productos de PCR se mantuvieron a 4°C y después se separaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/mL) utilizando como amortiguador TAE 1X.

Para los ensayos de RT-PCR semi-cuantitativo el RNA total se calibró por espectrofotometría y en geles de agarosa al 1% por la banda de RNAr 18S. Para comparar los niveles de transcritos se realizaron análisis sistemáticos de concentraciones de cebadores (0.1 a 0.3 µM) y número de ciclos de amplificación (22 a 32). Los niveles del transcrito NbEF1α se usaron para la normalización permitiendo el análisis reproducible de varios transcritos dentro de 3 o 4 réplicas realizadas. Los cebadores específicos para cada gen analizado se encuentran en el Anexo A. El análisis densitométrico de los fragmentos generados por PCR fueron cuantificados con el software Quantity One (Bio-Rad).

Clonación de *NbLCB2* en el vector viral pTV00.

Para realizar el VIGS de *NbLCB2* se eligió a un vector viral derivado del virus TRV (virus sonajero del *N. tabacum*) que tiene un genoma bipartito de RNA de cadena sencilla, RNA1 (6971 nt) y RNA2 (3855 nt), encapsidado en partículas diferentes. Es capaz de invadir a todas las células vegetales, incluyendo a los puntos en crecimiento, con la ventaja de no provocar los síntomas de infección viral (Ratcliff et al., 2001).

El vector TRV fue proporcionado por el Dr. David Baulcombe del laboratorio Sainsbury (Norwich, Inglaterra, <http://www.tsl.ac.uk>). El sistema comprende dos plásmidos Ti que se propagan por separado en *A. tumefaciens* (Fig. 9). La construcción que contiene al RNA1 se denomina **pBINTRA6** y posee al cDNA completo de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y de la proteína de movimiento viral (Mp). El vector **pTV00** codifica al RNA2 y posee al sitio de clonación múltiple (MCS) para la inserción de la secuencia no viral (Ratcliff et al., 2001; Lu et al., 2003).

Se amplificó por PCR un fragmento de 1069 pb del cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de hojas de *N. benthamiana* utilizando los cebadores LCB2_602 Fw y LCB2_256 Rv (Anexo A). El producto de PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y pos-

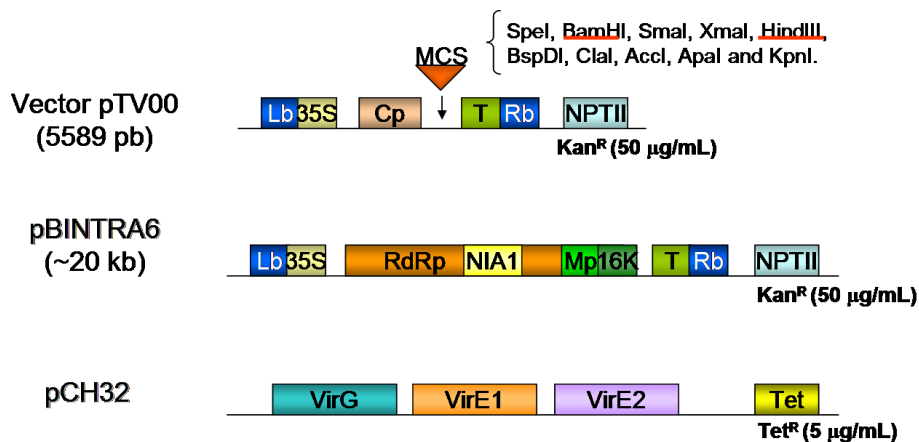


Figura 9. Organización de los plásmidos de transformación binarios pBINTRA6 y pTV00. El plásmido pTV00 se deriva del RNA2 de TRV y contiene al sitio de clonación múltiple (MCS). El cDNA se inserta entre los bordes izquierdo (LB) y derecho (Rb) de T-DNA, y entre el promotor CaMV 35S y el terminador transcripcional (T). El plásmido pBINTRA6 contiene una clona de cDNA del RNA1 de TRV. Los marcos abiertos de lectura corresponden a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), proteína de movimiento (Mp), proteína de la cápside (Cp) y a la proteína 16K. El plásmido ayudador pCH32 contiene genes de virulencia (*vir*) de *A. tumefaciens* requeridos para la transferencia de fragmentos grandes de DNA (Modificada de Ratcliff et al., 2001).

teriormente se purificó con el kit QIAquick® Gel extraction (QIAGEN). El DNA purificado se clonó en el vector pGEM®-T Easy (Promega) y se reamplificó un fragmento de 602 pb correspondiente a la región N-terminal de LCB2, utilizando los cebadores adaptadores LCB2-BamHI y LCB2-HindIII (Anexo A). El producto de PCR se trató con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, se purificó de un gel de agarosa y se usó en reacciones de ligación independientes con la DNA ligasa T4 para insertarlo en el vector pTRV00 y en el plásmido pUC19. Los productos de estas reacciones se emplearon para transformar células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico (42°C/45 seg). Las colonias transformantes se seleccionaron con el antibiótico correspondiente (50 µg/mL; kanamicina para pTRV y ampicilina para pUC19). La construcción en el vector pTRV (nombrada pTRVSPT) se empleó para VIGS como se describe más adelante y el plásmido pUC19 para secuenciar el inserto. A partir de las colonias transformantes crecidas en medio LB con los respectivos antibióticos de selección se aislaron los DNA plasmídicos con el kit QIAprep® miniprep (QIAGEN). La presencia del inserto se corroboró por PCR con los cebadores LCB2_602. Adicionalmente, la secuencia del plásmido

pTRV:SPT (Anexo C) se corroboró en la Unidad de Secuenciación de Instituto de Fisiología Celular con el cebador TRV-Fw (Anexo A).

Posteriormente se transformaron células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1 que contenían al plásmido ayudador pCH32, Fig. 9) con 5 µg del plásmido pTRVSPT por electroporación (300 V/6 µF). Los cultivos de *A. tumefaciens* con las construcciones pBINTRA6, pTRV00, o pTRVSPT se almacenaron en glicerol al 10% a -70°C.

Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de *NbLCB2*.

Se prepararon 15 mL de medio nutritivo (Anexo B) con los antibióticos de selección kanamicina 50 µg/mL y tetraciclina 5 µg/mL (MN/kan/tet) en un matraz de 50 mL estéril. Después se transfirieron 3 mL a 4 tubos de cultivo estériles. Uno se usó como testigo y los otros 3 tubos previamente etiquetados se inocularon con 200 µL de las cepas de *A. tumefaciens* pBINTRA6, pTRV:00 y pTRV:SPT almacenadas con glicerol al 10% y a -70°C. Se incubó a temperatura ambiente durante 16 h con agitación constante.

Posteriormente se prepararon 50 mL de MN/kan/tet/acetosiringona 20 µM en un matraz de 125 mL estéril y se transfirieron 15 mL a matraces de 50 mL con tapón de rosca estériles. Nuevamente uno se usó como testigo y los otros 3 matraces previamente etiquetados se inocularon con 500 µL del cultivo iniciador. Los matraces se protegieron de la luz y se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante durante 12 h.

Los cultivos se transfirieron por decantación a tubos Corning de 50 mL para separar por decantación al precipitado. Después se determinó la densidad óptica (DO) de cada cultivo a una $\lambda=600$ nm utilizando el MN/kan/tet/acetosiringona como blanco. La DO^{600} apropiada para la agroinfección es de 0.6 a 0.8. Se transfirieron de 10 a 12 mL de cada uno de los cultivos a tubos Corex estériles previamente etiquetados con una micropipeta de 5 mL con puntas estériles y se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min a 4°C (centrífuga Jouan MR1812). Mientras transcurrió el tiempo de centrifugación se prepararon 100 mL de buffer de agroinfiltración con agua estéril (MgCl₂ 10 mM/MES 10 mM pH 5.8/acetosiringona 200 µM/sacarosa 2%), y se mantuvo a temperatura ambiente protegido de la luz. Para cosechar las

células de *A. tumefaciens* se decantó el medio de cultivo en un vaso de precipitados y cada botón se resuspendió en 10 mL de buffer de agroinfiltración. La suspensión se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y las células se lavaron por última vez con 5 mL de buffer de agroinfiltración. Por último, las células de cada cultivo se resuspendieron en volúmenes previamente calculados de buffer de agroinfiltración para una DO^{600} de 1.5. Las células se incubaron durante 3 horas bajo agitación suave y en oscuridad.

Para la agroinfiltración se prepararon en tubos Corning de 15 mL estériles dos mezclas con los cultivos de *A. tumefaciens*, en un tubo se mezclaron las suspensiones pBINTRA y pTRV00, y en el segundo pBINTRA y pTRVSPT en proporción 1:1 (v/v). Por último, de cada mezcla se infiltraron 150 μ L repartidos en 3 hojas de plantas de *N. benthamiana* de 4 a 5 semanas (4 a 5 hojas), utilizando jeringas de insulina sin aguja. Con cada mezcla se infiltraron aproximadamente de 15 a 20 plantas y el fenotipo causado por TRVSPT se observó a los 20 días posteriores a la agroinfiltración. El silenciamiento se confirmó por RT-PCR semi-cuantitativo utilizando dos diferentes sets de cebadores: LCB2_1069 y LCB2_256 (Anexo A). La replicación viral y la infección sistémica se analizaron utilizando los cebadores TRV_Cp y TRV_Mp, dirigidos a los transcritos de las proteínas de la cápside y de movimiento del virus TRV.

Extracción de esfingolípidos y cuantificación de LCBs totales.

Las LCBs totales se extrajeron a partir de hojas de plantas TRV y TRVSPT de acuerdo al protocolo descrito por Markham et al. (2006), añadiendo 1 nmol de esfingosina C20 (d20:1) como estándar interno a cada muestra. Se colectaron con un sacabocados de 15 a 20 discos de diferentes hojas por planta para obtener una muestra representativa. Se pesaron aproximadamente 500 mg de tejido y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su pulverización en un mortero. El tejido se transfirió a un tubo de ensayo con tapón de rosca y se añadió 1 mL de dioxano, 1 mL de hidróxido de bario ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) al 10%, y 1 nmol de esfingosina C20. Se mezcló en el vórtex y los esfingolípidos se hidrolizaron durante 16 h a 110°C. Posteriormente se añadieron 2 mL de $(NH_4)_2SO_4$ al 2% para precipitar los iones Ba^{2+} (y evitar la formación de precipitado durante la reacción de derivatización de las LCBs para su

detección por HPLC). Las LCBs liberadas se extrajeron con 2 mL de dietiléter y las fases se separaron por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min en una centrífuga Beckman GS-6R. La fase orgánica se transfirió a un tubo de vidrio limpio y se repitió la extracción con dietiléter. El segundo extracto se combinó con el primero y el solvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. Todos los extractos se resuspendieron en 200 μ L de etanol absoluto y se almacenaron a -20°C .

Para la cuantificación de LCBs se transfirió una alícuota de 20 μ L de los extractos a un tubo eppendorf para acoplarlas al NDA por adición de las siguientes soluciones: 140 μ L de buffer de tetraborato de sodio 25 mM, 30 μ L de KCN 2.5 mM y 10 μ L de NDA 2.5 mM. El tubo se selló con parafilm y se calentó a 60°C durante 20 min. El equipo de HPLC marca Shimadzu consistió en una bomba mod. LC-10ADVP, detector de fluorescencia mod. RF-10AXL y un integrador mod. CR5A. Las LCBs acopladas a NDA se separaron por HPLC en fase reversa por elución isocrática en una columna SUPELCO C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 μ m), usando acetonitrilo:agua (94:6 v/v) como fase móvil a un flujo de 1.2 mL/min. Los derivados fluorescentes se detectaron a una $\lambda_{\text{exc}}=419$ y $\lambda_{\text{emisión}}=493$ nm. La cuantificación de LCBs se hizo considerando la recuperación del estándar interno d20:1. También fue necesario analizar dos diluciones distintas de las BCLs acopladas al NDA. Para cuantificar a la fitoesfingosina (t18:0) se inyectó una dilución 1:70 equivalente a 9.5 μ g de tejido, mientras que la esfinganina (d18:0) y esfingosina (d18:1) se cuantificaron en una dilución menor equivalente a 44 μ g de tejido. Las curvas de calibración se prepararon de 10 a 100 fmol, y para d20:1 de 100 a 500 fmol.

Extracción de SA y cuantificación por HPLC.

El SA se extrajo a partir de hojas siguiendo el método descrito por Meuwly y Métraux (1993) utilizando 300 ng de ácido *o*-anísico (*o*-ANI) como estándar interno.

Se tomaron aproximadamente 500 mg por muestra, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para pulverizarlos en un mortero, y se transfirieron a tubos de vidrio con tapón de rosca para añadirles 3 mL de metanol al 90%. Se sonicó en un baño L&R (Ultrasonic T14B) durante 10 min a frecuencia fija y después se centrifugó a 3600 rpm durante 15 min en

una centrífuga Beckman GS-6R. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios y el pellet se resuspendió en 2 mL de metanol al 100%. Nuevamente se sonicó y centrifugó bajo las condiciones anteriores y el sobrenadante se combinó con el primero. El solvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y posteriormente los extractos se redisolviaron en 2.5 mL de ácido tricloroacético al 5%. Las muestras se sonicaron durante 5 min a frecuencia fija y después se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios para extraer al SA libre con la mezcla ciclopentano:acetato de etilo 1:1 (v/v), agitando suavemente durante 15 min. Las muestras se centrifugaron a 3600 rpm durante 10 min para separar las fases y la fase orgánica se transfirió a tubos limpios. Se realizó una segunda extracción de la fase acuosa con la misma mezcla de solventes, después se centrifugó nuevamente y se recuperó la fase orgánica para combinarla con la de la primera extracción. Posteriormente los solventes se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno y los extractos de SA libre se disolvieron en 400 μ L de metanol.

El SA conjugado se extrajo de la fase acuosa remanente. Para ello se hidrolizó con HCl concentrado a una concentración final 4 N. Se incubó a 80°C durante una hora y la extracción se realizó con la mezcla ciclopentano:acetato de etilo 1:1 (v/v) bajo las mismas condiciones que el SA libre.

El análisis por HPLC se realizó con el equipo descrito anteriormente, estableciendo la λ de excitación en 305 nm y la λ de emisión en 405 nm para el SA, y para el *o*-ANI en 305 y 365 nm. Las diluciones de los extractos de SA libre y conjugado se prepararon en fase móvil (metanol 40% y 60% agua acidificada con 4% de ácido acético) en un volumen total de 250 μ L y se resolvieron por elución isocrática a un flujo de 1.2 mL/min. Bajo estas condiciones el SA eluyó a los 10 min y el *o*-ANI a los 5 min. El porcentaje de recuperación del *o*-ANI fue del 46 al 74% y los valores de SA se ajustaron de acuerdo a las pérdidas durante la extracción. La curva de calibración se preparó de 100 a 500 pg.

Los datos experimentales se expresaron como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes en los que se cuantificaron 5 réplicas biológicas. Los datos se analizaron con el modelo general lineal de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para determinar la significancia estadística al $p < 0.05$ y 0.01 , usando el software Statistix™.

Aislamiento de *Alternaria* sp. e identificación.

Alternaria sp. se aisló a partir de hojas de plantas TRVSPT que mostraron síntomas de infección. Las hojas infectadas se colocaron en agar papa-dextrosa (PDA) y se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente bajo luz blanca fluorescente. Las colonias se transfirieron con un asa estéril al centro de una caja Petri con agar PDA y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 7 días. Posteriormente se obtuvo un cultivo monospórico para tener un cultivo puro. Se preparó una suspensión de esporas transfiriendo una asada del cultivo en agar PDA a un tubo de ensayo con 10 mL de agua desionizada estéril y se agitó vigorosamente. De esta suspensión se transfirieron 50 μ L al centro de una caja Petri con agar PDA y se incubó a temperatura ambiente bajo luz blanca fluorescente durante 1 a 3 días. Después se seleccionaron, bajo el microscopio estereoscópico, conidios individuales germinando y se transfirieron a cajas con agar PDA, que se incubaron durante 7 a 10 días bajo las condiciones descritas anteriormente. La cepa aislada se nombró A2SS y su identificación se basó en sus características macro- y microscópicas. Las preparaciones se observaron en un microscopio Olympus modelo CH30. Adicionalmente se confirmó su identidad por la secuenciación de su región espaciadora intergénica transcribible (ITS) localizada entre los genes de RNAr 18S y 28S. A partir de un cultivo de 10 días se preparó una suspensión de conidias y micelio para extraer al DNA con DNAzol® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La secuencia ITS se amplificó con los cebadores universales ITS4 e ITS5 (White et al. 1990), y el producto de 600 pb se analizó y purificó de un gel de agarosa al 1.5% para su secuenciación.

Inoculación de tejidos de *N. benthamiana* con *Alternaria* sp.

Las cepas de *Alternaria* (A2SS, *A. brassicicola* y *A. alternata* f. sp. *lycopersici*) se cultivaron en agar PDA durante 2 a 3 semanas a temperatura ambiente bajo luz blanca fluorescente. Las conidias se colectaron adicionando 5 mL de agua desionizada estéril al cultivo y agitando durante 20 min. La suspensión se colectó y distribuyó en 5 tubos eppendorf de 1.5 mL estériles para centrifugar a 13000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se eliminó y las conidias se

resuspendieron en 200 μL de agua estéril para después combinarse en un solo tubo. El conteo de conidias se realizó en la cámara de Neubauer y se hicieron diluciones para ajustar la concentración a 1×10^5 conidias/mL.

Se colectaron hojas o fragmentos de tallo de 2 cm de longitud de plantas de *N. benthamiana* TRV y TRVSPT, y se colocaron en cajas de Petri de vidrio esterilizadas con un papel filtro en su interior que se humedeció con agua estéril. Los tejidos se inocularon con 10 μL de la suspensión de conidias y a los controles se les aplicó el mismo volumen de agua estéril. Posteriormente las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 22°C con fotoperiodo de 8 h luz/16 h oscuridad (GE lamps, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los síntomas de infección se registraron con fotografías. Para el conteo de conidias, a los 6 dpi los tallos se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de agua y las esporas se retiraron del tejido por agitación vigorosa para contarse en la cámara de Neubauer. Se cuantificaron 40 fragmentos de tallos de plantas control y silenciadas de dos experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

VI. RESULTADOS.

Clonación de un fragmento de cDNA de *NbLCB2*.

Se amplificó un cDNA de 1069 pb a partir de RNA total de *N. benthamiana* (Fig. 20, Anexo C) utilizando oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia heteróloga de papa (*Solanum tuberosum*, GenBank AJ242649). Al traducir la secuencia a aminoácidos observamos que ésta tiene 99 y 90% de identidad con las secuencias de tabaco y papa, respectivamente, y alrededor del 80% de identidad con las secuencias de *A. thaliana* (NM_122272) y arroz (*O. sativa*, GenBank AK120617.1), lo que corrobora la alta conservación de *LCB2* en plantas (Fig. 10). Este cDNA de 1069 pb (GenBank AM902524) contiene al 74% del marco abierto de lectura de la subunidad *LCB2* pues codifica a 356 de los 489 aminoácidos de la proteína *NbLCB2* (solgenomics.net).

El VIGS de *NbLCB2* fue eficaz y causó alteraciones morfológicas en las plantas.

El cDNA de 1069 pb se utilizó para subclonar un fragmento de 602 pb en el vector TRV y la construcción se denominó pTRVSPT (Fig. 11a). Con estas construcciones se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* C5851 y se prepararon cultivos por separado para la agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* en el estadio de 5 hojas. A las 4 semanas posteriores las plantas agroinfiltradas con el vector viral TRV vacío no presentaron alteraciones en su fenotipo (Fig. 11b y c), aunque el crecimiento de algunas de ellas fue menor en comparación con las plantas control infiltradas con el amortiguador (MgCl₂ 10 mM/MES 10 mM pH 5.6/acetosiringona 200 µM). Los síntomas por la infección viral fueron mínimos, muy pocas plantas presentaron pequeñas regiones cloróticas características de la infección viral. La translocación viral en las plantas se verificó a través de la síntesis y amplificación de los cDNAs de las proteínas de la cápside y de movimiento de TRV, utilizando como molde 1 µg del RNA total extraído de hojas de *N. benthamiana* TRV y TRVSPT, usando como control negativo RNA de plantas infiltradas con amortiguador (Fig. 21, Anexo D).

```

1
N benthamiana TYFSYGLLF AFGQFRDFFR KIFDWWKASN LQGYAPICLG LEDFYIRRLY HRIQDCFGRP ICSPPDAWFD 80
N tabacum MITIPYLTAL TTYFSYGLLF AFGQFRDFFR KIFDWWRPNN LQGYAPICLG LEDFYIRRLY HRIQDCFGRP ICSPPDAWFD
S tuberosum MITIPYLTAL TTYFSYGLLF AFGQFRDFFR KIFDWWRGNN LQGYAPICLG LEDFYIRRLY HRIQDCFGRP ICSPPDAWFD
At3g48780 MITIPYLTAV STYFSYGLLF AFGQLRDYSR LIFDWWRTNN LQGYAPICLA HEDFYIRRLY HRIQDCFGRP ISSAPDAWID
At5g23670 MITIPYLTAV STYFSYGLLF AFGQLRDFFR RFIDWWFTSN LQGYAPICLG HEDFYIRRLY HRIQDCFGRP ISSAPDAWFD
Consensus mitipylta. .TYFSYGLLF AFGQFR#%fr kifdww..sn LQGYAPICLg LEDFYIRRLY HRIQDCFgRp Icsppdawfd
81
N benthamiana VVERVSDNN KTLKRRTTKV RCLNLGSYNY LGFAASDEYC TPRVIESLKK FSASTCSACV DGGTTSIHME LEECVANFVG 160
N tabacum VVERVSDNN KTLKRRTTKV RCLNLGSYNY LGFAASDEYC TPRVIESLKK FSASTCSARV DGGTTSIHTE LEECVANFVG
S tuberosum VVERLSNDNN KTLKRRTTKV RCLNLGSYNY LGFAASDEYC TPRVIESLKK YSASTCSARV DGGTTSIHME LEECVANFVG
At3g48780 VVERVSDNN KTLKRRTTKS RCLNLGSYNY LGFGSFDEYC TPRVIESLKK FSASTCSSRV DAGTTSVHAE LEDCVAKYVG
At5g23670 VVERYSNDNN KTLKRRTTKS RCLNLGSYNY LGFGSFDEYC TPRVIESLKK FSASTCSSRV DAGTTSVHAE LEECVTRFVG
Consensus VVERvs#DNN KTLKRRTKvS RCLNLGSYNY LGFaasDEYC TPRVIESLKK %SASTCSarv DgGTTs!Hme LE#Cvan%VG
161
N benthamiana KPAAIVTGMG YVTNSAILPV LIGKGGLIIS DSLNHNSIVN GARGSGATIR VFQHNTPSHL EKVLRHIAE GQPRTHRPPWK 240
N tabacum KPAAIVTGMG YVTNSAILPV LIGKGGLIIS DSLNHNSIVN GARGSGATIR VFQHNTPSHL EKVLRHIAE GQPRTHRPPWK
S tuberosum KPAAIVTGMG YVTNSAILPV LIGKGGLIIS DSLNHNSIVN GARGSGATIR VFQHNTPSHL EKVLRHIAE GQPRTHRPPWK
At3g48780 QPAAVIFGMG YATNSAII PV LIGKGGLIIS DSLNHTSIVN GARGSGATIR VFQHNTPGHL EKVLRQIAE GQPRTHRPPWK
At5g23670 KPAAVVFGMG YATNSAII PV LIGKGGLIIS DSLNHNSIVN GARGSGATIR VFQHNTPSHL ERVLRQIAE GQPRTHRPPWK
Consensus kpAA!tGMG YvTNSAILPV LIGKGGLIIS DSLNHnsIVN GARGSGATIR VFQHNTpshL EkvLrEhIAE GQPRTHRPPWK
241
N benthamiana KIIIVIVEGIY SMEGELCQLP EIVAICKKYY AYVYLDEAHS IGAVGKTGRG VCELLGVDTA DVDIMMGFTT KSGSCGGYI 320
N tabacum KIVVIVEGIY SMEGELCQLP EIVAICKKYY AYVYLDEAHS IGAVGKTGRG VCELLGVDTA DVDIMMGFTT KSGSCGGYI
S tuberosum KIIIVIVEGIY SMEGELCQLP EIVAICKKYY VYVYLDEAHS IGAVKSGRG VCELLGVDTA DVDIMMGFTT KSGSCGGYI
At3g48780 KIIVVVEGIY SMEGEICHL P EIVSICKKYY AYVYLDEAHS IGAIGKTGRG VCELLGVDT S DVDIMMGFTT KSGSCGGYI
At5g23670 KIIVVVEGIY SMEGEICHL P EVVAICKKYY AYVYLDEAHS IGAIGKTGKG ICELLGVDTA DVDVMMGFTT KSGSCGGYI
Consensus KI!V!VEGIY SMEGELCqLp E!VaICKKYY aYVYLDEAHS IGA!GktGrG !CELLGVDTa DVD!MMGFTT KSGSCGGYI
321
N benthamiana AGSKELIEFL KHTCPAHLA TSISPPAAQQ IISAIVILG EDGSSRG 400
N tabacum AGSKELIEFL KYTCPAHLA TSISPPAAQQ IISAIVILG EDGSSRGAQK LARIRENSNF FRSELQKMGF EVLGDNDSPV
S tuberosum AGSKELIEYL KYSCPAHLA TSISPPAAQQ IISAIVILG EDGTSRGAQK LARIRENSNF FRSELQKMGF EVLGDNDSPV
At3g48780 AGSKDLIQYL KHQCPAHLA TSISPPAAQQ IISAIVILG EDGSSRGAQK LARIRENSNF FRAELQKMGF EVLGDNDSPV
At5g23670 AGSKELIQYL KHQCPAHLA TSISPPAAQQ IISAIVILG EDGSSRGAQK LARIRENSNF FRAELQKMGF EVLGDNDSPV
Consensus AGSK#LI#%L KhtCPAHLA TSISpPaAqQ IISAIVILG EDGssRGaQk larirensnf fr.elqkmgf evlgdndspv
401
N benthamiana MPIMLYNPAK IPAFSRECLQ QNVAVVIVGF PATPLLLARA RICISAAHSR EDLNKALEVI SRVGDLVGK YFPAEPKQKQ
N tabacum MPIMLYNPAK IPAFSRECLQ RSVAVVIVGF PATPLLLARA RICISAAHSR EDLNIALEVI SKVGDLTGK YFPAEPKQKQ
S tuberosum MPIMLYNPAK IPAFSRECLR ENLAVVVVGF PATPLLLARA RICISASHSR EDLIRALKVI SKVGDLSGK YFPAEPKQKQ
At3g48780 MPIMLYNPAK IPAFSRECLR QKVAVVVVGF PATPLLLARA RICISASHSR EDLIRALKVI SKVGDLSGK YFPAEPKQKQ
At5g23670 MPIMLYNPAK IPAFSRECLR QKVAVVVVGF PATPLLLARA RICISASHSR EDLIRALKVI SKVGDLSGK YFPAEPKQKQ
Consensus mpim.ynp.k ipafsrecl. ...avv.vgf patplllara ricisa.hsr edl..al.vi s..gdl.gik yfpa.p.k..
481
N benthamiana LEENRVKLE
N tabacum LEENRVKLE
S tuberosum VEESRVKLE
At3g48780 VEKNGIKLD
At5g23670 QSKNDIKLD
Consensus .....kl.

```

Figura 10. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de *NbLCB2* con secuencias de solanáceas y *Arabidopsis thaliana*. El alineamiento se realizó usando BLAST con las secuencias disponibles en GenBank.

Las plantas silenciadas en la expresión de *NbLCB2* con la construcción TRVSPT mostraron alteraciones morfológicas a partir de los 15 días posteriores a la agroinfiltración. En todas las plantas silenciadas se observaron alteraciones en hojas y flores, así como disminución del crecimiento (Fig. 11b). Las hojas perdieron la forma acorazonada y desarrollaron una forma asimétrica respecto a la nervadura primaria y algunas hojas se encorvaron. Asimismo, se observaron mosaicos que no se deben a la infección viral pues no los presentaron las plantas agroinfiltradas con el vector viral TRV (Fig. 11c).

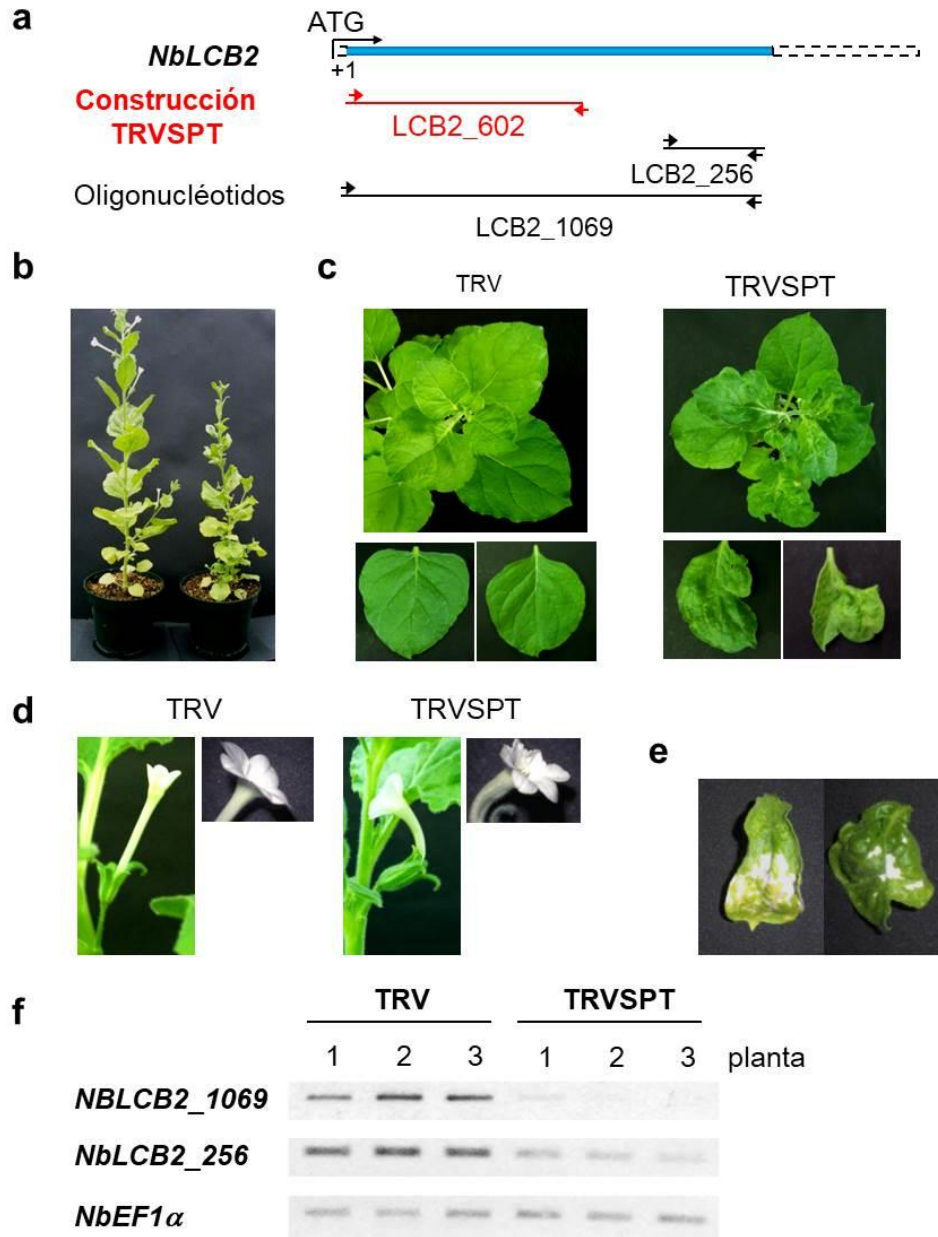


Figura 11. VIGS de la subunidad LCB2 de la SPT en *N. benthamiana*. **a)** Esquema del cDNA de *NbLCB2* y la región utilizada para generar la construcción pTRVSPT para el VIGS. Las posiciones de las parejas de oligonucléotidos LCB_256 y LCB_1069 usadas para el análisis RT-PCR semi-cuantitativo se muestran con flechas. **b)** El fenotipo asociado al VIGS de *NbLCB2* se caracterizó por disminución del crecimiento y alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo. Las plantas control TRV (izq) y silenciadas TRVSPT (derecha) se fotografiaron 4 semanas posteriores a la agroinfiltración. **c)** Cambios morfológicos de las hojas de plantas TRVSPT. **d)** Alteraciones en las flores de plantas TRVSPT. **e)** Muerte celular espontánea asociada al silenciamiento de la SPT. **f)** Niveles de los transcritos *NbLCB2* en hojas de plantas TRV y TRVSPT. La expresión de *NbEF1 α* se utilizó como control de cargado.

Las flores de las plantas silenciadas en la expresión de *NbLCB2* también presentaron una morfología alterada denotada por encorvamiento de la corola, alteraciones en el número de pétalos y senescencia temprana (Fig. 11d). También se observó muerte celular espontánea denotada por lesiones necróticas en varias hojas (Fig. 11e).

La eficiencia del silenciamiento de *NbLCB2* se evaluó por RT-PCR semi-cuantitativo usando dos diferentes pares de cebadores, *LCB2_256* y *LCB2_1069* (Fig. 11a), y se encontró una disminución entre el 20 y 50% en los niveles de transcrito *NbLCB2* en las plantas silenciadas TRVSPT, en comparación con las plantas control TRV (Fig. 11f). Los niveles de transcritos virales (de las proteínas de la cápside y movimiento) se detectaron en niveles similares entre las plantas control TRV y las silenciadas TRVSPT (Fig. 21, Anexo D), confirmando que la infección viral no intervino en el fenotipo y cambios morfológicos asociados al silenciamiento de la SPT de *N. benthamiana*.

El VIGS de la SPT en *N. benthamiana* alteró la composición de LCBs de los esfingolípidos.

Debido a que la SPT es la enzima que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de esfingolípidos, se evaluó el efecto del silenciamiento de *NbLCB2* en la composición de LCBs en hojas de plantas a las 4 semanas posteriores a la agroinfiltración. Se obtuvieron extractos de LCBs totales (libres y conjugadas a esfingolípidos complejos) a partir de homogenados de hojas.

Las LCBs fitoesfingosina (t18:0), esfinganina (d18:0), esfingosina (d18:1) y la esfingosina C20 utilizada como estándar interno durante la extracción (d20:1) se identificaron por los tiempos de retención de sus estándares (Fig. 12). Se detectaron picos adicionales que pueden corresponder a otras LCBs liberadas por la hidrólisis alcalina de esfingolípidos de plantas control TRV y silenciadas TRVSPT (Fig. 12a y b, picos 1 al 9). Por su abundancia, éstas pueden corresponder a isómeros de 8-fitoesfingenina (t18:1-*E* o t18:1-*Z*) (Mongrand et al., 2004; Sperling et al., 2005), o a isómeros de 4,8-esfingadienina (d18:2-*EE* y d18:2-*EZ*), Sperling et al., 2005; Markham et al., 2006; Buré et al., 2011), que se han detectado en solanáceas como tabaco y jitomate.

En las hojas de plantas silenciadas TRVSPT el perfil de LCBs fue alterado notablemente pues los niveles de fitoesfingosina (t18:0) disminuyeron 50% con respecto a las plantas TRV (Fig. 13 y Tabla 2). El perfil cromatográfico indica que otras LCBs también disminuyeron (Fig. 12a; picos 1, 2, 3 y 4). Éstas son las LCBs más abundantes en los tejidos, sin embargo, también analizamos

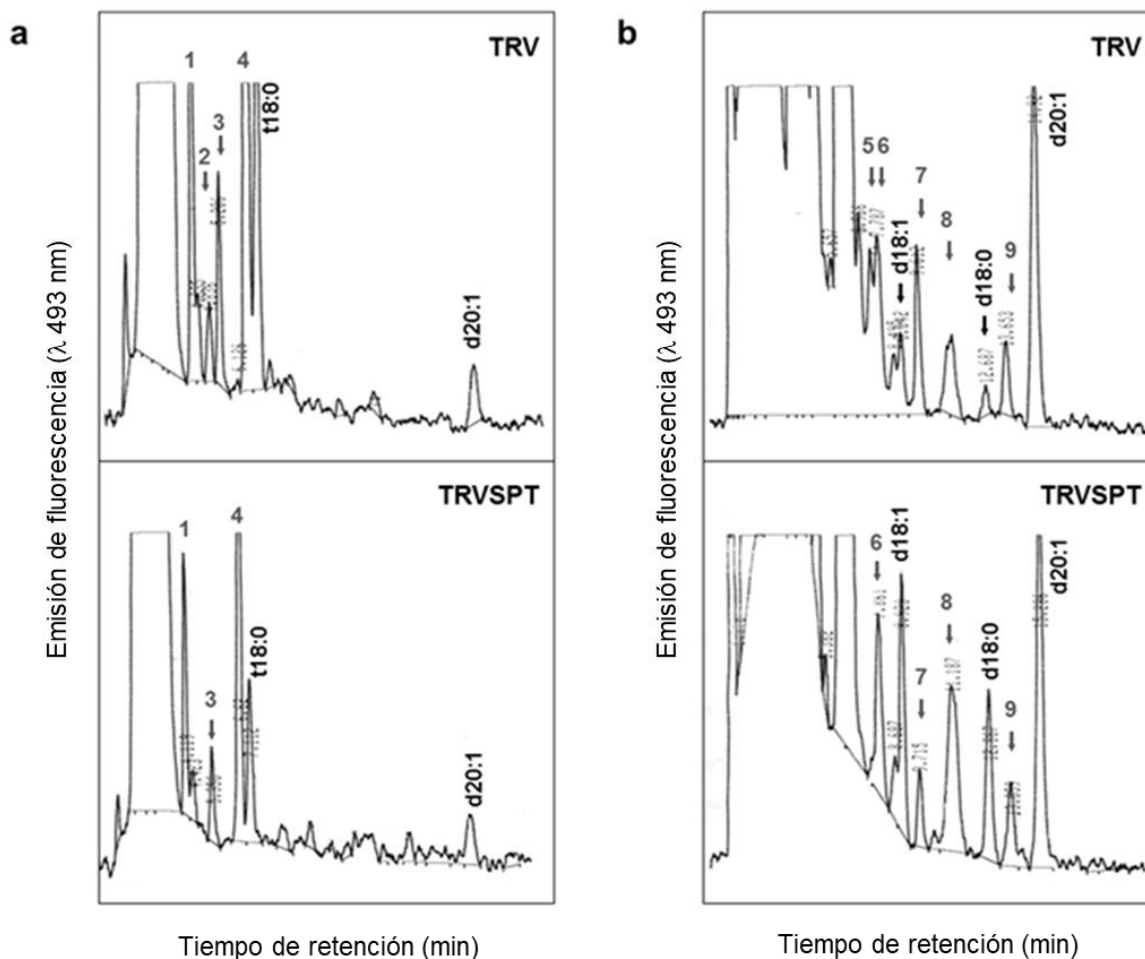


Figura 12. Perfiles de las LCBs extraídas por hidrólisis de esfingolípidos de hojas de plantas de *N. benthamiana* TRV y TRVSPT. Las LCBs fueron conjugadas a NDA y analizadas por HPLC. Se inyectaron dos distintas diluciones de cada extracto equivalentes a 9.5 µg (a) y 44 µg (b) de tejido fresco, debido a la diferencia en la abundancia de LCBs.

otras LCBs cuyos niveles son menores pero que tienen actividad biológica (Fig. 12b). Los niveles de esfingosina (d18:1) y esfinganina (d18:0) se incrementaron 3 y 4 veces, respectivamente, en las plantas TRVSPT, comparados con las hojas control TRV (Fig. 13 y Tabla 2). Aunque no se observó el decremento general de LCBs esperado, los resultados mostraron que el silenciamiento de la SPT en *N. benthamiana* alteró la composición de LCBs bioactivas.

Tabla 2. Contenido de LCBs totales (nmoles/g tejido) en hojas de *N. benthamiana* control TRV y TRVSPT.

| LCB | nmol de LCB/g tejido fresco | |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------|
| | TRV | TRVSPT |
| fitoesfingosina (t18:0) | 104.69 ± 4.79 | 57.89 ± 21.57 |
| esfingosina (d18:1) | 4.82 ± 1.09 | 13.41 ± 3.36 |
| esfinganina (d18:0) | 3.61 ± 1.66 | 15.54 ± 3.32 |

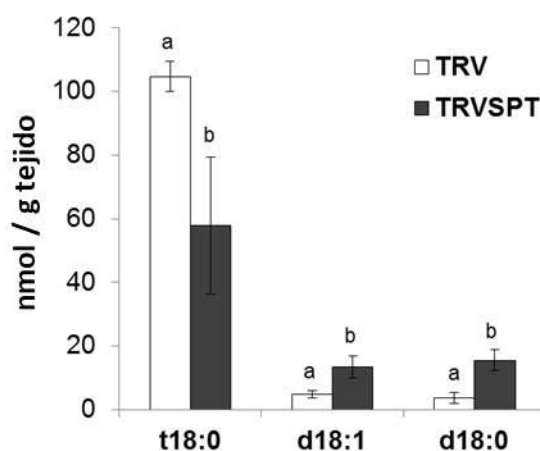


Figura 13. Contenido total (nmol/g tejido) de fitoesfingosina (t18:0), esfingosina (d18:1) y esfinganina (d18:0) en hojas de plantas de *N. benthamiana* TRV y TRVSPT, a las 4 semanas posteriores a la agroinfiltración. Se colectaron de 15 a 20 discos de hojas por planta (aprox. 100 mg) para la extracción. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar de cuatro plantas independientes. Las letras diferentes sobre las barras indican una diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey; $p < 0.01$) entre los niveles de las LCBs indicadas.

El VIGS de la SPT en *N. benthamiana* activó la vía de señalización dependiente de SA.

Los niveles elevados de esfinganina y esfingosina encontrados en las plantas silenciadas TRVSPT coincidieron con un fenotipo de muerte celular espontánea (Fig. 11e), que fue comparable al desarrollado por varias mutantes de *Arabidopsis* afectadas en distintas reacciones del metabolismo esfingoideo (*acd5*, *acd11* y *erh1*) que fue asociado con altos niveles de SA (Greenberg et al., 2000; Brodersen et al., 2005; Wang et al., 2008). Por consiguiente, comparamos el contenido de SA entre hojas de plantas silenciadas TRVSPT y plantas control TRV. Los niveles de SA total en hojas de plantas silenciadas TRVSPT fue 50% (816 ± 168 ng/g tejido fresco) más alto que en las hojas de plantas control TRV (527 ± 81 ng/g tejido fresco, Fig. 14a).

La acumulación de SA se asoció con la expresión constitutiva de *NbPR-1*, que es un gen de defensa inducido por SA y que no se expresó en plantas control TRV (Fig. 14b). La abundancia de los transcritos *NbPR-1* se determinó en fase de saturación de PCR, demostrando que la infección viral no contribuyó a la inducción de su expresión en plantas silenciadas TRVSPT. Estos resultados sugirieron una estrecha asociación entre el metabolismo de esfingolípidos y la vía de señalización dependiente de SA, probablemente mediada por las LCBs que se incrementaron por el silenciamiento de la SPT en *N. benthamiana*.

La esfinganina y la FB1 restringieron el crecimiento de plántulas de *N. benthamiana* y activaron la expresión del gen *NbPR-1* inducible por SA.

Para confirmar si la activación de la vía de señalización dependiente de SA en las plantas TRVSPT estaba mediada por la elevación en los niveles de LCBs, se expusieron plántulas de *N. benthamiana* de 10 días a esfinganina exógena así como a la FB1 para evaluar los niveles del transcrito *NbPR-1*. Inicialmente se determinó la susceptibilidad de las plántulas de *N. benthamiana* a la FB1 dado que se había reportado que la mayoría de las solanáceas, en particular las especies de *Nicotiana*, son insensibles a las SAMs (Mesbah et al., 2000; Brandwagt et al., 2001). Como se muestra en la Fig. 15a, la FB1 indujo un arresto del crecimiento de la radí

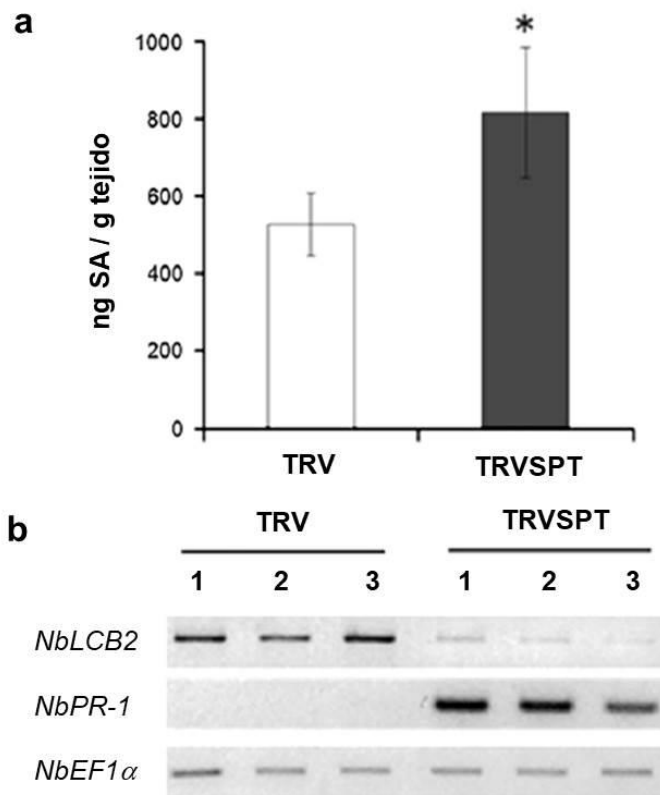


Figura 14. El VIGS de la SPT en *N. benthamiana* activó la vía de señalización dependiente de SA. **a)** Contenido de SA total en hojas de plantas TRV y TRVSPT. Las muestras se tomaron 5 semanas después de la agroinfiltración. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de 5 plantas independientes. El asterisco sobre la barra denota una diferencia significativa ($p < 0.01$, prueba de Tukey). **b)** Expresión constitutiva del gen inducible por SA *NbPR-1* en plantas silenciadas TRVSPT. Los números corresponden a plantas independientes.

cula de manera dependiente de la concentración. En las plántulas expuestas a FB1 (1 μ M) se observó una reducción discreta de 24% en la elongación radicular, mientras que en concentración 5 μ M causó un decremento significativo de 64% ($p < 0.01$, Fig 15b), pero no indujo clorosis o muerte celular en los cotiledones. Estos resultados indicaron que *N. benthamiana* tiene una sensibilidad intermedia a la FB1 de acuerdo a la clasificación hecha por Brandwagt et al. (2001). La restricción del crecimiento causada por la FB1 sí podría deberse a la acumulación de LCBs dado que plántulas expuestas a la esfinganina también mostraron una restricción en la elongación de cotiledones y raíces similar (Fig. 15c).

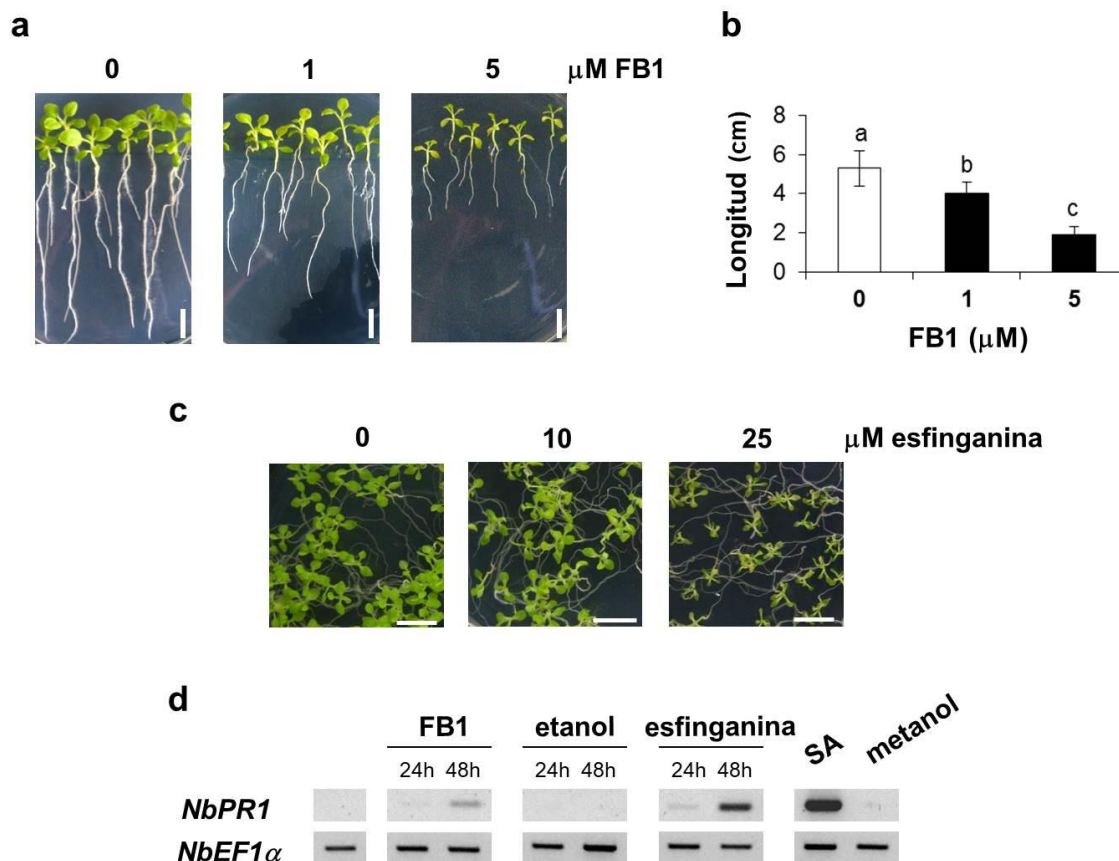


Figura 15. La FB1 y la esfingarina activaron al gen inducible por SA *NbPR1* en plántulas silvestres de *N. benthamiana*. **a)** *N. benthamiana* tiene una sensibilidad intermedia a la FB1. Plántulas de 10 días fueron transferidas a medio GB5 con o sin FB1 y fotografiadas 10 días después. **b)** Comparación de la longitud radicular a los 10 días de exposición a la FB1 (n=10). Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican una diferencia significativa (ANOVA seguida de Prueba de Tukey, $p < 0.01$). **c)** La esfingarina también inhibió el crecimiento de *N. benthamiana*. Fotografías de plántulas de 20 días germinadas y crecidas en presencia de la LCB a las concentraciones indicadas. El medio GB5 control contenía 0.05% de etanol. **d)** La FB1 y esfingarina indujeron la expresión del gen marcador de la vía de SA *PR-1* en *N. benthamiana*. Plántulas de 10 días de edad fueron transferidas a medio GB5 suplementado con FB1 5 μM , esfingarina 25 μM , o SA 5 mM. Se incluyeron tratamientos control con etanol 0.05% y metanol 0.1% por haberse utilizado en la preparación de soluciones stock de esfingarina y SA, respectivamente. Las hojas se colectaron a las 24 y 48 h de tratamiento y se congelaron inmediatamente para la extracción de RNA. Los resultados mostrados son representativos de dos ensayos independientes.

Una vez confirmada la sensibilidad de *N. benthamiana* a la FB1, se transfirieron plántulas de 10 días a placas de medio GB5 suplementadas con FB1 (5 μ M), esfinganina (25 μ M) o SA (500 μ M), y otras plántulas se transfirieron a placas de medio GB5 que contenían los solventes empleados (0.05% de etanol o 0.1% de metanol). Tanto la FB1 como la esfinganina indujeron la expresión del gen inducible por SA *NbPR-1* desde las 24 h y la respuesta aumentó a las 48 h, especialmente con la LCB, mientras que en el control y los blancos con los solventes empleados en la preparación de soluciones de esfinganina y SA no hubo inducción de la expresión del gen *NbPR-1* (Fig. 15d). Estos resultados respaldan la hipótesis de que las LCBs son reguladores de la vía dependiente de SA. En términos de la patogénesis, estos resultados permiten postular que una posible estrategia empleada por hongos necrótrofos productores de SAMs es la activación de la vía dependiente de SA inducida por las LCBs que conduce a muerte celular, y que contribuye a una colonización exitosa.

El VIGS de la SPT comprometió la resistencia de *N. benthamiana* contra el hongo patógeno necrótrofo *Alternaria alternata*.

Como se describió anteriormente, el silenciamiento de la subunidad LCB2 de la SPT causó severas alteraciones en el desarrollo de las plantas de *N. benthamiana*. Un fenotipo adicional sumamente interesante fue que las plantas TRVSPT crecidas en el invernadero frecuentemente desarrollaron lesiones necróticas en tallos y hojas (Fig. 16a y b) que nunca se observaron en plantas control TRV ni en plantas silvestres. A partir de estas lesiones se aisló un hongo y se obtuvo un cultivo monospórico de la cepa que se denominó A2SS. En agar PDA el hongo desarrolló colonias negras con anillos concéntricos (Fig. 16c) y al microscopio se observaron conidias color café con septos transversales y longitudinales que son características de la morfología de *Alternaria sp.* (Fig. 16d). Este género es fitopatógeno de cultivos importantes y solanáceas como tabaco, papa y jitomate (Prior & Michailides, 2002). Las conidias del hongo sobreviven en el suelo donde se genera la mayor parte del inóculo hacia las plantas hospederas y el desarrollo de la enfermedad se favorece en condiciones húmedas.

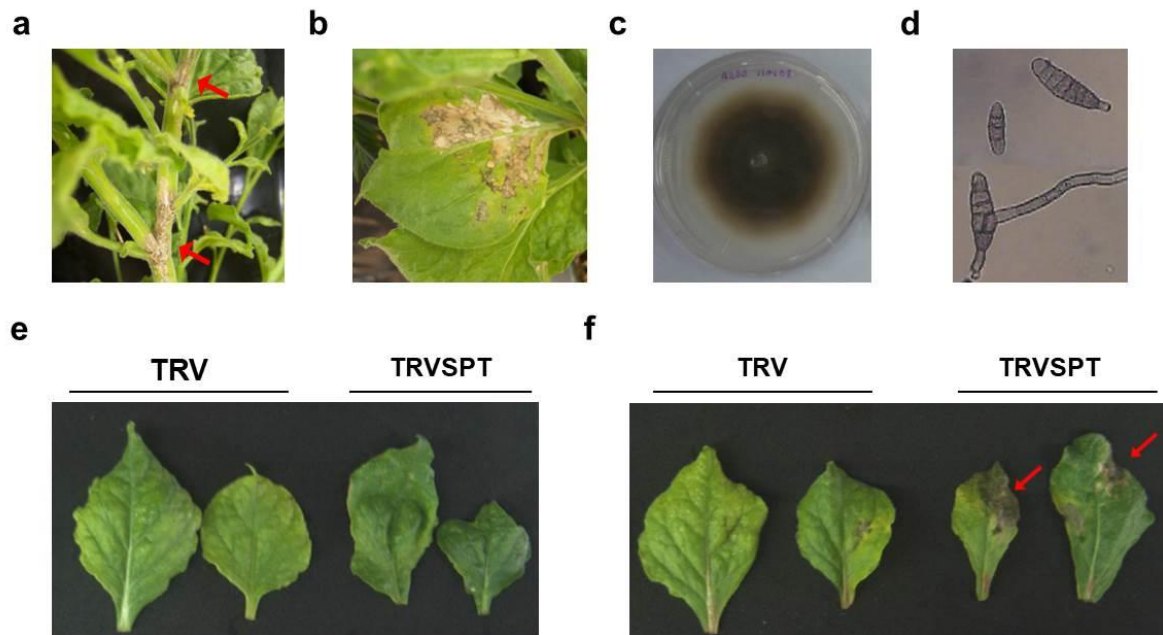


Figura 16. El VIGS de la SPT confirió susceptibilidad al hongo patógeno necrótrofo *Alternaria alternata*. Lesiones en tallos **(a)** y hojas **(b)** de plantas TRVSPT. A partir de las lesiones en hojas TRVSPT se aisló la cepa A255 y se presenta su morfología macroscópica **(c)** y microscópica **(d)**. La cepa se cultivó en agar PDA 0.5X y se observó a los 15 días posteriores. Para ensayos de patogenicidad, se colectaron hojas TRV y TRVSPT para inocularse con 1×10^3 conidias de *Alternaria brassiciola* **(e)** o la cepa *Alternaria* sp. A255 **(f)** y se tomaron fotografías a los 10 dpi. Las hojas inoculadas se mantuvieron en cámaras húmedas separadas a 22°C. Únicamente las hojas de plantas TRVSPT inoculadas con la cepa A255 desarrollaron síntomas de infección y desarrollo del hongo (indicado por flechas rojas).

La caracterización molecular de un fragmento de aproximadamente 600 pb de la secuencia de la región intergénica espaciadora (ITS) de los genes de RNA ribosomales acotó la identidad a dos posibles especies: *Alternaria alternata* y *A. tenuissima*. Este resultado fue relevante porque *N. benthamiana*, al igual que la mayoría de las especies de *Nicotiana*, es resistente a *A. alternata* (Brandwagt et al. 2001). En consecuencia, el silenciamiento de la SPT y la interrupción de la biosíntesis de esfingolípidos estaba directamente asociada a la susceptibilidad a este necrótrofo.

Para descartar que la susceptibilidad de las plantas TRVSPT fuera generalizada a otras especies de *Alternaria* se inocularon hojas de plantas TRV y TRVSPT con una suspensión de conidias (1×10^5 conidias/ μL) de *A. brassicicola* y la cepa aislada A2SS. *A. brassicicola* no pudo infectar las hojas de plantas TRV y tampoco hojas TRVSPT (Fig. 16e), y tal como se esperaba, la cepa A2SS pudo infectar únicamente las hojas TRVSPT causando lesiones necróticas expandidas visibles desde los 7 días posteriores a la inoculación (dpi), mientras que en las hojas TRV se observó una ligera clorosis (Fig. 16f). Estos resultados indicaron que el silenciamiento de la SPT confirió una susceptibilidad selectiva al hongo *A. alternata*, resaltando una función potencial de las LCBs en la respuesta de defensa, que correlaciona con que la virulencia del patotipo de jitomate (*A. alternata* f. sp. *lycopersici*) dependa de la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos y acumulación de LCBs causada por la toxina AAL (Gilchrist & Grogan 1976; Spassieva et al., 2002). Esto nos alentó a analizar la respuesta de defensa de plantas TRVSPT infectadas por *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.

Las plantas de *N. benthamiana* silenciadas en la expresión de la SPT se volvieron susceptibles al hongo *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, y mostraron una expresión de genes de defensa alterada.

Para evaluar la relevancia de la homeostasis alterada de LCBs en las plantas TRVSPT en la respuesta de defensa contra un hongo necrótrofo productor de SAM se realizaron ensayos de patogenicidad con una cepa de *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (provista por el Dr. Liancheng Du, Universidad de Nebraska). Se inocularon hojas de plantas TRV y TRVSPT con una suspensión de conidias y a los tejidos control se les aplicó agua estéril. *A. alternata* f. sp. *lycopersici* fue incapaz de infectar las hojas de plantas TRV pues no es su hospedero y solo se observaron síntomas leves de clorosis (Fig. 17a). En contraste, las hojas de plantas TRVSPT desarrollaron síntomas severos de clorosis y lesiones necróticas en los sitios inoculados, también se observó un incremento en el crecimiento del hongo a los 10 dpi (Fig. 17a). Debido a que *A. alternata* f. sp. *lycopersici* es el agente causal del cáncer de tallo en jitomate, también se realizaron ensayos de patogenicidad en tallos de plantas de *N. benthamiana*. En los tallos de plantas TRVSPT la proliferación del hongo fue evidente a los 6 dpi, mientras que en los tallos TRV no se encontró

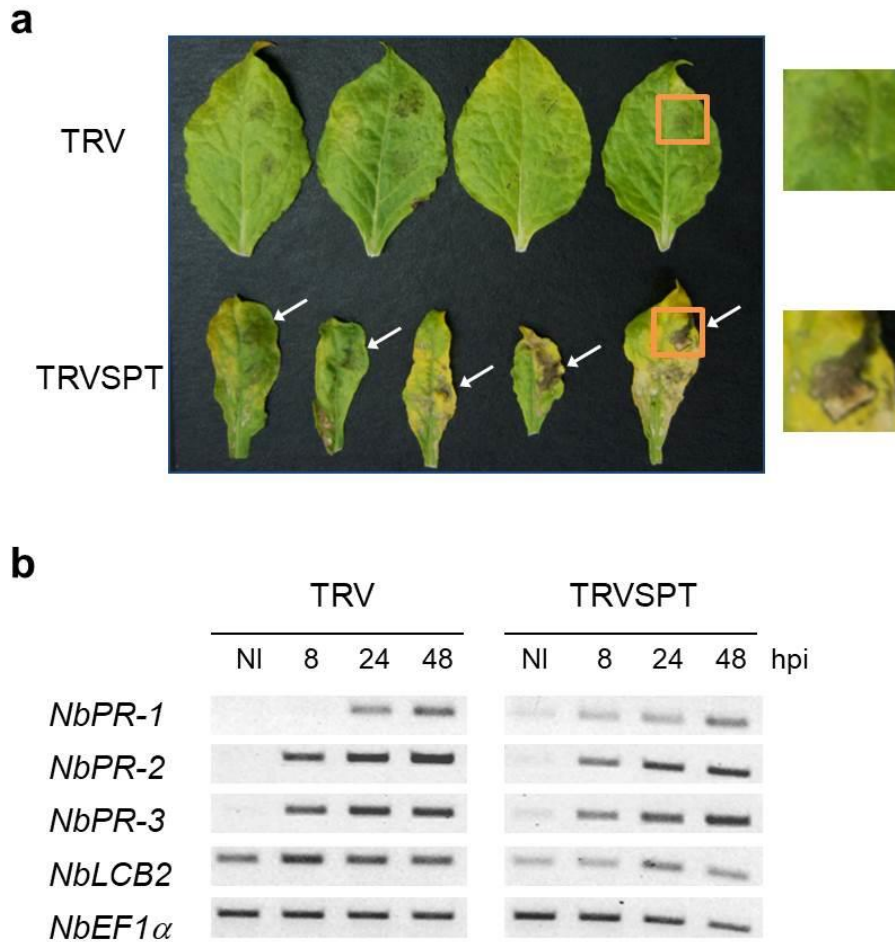


Figura 17. El VIGS de la SPT en *N. benthamiana* comprometió su resistencia contra *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **a)** Hojas de plantas TRV y TRVSPT fueron inoculadas con 1×10^3 conidias. Las hojas inoculadas se mantuvieron en cámaras húmedas por separado a 22°C y las fotografías se tomaron a los 10 dpi. A la derecha se muestran acercamientos de los rectángulos marcados en naranja. Los controles se inocularon con agua estéril y no desarrollaron síntomas de infección (datos no mostrados). **b)** Análisis temporal de la expresión de genes *PR* por RT-PCR semi-cuantitativo en hojas de plantas TRV y TRVSPT inoculadas con *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (1×10^3 conidias). NI corresponde a hojas control no inoculadas con el hongo. El transcrito de *NbEF1 α* se utilizó como control de normalización. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

o fue muy discreto el crecimiento del hongo (Fig. 22a, Anexo E). En los tallos control inoculados con agua estéril (tanto TRV como TRVSPT) no se encontraron síntomas de infección o desarrollo fúngico (datos no mostrados). Los niveles de colonización se determinaron contando las

conidias desprendidas de los tallos a los 6 dpi. La colonización encontrada en plantas TRVSPT se relacionó con un incremento de 10 veces en el número de conidias comparado con los tallos de plantas TRV (Fig. 22b, Anexo E). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que las LCBs son moduladores de la respuesta de defensa contra patógenos, incluyendo necrótrofos, por lo que la alteración en la homeostasis de LCBs en las plantas TRVSPT suprimió su resistencia contra el hongo *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, patógeno del que *N. benthamiana* no es hospedero.

Debido a que las LCBs actúan como transductores de señales en las plantas, se investigó si la susceptibilidad de las plantas de *N. benthamiana* TRVSPT a *A. alternata* f. sp. *lycopersici* podría estar asociada con la expresión retardada o disminuida de genes de defensa. Las infecciones por hongos necrótrofos generalmente induce la activación de genes *PR* que codifican proteínas con actividades antifúngicas potentes (Glazebrook, 2005). Por tanto, se analizaron por RT-PCR semi-cuantitativo la expresión de los genes *NbPR-1*, *NbPR-2* y *NbPR-3* en hojas de plantas TRV y TRVSPT inoculadas. Desde las 8 horas posteriores a la inoculación (hpi) se observó una inducción en la expresión de los genes *NbPR-2* y *NbPR-3* en las hojas TRV que incrementó a las 24 y 48 hpi (Fig. 17b), sugiriendo que durante la respuesta de defensa de *N. benthamiana* contra este hongo necrótrofo se induce la actividad de glucanasas y quitinasas. La expresión de *NbPR-1* también fue inducida a las 24 hpi y aumentó a las 48 hpi (Fig. 17b). Las hojas de plantas TRVSPT mostraron una baja expresión de los genes *NbPR-2* y *NbPR-3* a tiempos tempranos (8 y 24 hpi) en comparación con las hojas TRV inoculadas (Fig. 17b) que correlacionó con su susceptibilidad a la infección por *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. Por otro lado, el aumento en la expresión del gen *NbPR-1* en las hojas TRVSPT ocurrió las 8 hpi, antes que en hojas TRV. Es posible que la expresión constitutiva de *NbPR-1* en las plantas TRVSPT debida a la acumulación de SA facilite su inducción temprana ante la infección por el hongo necrótrofo. También la menor expresión de genes de defensa *Nb-PR2* y *NbPR3* en plantas TRVSPT podría deberse a la interrupción de respuestas de defensa dependientes de JA/ET por el SA.

Por consiguiente, para determinar si la activación de la vía dependiente del SA encontrada en las plantas TRVSPT podría tener un efecto antagónico en la respuesta de defensa mediada por el ácido jasmónico (JA), se analizaron los niveles de transcrito del gen *NbLOX* en respuesta

a metil jasmonato (MeJA) tanto en hojas TRV y TRVSPT. En las hojas TRV se observó una fuerte inducción de la expresión de *NbLOX* que fue proporcional a la concentración de MeJA empleada, mientras que en las hojas TRVSPT ocurrió en menor magnitud (Fig. 18).

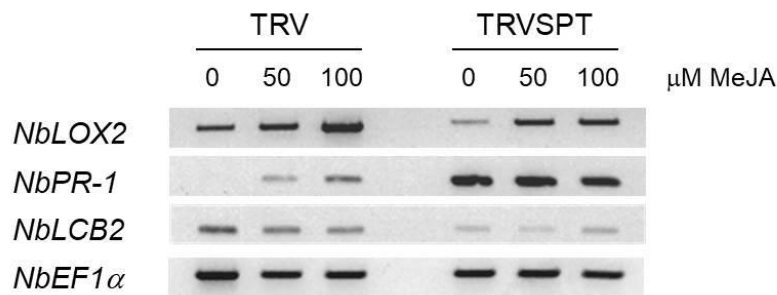


Figura 18. Las plantas de *N. benthamiana* TRVSPT tienen una respuesta atenuada al MeJA. Los niveles de transcrito del gen inducible por JA *NbLOX* fueron menores en hojas de plantas TRVSPT comparados con hojas TRV, posiblemente por la activación de la vía dependiente de SA que provoca expresión constitutiva del gen *NbPR-1*.

En conjunto los resultados sugieren que la desregulación de la homeostasis de LCBs causada por el VIGS de la subunidad LCB2 de la SPT activó la señalización dependiente de SA y afectó mecanismos de defensa que comprometieron la resistencia de *N. benthamiana* contra el hongo necrótrofo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Fenotipo de plantas de *N. benthamiana* silenciadas en el gen *LCB2* de la SPT.

En la literatura hay dos reportes previos sobre el silenciamiento de *NbLCB2* para explorar la función de los esfingolípidos en la resistencia a patógenos (Takahashi et al., 2009b) y en la respuesta de hipersensibilidad en *N. benthamiana* (Gan et al., 2009). Sin embargo, en este trabajo se observó un fenotipo mucho más severo que los previamente reportados. Estas diferencias podrían deberse a la secuencia del cDNA clonada en el vector viral. En este trabajo y en el reporte de Takahashi et al. (2009b) se emplearon secuencias similares del extremo 5' del cDNA de *NbLCB2*, mientras que Gan et al. (2009) usaron un fragmento de 303 pb del extremo 3' (Fig. 20, Anexo C). En *N. benthamiana*, *LCB2* es un gen de copia única (www.solgenomics.net) lo que facilita el análisis funcional y se lograron reducciones entre 20% y 50% en los niveles de transcrito. La restricción significativa del crecimiento y el desarrollo anormal de las hojas (Fig. 11b y c) denota la importancia de los esfingolípidos como componentes estructurales y moléculas de señalización durante el crecimiento y desarrollo vegetal (Pata et al., 2010; Zäuner et al., 2010; Berkey et al., 2012; Michaelson et al., 2016; Luttgaharm et al., 2016; Mamode Cassim et al., 2019).

El fenotipo de crecimiento alterado de las plantas de *N. benthamiana* TRVSPT es comparable al de plantas de *Arabidopsis* silenciadas en la expresión del gen *LCB1* y en mutantes nulas *lcb2a lcb2b* que muestran alteraciones morfológicas en las hojas y una severa restricción de crecimiento, ésta última asociada a una expansión celular alterada. Se ha sugerido que las plantas podrían ajustar sus mecanismos de crecimiento para compensar la reducción en la biosíntesis de esfingolípidos (Chen et al., 2006; Dietrich et al., 2008). Asimismo, la sobreexpresión en *Arabidopsis* de la ceramida sintasa LOH2 (*At3g19260*) cuyos sustratos son las LCBs dihidroxiladas, también presenta una restricción de crecimiento asociado a la acumulación de esfingolípidos con éstas LCBs (Luttgeharm et al., 2015a). Este fenotipo también es muy similar al de la doble mutante *sbh1 sbh2* (afectada en los dos genes que codifican LCB C-4 hidroxilasas) que no contiene LCBs trihidroxiladas y que está enriquecida en LCBs dihidroxiladas (Chen et al., 2008), por lo que se ha sugerido que las LCBs trihidroxiladas o sus

ceramidas promueven la división celular y crecimiento (Chen et al., 2008; Luttgarm et al., 2015a).

La forma irregular de las hojas de plantas de *N. benthamiana* TRVSPT (Fig. 11c) sugiere una alteración en el establecimiento de la polaridad. Estudios de proteómica han documentado el enriquecimiento de algunas proteínas relacionadas con la polaridad en los microdominios de la membrana plasmática, como PIN1, SKU5 y COBRA, lo que apunta a la relevancia de los microdominios en la expansión de las células vegetales (Willemsen et al., 2003; Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005). Además, han surgido evidencias de la participación de los esfingolípidos en una ruta de secreción para el transporte polar de auxinas. La interrupción de la biosíntesis de esfingolípidos por la FB1 en células en cultivo de tabaco BY2, así como en plántulas de *Arabidopsis*, altera la localización polar del transportador de auxinas PIN1 a la membrana plasmática (Aubert et al., 2011; Markham et al., 2011).

Otro fenotipo que no había sido reportado por el silenciamiento de *LCB2* en *N. benthamiana* y que observamos en este trabajo es el desarrollo y arquitectura de las flores (Fig. 11d). Este resultado apoya evidencias previas en *Arabidopsis* del papel esencial de la biosíntesis de esfingolípidos durante el desarrollo reproductivo. La expresión del gen *AtLCB2a* es mucho mayor en los botones florales comparada con otros órganos como hojas y tallo, mientras que las mutantes nulas *lcb2a lcb2b* presentan letalidad gametofítica y pérdida de la viabilidad de polen (Dietrich et al., 2008). Por otro lado, en la doble mutante *sbh1 sbh2* (que no sintetiza LCBS trihidroxiladas) no se da la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo (Chen et al., 2008). Las LCBP son importantes para la regulación del crecimiento del tubo polínico; la esfingosina-1-fosfato (d18:0-P) y fitoesfingosina-1-fosfato (t18:0-P) inducen el crecimiento del tubo polínico por activación de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, mediada por proteínas G heterotriméricas (Wu et al., 2014). En el presente trabajo ya no se exploró con mayor detalle este aspecto que ciertamente resulta muy interesante sobre la función de los esfingolípidos en el desarrollo gametofítico.

Por último, otra característica del fenotipo de las plantas de *N. benthamiana* TRVSPT fue la presencia de lesiones espontáneas de muerte celular (Fig. 11e), que son consistentes con reportes previos que relacionan a la biosíntesis de esfingolípidos con la regulación de la PCD.

Evidencias bioquímicas mediante el empleo de SAMs, que inhiben la biosíntesis de esfingolípidos complejos y provocan acumulación de LCBs, han mostrado que éstas inducen muerte celular en varias especies vegetales (Abbas et al., 1994; Lamprecht et al., 1994; Stone et al., 2000; Saucedo-García et al., 2011). También, por evidencias genéticas en las que se han caracterizado mutantes de *Arabidopsis* que afectan el metabolismo de esfingolípidos como *acd5*, *acd11*, *erh1* y *loh2* muestran un fenotipo de muerte celular acelerada. Estas mutaciones afectan a la ceramida cinasa, a un transportador de esfingosina, a una inositol fosforil ceramida sintasa y a una ceramida sintasa, respectivamente (Brodersen et al., 2002; Liang et al., 2003; Wang et al., 2008; Luttgeharm et al., 2015a). Varias evidencias sustentan que la activación de la PCD está mediada por el incremento en los niveles de LCBs. La infiltración o aspersion de hojas de *Arabidopsis* y *N. benthamiana* con esfinganina, esfingosina o fitoesfingosina, o la adición de esfinganina a células en cultivo de tabaco BY2 promueven muerte celular (Shi et al., 2007; Takahashi et al., 2009b; Lachaud et al., 2010). Asimismo, la sobreexpresión de la subunidad LCB2 de la SPT en *N. benthamiana* provoca muerte celular, probablemente debido a acumulación de LCBs (Takahashi et al., 2009b). Por el contrario, las mutaciones *lcb1* o *lcb2a* en *Arabidopsis*, o la inhibición de la SPT con miriocina, previenen la acumulación de LCBs inducida por la FB1 y evitan la muerte celular (Shi et al., 2007; Saucedo-García et al., 2011).

El silenciamiento de la SPT en *N. benthamiana* altera el balance de LCBs en los tejidos.

Uno de los objetivos de este trabajo fue analizar el efecto del silenciamiento de la SPT sobre la composición de LCBs en el tejido de la planta. Aunque se implementó un método analítico muy sensible por la formación del derivado fluorescente de las bases con NDA, no fue posible detectar las LCBs libres. Por esta razón, realizamos una hidrólisis de esfingolípidos y analizamos los derivados de NDA de las LCBs liberadas. La composición de LCBs en hojas control TRV (Fig.12) fue similar a las reportadas para otras solanáceas como tabaco y jitomate, así como en *Arabidopsis* (Sperling et al., 2005; Markham et al., 2006; Buré et al., 2011), en las que las LCBs trihidroxiladas como la fitoesfingosina son mucho más abundantes que las LCBs dihidroxiladas esfinganina y esfingosina (Fig. 12 y 13; Tabla 2). Como lo muestran los cromatogramas, hay otros compuestos que pueden corresponder a isómeros de 8-

fitoesfingenina (t18:1-*E* o t18:1 *Z*) que fue detectada en cerebrósidos de la membrana plasmática y de las balsas lipídicas de *N. tabacum* (Mongrand et al., 2004; Sperling et al., 2005), o a isómeros de 4,8-esfingadienina (d18:2-*EE* y d18:2-*EZ*), que también fue detectada en hojas de tabaco, células en cultivo y hojas de jitomate (Sperling et al., 2005; Markham et al., 2006; Buré et al., 2011).

Dado que la SPT es la enzima que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de esfingolípidos, es posible que el silenciamiento de la subunidad LCB2 de la SPT ocasione una reducción general en los niveles de LCBs, especialmente de esfinginanina por ser la primera LCB sintetizada, y que es sustrato de desaturasas e hidroxilasas para generar otras LCBs (Chen et al., 2009b). Sin embargo, encontramos que la fitoesfingosina (una de las LCBs trihidroxiladas más abundantes) disminuyó en 50% (Tabla 2, Fig. 13), mientras que las LCBs dihidroxiladas que son mucho menos abundantes, esfinganina y esfingosina, aumentaron considerablemente (4 y 3 veces, respectivamente). Este efecto diferencial en el perfil de LCBs indica la complejidad de la regulación del metabolismo de esfingolípidos, y coincide con resultados reportados por Chen et al. (2006). En *Arabidopsis* la reducción de la actividad de la SPT en plantas *LCB1*-RNAi provoca una elevación de casi 4 veces en el contenido total de esfinganina y también de 2.5 veces en los niveles de fitoesfingosina, mientras que otras LCBs trihidroxiladas como los isómeros de fitoesfingenina (t18:1-*E* y t18:1-*Z*) disminuyen. Estas discrepancias entre *Nicotiana* y *Arabidopsis* podrían atribuirse a diferencias en el contenido de LCBs entre géneros taxonómicos distintos, como lo reportó Markham et al. (2006).

El silenciamiento de la SPT revela la función de las LCBs como transductores de señales en la vía dependiente del SA.

El ácido salicílico es una fitohormona que no solamente participa en la respuesta a estrés biótico y abiótico, sino que también tiene una función esencial en la regulación de muchos procesos fisiológicos a lo largo del desarrollo de la planta. Sus niveles están estrechamente controlados y mutantes de *Arabidopsis* que acumulan SA presentan restricción de crecimiento (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). El fenotipo observado por el silenciamiento de la SPT en

N. benthamiana, como la reducción del crecimiento, muerte celular y susceptibilidad a un patógeno necrótrofo, podrían explicarse por la acumulación de SA. En maíz, la FB1 provoca un incremento en los niveles de esfinganina que inducen acumulación de SA libre (de la Torre Hernández et al., 2010). La comparación de los niveles de SA entre plantas TRV y TRVSPT indicó que efectivamente éstas últimas tuvieron una elevación discreta pero significativa del contenido de SA total que correlacionó con una fuerte expresión constitutiva del gen de defensa e inducible por SA, *Nb-PR1* (Fig. 14). De forma similar, varias mutantes de *Arabidopsis* afectadas en el metabolismo de esfingolípidos (*acd5*, *acd11* y *erh1*, etc.) contienen niveles elevados de SA (de 3 a 80 veces) y expresan fuertemente al gen *AtPR-1* (Greenberg et al., 2000; Brodersen et al., 2005; Wang et al., 2008; Sánchez Rangel et al., 2015; Tabla 3). Estas evidencias en conjunto sugieren fuertemente que el incremento de intermediarios esfingoideos, especialmente LCBs, activa la vía de señalización dependiente de SA. Para definir si la elevación de LCBs observada en las plantas TRVSPT era responsable de la activación de la vía del SA, tratamos plántulas de *N. benthamiana* silvestres con FB1 y esfinganina y analizamos los niveles de transcrito del gen *NbPR-1*. Este gen es un marcador canónico de la activación de la vía dependiente de SA (Mur et al., 2006; Spoel et al., 2007; Koorneef et al., 2008; Denoux et al., 2008), y su expresión se indujo por ambos compuestos (Fig. 15). Además, el mismo efecto ocurre en *Arabidopsis*, indicando que las LCBs regulan positivamente la vía dependiente del SA. Plántulas silvestres de *Arabidopsis* que fueron tratadas con SAMs (FB1 y toxina AAL) muestran una inducción de la expresión del gen *PR-1* y otros genes de defensa de manera proporcional a la dosis aplicada (Stone et al., 2000; Gechev et al., 2004). Por otro lado, en células de tabaco BY2 la esfinganina (25 μ M) induce rápidamente la expresión de los genes de defensa *NtPR-3* y *NtMYB2*, pero no de *NtPR-1* (Lachaud et al., 2011). En este caso la expresión de *NtPR-1* podría no haberse detectado porque las células fueron cosechadas a los 15 min posteriores a la adición de esfinganina, que podría ser un tiempo muy corto para activar la vía del SA. Nuestros resultados indican que la expresión de *NbPR-1* es inducida a las 24 h (Fig. 15d), y este tiempo coincide con la inducción causada por las SAMs en *Arabidopsis* (Stone et al., 2000; Gechev et al., 2004).

Tabla 3. Asociación entre el metabolismo de esfingolípidos, niveles de ácido salicílico y expresión del gen *PR1* (Modificado de Sánchez-Rangel et al., 2015).

| Gen | Producto Génico | Perfil esfingoideo en la mutante o planta silenciada | Niveles de SA en la mutante o planta silenciada | Expresión de <i>PR-1</i> | Referencia |
|---|---|---|--|--|---|
| <i>NbLCB2</i> <i>AM902524</i> | Subunidad LCB2 de la serina palmitoil transferasa | Disminución (--) del 50% de LCBs trihidroxiladas, e incremento (++) de 4 veces (4x) de LCBs dihidroxiladas | Incremento (++) de 1.5 veces (1.5x) en los niveles de SA total | Constitutiva | Rivas-San Vicente et al. (2013) |
| <i>AtLOH1</i> <i>At3g25540</i> | Ceramida sintasa | ++ ceramidas (7%) ++ glucosilceramidas (19%) ++ LCBs trihidroxiladas (5x) | No se afectan | Constitutiva ++ 160x | Ternes et al. (2011) |
| <i>AtFAH1/</i> <i>AtFAH2</i> <i>At2g34770</i> <i>At4g20870</i> | Hidroxilasa de ácidos grasos | ++ LCBs trihidroxiladas (5x) -- hidroxiceramidas (100x) -- fitoglucosilceramidas (2 a 4x) ++ fitoceramidas (10x) | ++ SA libre (3.2x) ++ SA conjugado (4.3x) | Constitutiva | König et al. (2012) |
| <i>AtACD5</i> <i>At3G21630</i> | Ceramida cinasa | ++ ceramidas e hidroxiceramidas (2 a 6x) No se encontraron cambios en glucosilceramidas ni LCBs | ++ SA libre (4x) ++ SA total (9x) | Constitutiva pero su inducción está afectada | Greenberg et al. (2000) Bi et al. (2014) |
| <i>AtPCS2</i> <i>At2g37940</i> | Inositol fosforil ceramida sintasa 2 | ++ ceramidas e hidroxiceramidas (2 a 3x) Enriquecido en LCBs trihidroxiladas | ++ SA libre y conjugado (3x) | Constitutiva | Wang et al. (2008) |
| <i>AtACD11</i> <i>At2g34690</i> | Proteína transportadora de ceramida-1-fosfato | ++ ceramidas (7x) ++ hidroxiceramidas (3x) ++ GIPC y GlcCer (2x) ++ LCBs y LCB-P (2x) | ++ SA total (63x) | Constitutiva | Brodersen et al. (2002; 2005) Simanshu et al. (2014) |

Aunque la mayoría de las especies de *Nicotiana* son resistentes a las SAMs (determinado por ensayos de elongación radicular en presencia de toxina AAL 0.2 μ M, Brandwagt et al., 2001), cuando se expusieron plántulas de *N. benthamiana* a FB1 (1 y 5 μ M) presentaron una fuerte inhibición de la elongación radicular y expansión de los hipocotilos (Fig. 15a), que es un efecto muy similar al observado en especies con sensibilidad intermedia a las SAMs (Brandwagt et al., 2001). Estas observaciones también son comparables con la restricción de crecimiento inducida por la FB1 en maíz, jitomate (Lamprecht et al., 1994), y *Arabidopsis* (Stone et al., 2000; Shi et al., 2007; Markham et al., 2011; Saucedo-García et al., 2011; Watanabe y Lam, 2011). Sin embargo, a diferencia de las especies mencionadas, las plántulas de *N. benthamiana* expuestas a la FB1 no desarrollaron síntomas de clorosis o muerte celular (Fig. 15a). Es importante denotar que en jitomate la resistencia al hongo necrótrofo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* y la insensibilidad a su toxina AAL se debe al gen *Asc-1* (Gilchrist y Grogran, 1976), que está conservado en la mayoría de las especies de *Nicotiana* (Brandwagt et al., 2001). *Asc-1* es un gen unicopia codominante que codifica a una ceramida sintasa tolerante a las SAMs, por lo que la acumulación de LCBs inducida por la toxina AAL en hojas de jitomate resistentes *Asc/Asc* es discreta comparada con la causada en hojas susceptibles *asc/asc* (Spassieva et al., 2002). Lo mismo podría ocurrir en *Nicotiana* sp. debido a que el tabaco es insensible a dosis bajas de toxina AAL (Brandwagt et al., 2001), pero la FB1 1 μ M provoca un incremento de 10 veces en los niveles de esfinganina en células en cultivo BY2 (Aubert et al., 2011).

El silenciamiento de la SPT en *N. benthamiana* compromete su resistencia al hongo necrótrofo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*.

N. benthamiana contiene y expresa el gen *Asc-1* que confiere resistencia contra *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (Brandwagt et al., 2001). Sin embargo, las plantas silenciadas TRVSPT fueron susceptibles a este hongo necrótrofo (Fig. 17). Consideramos que la alteración de los niveles de compuestos esfingoideos, en particular la elevación de esfinganina (Fig. 13) que mimetiza el efecto de las SAMs, podría haber generado una condición de crecimiento favorable para este

hongo necrótrofo (Fig. 17a). Para investigar los mecanismos involucrados en esta interacción compatible, analizamos la expresión de los genes de defensa *NbPR-1*, *NbPR-2* y *NbPR-3* que son parte de las respuestas de defensa tempranas y tienen una función relevante al limitar la entrada, crecimiento y dispersión del patógeno. El patrón de expresión de estos genes de defensa en las hojas de plantas TRVSPT en respuesta a la infección por el hongo mostró importantes alteraciones en comparación con las hojas TRV (Fig. 17b). La resistencia comprometida de las plantas TRVSPT contra *A. alternata* f. sp. *lycopersici* correlacionó con niveles menores de los transcritos *NbPR-2* y *NbPR-3* (Fig. 17b). La producción de enzimas capaces de degradar la pared celular de hongos (β -1,3-glucanasas y quitinasas codificadas por *NbPR-2* y *NbPR-3*, respectivamente) y el tiempo en que se activa este mecanismo de defensa es un componente importante de la respuesta de defensa. Su papel en la respuesta inmune de las plantas ha sido demostrado por la mayor resistencia y retraso en los síntomas de infección por hongos en plantas transgénicas que las sobreexpresan (Jach et al., 1995; Dana et al., 2006). Más aun, experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el efecto antifúngico de las proteínas PR-2 y PR-3 es sinérgico cuando ambas enzimas están presentes (Lawrence et al., 1996).

La expresión constitutiva del gen *NbPR-1* inducida por la acumulación de SA en las plantas TRVSPT (apenas observada bajo las condiciones de RT-PCR semi-cuantitativo) posiblemente permitió una inducción más temprana ante la infección por el hongo, en comparación con las plantas TRV (Fig. 17b). Esta activación constitutiva de la vía dependiente del SA en las plantas TRVSPT podría ser crucial en la susceptibilidad a *A. alternata* f. sp. *lycopersici* dado que las fitohormonas tienen un papel central en la determinación de las interacciones planta-patógeno (Spoel & Dong, 2008; Pieterse et al., 2009; 2012; Robert-Seilaniantz et al., 2011; Verma et al., 2016; Li et al., 2019). En los modelos de integración de señales entre las fitohormonas para la respuesta inmune de las plantas, el JA y el ET trabajan en conjunto para resistir a patógenos necrótrofos, mientras que el SA generalmente los suprime o antagoniza (Spoel et al., 2007; Koorneef et al., 2008; León-Reyes et al., 2009, 2010; El Oirdi et al., 2011; Verma et al., 2016; Li et al., 2019). En este sentido es posible que las SAMs actúen como efectores que promueven la elevación de LCBs para inducir la muerte de sus hospederos, y para activar de manera sostenida

la vía dependiente del SA para antagonizar o suprimir los mecanismos de defensa efectivos mediados por otras fitohormonas, como el JA (Collemare et al., 2019). La activación de la vía del SA en *Arabidopsis* (tanto por estrés biótico como por tratamiento exógeno) provoca que sean más susceptibles a *Alternaria brassicicola*, exhibiendo severos síntomas de infección. También presentan una fuerte expresión de *PR-1* y una reducción en la expresión del gen *PDF1.2* que es inducido por JA (Spoel et al., 2007). La aplicación de SA a bajas concentraciones (1 - 10 μ M) es suficiente para activar un rápido y duradero efecto antagónico en genes de defensa regulados por JA (Koorneef et al., 2008). Esto también ocurre en solanáceas pues el pretratamiento de hojas de jitomate con SA (50 μ M) incrementa la infección por *Botrytis cinerea* y reduce significativamente la expresión de los genes de defensa *PI-I* y *PI-II* regulados por JA. Por otra parte, cepas agresivas de *B. cinerea* secretan un exopolisacárido que promueve una elevación de SA en el hospedero para suprimir la vía dependiente de JA requerida para resistencia (El Oirdi et al., 2011). Es posible que en las plantas TRVSPT la activación constitutiva de la vía del SA suprima la respuesta de defensa mediada por JA como se encontró con los niveles del transcrito *NbLOX* (Fig. 18). Se ha demostrado que tanto el JA como el ET están involucrados en la muerte celular inducida por *A. alternata* f. sp. *lycopersici* en jitomate (Egusa et al., 2009; Zhang et al., 2011), así como en la muerte celular inducida en *Arabidopsis* y jitomate por la FB1 y toxina AAL, respectivamente (Asai et al., 2000; Gechev et al., 2004; Mase et al., 2012), pero todavía se desconocen los mecanismos de señalización que relacionan a los esfingolípidos con las fitohormonas.

En *Arabidopsis* las modificaciones del contenido de esfingolípidos afectan su respuesta de defensa contra patógenos necrótrofos y hemibiótrofos. La mutante *Atdpl1* (deficiente en la esfinganina-1-fosfato liasa que regula la homeostasis entre LCBs y sus derivados fosforilados, LCBP) exhibe mayor tolerancia al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*, pero es susceptible a la bacteria hemibiótrofa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), comparada con plantas silvestres (Magnin-Robert et al. 2015). La mutante *Atdpl1* es indistinguible de plantas silvestres bajo condiciones normales de crecimiento y el contenido de esfingolípidos es muy similar entre ellas, la única diferencia es que *Atdpl1* acumula fitoesfingina-1-fosfato (t18:1-P, aprox. 5 veces) y es hipersensible a la FB1 (Tsegaye et al., 2007). La infección por *B. cinerea* provoca acumulación

de ceramidas y LCBs en plantas silvestres, mientras que la mutante *Atdpl1* acumula más LCBPs (t18:0-P y t18:1-P) y menos ceramidas y LCBs. En respuesta a *Pst* la t18:0-P se acumula en mayores niveles en *Atdpl1* en comparación con las plantas silvestres. Un aspecto relevante es que la mutante *Atdpl1* presenta menor muerte celular en respuesta a ambos patógenos. Los niveles de SA son similares en ambas plantas, independientemente del patógeno, pero su vía de señalización es reprimida en la mutante *Atdpl1* ante la infección por *Pst*. En contraste, la infección por ambos patógenos induce mayor acumulación de JA con la consecuente expresión de genes de defensa dependientes de JA en la mutante *Atdpl1* (Magnin-Robert et al., 2015). La disminución de la muerte celular y los altos niveles de JA podrían ser la razón de que la mutante *Atdpl1* sea más tolerante a *B. cinerea* pero más susceptible a *Pst*. Además, el tratamiento con t18:0-P exógena a plantas silvestres redujo la muerte celular inducida por ambos patógenos, por lo que esta LCBP podría ser esencial para modular la muerte celular y la resistencia de las plantas contra patógenos (Magnin-Robert et al., 2015). Por último, una evidencia adicional de la importancia en la homeostasis de LCBs/LCBPs en la activación de respuestas de defensa dependientes de SA y JA es que plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan a la esfingosina cinasa (SPHK1) acumulan más SA en respuesta a la FB1, mientras que la supresión de la SPHK1 disminuye la síntesis de SA pero promueve la síntesis de JA y la expresión de sus genes de defensa (Qin et al., 2017).

Es muy probable que las complejas interacciones entre distintas fitohormonas participen en la susceptibilidad de las plantas de *N. benthamiana* TRVSPT al hongo necrótrofo *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, y se requieren investigaciones futuras para determinar si los niveles elevados de SA en estas plantas antagonizan la respuesta de defensa mediada por JA/ET y otras fitohormonas. Asimismo, es importante identificar a los componentes de la vía de señalización que transducen la señal de los esfingolípidos para la activación de la respuesta de defensa contra patógenos.

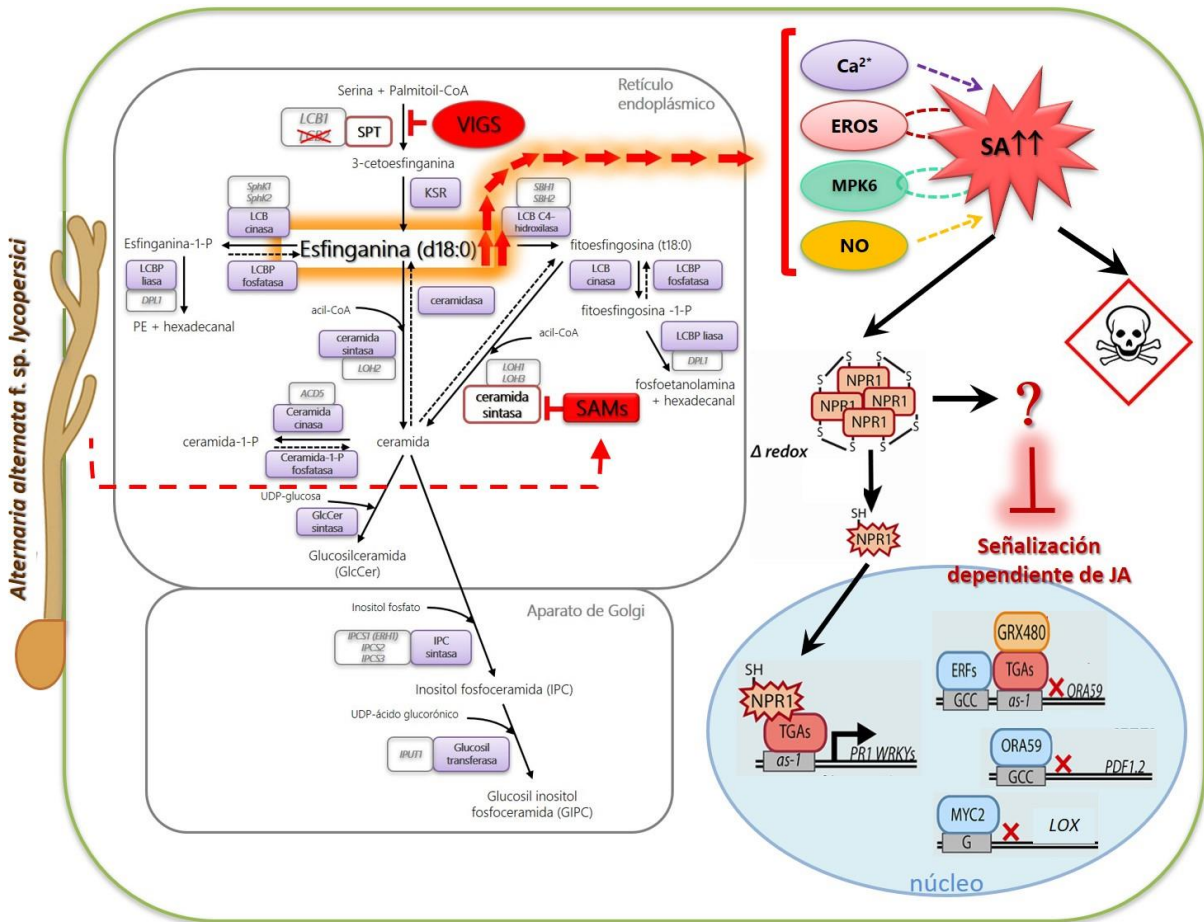


Figura 19. Modelo experimental. La interrupción de la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos en *N. benthamiana* por dos distintas estrategias (VIGS de la SPT y la exposición de plántulas a FB1) incrementa los niveles de LCBs dihidroxiladas como la esfinganina. Las LCBs actúan como moléculas de señalización que inducen la activación de la vía de señalización del SA. Los posibles mediadores de la señalización de LCBs con el SA que se han reportado son el Ca^{2+} , EROS, MPK6 y óxido nítrico (NO). El aumento en los niveles de SA es percibido por el receptor NPR1 que cambia a su forma monomérica e ingresa al núcleo para activar la expresión de genes de defensa dependientes de SA, entre ellos *PR-1*. En cambio, NPR1 en su forma oligomérica en el citosol suprime la señalización que activa la expresión de genes de defensa dependientes de JA que confieren resistencia a patógenos necrótrofos. La glutarredoxina GRX480 es otro regulador del antagonismo del SA/JA que bloquea la expresión de los genes *ORA59* y *PDF1.2*. Por último, el incremento en los niveles de SA también provoca muerte celular, condición que favorece la proliferación y desarrollo de *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.

Análisis de Impacto.

Se aprovecha el periodo de tiempo transcurrido entre la publicación del artículo original de investigación (2013) y la presentación de este documento (2020) para evaluar el impacto del trabajo en términos de citas en la literatura científica. El artículo (Rivas San Vicente et al., 2013) ha sido citado 14 ocasiones (excluyendo autocitas) desde su publicación (Anexo G). Cuatro de estas citas corresponden a artículos de revisión especializados en la función de esfingolípidos (3) y sobre ácido salicílico (1). Dos de las citas son artículos originales de investigación sobre la actividad biológica de la fumonisina B1. Otras cuatro citas corresponden a artículos originales en los que resaltan el uso de *N. benthamiana* como modelo para estudiar interacciones planta – patógeno y/o el empleo de VIGS para análisis funcional de genes.

Begum et al. (2016) reportan la caracterización del gen *LCB2* de arroz y análisis funcional por sobreexpresión en plantas de *Arabidopsis* que tienen niveles incrementados de fitoesfingosina (LCB trihidroxilada), y fitoceramida. Esto se asoció con niveles mayores de calosa, ceras en las hojas y resistencia a ataque por insectos. En estas plantas ocurre inducción de genes de defensa asociados a la vía de SA.

Finalmente, Magnin-Robert et al. (2015) a través del análisis de una mutante de *Arabidopsis* en el gen *DPL1* (liasa de dihidroesfingosina-1-fosfato) que regula el balance entre LCBs fosforiladas y no fosforiladas, encontraron que los esfingolípidos tienen una función relevante en la respuesta de defensa de la planta contra patógenos necrótrofos. Establecieron la conexión entre la señalización por jasmonato, la muerte celular y el metabolismo de esfingolípidos.

VIII. CONCLUSIONES.

El trabajo presentado demuestra que la alteración en la biosíntesis de *nov* de los esfingolípidos en *N. benthamiana* por el silenciamiento de la SPT provoca elevaciones en los niveles de distintas LCBs, activa la vía de señalización dependiente del SA y confiere susceptibilidad al hongo necrótrofo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. En este contexto, las SAMs producidas por *Fusarium verticillioides* y *A. alternata* f. sp. *lycopersici* podrían tener una doble función: la interrupción del metabolismo esfingoideo para elevar las LCBs e inducir muerte celular, y a la vez activar de manera sostenida la vía dependiente del SA con la finalidad de suprimir la respuesta de defensa dependiente de otras fitohormonas como JA y ET. Así, ambas estrategias asegurarían una invasión exitosa del hospedero.

IX. PERSPECTIVAS.

- Comparar los niveles de LCBs durante la respuesta de defensa de plantas TRV y TRVSPT contra *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.
- Determinar si los niveles de SA en las plantas TRV y TRVSPT cambian ante la infección por *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.
- Analizar la importancia de la vía del SA en la susceptibilidad de las plantas de *N. benthamiana* TRVSPT a *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, comparando su respuesta con plantas transgénicas *nahG* (incapaces de acumular SA), silenciadas con la construcción TRVSPT e inoculadas con el hongo necrótrofo.
- Evaluar la potencial supresión de respuestas de defensa dependientes de JA y ET en las plantas TRVSPT mediante la cuantificación de los niveles de JA y el análisis de la expresión de genes de defensa inducidos por JA/ET.
- Analizar con detalle el fenotipo del desarrollo gametofítico en *N. benthamiana* TRVSPT.

X. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH Jr, Riley RT (1994) Fumonisin-and AAL-toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* 106:1085–1093
- Ádám AL, Nagy ZA, Kátay G, Mergenthaler E, Viczián O (2018) Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. *Int J Mol Sci* doi:10.3390/ijms19041146
- Agrawal AA, Tuzun S, Bent E (1999) Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture. APS Press Inc., Saint Paul, MN
- Akamatsu H, Itoh Y, Kodama M, Otani H, Kohmoto K (1997) AAL toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* 87:967–972
- Alcántara-Sánchez F (1998) Efecto de la fumonisina B1 en la integridad del ADN genómico de maíz durante la germinación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 98 pp
- Ali U, Li H, Wang X, Guo L (2018) Emerging roles of sphingolipid signaling in plant response to biotic and abiotic stresses. *Mol Plant* 11: 1328-1343.
- An F, Zhao Q, Ji Y, Li W, Jiang Z, Yu X, Zhang C, Han Y, Liu Y, Zhang S, Ecker JR, Guo H (2010) Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22:2384–2401
- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12:1823–1836
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977–983
- Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR, Cooper RM (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* 18:1078-1083
- Aubert A, Marion J, Boulogne C, Bourge M, Abreu S, Bellec Y, Faure JD, Satiat-Jeunemaitre B (2011) Sphingolipids involvement in plant endomembrane differentiation: the BY2 case. *Plant J* 65:958–971
- Balint-Kurti P (2019) The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol* 20:1163-1178
- Begum MA, Shi XX, Tan Y, Zhou WW, Hannun Y, Obeid L, Mao C, Zhu ZR (2016) Molecular characterization of rice *OsLCB2a1* gene and functional analysis of its role in insect resistance. *Front Plant Sci* 7:1789
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:266-292
- Berens ML, Berry HM, Mine A, Argueso CT, Tsuda K (2017) Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 55:401–425

- Berkey R, Bendigeri D, Xiao S (2012) Sphingolipids and plant defense/disease: the “death” connection and beyond. *Front Plant Sci* 3:68
- Berna A, Bernier F (1999) Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. *Plant Mol Biol* 39:539-549
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R (2002) Constitutive expression of *ETHYLENE RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* 29:23-32.
- Bi FC, Liu Z, Wu JX, Liang H, Xi XL, Fang C, Sun TJ, Yin J, Dai GY, Rong C, Greenberg JT, Su WW, Yao N (2014) Loss of ceramide kinase in *Arabidopsis* impairs defenses and promotes ceramide accumulation and mitochondrial H₂O₂ bursts. *Plant Cell* 26: 3449-3467
- Birch PRJ, Avrova AO, Duncan JM, Lyon GD, Toth RL (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* 12:356-361
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406
- Bolton MD, van Esse HP, Vossen JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJ, van den Berg GC, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, de Koster CG, de Wit PJ, Joosten MH, Thomma bp (2008) The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol* 69:119-136
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* 137:104–116
- Brader G, Djamei A, Teige M, Palva ET, Hirt H (2007) The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:589-596
- Bradley D.J, Kjellbom P, Lamb C.J (1992) Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70:21–30
- Brandwagt BF, Kneppers TJA, Van der Weerden GM, Nijkamp HJJ, Hille J (2001) Most AAL toxin-sensitive *Nicotiana* species are resistant to the tomato fungal pathogen *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:460–470
- Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, Ejsing CS, Weissman JS (2010) Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* 463:1048–1055
- Brodersen P, Malinovsky FG, He´maty K, Newman MA, Mundy J (2005) The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. *Plant Physiol* 138:1037–1045
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen LB, Brown RE, Mundy J (2002) Knockout of *Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* 16:490–502
- Brooks DM, Bender CL, Kunkel BN (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* 6:629-639
- Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM (2003) A role for the GCC box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132:1020-1032
- Bugert P, Geider K (1995) Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol Microbiol* 15:917-933

- Buré C, Cacas JL, Wang F, Gaudin K, Domergue F, Mongrand S, Schmitter JM (2011) Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25:3131–3145
- Cacas JL, Bure C, Furt F, Maalouf JP, Badoc A, Cluzet S, Schmitter JM, Antajan E, Mongrand S (2013) Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity. *Phytochemistry* 96:191–200
- Cacas JL, Buré C, Grosiean K, Gerbeau-Pissot P, Lherminier J, Rombouts Y, Maes E, Bossard C, Gronnier J, Furt F, Fouillen L, Germain V, Bayer E, Cluzer S, Robert F, Schmitter JM, Deleu M, Lins L, Simon-Plas F, Mongrand S (2016) Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids. *Plant Physiol* 170:367–384
- Camera S, L'haridon F, Astier J, Zander M, Abou-Mansour E, Page G, Thurow C, Wendehenne D, Gatz C, Métraux JP, Lamotte O (2011) The glutaredoxin ATGRXS13 is required to facilitate *Botrytis cinerea* infection of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* 68:507–519
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 6:1583–1592
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X (1997) The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88:57–63
- Chao DY, Gable K, Chen M, Baxter I, Dietrich CR, Cahoon EB, Guerinot ML, Lahner B, Lü S, Markham JE, Morrissey J, Han G, Gupta SD, Harmon JM, Jaworsky JG, Dunn TM, Salt DE (2011) Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:1061–1081
- Chen H, Xue L, Chintamanani S, Germain H, Lin H, Cui H, Cai R, Zuo J, Tang X, Li X, Guo H, Zhou JM (2009a) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:2527–2540
- Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M (2009b) Plant sphingolipids: structure, synthesis and function. In: Wada H, Murata N, Govindjee (eds) *Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions*. Springer, Dordrecht, pp 77–115
- Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM, Cahoon EB (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* 18:3576–3593
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:1862–1878
- Cheng YT, Germain H, Wiermer M, BiD, Xu F, García AV, Wirthmueller L, Després C, Parker JE, Zhang Y, Li X (2009) Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:2503–2516
- Chini A, Cimmino A, Masi M, Reveglia P, Nocera P, Solano R, Evidente A (2018) The fungal phytotoxin lasiojasmonate A activates the plant jasmonic acid pathway. *J Exp Bot* 69:3095–3102
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448:666–671

- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814
- Cianciotto NP (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* 13:581-588
- Colcombet J, Hirt H (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413:217-226
- Cole SJ, Yoon AJ, Faull KF, Diener AC (2014) Host perception of jasmonates promotes infection by *Fusarium oxysporum* formae speciales that produce isoleucine- and leucine-conjugated jasmonates. *Mol Plant Pathol* 15:589-600
- Collemare J, O'Connell R, Lebrun MH (2019) Nonproteinaceous effectors: the *terra incognita* of plant – fungal interactions. *New Phytol* 223: 590–596.
- Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM (2003) Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423: 651–654
- Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S (2005) Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol* 137:724–737
- Dana M, Pintor-Toro J, Cubero B (2006) Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* 142:722–730
- de Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MH, Thomma BP (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329:953-955
- de la Torre-Hernández ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernández N, Cruz-Ortega R, Plasencia J (2010) Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol Mol Plant Pathol* 74:337–345
- Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA (1995) Arabidopsis signal-transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6602-6606
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247–1250
- Dempsey DA, Vlot AC., Wildermuth MC, KlessigDF (2011) Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* 9, e0156. doi: 10.1199/tab.0156
- Denny TP (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33:173-197
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol Plant* 1:423–445
- Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM, Cahoon EB (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis *LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J* 54:284-298
- Ding Y, Sun T, Ao K, Peng Y, Zhang Y, Li X, Zhang Y (2018) Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell* 173:1454-1467

- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, Feussner K, Meinicke P, Stierhof YD, Schwarz H, Macek B, Mann M, Kahmann R (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478:395–398
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11:539-548
- Dong X (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 7:547–552
- Dumas B, Freyssinet G, Pallett KE (1995) Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. *Plant Physiol* 107:1091–1096
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42:185-209
- Egusa M, Ozawa R, Takabayashi J, Otani H, Kodama M (2009) The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen. *Planta* 229:965–976
- El Oirdi M, El Rahman TA, Rigano L, El Hadrami A, Rodriguez MC, Daayf F, Vojnov A, Bouarab K (2011) *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* 23:2405–2421
- Ellis C, Turner JG (2001) The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* 13:1025–1033
- Fang L, Ishikawa T, Rennie EA, Murawska GM, Lao J, Yan J, Tsai AY, Baidoo EE, Xu J, Keasling JD, Demura T, Kawai-Yamada M, Scheller HV, Mortimer JC (2016) Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induces plant immune responses and reduces cellulose content in Arabidopsis. *Plant Cell* 28:2991–3004
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geering J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* 23:701-715
- Fett WF, Dunn MF (1989) Exopolysaccharides produced by phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pathovars in infected leaves of susceptible hosts. *Plant Physiol* 89:5-9
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* 5:344–350
- Freeman BC, Beathe GA (2008) An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486:228–232
- Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988) Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263:18545-18552
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inzé D, Mittler R, Van Breusegem F (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 14:436-445

- Gamir J, Darwiche R, Van't Hof P, Choudhary V, Stumpe M, Schneiter R, Mauch F (2017) The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J* 89:502-509
- Gan Y, Zhang L, Zhang Z, Dong S, Li J, Wang Y, Zheng X (2009) The LCB2 subunit of the sphingolipid biosynthesis enzyme serine palmitoyl transferase can function as an attenuator of the hypersensitive response and Bax-induced cell death. *New Phytol* 181:127–146
- Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y (2008) MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res* 18:1190-1198
- Gao QM, Zhu S, Kachroo P, Kachroo A (2015) Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front Plant Sci* 6:228
- Gao X, Chen X, Lin W, Chen S, Lu D, Niu Y, Li L, Cheng C, McCormack M, Sheen J, Shan L, He P (2013) Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca²⁺ dependent protein kinases. *PLoS Pathog.* 9:e1003127
- Gechev TS, Gadjev IZ, Hille J (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Mol Life Sci* 61:1185–1197
- Gfeller A, Liechti R, Farmer EE (2010) Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci Signal* doi:10.1126/scisignal.3109cm4
- Gilchrist DG, Grogan RG (1976) Production and nature of a host specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 66:165–171
- Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Ntoukakis V, Petutschnig E, Lipka V, Rathjen JP (2009) AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* 19:423-429
- Gimenez-Ibanez S, Solano R (2013) Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Front Plant Sci* 4:72
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43:205–227
- Göhre V, Robatzek S (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 46:189-215
- Göhre V, Spallek T, Häweker H, Mersmann S, Mentzel T, Boller T, de Torres M, Mansfield JW, Robatzek S (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* 18:1824-1832
- Greenberg JT (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Biol* 48:525-545
- Greenberg JT, Silverman FP, Liang H (2000) Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the Arabidopsis mutant *acd5*. *Genetics* 156:341–350
- Grogan RG, Kimble KA, Misaghi I (1975) A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 65:880-886.
- Guerineau F, Benjdia M, Zhou DX (2003) A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana vsp1* promoter. *J Exp Bot* 54:1153–1162

- Guo L, Mishra G, Markham JE, Li M, Tawfall A, Welti R, Wang X (2012) Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic signaling pathway in Arabidopsis. *J Biol Chem* 287:8286-8296
- Gutsche N, Thurow C, Zachgo S, Gatz C (2015) Plant specific CC-type glutaredoxins: functions in developmental processes and stress responses. *Biol Chem* 396:495-509
- Han G, Gupta SD, Gable K, Niranjankumari S, Moitra P, Eichler F, Brown RH Jr, Harmon JM, Dunn TM (2009) Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8186-8191
- Han S, Lone MA, Schneider R, Chang A (2010) Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5851-5856
- Han X, Kahmann R (2019) Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Front Plant Sci* 10:822
- Hanada K (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1632:16-30
- Hou Q, Ufer G, Bartels D (2016) Lipid signaling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 39:1029-1048
- Huby E, Napier JA, Baillieux F, Michaelson LV, Dhondt-Cordelier S (2019) Sphingolipids: towards an integrated view of metabolism during the plant stress response. *New Phytol* doi: 10.1111/nph.15997.
- Hussain RMF, Sheikh AH, Haider I, Quareshy M, Linthorst HJM (2018) Arabidopsis WRKY50 and TGA transcription factors synergistically activate expression of *PR1*. *Front Plant Sci* 9:930
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7:301-308
- Ishihama N, Yoshioka H (2012) Post translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 15:431-437
- Ishihara T, Sekine KT, Hase S, Kanayama Y, Seo S, Ohashi Y, Kusano T, Shibata D, Shah J, Takahashi H (2008) Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* EDS5 gene enhances resistance to viruses. *Plant Biol* 10:451-461
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4800-4805
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* 8:97-109
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329
- Joo S, Liu Y, Lueth A, Zhang S (2008) MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J* 54: 129-140
- Ju C, Yoon GM, Shemansky JM, Lin DY, Ying ZI, Chang J, Garrett WM, Kessenbrock M, Groth G, Tucker ML, Cooper B, Kieber JJ, Chang C (2012) CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to

- control ethylene hormone signalling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 109:19486-19491
- Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annu Rev Phytopathol 44:41-60
- Kärkönen A, Kuchitsu K (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. Phytochemistry 112:22-32
- Katagiri F, Tsuda K (2010) Understanding the plant immune system. Mol Plant Microbe Interact 23:1531-1536
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. Proc Natl Acad Sci USA 105:7100-7105
- Kemp BP, Horne J, Bryant A, Cooper RM (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). Physiol Mol Plant Pathol 64:209-218
- Kim TH, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂ and Ca²⁺ signaling. Annu Rev Plant Biol 61:561-591
- Kimberlin AN, Han G, Luttgeharm KD, Chen M, Cahoon RE, Stone JM, Markham JE, Dunn TM, Cahoon EB (2016) ORM expression alters sphingolipid homeostasis and differentially affects ceramide synthase activity. Plant Physiol 172:889-900
- Kimberlin AN, Majumder S, Han G, Chen M, Cahoon RE, Stone JM, Dunn TM, Cahoon EB (2013) Arabidopsis 56-aminoacid serine palmitoyltransferase-interacting proteins stimulate sphingolipid biosynthesis, are essential, and affect mycotoxin sensitivity. Plant Cell 25:4627-4639
- König S, Feussner K, Schwarz M, Kaefer A, Iven T, Landesfeind M, Ternes P, Karlovsky P, Lipka V, Feussner I (2012). *Arabidopsis* mutants of sphingolipid fatty acid α -hydroxylases accumulate ceramides and salicylates. New Phytol 196:1086-1097
- Koornneef A, León-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2008) Kinetics of salicylate mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. Plant Physiol 147:1358-1368
- Lacey RF, Binder BM (2014) How plants sense ethylene gas—The ethylene receptors. J Inorg Biochem 133:58-62
- Lachaud C, Da Silva D, Amelot N, Béziat C, Brière C, Cotelle V, Graziana A, Grat S, Mazars C, Thuleau P (2011) Dihydrosphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. Mol Plant 4:310-318
- Lachaud C, Da Silva D, Cotelle V, Thuleau P, Xiong TC, Jauneau A, Brière C, Graziana A, Bellec Y, Faure JD, Ranjeva R, Mazars C (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. Cell Calcium 47:92-100
- Lachaud C, Prigent E, Thuleau P, Grat S, Da Silva D, Briere C, Mazars C, Cotelle V (2013) 14-3-3-regulated Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in *Arabidopsis*. Cell Death Differ 20:209-217
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. Annu Rev Plant Biol 48:251-275
- Lamprecht SC, Marasas WFO, Alberts JF, Cawood ME, Gelderblom WCA, Shephard GS, Thiel PG, Calitz FJ (1994) Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. Phytopathology 84:383-391

- Larios-Zárate, G. (2012) Producción de ácido salicílico en plantas por la infección de hongos necrótrofos productores de micotoxinas análogas a esfinganina. Tesis de licenciatura, Q.A. Facultad de Química, UNAM.
- Laurie-Berry N, Joardar V, Street IH, Kunkel BN (2006) The Arabidopsis thaliana JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 19:789–800
- Lawrence CB, Josten MHAJ, Tuzun S (1996) Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol Mol Plant Pathol* 48:361–377
- Lenarčič T, Albert I, Böhm H, Hodnik V, Pirc K, Zavec AB, Podobnik M, Pahovnik D, Žagar E, Pruitt R, Greimel P, Yamaji-Hasegawa A, Kobayashi T, Zienkiewicz A, Gömann J, Mortimer JC, Fang L, Mamode-Cassim A, Deleu M, Lins L, Oecking C, Feussner I, Mongrand S, Anderlüh G, (2017) Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science* 358:1431-1434
- Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes AP, Memelink J, Pieterse CMJ, Ritsema T (2010) Ethylene signaling renders the jasmonate response of Arabidopsis insensitive to future suppression by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Int* 23:187–197
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583–593
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46:477-491
- Li J, Brader G, Palva ET (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16:319-331
- Li J, Yin J, Rong C, Li KE, Wu JX, Huang LQ, Zeng HY, Sahu SK, Yao N (2016) Orosomucoid proteins interact with the small subunit of serine palmitoyltransferase and contribute to sphingolipid homeostasis and stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 28:3038-3051
- Li N, Han X, Feng D, Yuan D, Huang LJ (2019) Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering? *Int J Mol Sci* 20: 671
- Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* 17:2636–2641
- Liu G, Holub EB, Alonso JM, Ecker JR, Robert PR (2015) An Arabidopsis NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *Plant J* 41:304-318
- Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Zhang M, Gu L, Zhang B, Dou D (2014) Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nat Commun* 5:4686
- Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16:3386-3399
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165–178

- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30:296–303
- Luttgeharm KD, Chen M, Mehra A, Cahoon RE, Markham JE, Cahoon EB (2015a) Overexpression of *Arabidopsis* ceramide synthases differentially affects growth, sphingolipid metabolism, programmed cell death and mycotoxin resistance. *Plant Physiol* 169:1108-1117
- Luttgeharm KD, Kimberlin AN, Cahoon EB (2016) Plant sphingolipid metabolism and function. *Subcell Biochem* 86:249-286
- Luttgeharm KD, Kimberlin AN, Cahoon RE, Cerny RL, Napier JA, Markham JE, Cahoon EB (2015b) Sphingolipid metabolism is strikingly different between pollen and leaf in *Arabidopsis* as revealed by compositional and gene expression profiling. *Phytochemistry* 115:121-129
- Lynch DV, Dunn TM (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol* 161:677–702
- Magnin-Robert M, Le Bourse D, Markham J, Dorey S, Clément C, Baillieul F, Dhondt-Cordelier S (2015) Modifications of sphingolipid content affect tolerance to hemibiotrophic and necrotrophic pathogens by modulating plant defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 169: 2255-2274.
- Mamode Cassim A, Goughet P, Gronnier J, Laurent N, Germain V, Grison M, Boutté Y, Gerbeau-Pissot P, Simon-Plas F, Mongrand S (2019) Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog Lipid Res* 73: 1-27.
- 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 Commun Mass Spectrom* 21:1304-1314
- Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* 281:22684-22694
- Markham JE, Lynch DV, Napier JA, Dunn TM, Cahoon EB (2013) Plant sphingolipids: function follows form. *Curr Opin Plant Biol* 16:350-357
- Markham JE, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hématy K, Marion J, Belcram K, Palauqui JC, Satiat-JeuneMaître S, 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
- Mase K, Mizuno T, Ishihama N, Fuji T, Mori H, Kodama M, Yoshioka H (2012) Ethylene signaling pathway and MAPK cascades are required for AAL-toxin-induced programmed cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1015–1025
- Melotto M, Underwood W, He SY (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* 46:101–122
- Melser S, Batailler B, Peypelut M, Poujol C, Bellec Y, Wattelet-Boyer V, Maneta-Peyret L, Faure JD, Moreau P (2010) Glucosylceramide biosynthesis is involved in Golgi morphology and protein secretion in plant cells. *Traffic* 11:479–490
- Meng X, Zhang S (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol* 51:245-266
- Menke FL, van Pelt JA, Pieterse CM, Klessig DF (2004) Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:897-907

- Meuwly P, Métraux JP (1993) *Ortho*-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem* 214:500–505
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809–834
- Michaelson LV, Napier JA, Molino D, Faure JD (2016) Plant sphingolipids: their importance in cellular organization and adaptation. *Biochim Biophys Acta* 1861:1329–1335
- Michaelson LV, Zäuner S, Markham JE, Haslam RP, Desikan R, Mugford S, Albrecht S, Warnecke D, Sperling P, Heinz E, Napier JA (2009) Functional characterization of a higher plant sphingolipid delta4-desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149:487–498
- Mina JG, Okada Y, Wansadhipathi-Kannangara NK, Pratt S, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Steel PG, Fawcett T, Denny PW (2010) Functional analyses of differentially expressed isoforms of the *Arabidopsis* inositol phosphorylceramide synthase. *Plant Mol Biol* 73:399–407
- Mittal S, Davis KR (1995) Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol Plant Microbe Interact* 8:165–171
- Möbius N, Hertweck C (2009) Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Curr Opin Plant Biol* 12:390–398
- Moffat CS, Ingle RA, Wathugala DL, Saunders NJ, Knight H, Knight MR (2012) ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PLoS One* 7:e35995
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 279:36277–36286
- Mortimer JC, Yu XL, Albrecht S, Sicilia F, Huichalaf M, Ampuero D, Michaelson LV, Murphy AM, Matsunaga T, Kurz S, Stephens E, Baldwin TC, Ishii T, Napier JA, Weber APM, Handford MG, Dupree P (2013) Abnormal glycosphingolipid mannosylation triggers salicylic acid-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1881–1894
- Mou Z, Fan W, Dong X (2013) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935–944
- Msanne J, Chen M, Luttgeharm KD, Bradley AM, Mays ES, Paper JM, Boyle DL, Cahoon RE, Schrick K, Cahoon EB (2015) Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in *Arabidopsis*. *Plant J* 84:188–201
- Muir A, Ramachandran S, Roelants FM, Timmons G, Thorner J (2014) TORC2-dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids. *Elife* 3:e03779
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140:249–262
- Nawrath C, Heck S, Parinshawong N, Métraux JP (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14:275–286

- Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C (2007) SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. *Plant J* 50:128–139
- Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM (2001) Drought-induced guard cells signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410:596–599
- Palmer IA, Shang Z, Fu ZQ (2017) Salicylic-acid mediated plant defense: Recent developments, missing links and future outlook. *Front Biol* 12:258–270
- Pata MO, Hannun YA, Ng CKY (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the sphinx. *New Phytol* 185:611–630
- Peer M, Stegmann M, Mueller MJ, Waller F (2010) *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 584:4053–4056
- Peng Y, van Wersch R, Zhang Y (2018) Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Mol Plant Microbe Interact* 31: 403–409
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5:308–316
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:28.1–28.33
- Poovaiah B, Du L, Wang H, Yang T (2013) Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. *Plant Physiol* 163:531–542
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* 147:1347–1357
- Qiao H, Shen ZS, Huang C, Schmitz RJ, Urich MA, Briggs SP, Ecker JR (2012) Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science* 338:390–393
- Qin X, Zhang RX, Ge S, Zhou T, Liang YK (2017) Sphingosine kinase AtSPHK1 functions in fumonisin B1-triggered cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 119: 70–80
- Ranf S, Eschen-Lippold L, Pecher P, Lee J, Scheel D (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J* 68:100–113
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 25:237–245
- Reitz MU, Gifford ML, Schäfer P (2015) Hormone activities and the cell cycle machinery in immunity-triggered growth inhibition. *J Exp Bot* 66:2187–2197
- Rennie EA, Ebert B, Miles GP, Cahoon RE, Christiansen KM, Stonebloom S, Khatab H, Twell D, Petzold CJ, Adams PD, Dupree P, Heazlewood JL, Cahoon EB, Scheller HV (2014) Identification of a sphingolipid α -glucuronosyltransferase that is essential for pollen function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26:3314–3325
- Rivas-San Vicente LM (2001) Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisin B1. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 99 pp

- Rivas-San Vicente LM (2004) Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 99 pp
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot* 62:3321–3338
- Rivas-San Vicente M., Larios-Zarate G., Plasencia J. (2013) Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Planta* 237:121-136
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 49: 26.1–26.27
- Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, Després C (2006) The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 18:3670-3685
- Roelants FM, Breslow DK, Muir A, Weissman JS, Thorner J (2011) Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:19222–19227
- Rooney HC, Van't Klooster JW, van der Hoorn RA, Joosten MH, Jones JD, de Wit PJ (2005) *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308:1783-1786
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 15:247–258
- San Juan Badillo A (2001) Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 110 pp
- Sánchez-Rangel D (2012) La fumonisina B1 es un factor de virulencia que modula la respuesta de defensa en maíz durante la infección con *Fusarium verticillioides*. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM. 127 pp
- Sánchez-Rangel D, Plasencia J (2010) The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Rev* 29:73–86
- Sánchez-Rangel D, Rivas-San Vicente M, de la Torre-Hernández ME, Nájera-Martínez M, Plasencia J (2015) Deciphering the link between salicylic acid signaling and sphingolipid metabolism. *Front Plant Sci* 6:125
- Saucedo-García M, Guevara-García A, González-Solís A, Cruz-García F, Vázquez-Santana S, Markham JE, Lozano-Rosas MG, Dietrich CR, Ramos-Vega M, Cahoon EB, Gavilanes-Ruiz 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 Phytol* 191:943–957
- Selbmann L, Stingle F, Petruccioli M (2003) Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84:135-145
- Seviour RJ, Stasinopoulos SJ, Auer PF, Gibbs PA (1992) Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Rev Biotech* 12:279-298
- Seybold H, Trempel F, Ranf S, Scheel D, Romeis T, Lee J (2014) Ca²⁺ signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca²⁺ decoding mechanisms. *New Phytol* 204:782–90

- Seyfferth C, Tsuda K (2014) Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front Plant Sci* 5:697
- Shah J, Tsui F, Klessig DF (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:69–78
- Shan L, He P, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB, Sheen J (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* 4:17-27
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun YA, Zuo J (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res* 17:1030–1040
- Simanshu DK, Zhai X, Munch D, Hofius D, Markham JE, Bielawski J, Bielawska A, Malinina L, Molotkovsky JG, Mundy JW, Patel DJ, Brown RE (2014) *Arabidopsis* accelerated cell death 11, ACD11, is a ceramide-1-phosphate transfer protein and intermediary regulator of phytoceramide levels. *Cell Rep* 6:388-399
- Spassieva SD, Markham JE, Hille J (2002) The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J* 32:561–572
- Sperling P, Franke S, Lüthje S, Heinz E (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem* 43:1031–1038
- Spoel SH, Dong X (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3:348–351
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18842–18847
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, van Loon L, Dong X, Pieterse CM (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760–770
- Spoel SH, Mou ZL, Tada Y, Spivey NW, Genshik P, Dong X (2009) Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* 137:860-872
- Steele JA, Uchytel TF, Durbin RD, Bhatnagar PK, Rich DH (1978) The stimulation of coupling factor 1 ATPase by tentoxin and its analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 84:215-218
- Stergiopoulos I, de Wit PJ (2009) Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47:233-263
- Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 12:1811–1822
- Takahashi F, Mizoguchi T, Yoshida R, Ichimura K, Shinozaki K (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 41:649–660
- Takahashi Y, Berberich T, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Kusano T, Terauchi R (2009a) Unraveling the roles of sphingolipids in plant innate immunity. *Plant Signal Behav* 4:536–538
- Takahashi Y, Berberich T, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Tomonobu K, Terauchi R (2009b) Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in nonhost resistance. *Mol Plant Microbe Int* 22:31–38

- Tamura K, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I, Imai H (2001) Characterization of an Arabidopsis cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 42:1274–1281
- Tartaglio V, Rennie EA, Cahoon R, Wang G, Baidoo E, Mortimer JC, Cahoon EB, Scheller HV (2017) Glycosylation of inositol phosphorylceramide sphingolipids is required for normal growth and reproduction in Arabidopsis. *Plant J* 89:278-290
- Teng C, Dong H, Shi L, Deng Y, Mu J, Zhang J, Yang X, Zuo J (2008) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146:1322–1332
- Ternes P, Feussner K, Werner S, Lerche J, Iven T, Heilmann I, Riezman H, Feussner I (2011) Disruption of the ceramide synthase LOH1 causes spontaneous cell death in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 192:841– 854
- Ternes P, Franke S, Zähringer U, Sperling P, Heinz E (2002) Identification and characterization of a shingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* 277:25512-25518
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448:661–665
- Thomma BP (2003) *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol Plant Pathol* 4:225-236
- Thulasi DK, Li X, Zhang Y (2018) MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cell Mol Life Sci* 75:2981-2989
- Thuleau P, Aldon D, Cotelte V, Brière C, Ranty B, Galaud JP, Mazars C (2013) Relationships between calcium and sphingolipid-dependent signaling pathways during the early steps of plant-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta* 1833:1590-1594
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141:373–378
- Townley HE, McDonald K, Jenkins GI, Knight MR, Leaver CJ (2005) Ceramides induce programmed cell death in Arabidopsis cells in a calcium-dependent manner. *Biol Chem* 386:161–166
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 20:955-965
- van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MH, Vervoort J, de Wit PJ (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolisis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1420-1430
- Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk MC, Rodenbug N, Pauwels L, Goossens A, Körbes OP, Memelink J, Ritsema T, Van Wees SC, Pieterse CM (2013) Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* 25:744–761
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162

- Verhage A, Vlaardingerbroek I, Raaymakers C, Van Dam NM, Dicke M, Van Wees SC, Pieterse CM (2011) Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Front Plant Sci* 2:47
- Verma V, Ravindran P, Kumar PP (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* 16:86
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47:177–206
- Wang C, Liu Y, Li SS, Han GZ (2015) Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery. *Plant Physiol* 167:872–886
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* 2:e123
- Wang KL, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell Suppl*:S131–151
- Wang L, Tsuda K, Sato M, Cohen JD, Katagiri F, Glazebrook J (2009) *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* 5:e1000301
- Wang L, Tsuda K, Truman W, Sato M, Nguyen le V, Katagiri F, Glazebrook J (2011) CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. *Plant J* 67: 1029–1041
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:3163–3179
- Wangdi T, Uppalapati SR, Nagaraj S, Ryu CM, Bender CL, Mysore KS (2010) A virus-induced gene silencing screen identifies a role for Thylakoid Formation1 in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* symptom development in tomato and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152:281–292
- Watanabe N, Lam E (2011) *Arabidopsis* metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *Plant J* 66:969–982
- Wen X, Zhang C, Ji Y, Zhao Q, He W, An F, Jiang L, Guo H (2012) Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res* 22:1613–1616
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414:562–565
- Willemsen V, Frimi J, Grebe M, van der Toorn A, Palme K, Scheres B (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require *STEROL METHYLTRANSFERASE1* function. *Plant Cell* 15:612–625
- Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annu Rev Phytopathol* 40:251–285
- Wu J, Qin X, Tao S, Jiang X, Liang YK, Zhang S (2014) Long-chain base phosphates modulate pollen tube growth via channel-mediated influx of calcium. *Plant J* 79: 507–516.
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep* 1: 639–647.

- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, Zhou JM (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* 18:74-80
- Yu X, Feng B, He P, Shan L (2017) From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu Rev Phytopathol* 55:109-137
- Yun MH, Torres PS, El Oirdi M, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K, Vojnov AA (2006) Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol* 141:178-187
- Zander M, Chen S, Imkampe J, Thurow C, Gatz C (2012) Repression of the *Arabidopsis thaliana* jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif. *Mol Plant* 5:831-840
- Zäuner S, Ternes P, Warnecke D (2010) Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Adv Exp Med Biol* 688:249-263
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou JM (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1:175-185
- Zhang L, Jia C, Liu L, Zhang Z, Li C, Wang Q (2011) The involvement of jasmonates and ethylene in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin-induced tomato cell death. *J Exp Bot* 62:5405-5418
- Zhang Y, Cheng YT, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X (2006) Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs. *Plant J* 48:647-656
- Zhang Y, Fan w, Kinkema M, Li X, Dong X (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6523-6528
- Zhao C, Nie H, Shen Q, Zhang S, Lukowitz W, Tang D (2014) EDR1 physically interacts with MKK4/MKK5 and negatively regulates a MAP kinase cascade to modulate plant innate immunity. *PLoS Genetics* 10:e1004389
- Zheng XY, Spivey NW, Zeng W, Liu PP, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X (2012) Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11:587-596
- Zhou T, Wang Y, Chen JQ, Araki H, Jing Z, Jiang K, Shen J, Tian D (2004) Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Mol Genet Genomics* 271:402-415
- Zipfel C (2008) Pattern recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Plant Immunol* 20:10-16

XI. ANEXOS

Anexo A. Secuencias de cebadores usados para la construcción de vectores virales y ensayos de RT-PCR semicuantitativos.

| Cebadores | Fw (5'-3') | Rv (5'-3') |
|------------------|---------------------------|-----------------------------|
| LCB2_1069 | CATACTTGACCGCCTTGACA | AATTCGAGCCAGCTTCTGAG |
| LCB2_602 | CATACTTGACCGCCTTGACA | AGACCCTCGAGCACCATTTA |
| LCB2_256 | GGGAGTCTGTGAGCTCTTGG | AATTCGAGCCAGCTTCTGAG |
| LCB2-BamHI* | CGGGATCCCGCATACTTGACCGCCT | |
| LCB2-HindIII* | | CCCAAGCTTGGGAGACCCTCGAGCACC |
| TRV | GCTGCTAGTTCATCTGCAC | GCACGGATCTACTTAAAGAAC |
| TRV_Mp | CAAATCTAGGGGCCATTGAA | GGCGCCTAGTCGAATCAGTA |
| TRV_Cp | TTGGGTGGAATCAGTTTCGT | TCTTCCAAAGTCGAGCCAGT |
| NbPR-1 | ATGCGCAAAATTATGCTTCC | CCTAGCACATCCAACACGAA |
| NbPR-2 | GCTGCCCTTGACTTGTTGG | TACTATCTTTGGGCGGGTTG |
| NbPR-3 | GCCAATTCCTTTCCTGGTTT | ATCTTCCACTGCGTCATTCC |
| NbLOX | CACCAACTCGTCAACCACTG | AAACTGCATATTCGGGATCG |
| NbEF1 α | ACCCTGACAAGATCCCCTTT | GGAGTTGGAAGCAACAAACC |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC | |
| ITS5 | | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG |

*Usados para la clonación direccionada en el vector viral pTV:00.

Anexo B. Composición del medio nutritivo para *A. tumefaciens* C58C1, soluciones y antibióticos usados para el VIGS de la SPT.

Medio nutritivo para *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

Se disolvieron los siguientes compuestos en 250 mL de agua desionizada en el siguiente orden:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.075 g |
| Sacarosa | 2.5 g |
| Caseína | 1 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g |

El medio nutritivo se esterilizó durante 15 min en autoclave, se enfrió a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C.

Antibióticos de selección

En tubos eppendorf de 1.5 mL estériles se preparó 1 mL de **kanamicina** y **tetraciclina (20mg/mL)** con agua desionizada estéril y se almacenaron a -20°C.

Acetosiringona 100 mM

Se preparó 1 mL disolviéndola en DMSO (dimetil sulfóxido) y se almacenó a 4°C protegida de la luz (fotosensible).

MgCl₂ 1 M y MES (ácido 2-morfolino etano sulfónico) 250 mM pH 5.8

Se prepararon 50 mL de cada solución, el MgCl₂ 1 M se esterilizó en autoclave durante 15 min, y el MES 250 mM pH 5.8 por filtración.

Anexo C. Comparación de las regiones del cDNA de *LCB2* usadas para el VIGS de la SPT en *Nicotiana benthamiana*.

| No. acceso GenBank | Vector viral | Fragmento de cDNA usado | Referencia |
|--------------------|--------------|--|---------------------------------|
| EU117119 | PVX | 899-1202 (303 bases del extremo C-terminal) | Gan et al., 2009 |
| AB378334 | TRV | 1-527 (extremo N-terminal) | Takahashi et al., 2009b |
| AM902524 | TRV | 34-636 (602 bases del extremo N-terminal) | Rivas et al., 2013 (Anexo F) |

```

1
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
.....
81
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
.....at gatcaccatt ccatatttga cgccttgac aacttacttc agctatggcc tgctcttcgc ctttggccaa
161
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
.....at gatcaccatt ccatatttga cgccttgac aacttacttc agctatggcc tgctcttcgc ctttggccaa
240
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
TTCCGTGATT TCTTCAGAAA AATCTTTGAT TGGTGGAGGC CACGCAATCT TCAGGGATAT GCTCCGATCT GCTTAGGACT
241
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
TGAAGATTC TACATCCGCC GATTGTATCA TCGCATTAG GATTGTTTTG GACGGCCAAT ATGTAGTCTT CCTGATGCTT
321
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
GGTTCGATGT GGTGGAGCGT GTGTCCAATG ACAATAACAA GACACTAAAG CGGACCACAA AAGTTTCAAG GTGCCTAAAC
401
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
TTGGGTTTCA ACAATTACCT TGGTTTTGCT GCATCTGATG AATATTGTAC ACCTCGGTC ATTGAGTCTT TGAAAAAGTT
481
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
TTCTGCAAGC ACTTGCAAGT CCGAGTAGA CGGAGGTACC ACAAGCATCC ATACGGAATT GGAAGAATGT GTGGCTAATT
561
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
TTGTTGGCAA GCCAGCTGCC ATCGTTACAG GCATGGGTTA TGTAACAAAT TCAGCCATAC TTCTGTTTT GATTGGGAAG
641
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
GGAGGTTTGA TTATCAGCGA CTCTCTCAAC CACAACCTTA TTGTAATGG TGCTCGAGGG TCTGGAGCTA CTATTCGTGT
721
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah
NbLCB2_Rivas
Consensus
TTTTCAACAT AACACACCTT CTCACTTGA GAAGGTTTTA AGAGAACATA TTGCTGAGGG ACAACCCAGA ACACACAGGC

```

```

801
NbLCB2_Gan CGTGGGAAGAA GATAGTTGTT ATAGTGGAGG GCATATACAG CATGGAAGGG GAGCTATGCC AGCTTCCGGA GATTGTTGCC 880
NbLCB2_Takah CGTGGGAAGAA GATAATTGTT ATAGTGGAGG GCATATACAG CATGGAAGGG GAGCTATGCC AGCTTCCGGA GATTGTTGCT
NbLCB2_Rivas CGTGGGAAGAA GATAATTGTT ATAGTGGAGG GCATATACAG CATGGAAGGG GAGCTATGCC AGCTTCCGGA GATTGTTGCT
Consensus CGTGGGAAGAA GATAATTGTT ATAGTGGAGG GCATATACAG CATGGAAGGG GAGCTATGCC AGCTTCCGGA GATTGTTGCT
881
NbLCB2_Gan ATATGCAAGA AATACAAGGC ATATGTTTAT TTGGACGAGG CTCACAGCAT TGGAGCTGTT GGAAAAACAG GAAGGGGGGT 960
NbLCB2_Takah ATATGCAAGA AATACAAGGC ATATGTTTAT TTGGATGAGG CTCACAGCAT TGGAGCTGTT GGAAAAACAG GAAGGGGGGT
NbLCB2_Rivas ATATGCAAGA AATACAAGGC ATATGTTTAT TTGGATGAGG CTCACAGCAT TGGAGCTGTT GGAAAAACAG GAAGGGGGGT
Consensus ATATGCAAGA AATACAAGGC ATATGTTTAT TTGGATGAGG CTCACAGCAT TGGAGCTGTT GGAAAAACAG GAAGGGGGGT
961
NbLCB2_Gan CTGTGAGCTC TTGGGAGTTG ACACGGCTGA TGTGGACATT ATGATGGGAA CTTTCACAAA GTCATTTGGT TCATGTGGGG 1040
NbLCB2_Takah CTGTGAGCTC TTGGGAGTTG ACACGGCTGA TGTGGACATT ATGATGGGAA CTTTCACAAA GTCATTTGGT TCATGTGGGG
NbLCB2_Rivas CTGTGAGCTC TTGGGAGTTG ACACGGCTGA TGTGGACATT ATGATGGGAA CTTTCACAAA GTCATTTGGT TCATGTGGGG
Consensus CTGTGAGCTC TTGGGAGTTG ACACGGCTGA TGTGGACATT ATGATGGGAA CTTTCACAAA GTCATTTGGT TCATGTGGGG
1041
NbLCB2_Gan GTTATATTGC TGGATCCAAA GAACTTATTG AATTTTTGAA GTACACTTGC CCAGCTCATC TGTATGCCAC ATCAATATCA 1120
NbLCB2_Takah GTTATATTGC TGGATCCAAA GAACTTATTG AATTTTTGAA GCACACTTGC CCAGCTCATC TGTATGCCAC ATCAATATCA
NbLCB2_Rivas GTTATATTGC TGGATCCAAA GAACTTATTG AATTTTTGAA GCACACTTGC CCAGCTCATC TGTATGCCAC ATCAATATCA
Consensus GTTATATTGC TGGATCCAAA GAACTTATTG AATTTTTGAA GcACACTTGC CCAGCTCATC TGTATGCCAC ATCAATATCA
1121
NbLCB2_Gan CCTCCAGCTG CCCAACAAAT CATTCTGCT ATCAAGGTTA TACTTGGTGA AGATGGTCT AGTAGAGGGG CTCAGAAACT 1200
NbLCB2_Takah CCTCCAGCTG CCCAACAAAT CATTCTGCT ATCAAGGTTA TACTTGGTGA AGATGGTCT AGTAGAGGGG CTCAGAAACT
NbLCB2_Rivas CCTCCAGCTG CCCAACAAAT CATTCTGCT ATCAAGGTTA TACTTGGTGA AGATGGTCT AGTAGAGGGG
Consensus CCTCCAGCTG CCCAACAAAT CATTCTGCT ATCAAGGTTA TACTTGGTGA AGATGGTCT AGTAGAGGGG ctcagaaaact
1201
NbLCB2_Gan GGCACGCATT CGTGAAAATA GCAATTTTTT CCGATCAGAA CTGCAGAAGA TGGGTTTTGA AGTCCTTGGG GACAAATGATT 1280
NbLCB2_Takah TGACACGCATT CGTGAAAATA GCAATTTTTT CCGATCAGAA CTGCAGAAGA TGGGTTTTGA AGTCCTTGGG GACAAATGATT
NbLCB2_Rivas
Consensus .gcacgcatt cgtgaaaata gcaatTTTTT ccgatcagaa ctgcagaaga tgggTTTTga agtccTTggg gacaatgatt
1281
NbLCB2_Gan CTCCTGTGAT GCCCATCATG CTCTACAATC CTGCAAAAAT ACCTGCTTTT TCACGGGAAT GTCTCAAACA GAATGTGGCC 1360
NbLCB2_Takah CTCCTGTGAT GCCCATCATG CTCTACAATC CTGCAAAAAT ACCTGCTTTT TCACGGGAAT GTCTCAAACA GAATGTGGCC
NbLCB2_Rivas
Consensus ctcctgtgat gcccatcatg ctctacaatc ctgcaaaaat acctgctttt tcacgggaat gtctcaaaca gaatgtggcc
1361
NbLCB2_Gan GTAGTGATTG TTGGTTTTCC AGCAACCCCT TTACTTTTGG CCAGAGCACG CATATGTATT TCTGCTGCTC ACTCACGGGA 1440
NbLCB2_Takah GTAGTGATTG TTGGTTTTCC AGCAACCCCT TTACTTTTGG CCAGAGCACG CATATGTATT TCTGCTGCTC ACTCACGGGA
NbLCB2_Rivas
Consensus gtagtgattg ttggTTTTcc agcaacccct ttactTTTTgg ccagagcacg catatgtatt tctgctgctc actcacggga
1441
NbLCB2_Gan AGATCTTAAC AAAGCACTGG AGGTTATCAG CAGAGTTGGT GATCTAGTTG GCATAAAATA CTTCCCGCT GAGCCCAAGA 1520
NbLCB2_Takah AGATCTTAAC AAAGCACTGG AGGTTATCAG CAGAGTTGGT GATCTAGTTG GCATAAAATA CTTCCCGCT GAGCCCAAGA
NbLCB2_Riv
Consensus agatcttaac aaagcactgg aggttatcag cagagttggg gatctagttg gcataaaata cttccccgct gagcccaaga
1521
NbLCB2_Gan AACACAGCT TGAAGAAAAC AGAGTCAAGC TGGAATGA 1600
NbLCB2_Takah AACACAGCT AGAAGAAAAT AGAGTCAAGC TGGAATGATT ACTGTAGTTT TATTTTAGTT CTCCGAAGGA GTTTCGAGC
NbLCB2_Rivas
Consensus aacaacagct .gaagaaaa. agagtcaagc tggaatga.. ..... 1651
NbLCB2_Gan
NbLCB2_Takah TGTTGTTTAT TGTTTCATGA TGATTTTGA ATCCTTTGGA TATGATGTGT G
NbLCB2_Rivas
Consensus .....

```

Figura 20. Secuencias reportadas en Genbank del cDNA de *NbLCB2* indicando los fragmentos empleados para el VIGS de la SPT.

Anexo D. Movimiento sistémico del virus TRV durante el VIGS de la subunidad LCB2 de la SPT en *N. benthamiana*.

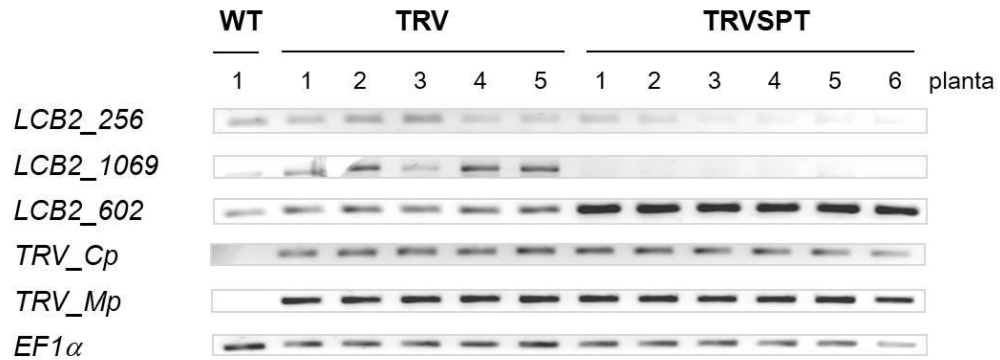


Figura 21. La replicación y movimiento sistémico de TRV se confirmó a los 20 días posteriores a la agroinfiltración por la expresión de las proteínas de la cápside (TRV_Cp) y de movimiento (TRV_Mp) en hojas no inoculadas. Con los cebadores LCB2_1069 y LCB2_256 que amplifican la secuencia casi completa del cDNA de *NbLCB2* o un fragmento de su extremo C-terminal, respectivamente, se observó una eficiencia de silenciamiento aproximadamente del 50%. Sin embargo, con los cebadores LCB2_602 se detectó la expresión de *NbLCB2* y del inserto en el RNA viral.

Anexo E. Susceptibilidad de tallos de plantas de *N. benthamiana* TRVSPT a *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.

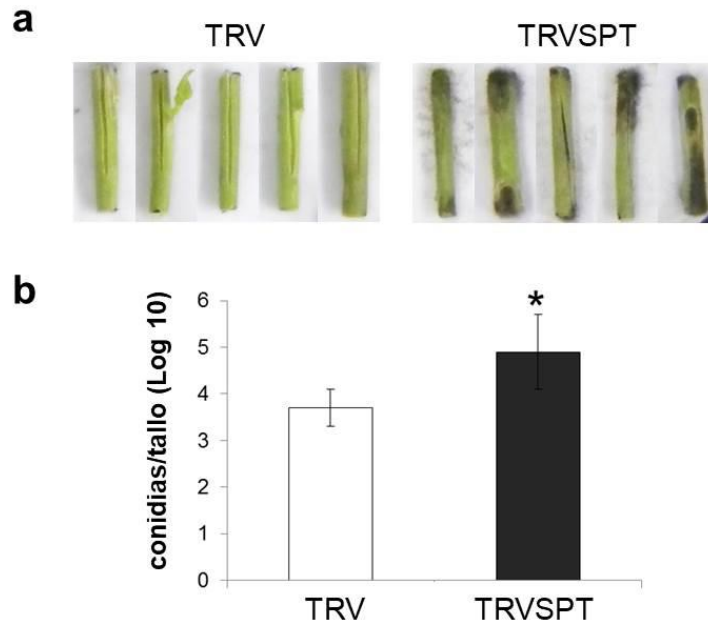


Figura 22. Desarrollo y proliferación de *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* en *N. benthamiana* asociados al VIGS de la SPT. **a)** Fragmentos de tallos de plantas TRV y TRVSPT inoculados con 1×10^3 conidias y mantenidos en cámaras húmedas separadas a 22°C. Las fotografías fueron tomadas a los 6 dpi. Los controles inoculados con agua estéril no desarrollaron síntomas de infección (datos no mostrados). **b)** Análisis cuantitativo de la producción de esporas. Para coleccionar las conidias cada tallo fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le añadió 1 mL de agua, se agitó vigorosamente y posteriormente se hizo el conteo en un hematocitómetro. Los valores corresponden a la media de 40 piezas y son representativos de dos ensayos independientes. El asterisco refiere diferencia significativa que fue calculada por la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.01$) (Tomado de Larios-Zárate, 2012).

Anexo F. Publicaciones derivadas durante los estudios de Doctorado.

Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*

Mariana Rivas-San Vicente · Guadalupe Larios-Zarate · Javier Plasencia

Received: 6 July 2012 / Accepted: 29 August 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Sphingolipids play an important role in signal transduction pathways that regulate physiological functions and stress responses in eukaryotes. In plants, recent evidence suggests that their metabolic precursors, the long-chain bases (LCBs) act as bioactive molecules in the immune response. Interestingly, the virulence of two unrelated necrotrophic fungi, *Fusarium verticillioides* and *Alternaria alternata*, which are pathogens of maize and tomato plants, respectively, depends on the production of sphinganine-analog mycotoxins (SAMs). These metabolites inhibit de novo synthesis of sphingolipids in their hosts causing accumulation of LCBs, which are key regulators of programmed cell death. Therefore, to gain more insight into the role of sphingolipids in plant immunity against SAM-producing necrotrophic fungi, we disrupted sphingolipid metabolism in *Nicotiana benthamiana* through virus-induced gene silencing (VIGS) of the serine palmitoyltransferase (SPT). This enzyme catalyzes the first reaction in LCB synthesis. VIGS of SPT profoundly affected *N. benthamiana* development as well as LCB composition of sphingolipids. While total levels of phytosphingosine decreased, sphinganine and sphingosine levels increased in SPT-silenced plants, compared with control plants. Plant immunity was also affected as silenced plants accumulated salicylic acid (SA), constitutively expressed the SA-inducible *NbPR-1* gene and showed increased

susceptibility to the necrotroph *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. In contrast, expression of *NbPR-2* and *NbPR-3* genes was delayed in silenced plants upon fungal infection. Our results strongly suggest that LCBs modulate the SA-dependent responses and provide a working model of the potential role of SAMs from necrotrophic fungi to disrupt the plant host response to foster colonization.

Keywords Fumonisin · Long-chain bases · Plant immunity · Serine palmitoyltransferase · Sphinganine-analog mycotoxins

Abbreviations

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| SPT | Serine palmitoyltransferase |
| LCB | Long-chain base |
| d18:0 | Sphinganine |
| d18:1(Δ 4) | Sphingosine |
| t18:0 | Phytosphingosine |
| SAMs | Sphinganine-analog mycotoxins |
| FB1 | Fumonisin B1 |
| JA | Jasmonic acid |
| PCD | Programmed cell death |
| VIGS | Virus-induced gene silencing |
| PR | Pathogenesis-related |
| SA | Salicylic acid |

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-012-1758-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Rivas-San Vicente · G. Larios-Zarate · J. Plasencia (✉)
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 Mexico, D.F., Mexico
e-mail: javierp@unam.mx

Introduction

Long-chain bases (LCBs) are metabolic precursors of complex sphingolipids, whose predominant forms in plants are C18 aminoalcohols differing by modifications at C4 (*E*-desaturation, hydroxylation) and at C8 (*E/Z*-desaturation). Biosynthesis of LCBs involves the condensation between

L-serine and palmitoyl-CoA in a reaction catalyzed by the serine palmitoyltransferase (SPT), a heterodimeric enzyme composed of two subunits named LCB1 and LCB2. The first LCB produced in plants is sphinganine, which is fully saturated and contains two hydroxyl groups. Sphinganine can be further modified by the addition of a hydroxyl group at C4 to yield phytosphingosine, and/or by introduction of double bonds at C4 and C8 to produce other LCBs (Lynch and Dunn 2004; Chen et al. 2009).

LCBs play prominent roles in signal transduction pathways regulating many aspects of plant development including cell growth, proliferation, differentiation, and cell death (Worrall et al. 2003; Sperling and Heinz 2003; Chen et al. 2006, 2008; Shi et al. 2007; Dietrich et al. 2008; Teng et al. 2008; Saucedo-García et al. 2011), as well as responses to abiotic (Ng et al. 2001; Coursol et al. 2003; Chen et al. 2012; Dutilleul et al. 2012) and biotic stress (Koga et al. 1998; Suharsono et al. 2002; Wang et al. 2008; Takahashi et al. 2009; Peer et al. 2010).

The relevance of sphingolipids in plant immunity has been known for some time but in recent years there have been major breakthroughs. Sphingolipids from the fungal pathogen *Magnaporthe grisea* induced phytoalexin accumulation, cell death, and increased resistance to infection in rice cells (Koga et al. 1998). In this sphingolipid-mediated response, a heterotrimeric G protein and the small GTPase OsRac1 activate the OsMAPK6 transduction pathway (Suharsono et al. 2002; Lieberherr et al. 2005). In *Nicotiana benthamiana*, sphingolipid biosynthesis is crucial at early stages of the resistance defense response as evidenced by the fact that the gene for the SPT LCB2 subunit is strongly induced upon infection with the non-host pathogen *Pseudomonas cichorii*, but only a minor and transient induction is observed in response to the host pathogen *P. syringae* pv. *tabaci* (Takahashi et al. 2009). In *Arabidopsis* leaves inoculated with *P. syringae* a higher and sustained increase of phytosphingosine levels occurs in an incompatible interaction that leads to resistance, as compared with the compatible one (Peer et al. 2010). This body of evidence suggests that LCBs are early transducers required for plants' immune response. Under this new role for sphingolipids, it is relevant to analyze the cases of two unrelated genera of necrotrophic fungi, *Fusarium verticillioides* and *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, which have evolved to produce sphinganine-analog mycotoxins (SAMs) that disrupt sphingolipid biosynthesis (Gilchrist and Grogan 1976; Desjardins et al. 1995; Akamatsu et al. 1997).

Alternaria alternata f. sp. *lycopersici* is the causal agent of tomato stem canker, and it can also infect leaves, stems, and fruits (Gilchrist and Grogan 1976). *F. verticillioides* is a non-obligate plant pathogen commonly associated with maize, causing root, stalk, and ear rot (Kommedahl and Windels 1981). The role of SAM production in

pathogenicity has been demonstrated for both pathogens [reviewed by Sánchez-Rangel and Plasencia (2010)]. When a *Fusarium musae* strain that neither colonizes maize nor produces SAMs is transformed with the entire *FUM* cluster responsible for FB1 production, it synthesizes the toxin and infects maize seedlings (Glenn et al. 2008). *A. alternata* f. sp. *lycopersici* pathogenicity depends on the production of another SAM, the AAL-toxin, to infect susceptible tomato plants (Gilchrist and Grogan 1976; Akamatsu et al. 1997).

SAMs competitively inhibit ceramide synthase activity in distinct plant species including *Arabidopsis*, causing significant accumulation of LCBs which in turn induces programmed cell death (PCD) (Abbas et al. 1994; Spassieva et al. 2002; Shi et al. 2007; Saucedo-García et al. 2011). SAM-induced PCD in *Arabidopsis* resembles the hypersensitive response (HR) triggered in plant cells at the site of pathogen infection, which includes ROS accumulation, callose deposition, and a dose-dependent induction of defense-related gene expression (Stone et al. 2000; Gechev et al. 2004). Hypersensitive cell death is an effective defense response against biotrophic pathogens that derive nutrients from living host tissues, but not against necrotrophic pathogens as they benefit from host cell death (Glazebrook 2005).

The activation of effective defense responses against biotrophs and necrotrophs is finely regulated by phytohormones (Glazebrook 2005; Spoel and Dong 2008; Pieterse et al. 2009, 2012). Upon pathogen attack, the phytohormone concentration and/or sensitivity change depending mainly on the lifestyle and infection strategy of the invading pathogen. Salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethylene (ET) are considered the primary signals in the regulation of the plant defense response. The SA-dependent pathway is typically effective against biotrophic pathogens, whereas the JA-/ET-dependent pathways counteract necrotrophic pathogens (Glazebrook 2005). Mostly, these signaling pathways cross-communicate in an antagonistic or synergistic manner, activating a specific set of defense-related genes that eventually determine the outcome of the immune response (Pieterse et al. 2012). Interestingly, some evidence suggests an association between sphingolipid-mediated signaling and phytohormones in plant immunity. The FB1-induced PCD in *Arabidopsis* is accompanied by the induction of JA-, ET-, and SA-dependent genes (Asai et al. 2000; Stone et al. 2000). Likewise, AAL-toxin-induced PCD in tomato also requires the JA and ET signaling pathways (Egusa et al. 2009; Zhang et al. 2011; Mase et al. 2012).

In order to gain more insight into the role of sphingolipids in the defense response against necrotrophs, we used virus-induced gene silencing (VIGS) of SPT LCB2 subunit to disrupt sphingolipid biosynthesis in *N. benthamiana*. Silencing of SPT altered the cellular content of LCBs and

provoked a notable increase in the total levels of sphinganine and sphingosine, compared to control plants infiltrated with the viral vector. LCB elevation caused SA accumulation and constitutive expression of *NbPR-1*, the canonical marker of SA signaling. Moreover, SPT-silenced *N. benthamiana* plants became susceptible to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* infection, which was associated with an ameliorated expression of defense genes and possibly with the activation of SA-dependent responses. Our results provide genetic and biochemical evidence that the elevation of endogenous LCBs activates SA-dependent responses, and suggest that SAMs role in fungal virulence is to induce PCD, and possibly to subvert the signaling pathways required for disease resistance.

Materials and methods

Plant materials and growth conditions

Nicotiana benthamiana plants were grown in plastic pots containing a mixture of Sunshine Mix 4 and vermiculite (2:1 ratio), in a glasshouse set at 25 °C day temperature under natural photoperiod. For seedlings treatment with FB1, sphinganine, or SA, *N. benthamiana* wild-type seeds were surface-sterilized in 2.5 % sodium hypochlorite containing 0.05 % Tween20, rinsed three times in sterile water, and imbibed on GB-5 medium supplemented with 0.75 % sucrose and 0.8 % agar. Seeds were germinated and grown for 10 days in a Lab-Line growth chamber at 22 °C under 8 h light/16 h dark cycle (GE lamps, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Seedlings were transferred to fresh medium supplemented with 5 μM FB1, 25 μM sphinganine, or 0.5 mM SA. Control seedlings were transferred to GB5 medium with 0.1 % methanol or 0.05 % ethanol, as they were used to prepare stock solutions of SA and sphinganine, respectively. Leaves were collected after 24 and 48 h, and immediately frozen in liquid nitrogen for RNA extraction.

Chemicals

FB1, LCBs (phytosphingosine, sphinganine, and sphingosine), and SA were purchased from Sigma Chemical Company. A FB1 stock solution (1 mM) was prepared in water, a 50 mM solution of each LCB was prepared in absolute ethanol, and a SA stock solution (125 mM) was prepared in 50 % methanol. For HPLC analysis, HPLC-grade solvents (J.T. Baker), and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA; Fluka) were employed. NDA stock solution (20 mM) was prepared in acetonitrile. Stock solutions were protected from light and stored at -20 °C, except the FB1 stock solution that was stored at 4 °C.

VIGS of *NbLCB2*

The TRV vector was kindly provided by Dr. David Baulcombe from the Sainsbury Laboratory (Norwich, UK, <http://www.tsl.ac.uk>). A 602-bp cDNA fragment of the N-terminal region of *NbLCB2* was amplified from total RNA of *N. benthamiana* leaves with the *LCB2_602* primers listed in Supplementary Table S1. This fragment was cloned into pGEM-T Easy vector (Promega), sequenced and reamplified with the *LCB2-BamHI* and *LCB2-HindIII* primers. The resulting product was digested with *BamHI* and *HindIII* and cloned into the pTRV vector. The new plasmid was named pTRVSPT. *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 was transformed with the pTRVSPT construct by electroporation. Cultures of *A. tumefaciens* C58C1 containing pBIN-TRA6, pTRV, or pTRVSPT were used to infiltrate leaves of *N. benthamiana* plants at 5-leaf stage using a needleless syringe (Ratcliff et al. 2001). Plants were grown for 4 weeks and evidence of gene silencing of *NbLCB2* was obtained by semi-quantitative RT-PCR using two different primer sets: *LCB2_1069* and *LCB2_256*. Viral replication and systemic infection were confirmed with *TRV_Cp* and *TRV_Mp* primers. All primer sets used in this study are listed in Supplementary Table S1.

Sphingolipids extraction and total LCBs quantification

Total LCBs from leaves of TRV and TRVSPT plants were extracted following the method described by Markham et al. (2006) and 1 nmol of d20:1 was used as internal standard per sample. Approximately 15- to 20-leaf disk per plant were employed so a representative sample was collected. Sphingolipids were hydrolyzed for 16 h at 110 °C in 10 % barium hydroxide. LCBs were extracted with 2 mL of diethylether and the lipid extract was redissolved in 200 μL of ethanol. NDA derivatization was accomplished by adding the following stock solutions: 140 μL of 25 mM sodium tetraborate buffer pH 9.5, 30 μL of 2.5 mM KCN, and 10 μL of 2.5 mM NDA. The tube was sealed with PTFE film and heated at 60 °C for 20 min. LCBs were quantified based on the recovery of the d20:1 standard. The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ADVP pump, a RF-10AXL fluorescence detector, and a CR5A integrator. Derivatized LCBs were separated in a SUPELCO C18 column (15 cm \times 4.6 mm, 5 μm) using 94 % acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 1.2 mL min^{-1} . Fluorescent derivatives were monitored at λ_{exc} of 419 nm and λ_{em} of 493 nm.

Alternaria sp. isolation and identification

Alternaria sp. was isolated from leaves of TRVSPT plants showing disease symptoms. Briefly, the leaves were placed on potato dextrose agar medium (PDA) and incubated for

5 days at room temperature under fluorescent light. Fungal colonies were transferred to PDA agar and incubated under the same conditions for 5–7 days. A single-spore isolate was obtained by preparing a spore suspension from the PDA culture in 10 mL of sterile water and streaking a loopful on water agar. The isolate was named A2SS and the identification was based on its macroscopic and microscopic characteristics. This was further confirmed by comparative sequence-based identification using the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region (ITS1, 5.8S rRNA, and ITS2) located between the nuclear small (18S) and large subunit (28S) rRNA genes.

DNA was obtained from the A2SS strain with DNazol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The ITS was amplified with the universal primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; White et al. 1990), and the 600-bp product was resolved and purified from 2 % agarose gel for sequencing.

Pathogen inoculation

Alternaria sp. strains were grown on PDA for 2–3 weeks at room temperature under fluorescent light. Spores were collected in sterile water and the suspension was adjusted to 1×10^5 conidia/mL by counting in a hemacytometer. Detached leaves or stem pieces (2 cm length) of *N. benthamiana* TRV and TRVSPT plants were placed in a petri dish with a sterile moist filter paper and inoculated with 10 μ L of the conidial suspension, sealed with parafilm, and incubated at 22 °C under 8 h light/16 h dark photoperiod (GE lamps, 80 μ mol m⁻² s⁻¹). Control tissues were inoculated with the same volume of sterile water. Disease symptoms were recorded photographically. For spore counting, stems were transferred to eppendorf tubes and spores were released from the tissue by vigorous shaking in 1 mL water and counted in a hemacytometer.

Semi-quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 200 to 300 mg of leaf tissue using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was calibrated spectrophotometrically and in an agarose gels using the 18S rRNA band, and then 1 μ g was used to synthesize the first-strand cDNA with oligo(dT) primer and Improm-IITM reverse transcriptase (Promega). PCR was performed with a denaturing temperature of 94 °C for 3 min, and annealing and extension temperatures of 58 and 72 °C, respectively, for 40 s. To compare levels of each transcript, a systematic analysis of primer concentration, total RNA amounts, and number of amplification cycles were conducted. Calibration curves with varying cycle number (22–32 cycles) were

constructed to determine the proper number of cycles to quantify each transcript (Supplementary Fig. S1). Transcript levels of the eukaryotic elongation factor 1-alpha (*NbEF1 α*) were used for normalization thus allowing a reproducible analysis of the various transcripts within the three or four replicates performed. The gene-specific primers used are indicated in Supplementary Table S1. Densitometric analysis of the PCR-generated fragments were analyzed and quantified with the Quantity software (Bio-Rad).

SA extraction and quantification by HPLC

SA was extracted from leaves as described by Meuwly and Métraux (1993) using *o*-anisic acid (*o*-ANI, 300 ng) as internal standard. HPLC analysis was performed in the equipment described above, setting fluorescence detection wavelengths at 305 nm excitation/405 nm emission for SA, and 305/365 for *o*-ANI. Dilutions of the extracts of free and conjugated SA were prepared in mobile phase (40 % methanol and 60 % water acidified with 4 % acetic acid), and were resolved by isocratic elution with a flow rate of 1.2 mL min⁻¹. Under these HPLC conditions, SA eluted at ~10 min and *o*-ANI at 5 min. *o*-ANI recovery ranged from 46 to 74 %, and SA values were adjusted for yield losses.

Statistical analysis

Data was analyzed with the general linear model analysis of variance and Tukey's test to determine the statistical significance at 0.05 and 0.01 probability using the Statistix[®] software package.

Accession number

NbLCB2 cDNA sequence was deposited in GenBank/EMBL databases (accession number AM902524).

Results

VIGS of *N. benthamiana* SPT LCB2 subunit dramatically affected its vegetative and reproductive development

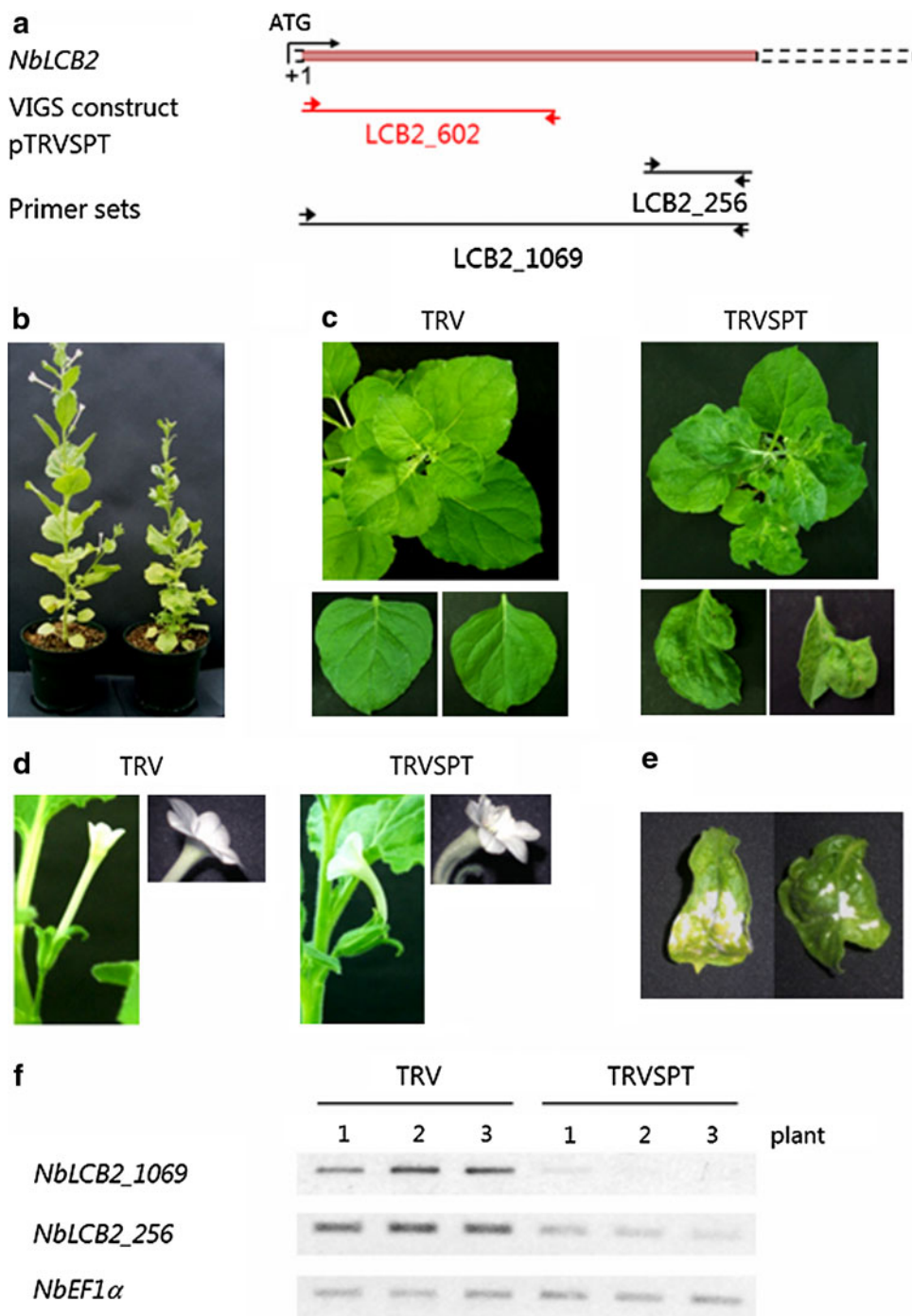
A 1069-bp cDNA fragment of *NbLCB2* (GenBank accession no. AM902524) was used to subclone a 602-bp cDNA into the TRV vector and the construct was named pTRVSPT (Fig. 1a). *N. benthamiana* plants at 5-leaf stage were agro-infiltrated with the empty TRV vector (as control) or pTRVSPT construct. Four weeks later, non-silenced TRV-infected control plants did not showed morphological differences compared to not agroinfiltrated plants (not shown). In contrast, TRVSPT infected plants developed dramatic

changes in their phenotype, qualitatively similar to those reported by Takahashi et al. (2009), such as significant growth reduction (Fig. 1b, right) and abnormal leaf morphology (Fig. 1c). TRVSPT plant leaves lost their typical heart-shape and developed irregular morphology. Moreover, a strong effect on flower development and morphology was also observed as flowers of TRVSPT plants showed several defects such as bending and shortening of the corolla tube, alterations in the number, and shape of petals (Fig. 1d). Also

spontaneous cell death was observed by the presence of necrotic areas on some leaves (Fig. 1e).

Efficiency of virus-induced SPT-silencing was evaluated by semi-quantitative RT-PCR using the *LCB2_256* and *LCB2_1069* primer sets (Fig. 1a). *NbLCB2* transcript was detected in TRV control plants and 20–50 % reduction was typically observed in TRVSPT plants (Fig. 1f). Similar levels of viral transcripts (coat and movement proteins) were detected in control and SPT-silenced plants

Fig. 1 VIGS of SPT LCB2 subunit in *N. benthamiana*. **a** Scheme of *NbLCB2* cDNA and the region used to generate the VIGS construct pTRVSPT. The positions of the primer sets *LCB2_256* and *LCB2_1069* used for RT-PCR analyzes are marked by arrows. **b** VIGS phenotype characterized by growth restriction and alterations in vegetative and reproductive development. The TRV (left) and TRVSPT plants (right) were photographed 4 weeks after agroinfiltration. **c** Morphological changes in leaves of TRVSPT plants. **d** Alterations in flower development of TRVSPT plants. **e** Spontaneous cell death associated to SPT-silencing. **f** Endogenous *NbLCB2* mRNA levels in the leaves of TRV and TRVSPT plants. *NbEF1α* mRNA levels were used as RNA loading control



(Supplementary Fig. S2), confirming that viral infection did not interfere with the phenotype and that morphological changes were caused by the silencing of the SPT.

Effects of SPT-silencing on sphingolipid LCB composition

Because SPT is the first enzyme in sphingolipid biosynthesis (Gable et al. 2000; Breslow et al. 2010), we evaluated the effect of *LCB2* gene silencing on LCB composition in *N. benthamiana* leaves 4 weeks after agroinfiltration. Phytosphingosine (t18:0), sphingosine (d18:1), and sphinganine (d18:0) were identified by the retention time of the corresponding standards (Fig. 2). Some other LCBs were detected as NDA derivatives of the LCBs released by sphingolipid hydrolysis from TRV- and SPT-silenced leaves (Supplementary Fig. 3, peaks 1–9). LCB composition of TRV control leaves was similar to those reported previously for other *Solanacea*, such as tobacco and tomato, and also *Arabidopsis* (Sperling et al. 2005; Markham et al. 2006; Buré et al. 2011), in which trihydroxylated LCBs such as phytosphingosine are more abundant than the dihydroxylated LCBs sphinganine and sphingosine (Fig. 2; Supplementary Fig. 3a, b). It is likely that some LCBs detected but not identified (Supplementary Fig. 3a, b) correspond to the isomers of 8-phytosphinganine (t18:1-*E* and t18:1-*Z*) that have been detected in *N. tabacum* leaves under similar analytical conditions (Sperling et al. 2005), or to the isomers of 4,8-sphingadine (d18:2-*EE* and d18:2-*EZ*) which were also detected in tobacco leaves, cultured cells, and in tomato leaves

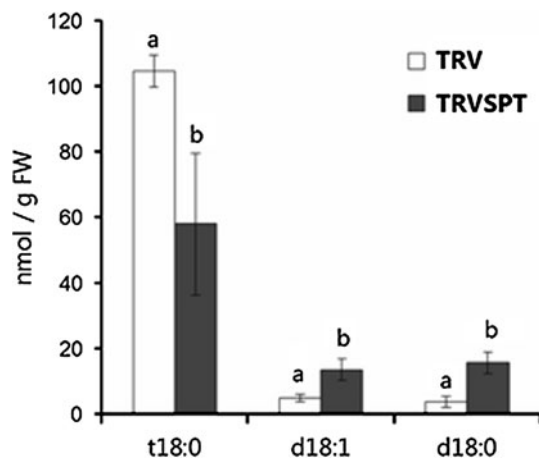


Fig. 2 Total content (nmol g⁻¹ FW) of phytosphingosine (t18:0), sphingosine (d18:1), and sphinganine (d18:0) in leaves of *N. benthamiana* TRV and TRVSPT plants 4 weeks after agroinfiltration. A total of 15–20 leaf disks were collected from each plant and pooled so values are expressed as the mean \pm SD of four independent plants. Different letters above each set of bars indicate a significant difference ($p < 0.01$, Tukey's test) in levels for the indicated LCB

(Sperling et al. 2005; Markham et al. 2006; Buré et al. 2011).

Regarding TRVSPT leaves, the LCB profile was notably altered as the levels of phytosphingosine and other LCBs decreased (Fig. 2; Supplementary Fig. 3a), whereas the abundance of sphinganine and sphingosine were consistently found to be higher than in the TRV leaves (Fig. 2; Supplementary Fig. 3b). In TRVSPT leaves phytosphingosine levels were reduced by 50 %, whereas sphingosine and sphinganine levels increased threefold and fourfold, respectively, compared with TRV control leaves (Fig. 2). A general decrease of LCBs was not observed as expected, and importantly, the results revealed that SPT-silencing in *N. benthamiana* had multiple effects on sphingolipid metabolism, and that the abundance of bioactive LCBs can be selectively affected by the action of SPT.

VIGS of SPT activated SA-dependent responses

The increased levels of sphinganine and sphingosine found in TRVSPT plants correlated with the spontaneous cell death phenotype (Fig. 1e). This response was comparable to the PCD developed by *Arabidopsis* mutants affected in different reactions of sphingolipid metabolism (*acd5*, *acd11*, and *erh1*), which was associated to increased levels of SA, (Greenberg et al. 2000; Brodersen et al. 2005; Wang et al. 2008). Therefore, we determined SA levels in TRVSPT-silenced plants. As shown in Fig. 3a, *N. benthamiana* TRV leaves had low basal levels of total SA (~ 500 ng g⁻¹ FW) in accordance with values reported by Catinot et al. (2008), while in TRVSPT leaves a 50 % increase in the content of total SA was found as compared to TRV leaves ($p < 0.01$). Furthermore, SA accumulation provoked by VIGS of SPT caused a strong constitutive expression of *NbPR-1* gene that was not observed in TRV plants (Fig. 3b). The abundance of *NbPR-1* transcripts was determined at saturation phase of PCR, demonstrating that the viral infection did not contribute to *NbPR-1* induction in TRVSPT plants. These results strongly suggest a link between sphingolipid metabolism and SA signaling, possibly through the LCBs which increased by the SPT-silencing in *N. benthamiana*.

Sphinganine and FB1 restricted the growth of *N. benthamiana* wild-type seedlings and up-regulated the SA-inducible *NbPR-1* gene

In order to confirm whether the activation of the SA-dependent signaling pathway in TRVSPT plants was mediated by elevation of LCBs levels, we exposed 10-day-old *N. benthamiana* wild-type seedlings to FB1 or exogenous sphinganine and evaluated *NbPR-1* transcript levels. First, we assessed the susceptibility of *N. benthamiana*

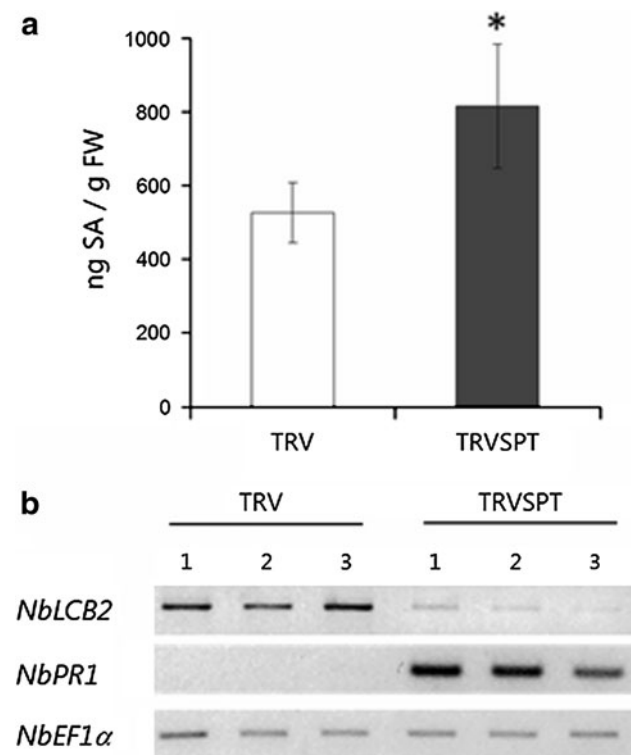


Fig. 3 VIGS of SPT activated the salicylic acid (SA) signaling pathway. **a** Content of total SA in TRV and TRVSPT plant leaves. Samples were taken 5 weeks after agroinfiltration. Values are expressed as the mean \pm SD of five independent plants. The asterisk above bars denotes a significant difference ($p < 0.01$, Tukey's test). **b** VIGS of SPT caused constitutive expression of the SA-inducible *NbPR-1* gene. Lane numbers correspond to independent plants

seedlings to FB1 because it was reported that the most of the *Solanaceae*, and in particular the *Nicotiana* species, are insensitive to SAMs (Mesbah et al. 2000; Brandwagt et al. 2001). As shown in Fig. 4a, FB1 induced a dose-dependent growth arrest and restricted root hair development. At the lowest dose (1 μ M) a discrete reduction (24 %) was observed, whereas 5 μ M FB1 caused a significant decrease of 64 % ($p < 0.01$, Fig. 4b), but did not induce chlorosis or cell death. These results indicated that *N. benthamiana* exhibited an intermediate sensitivity to FB1 according to the classification made by Brandwagt et al. (2001). Growth reduction caused by FB1 may be related to LCBs accumulation, as seedlings developed in presence of sphinganine showed a similar inhibition (Supplementary Fig. S4).

To examine whether LCBs were involved in the activation of SA-dependent signaling, 10-day-old seedlings were transferred to agar plates supplemented with 5 μ M FB1, 25 μ M sphinganine or 500 μ M SA, whereas control seedlings were transferred to agar plates without chemicals and mock treatments containing 0.05 % ethanol or 0.1 % methanol. Noticeably, FB1 and sphinganine-induced

NbPR-1 expression at 24 h of exposure, and the response was heightened at 48 h, especially with sphinganine, while in the control and mock-treated seedlings there was no induction of gene expression (Fig. 4c). These results support the hypothesis that LCBs are regulators of the SA-dependent pathway. Furthermore, it clearly opens the possibility that necrotrophic fungi that produce SAMs take advantage of the LCB-induced activation of the SA-dependent signaling pathway that leads to PCD, as part of their virulent strategy that contributes to a successful colonization.

VIGS of SPT compromised *N. benthamiana* resistance against the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*

As described above, SPT-silencing had strong effects on plant development, and a very interesting additional phenotype observed was that our TRVSPT plants grown in the greenhouse often developed necrotic lesions in stems and leaves (Fig. 5a, b) that were not observed in TRV or not agroinfiltrated plants. From these lesions, we isolated and obtained a monosporic fungal culture (strain A2SS). In PDA, the fungus developed black colonies (Fig. 5c) and brown conidia with transverse and longitudinal septa that are characteristic of *Alternaria* sp. morphology (Fig. 5d). Molecular identification by the sequence of the ITS narrowed the isolate to two possible species: *A. alternata* and *A. tenuissima*. This result was relevant because *N. benthamiana*, like most *Nicotiana* species, is resistant to *A. alternata* (Brandwagt et al. 2001), thus SPT-silencing and disruption of sphingolipid metabolism was directly associated to susceptibility to this necrotroph.

To rule out that TRVSPT plants susceptibility was generalized to other *Alternaria* species, detached leaves of TRV and TRVSPT plants were inoculated with 10^3 conidia of either *A. brassicicola* or *Alternaria* sp. A2SS. *A. brassicicola* could not infect the TRV leaves nor the TRVSPT (Fig. 5e) while, as expected, the A2SS strain infected only TRVSPT leaves causing necrotic expanded lesions, and on the inoculated TRV leaves only a slight chlorosis was observed (Fig. 5f). These results indicate that SPT-silencing conferred a selective susceptibility to *A. alternata*, highlighting the potential role of LCB in the defense response, as the virulence of the tomato pathotype (*A. alternata* f. sp. *lycopersici*) depends on the disruption of sphingolipid biosynthesis and LCBs accumulation caused by the AAL-toxin (Gilchrist and Grogan 1976; Spassieva et al. 2002). This prompted us to analyze the defense response of *N. benthamiana* TRVSPT plants challenged with *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.

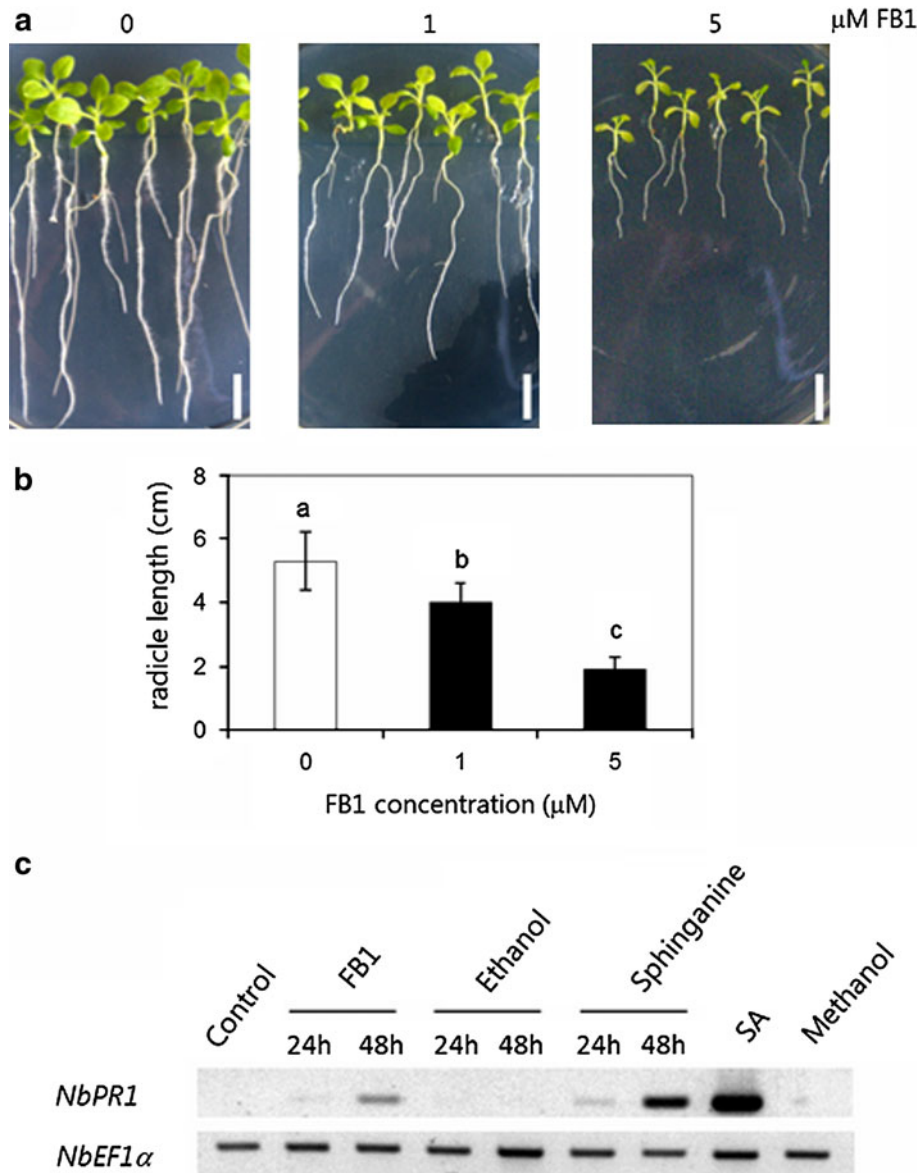


Fig. 4 Sphinganine and FB1 up-regulated the SA-responsive gene *PR-1* in *N. benthamiana* wild-type seedlings. **a** *N. benthamiana* had intermediate sensitivity to FB1. *N. benthamiana* 10-day-old seedlings were transferred to GB5 medium with or without FB1, and photographs were taken 10 days later. **b** Comparison of seedlings root length after 10 days of FB1 exposure ($n = 10$). Values are expressed as the mean \pm SD. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.01$, Tukey's test). Inhibition of root growth and hypocotyl elongation were observed, but the cotyledons emerged and became green. The cotyledons and roots never developed necrosis symptoms.

c FB1 and sphinganine induced the expression of the SA marker gene *PR-1* in *N. benthamiana*. Ten-day-old seedlings were transferred to GB5 media supplemented with 5 μM FB1, 25 μM sphinganine, or 0.5 mM SA. Leaves were collected after 24 and 48 h of treatment and immediately frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. Control seedlings correspond to 10-day-old seedlings transferred to fresh GB5 medium and the sample was taken after 48 h. Mock treatments with 0.05 % ethanol or 0.1 % methanol were included as they were used to prepare stock solutions of sphinganine and SA, respectively. Results are representative of two independent experiments

N. benthamiana SPT-silenced plants became susceptible to the non-host pathogen *A. alternata* f. sp. *lycopersici* and exhibited altered defense gene expression

To test the relevance of the altered LCB homeostasis in *N. benthamiana* TRVSPT plants in the defense response

against a SAM-producing fungus, we performed pathogenicity assays using an *A. alternata* f. sp. *lycopersici* aa strain (provided by Dr. Liancheng Du, University of Nebraska). A conidial suspension was used to inoculate detached leaves and stems from TRV and TRVSPT plants. Sterile water was used to spot control leaves. As expected, *A. alternata* f. sp. *lycopersici* was unable to

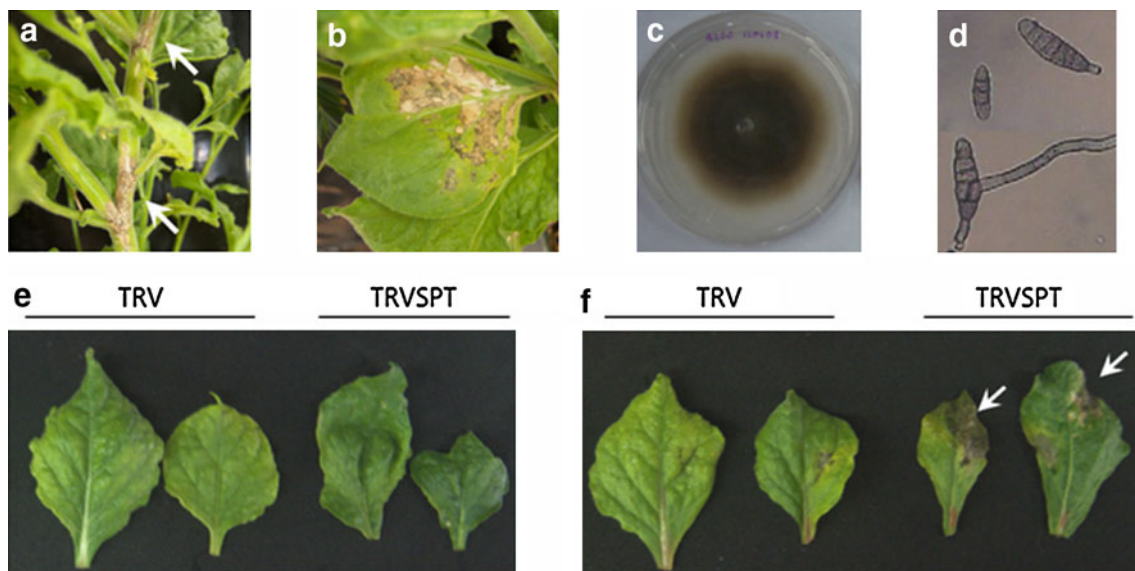


Fig. 5 VIGS of SPT conferred susceptibility to the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata*. Stem (a) and foliar lesions (b) on a TRVSPT plant. The macroscopic (c) and microscopic (d) morphology of the fungi isolated from the lesion on the TRVSPT leaf correspond to *A. alternata*. The strain isolated was cultivated on $0.5 \times$ PDA and photographed 15 days later. For pathogenicity assays, excised

N. benthamiana TRV and TRVSPT leaves were inoculated with 1×10^3 conidia of *Alternaria brassiciola* (e) or *Alternaria* sp. A2SS strain (f) and photographed 10 dpi. The inoculated leaves were kept in separate humid chambers at 22 °C. Only the TRVSPT leaves inoculated with A2SS strain (*Alternaria* sp.) developed symptoms of infection and spread of the fungus (indicated by white arrows)

infect the TRV leaves and the inoculated regions developed only mild symptoms of chlorosis (Fig. 6a). In contrast, TRVSPT leaves developed intense chlorosis and necrotic lesions on the inoculated sites, and an increase in fungal growth was observed at 10 days after inoculation (dai, Fig. 6a). Because *A. alternata* f. sp. *lycopersici* is the causal agent of tomato stem canker disease, pathogenicity tests were performed also on *N. benthamiana* stems. In the TRVSPT stems, fungal proliferation was evident at 6 dai, whereas very discrete or no signs of fungal growth were observed in TRV stems (Fig. 6b). In the control stems inoculated with sterile water (TRV and TRVSPT) no signs of infection or fungal development were observed (data not shown). Colonization levels were determined by counting conidia collected from the stems at 6 dai. Fungal colonization of TRVSPT plant stems correlated with a tenfold increase in conidia number compared with TRV plant stems (Fig. 6c). These results are consistent with the hypothesis that LCBs are modulators of the defense response against pathogens, including necrotrophs, so the altered LCB homeostasis in *N. benthamiana* TRVSPT plants suppressed the resistance against the non-host and necrotrophic pathogen *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.

Because LCBs are signal transducers in plants, we investigated whether the susceptibility of *N. benthamiana* TRVSPT plants to *A. alternata* f. sp. *lycopersici* might be associated with a delayed or reduced expression of

defense-related genes. Necrotrophic infection often results in the activation of *PR* genes encoding proteins with potent antifungal activities (Glazebrook 2005). To examine this, we analyzed by semi-quantitative RT-PCR the expression of *NbPR-1*, *NbPR-2*, and *NbPR-3* genes in inoculated TRV and TRVSPT leaves. At 8 h post-inoculation (hpi), an induction of *NbPR-2* and *NbPR-3* expression was observed in TRV leaves which was increased at later times (24 and 48 hpi, Fig. 6d), suggesting that glucanases and chitinases are induced during *N. benthamiana* defense response against this necrotroph. *NbPR-1* expression was induced at 24 hpi and increased at 48 hpi (Fig. 6d). As anticipated, the TRVSPT leaves showed a lower expression of *NbPR-2* and *NbPR-3* genes early (8 and 24 hpi) during infection, compared to the inoculated TRV leaves (Fig. 6d) which correlated with its compromised resistance to *A. alternata* f. sp. *lycopersici* infection. In contrast, high transcript levels of *NbPR-1* gene were observed at 8 hpi in TRVSPT leaves, whereas accumulation of this transcript occurred at 24 hpi in TRV leaves (Fig. 6d). This result could be explained by the fact that *NbPR-1* was constitutively expressed in TRVSPT plants due to SA accumulation. In order to test whether activation of the SA pathway observed in TRVSPT plants had an adverse effect on the JA-mediated response, we analyzed transcript levels of the JA-inducible *LOX* gene in *N. benthamiana* TRV and TRVSPT in response to methyl jasmonate (MeJA). TRV leaves showed a strong and dose-dependent induction of

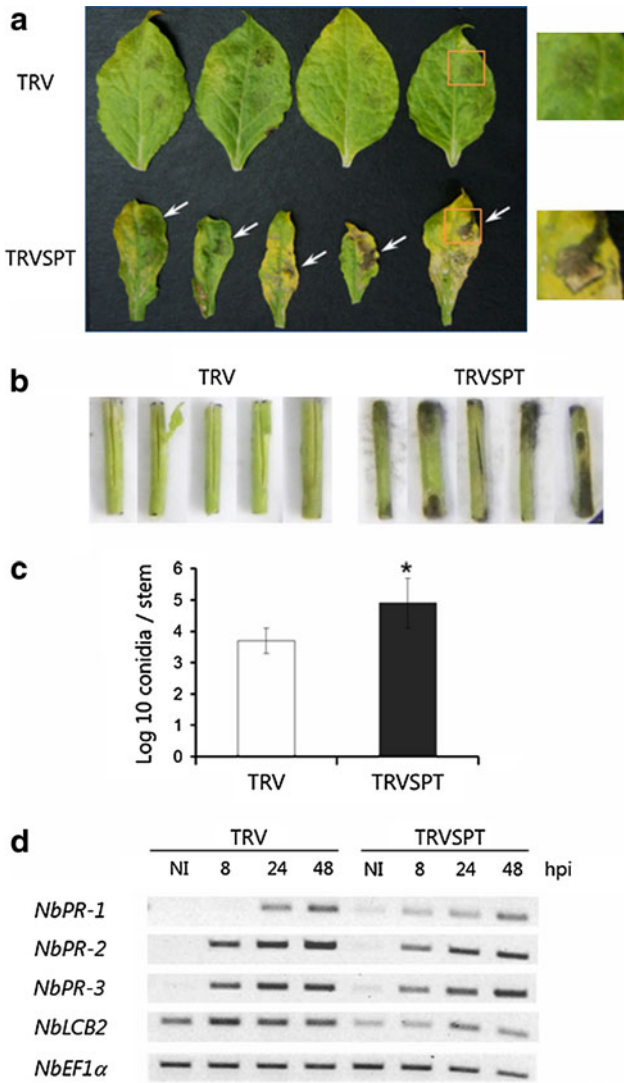


Fig. 6 VIGS of SPT compromised *Nicotiana benthamiana* resistance against *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Excised leaves (**a**) and cut stems (**b**) from TRV and TRVSPT plants were inoculated with 1×10^3 conidia. The inoculated tissues were kept in separate humid chambers at 22 °C, and photographed 10 days after inoculation (dai) in the case of leaves, and stems at 6 dai. Orange boxes close-up shown in leaves photographs at the right. Infection symptoms were observed only on tissues of TRVSPT plants. Controls inoculated with sterile water did not develop disease symptoms (not shown). **c** Quantitative analysis of spore production. Conidia were released from each stem, suspended in water 6 dai and counted in a hemacytometer. Values are mean of 40 stem pieces and are representative from two independent experiments. The asterisk denotes significant difference and was determined by Tukey's mean comparison test ($p < 0.01$). **d** Time course analysis of pathogenesis-related (PR) gene expression by semi-quantitative RT-PCR in leaves of TRV and TRVSPT plants inoculated with *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (1×10^3 conidia). NI corresponds to non-inoculated control leaves. *EF1α* transcript was used as control for normalization. Results are representative of three independent experiments

LOX expression, whereas in TRVSPT leaves a dose-dependent response was also observed but lower levels were detected (Fig. S5). Overall, these results indicate that

the misregulation of LCB homeostasis caused by VIGS of SPT LCB2 subunit and the activation of SA-dependent responses affected the expression of defense genes compromising *N. benthamiana* resistance to the non-host pathogen *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*.

Discussion

N. benthamiana phenotypic features associated to SPT-silencing

Because *NbLCB2* is a single-copy gene in the *N. benthamiana* genome (Gan et al. 2009), the VIGS strategy was highly effective as reflected in the dramatic phenotype observed using our pTRVSPT construct. The significant growth restriction and abnormal leaf development reproduces the phenotype observed by Takahashi et al. (2009), highlighting the importance of sphingolipids as structural and signaling molecules during plant growth and development (Pata et al. 2010; Zäuner et al. 2010). Furthermore, the phenotype caused by pTRVSPT is more severe than those previously reported for the same gene (Gan et al. 2009; Takahashi et al. 2009), and such differences might be due to the cDNA sequence cloned in the VIGS vector. While in the report by Takahashi et al. (2009) and this study, similar cDNA sequences corresponding to the 5'-cDNA end were used, Gan et al. (2009) employed a 303-bp cDNA from the 3'-end. The growth phenotype of *N. benthamiana* TRVSPT plants was also comparable to those observed in *Arabidopsis LCB1* RNAi-suppressed lines and in *LCB2* knock-out mutants that show altered leaf morphology and severe growth restriction, the latter associated to an impaired cell expansion. Therefore, as suggested, plants might adjust their growth mechanisms to compensate the reduction of sphingolipid biosynthesis (Chen et al. 2006; Dietrich et al. 2008). The aberrant shape of leaves from *N. benthamiana* TRVSPT plants also denotes an impaired regulation of cell growth and polarity establishment. Proteomic studies have revealed an enrichment of some polarity-related proteins in lipid rafts such as PIN1, SKU5, and COBRA, suggesting a role for these domains in the polar expansion of plant cells (Willemsen et al. 2003; Mongrand et al. 2004; Borner et al. 2005). Moreover, recent evidence has emerged on sphingolipids involvement in a secretory pathway for polar auxin transport. Disruption of sphingolipids biosynthesis in tobacco BY2 cultured cells and *Arabidopsis* seedlings by FB1 alters the polar localization of the auxin transporter PIN1 to the plasma membrane (Aubert et al. 2011; Markham et al. 2011).

Silencing efficiency of our construct is also highlighted by the dramatic effect observed on flower development that

was not described before in previous reports of *N. benthamiana* SPT-silenced plants. These results reinforce previous evidence found in *Arabidopsis* on the essential role of sphingolipid biosynthesis during reproductive development. The expression of *Arabidopsis LCB2a* gene is higher in the flower buds and mature flowers compared with other organs such as leaves and stem, whereas null mutants of the two functional *LCB2* genes display gametophytic lethality and loss of pollen viability (Dietrich et al. 2008). Similarly, the *sbh1 sbh2* double mutant (affected on LCB C-4 hydroxylase genes) does not progress from vegetative to reproductive growth (Chen et al. 2008).

Another observed feature of the *N. benthamiana* TRVSPT plants phenotype was the presence of spontaneous cell death lesions, which coincides with previous reports linking sphingolipid biosynthesis and metabolism to the regulation of PCD. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by SAMs causes cell death in several plant species (Abbas et al. 1994; Lamprecht et al. 1994; Stone et al. 2000; Saucedo-García et al. 2011). These observations are consistent with the fact that in *Arabidopsis*, several mutations affecting sphingolipid metabolism such as *acd5*, *acd11*, and *erh1* that affect a ceramide kinase, a sphingosine transporter and an inositol-phosphoryl-ceramide synthase, respectively, cause cell death as well (Brodersen et al. 2002; Liang et al. 2003; Wang et al. 2008). Importantly, several lines of evidence support that PCD activation is mediated by increased LCB levels. Spraying or infiltration of *Arabidopsis* and *N. benthamiana* leaves with sphinganine, sphingosine, or phytosphinganine, or the addition of sphinganine to tobacco BY2 cultured cells promote cell death (Shi et al. 2007; Takahashi et al. 2009; Lachaud et al. 2010). In accordance with these findings, overexpression of SPT LCB2 subunit in *N. benthamiana* causes cell death, probably due to accumulation of LCBs (Takahashi et al. 2009). Conversely, mutations in *Arabidopsis LCB1* or *LCB2a* genes, or the inhibition of SPT activity with myriocin, attenuate FB1-induced LCBs accumulation, and prevent cell death (Shi et al. 2007; Saucedo-García et al. 2011).

Silencing of the SPT LCB2 subunit in *N. benthamiana* significantly affects LCB homeostasis

As described above, two previous studies have reported VIGS of SPT LCB2 subunit in *N. benthamiana* (Gan et al. 2009; Takahashi et al. 2009). However, both of them lacked or were unsuccessful in analyzing LCBs levels. This is understandable given the diversity and low levels of these metabolites found in plant tissues. Indeed, as a first attempt, we tried to determine free LCBs in TRV and TRVSPT plants, but they were below detection limits. For

this reason, we performed sphingolipid hydrolysis and analyze the NDA derivatives of the released LCBs. Because SPT is the enzyme that catalyzes the first reaction in sphingolipid biosynthesis, we hypothesized that VIGS of the LCB2 subunit caused a general reduction in LCBs levels, especially of sphinganine, which is the first LCB synthesized and is a substrate for desaturases and hydroxylases to generate the other LCBs (Chen et al. 2009). However, we found that while the trihydroxylated LCB phytosphingosine, which is quite abundant, decreased 50 %, levels of the dihydroxylated LCBs sphinganine and sphingosine increased considerably. This differential effect of SPT-silencing on LCBs profile revealed the complexity of the LCBs metabolism and regulation, and is in agreement with the results from Chen et al. (2006). In *Arabidopsis*, reduction of SPT activity in *LCB1*-RNAi plants caused large increases (approximately fourfold) in the total content of sphinganine (and also a 2.5-fold increase of phytosphingosine), while some trihydroxylated LCBs such as the phytosphinganine isomers (t18:1-*E* and t18:1-*Z*) decreased. These results could be attributed to differences in LCB levels among taxonomic groups, as reported by Markham et al. (2006). Interestingly, the elevation of sphinganine and sphingosine levels in *N. benthamiana* TRVSPT plants partially mimics the effect of SAMs in de novo biosynthesis of sphingolipids, but this interesting similarity must be confirmed by further sphingolipidomic analyzes.

LCBs act as signal transducers in SA pathway

Because both, LCBs and SA have a key role in regulating cell death and plant immune response [reviewed by Berkey et al. (2012), Vlot et al. (2009), An and Mou (2011)], we hypothesized that they may share signaling pathways. Moreover, all the phenotypic characteristics associated with VIGS of SPT in *N. benthamiana* plants such as growth reduction, cell death, and susceptibility to a necrotroph could be associated with SA accumulation. A primary function of phytohormones is the regulation of plant growth and development, and interestingly, many *Arabidopsis* mutants with SA accumulation develop a dwarf phenotype like *N. benthamiana* TRVSPT plants (Rivas-San Vicente and Plasencia 2011). Furthermore, we recently found that FB1 and sphinganine induce a dose-dependent accumulation of free SA in germinating maize embryos (de la Torre-Hernández et al. 2010). The comparison of SA levels between TRV and TRVSPT plants indicated that indeed the latter had a discrete but significant elevation of total SA which correlated with a strong constitutive expression of *NbPR-1* gene. Likewise, the *Arabidopsis* mutants *acd5*, *acd11*, and *erh1*, which have an altered

sphingolipid metabolism, contain elevated (3- to 80-fold increase) SA levels and strongly express *AtPR-1* (Greenberg et al. 2000; Brodersen et al. 2005; Wang et al. 2008). Taken together, these evidences strongly suggest that an increase of sphingoid intermediaries, especially LCBs, activate the SA-dependent pathway. Then, in order to define if the LCB elevation observed in TRVSPT plants was responsible of the activation of the SA pathway, we treated *N. benthamiana* wild-type seedlings with FB1 or sphinganine and determined *NbPR-1* transcript levels. This gene, the canonical marker of SA signaling (Mur et al. 2006; Spoel et al. 2007; Koornneef et al. 2008; Denoux et al. 2008), showed an induced expression upon exposure to both compounds. Moreover, the same effect has been observed in *Arabidopsis*, indicating that LCBs positively regulate the SA-dependent pathway. *Arabidopsis* wild-type seedlings treated with SAMs (FB1 and AAL-toxin) show a dose-dependent induction of *PR-1* expression and other defense-related genes (Stone et al. 2000; Gechev et al. 2004). In tobacco BY2 cells, sphinganine (25 μ M) rapidly induces the expression of the defense genes *NtPR-3* and *NtMYB2*, but not of *NtPR-1* (Lachaud et al. 2011). In the latter case, *NtPR-1* expression could have not been detected because the cells were harvested 15 min after sphinganine treatment, which could be a very short time to activate SA signaling. Our results indicate that *NbPR-1* expression is induced after 24 h, and this time coincides with the induction caused by SAMs in *Arabidopsis* (Stone et al. 2000; Gechev et al. 2004).

It is worth mentioning that even though most *Nicotiana* species are resistant to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* and insensitive to SAMs (determined by a root elongation assay in presence of 0.2 μ M AAL-toxin; Brandwagt et al. 2001), when higher FB1 doses were used, inhibition of root elongation and hypocotyl expansion on *N. benthamiana* seedlings was recorded, a very similar effect to the species with intermediate SAM sensitivity (Brandwagt et al. 2001). These observations are also comparable with the FB1-induced growth restriction reported on maize, tomato (Lamprecht et al. 1994), and *Arabidopsis* (Stone et al. 2000; Shi et al. 2007; Markham et al. 2011; Saucedo-García et al. 2011; Watanabe and Lam 2011). However, unlike the aforementioned species, *N. benthamiana* seedlings exposed to FB1 did not develop symptoms of chlorosis or cell death. In this sense, it is important to mention that the tomato gene *Asc-1* that mediates insensitivity to SAMs and resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Gilchrist and Grogan 1976) is conserved in most *Nicotiana* species (Brandwagt et al. 2001). *Asc-1* is a single codominant gene that codes an enzyme with ceramide synthase activity that is not effectively inhibited by SAMs, therefore LCB accumulation induced by AAL-toxin in resistant (*Asc/Asc*) tomato leaves is discrete compared to

that caused in susceptible (*asc/asc*) leaves (Spassieva et al. 2002). The same could happen in *Nicotiana* sp. because even though tobacco is SAMs insensitive to low doses of AAL-toxin (Brandwagt et al. 2001), 1 μ M FB1 causes an approximately tenfold increase in sphinganine levels in BY-2 cultured cells (Aubert et al. 2011).

Compromised resistance of *N. benthamiana* SPT-silenced plants (TRVSPT) to the necrotrophic fungi *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*

The involvement of SPT in non-host resistance was illustrated with the compromised resistance in *N. benthamiana* *LCB1*- and *LCB2*-silenced plants against the bacterial pathogen *P. cichorii* (Takahashi et al. 2009). Consistent with this finding, our SPT-silenced plants were more susceptible to the non-host necrotrophic fungi *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, despite the presence of a functional *Asc* gene that confers resistance against this pathogen (Brandwagt et al. 2001). Because TRVSPT plants had altered levels of LCBs, in particular elevation of sphinganine resembling the effect of SAMs, we reasoned that this fact would generate a favorable growth condition for the necrotrophic pathogen. In order to gain more insight into the mechanisms operating in this compatible interaction, we evaluated the expression of *NbPR-1*, *NbPR-2*, and *NbPR-3* genes that are part of the early defense responses and have a key role in limiting pathogen entry, growth, and spread. The induction pattern of expression of these defense genes in TRVSPT leaves in response to the fungal infection showed important alterations compared to TRV leaves. Lower levels of *NbPR-2* and *NbPR-3* transcripts were observed in TRVSPT leaves that correlated with the compromised resistance against *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. The production of enzymes capable of degrading the cell walls of invading fungi (β -1,3-glucanases and chitinases coded by *NbPR-2* and *NbPR-3* genes) and the timing of this defense mechanism is an important component of plant disease resistance. Their role in plant immune response has been examined by their overexpression in transgenic plants that exhibit enhanced resistance to fungal infection and delayed disease symptoms (Jach et al. 1995; Dana et al. 2006). Furthermore, in vitro and in vivo experiments have demonstrated that the antifungal effect of PR-2 and PR-3 proteins is synergistically enhanced when both enzymes are present (Lawrence et al. 1996).

Constitutive expression of *NbPR-1* induced by the accumulation of SA in TRVSPT plants (scarcely observed under semi-quantitative RT-PCR conditions) possibly led to an earlier induction in response to fungal infection, compared to TRV plants. This constitutive activation of the SA-dependent pathway in TRVSPT plants could be crucial in the susceptibility to *A. alternata* f. sp. *lycopersici* as

phytohormone signaling plays a major role in determining the outcome of plant–pathogen interactions (Spoel and Dong 2008; Pieterse et al. 2009, 2012; Robert-Seilaniantz et al. 2011). A very tempting possibility is that the SAM-producing fungal necrotrophs promote LCBs elevation not only to induce the death of their hosts, but also to exploit their association with the SA-dependent pathway to antagonize or suppress the effective defense mechanisms activated by other phytohormones such as JA. In the most simplified models of hormone crosstalk in plant immunity, JA and ET work synergistically in resistance against necrotrophs, whereas SA pathway often antagonizes the JA-dependent defense responses (Spoel et al. 2007; Koornneef et al. 2008; Leon-Reyes et al. 2009, 2010; El Oirdi et al. 2011). Activation of the SA pathway in *Arabidopsis* (either by biotic stress or exogenous treatment) renders leaves more susceptible to *Alternaria brassicicola*, which exhibit severe disease symptoms. This correlates with a strong expression of *PR-1* and a decreased expression of the JA-inducible *PDF1.2* gene (Spoel et al. 2007). It has also been shown that low doses of SA are enough to trigger a fast and long-lasting antagonistic effect on defense genes regulated by JA (Koornneef et al. 2008). Notably, this also occurs in *Solanaceae* as SA-pretreatment (50 μ M) of tomato leaves increases *Botrytis cinerea* infection and significantly lowers the expression of the JA-regulated *PI-I* and *PI-II* defense genes. Moreover, an aggressive *B. cinerea* isolate (B191) secretes an exopolysaccharide that promotes a twofold accumulation of SA in the host to suppress the JA pathway required for resistance (El Oirdi et al. 2011). Our TRVSPT plants showed activation of the SA pathway which might potentially suppress the JA-mediated response as determined by transcript levels of the *LOX* gene. Supporting the interpretation behind the experimental evidence with these fungi, there are many other cases reported on pathogens that take advantage of the phytohormone signaling crosstalk to suppress host defenses (Pieterse et al. 2009; Robert-Seilaniantz et al. 2011).

It is very probable that complex interactions among the hormonal pathways operate in the susceptibility of *N. benthamiana* TRVSPT plants to *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, and future work will unravel whether the increased SA levels antagonize JA- and ET-dependent defense responses, and SA interaction with other hormones. Significantly, there is evidence that JA and ET are involved in the cell death triggered by this necrotroph in tomato (Egusa et al. 2009; Zhang et al. 2011), and also in the *Arabidopsis* and tomato cell death induced by FB1 and AAL-toxin, respectively (Asai et al. 2000; Gechev et al. 2004; Mase et al. 2012).

In summary, the work presented here provides evidence that alterations in the sphingolipids de novo biosynthesis that results in elevated LCB levels activate the SA

signaling pathway as a downstream element. In this context, the SAMs produced by *F. verticillioides* and *A. alternata* f. sp. *lycopersici* would be displaying a double role: disruption of the host sphingolipid metabolism and activation of the SA pathway in order to divert defense responses mediated by other plant hormones. Together, both strategies would assure a successful invasion into the host.

Acknowledgments We thank to Dr. Baulcombe and Sainsbury Laboratory (Norwich, UK) for the TRV vector and *Agrobacterium* strains used for VIGS, Dr. Liancheng Du (University of Nebraska) for the *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* aa strain, Dra. Helena Portu-Ducoing for the *Alternaria brassicicola* strain, and Dr. Arturo Guevara-García (IBT, UNAM) for providing *N. benthamiana* seeds. The authors gratefully acknowledge the critical comments and support received from Drs. Yvonne Rosenstein-Azoulay and Felipe Cruz-García. We appreciate the technical assistance of Manuela Nájera-Martínez and Diana Sánchez-Rangel, and Laurel Fabila-Ibarra for greenhouse work. This study was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant No. CONACYT 50503), and Facultad de Química, UNAM (PAIP 6290-08). Mariana Rivas-San Vicente received a doctoral fellowship (170394) from CONACYT.

References

- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions A, Wang E, Merrill AH, Riley RT (1994) Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* 106:1085–1093
- Akamatsu H, Itoh Y, Kodama M, Otani H, Kohmoto K (1997) AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* 87:967–972
- An C, Mou Z (2011) Salicylic acid and its function in plant immunity. *J Int Plant Biol* 53:412–428
- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12:1823–1835
- Aubert A, Marion J, Boulogne C, Bourge M, Abreu S, Bellec Y, Faure JD, Satiat-Jeuemaitre B (2011) Sphingolipids involvement in plant endomembrane differentiation: the BY2 case. *Plant J* 65:958–971
- Berkey R, Bendigeri D, Xiao S (2012) Sphingolipids and plant defense/disease: the “death” connection and beyond. *Front Plant Sci* 3:68
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* 137:104–116
- Brandwagt BF, Kneppers TJA, Van der Weerden GM, Nijkamp HJJ, Hille J (2001) Most AAL toxin-sensitive *Nicotiana* species are resistant to the tomato fungal pathogen *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:460–470
- Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, Ejsing CS, Weissman JS (2010) Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* 463:1048–1055

- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen LB, Brown RE, Mundy J (2002) Knockout of *Arabidopsis accelerated cell death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* 16:490–502
- Brodersen P, Malinovsky FG, Hématy K, Newman MA, Mundy J (2005) The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. *Plant Physiol* 138:1037–1045
- Buré C, Cacas JL, Wang F, Gaudin K, Domergue F, Mongrand S, Schmitter JM (2011) Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25:3131–3145
- Catinot J, Buchala A, Abou-Monsour E, Métraux JP (2008) Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett* 582:473–478
- Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM, Cahoon EB (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* 18:3576–3593
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:1862–1878
- Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M (2009) Plant sphingolipids: structure, synthesis and function. In: Wada H, Murata N, Govindjee (eds) *Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions*. Springer, Dordrecht, pp 77–115
- Chen M, Markham JE, Cahoon EB (2012) Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis*. *Plant J* 69:769–781
- Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM (2003) Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423:651–654
- Dana M, Pintor-Toro J, Cubero B (2006) Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* 142:722–730
- de la Torre-Hernández ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernández N, Cruz-Ortega R, Plasencia J (2010) Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol Mol Plant Pathol* 74:337–345
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol Plant* 1:423–445
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelsen TC, Leslie JF (1995) Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium monilliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl Environ Microbiol* 61:79–86
- Dietrich CR, Han G, Chen M, Howard R, Dunn TM, Cahoon EB (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J* 54:284–298
- 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 Phytol* 194:181–191
- Egusa M, Ozawa R, Takabayashi J, Otani H, Kodama M (2009) The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen. *Planta* 229:965–976
- El Oirdi M, El Rahman TA, Rigano L, El Hadrami A, Rodriguez MC, Daayf F, Vojnov A, Bouarab K (2011) *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* 23:2405–2421
- Gable K, Slife H, Bacikova D, Monaghan E, Dunn TM (2000) Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J Biol Chem* 275:7597–7603
- Gan Y, Zhang L, Zhang Z, Dong S, Li J, Wang Y, Zheng X (2009) The LCB2 subunit of the sphingolipid biosynthesis enzyme serine palmitoyltransferase can function as an attenuator of the hypersensitive response and Bax-induced cell death. *New Phytol* 181:127–146
- Gechev TS, Gadjev IZ, Hille J (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Mol Life Sci* 61:1185–1197
- Gilchrist DG, Grogan RG (1976) Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 66:165–171
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43:205–227
- Glenn AE, Zitomer NC, Zimeri AM, Williams LD, Riley RT, Proctor RH (2008) Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol Plant Microbe Interact* 21:87–97
- Greenberg JT, Silverman P, Liang H (2000) Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* 156:341–350
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* 8:97–109
- Koga J, Yamauchi T, Shimura M, Ogawa N, Oshima K, Umemura K, Kikuchi M, Ogasawara N (1998) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem* 273:31985–31988
- Kommedahl T, Windels CE (1981) Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ (eds) *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, pp 94–103
- Koornneef A, León-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147:1358–1368
- Lachaud C, Da Silva D, Cotellet V, Thuleau P, Xiong TC, Jauneau A, Brière C, Graziana A, Bellec Y, Faure JD, Ranjeva R, Mazars C (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by *D-erythro*-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium* 47:92–100
- Lachaud C, Da Silva D, Amelot N, Béziat C, Brière C, Cotellet V, Graziana A, Grat S, Mazars C, Thuleau P (2011) Dihydro-sphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Mol Plant* 4:310–318
- Lamprecht SC, Marasas WFO, Alberts JF, Cawood ME, Gelderblom WCA, Shephard GS, Thiel PG, Calitz FJ (1994) Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology* 84:383–391
- Lawrence CB, Josten MH, Tuzun S (1996) Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani*

- and the association of basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol Mol Plant Pathol* 48:361–377
- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RAM, Ritsema T, Pieterse CMJ (2009) Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol* 149:1797–1809
- Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes AP, Memelink J, Pieterse CMJ, Ritsema T (2010) Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Int* 23:187–197
- Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* 17:2636–2641
- Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K (2005) A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol* 138:1644–1652
- Lynch DV, Dunn TM (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol* 161:677–702
- Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* 281:22684–22694
- Markham JE, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hématy K, Marion J, Belcram K, Palauqui JC, Satiat-JeuneMaître S, 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
- Mase K, Mizuno T, Ishihama N, Fujii T, Mori H, Kodama M, Yoshioka H (2012) Ethylene signaling pathway and MAPK cascades are required for AAL-toxin-induced programmed cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1015–1025
- Mesbah LA, van der Weerden GM, Nijkamp HJJ, Hille J (2000) Sensitivity among species of *Solanaceae* to AAL toxins produced by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathol* 49:734–741
- Meuwly P, Métraux JP (1993) Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem* 214:500–505
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 279:36277–36286
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140:249–262
- Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM (2001) Drought-induced guard cells signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410:596–599
- Pata MO, Hannun YA, Ng CKY (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the sphinx. *New Phytol* 185:611–630
- Peer M, Stegmann M, Mueller MJ, Waller F (2010) *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 584:4053–4056
- Pieterse CMJ, León-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5:308–316
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:28.1–28.33
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 25:237–245
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot* 62:3321–3338
- Robert-Seilantiz A, Grant M, Jones JDG (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 49:26.1–26.27
- Sánchez-Rangel D, Plasencia J (2010) The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Rev* 29:73–86
- Saucedo-García M, Guevara-García A, González-Solís A, Cruz-García F, Vázquez-Santana S, Markham JE, Lozano-Rosas MG, Dietrich CR, Ramos-Vega M, Cahoon EB, Gavilanes-Ruiz 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 Phytol* 191:943–957
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun YA, Zuo J (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res* 17:1030–1040
- Spassieva SD, Markham JE, Hille J (2002) The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J* 32:561–572
- Sperling P, Heinz E (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta* 1632:1–15
- Sperling P, Franke S, Lühje S, Heinz E (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem* 43:1031–1038
- Spoel SH, Dong X (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3:348–351
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18842–18847
- Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 12:1811–1822
- Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, Iwasaki Y, Satoh H, Shimamoto K (2002) The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13307–13312
- Takahashi Y, Berberich T, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Tomonobu K, Terauchi R (2009) Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in nonhost resistance. *Mol Plant Microbe Int* 22:31–38
- Teng C, Dong H, Shi L, Deng Y, Mu J, Zhang J, Yang X, Zuo J (2008) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146:1322–1332
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47:177–206
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:3163–3179

- Watanabe N, Lam E (2011) Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *Plant J* 66:969–982
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322
- Willemsen V, Frimi J, Grebe M, van der Toorn A, Palme K, Scheres B (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require *STEROL METHYLTRANSFERASE1* function. *Plant Cell* 15:612–625
- Worrall D, Ng CKY, Hetherington AM (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci* 8:317–320
- Zäuner S, Ternes P, Warnecke D (2010) Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Adv Exp Med Biol* 688:249–263
- Zhang L, Jia C, Liu L, Zhang Z, Li C, Wang Q (2011) The involvement of jasmonates and ethylene in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin-induced tomato cell death. *J Exp Bot* 62:5405–5418

REVIEW PAPER

Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development

Mariana Rivas-San Vicente and Javier Plasencia*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad y Copilco, 04510, México, D.F., México

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: javierp@unam.mx

Received 14 October 2010; Revised 20 January 2011; Accepted 25 January 2011

Abstract

In recent years salicylic acid (SA) has been the focus of intensive research due to its function as an endogenous signal mediating local and systemic plant defence responses against pathogens. It has also been found that SA plays a role during the plant response to abiotic stresses such as drought, chilling, heavy metal toxicity, heat, and osmotic stress. In this sense, SA appears to be, just like in mammals, an 'effective therapeutic agent' for plants. Besides this function during biotic and abiotic stress, SA plays a crucial role in the regulation of physiological and biochemical processes during the entire lifespan of the plant. The discovery of its targets and the understanding of its molecular modes of action in physiological processes could help in the dissection of the complex SA signalling network, confirming its important role in both plant health and disease. Here, the evidence that supports the role of SA during plant growth and development is reviewed by comparing experiments performed by exogenous application of SA with analysis of genotypes affected by SA levels and/or perception.

Key words: Development, growth, phytohormones, salicylic acid.

Introduction

Salicylic acid (SA) is a phenolic compound (Fig. 1) which, despite its broad distribution in plants, has basal levels differing widely among species, with up to 100-fold differences having been recorded (Raskin *et al.*, 1990). This disparity can be observed within members of the same family. For example, in the Solanaceae, whereas tobacco (*Nicotiana tabacum*) contains low basal levels of SA [<100 ng g^{-1} fresh weight (FW)] in leaves (Yalpani *et al.*, 1991; Malamy *et al.*, 1992), potato (*Solanum tuberosum*) might contain up to 10 μ g of total SA g^{-1} FW (Coquoz *et al.*, 1998; Navarre and Mayo, 2004). In the model plant *Arabidopsis thaliana*, basal levels of total SA range from 0.250 μ g to 1 μ g g^{-1} FW (Nawrath and Métraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001; Brodersen *et al.*, 2005). SA is synthesized through two distinct and compartmentalized pathways that employ different precursors: the phenylpropanoid route in the cytoplasm initiates from phenylalanine, and the isochlorismate pathway takes place in the

chloroplast. Most of the SA synthesized in plants is glucosylated and/or methylated (Fig. 1). Glucose conjugation at the hydroxyl group of SA results in formation of the SA glucoside [SA 2-O- β -D-glucoside] as a major conjugate, whereas glucose conjugation at the SA carboxyl group produces the SA glucose ester in minor amounts (Fig. 1). These conjugation reactions are catalysed by cytosolic SA glucosyltransferases that are induced by SA application or pathogen attack in tobacco and *Arabidopsis* plants (Lee and Raskin, 1999; Song, 2006). SAG is actively transported from the cytosol into the vacuole of soybean and tobacco cells, where it may function as an inactive storage form that can release free SA (Dean and Mills, 2004; Dean *et al.*, 2005). Interestingly, SA is also converted to methyl salicylate (MeSA) by an SA carboxyl methyltransferase, and this volatile derivative is an important long-distance signal in tobacco and *Arabidopsis* systemic acquired resistance (Shulaev *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Park *et al.*,

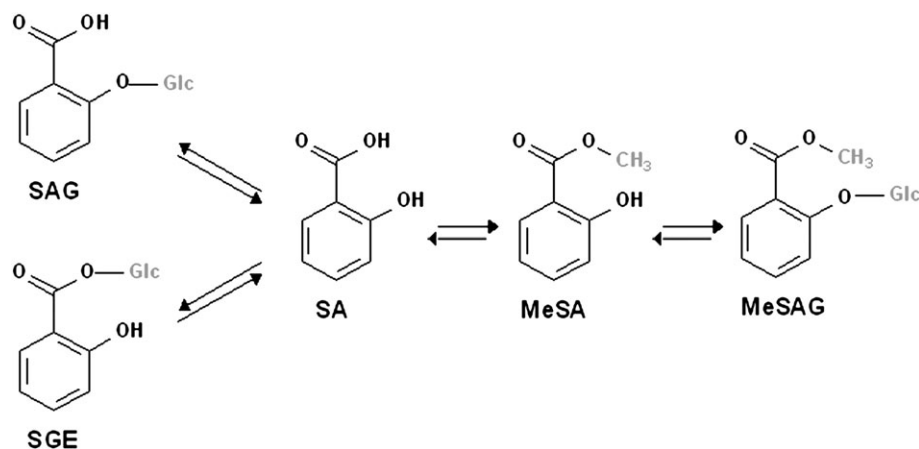


Fig. 1. Structures of salicylic acid and its derivatives. SA, salicylic acid; SAG, SA 2-O-β-D-glucoside; SGE, SA glucose ester; MeSA, methyl salicylate; MeSAG, methyl salicylate 2-O-β-D-glucose.

2007; Vlot *et al.*, 2008). MeSA can be further glucosylated to produce MeSA 2-O-β-D-glucose, but this SA-conjugated form is not stored in the vacuole (Dean *et al.*, 2005). The reader is referred to excellent reviews dealing with the enzymes and regulation of these biosynthetic routes (Klessig and Malamy, 1994; Lee *et al.*, 1995; Shah, 2003; Chen *et al.*, 2009; Vlot *et al.*, 2009).

SA has been recognized as a regulatory signal mediating plant response to abiotic stresses such as drought (Munné-Bosch and Peñuelas, 2003; Chini *et al.*, 2004), chilling (Janda *et al.*, 1999; Kang and Saltveit 2002), heavy metal tolerance (Metwally *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Freeman *et al.*, 2005), heat (Larkindale and Knight, 2002; Larkindale *et al.*, 2005), and osmotic stress (Borsani *et al.*, 2001). However, most of the research on this hormone has focused on its role in the local and systemic response against microbial pathogens, and on defining the transduction pathway leading to gene expression induced by SA. Again, there are several reviews on this subject (Klessig and Malamy, 1994; Durner *et al.*, 1997; Shah, 2003; Durrant and Dong, 2004; Vlot *et al.*, 2009).

The focus of this review is on the role of SA in plant growth and development as there is evidence that this hormone regulates processes such as seed germination, vegetative growth, photosynthesis, respiration, thermogenesis, flower formation, seed production, senescence, and a type of cell death that is not associated with the hypersensitive response. In addition, SA could contribute to maintaining cellular redox homeostasis through the regulation of antioxidant enzymes activity (Durner and Klessig, 1995, 1996; Slaymaker *et al.*, 2002) and induction of the alternative respiratory pathway (Moore *et al.*, 2002), and to regulating gene expression by inducing an RNA-dependent RNA polymerase that is important for post-transcriptional gene silencing (Xie *et al.*, 2001).

This review summarizes the recent advances in the understanding of the physiological functions of SA, and relevant insights regarding SA mechanisms that control these events are highlighted.

SA-regulated physiological functions

Seed germination

Effect of exogenous SA on seed germination. Environmental factors and interactions between the plant hormones abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), gibberellins (GAs), ethylene (ET), brassinosteroids (BRs), auxins (AUXs), and cytokinins (CKs) regulate seed germination. The role of SA in seed germination has been controversial as there are conflicting reports suggesting that it can either inhibit germination or increase seed vigour. The reported contradictory effects can be related to the SA concentrations employed. In *A. thaliana*, SA concentrations >1 mM delay or even inhibit germination (Rajjou *et al.*, 2006). In barley, doses >0.250 mM SA inhibit seed germination (Xie *et al.*, 2007), while maize germination is completely inhibited by SA doses ranging from 3 mM to 5 mM (Guan and Scandalios, 1995). SA's effect as a negative regulator of seed germination is presumably due to an SA-induced oxidative stress. In *Arabidopsis* plants treated with SA (1–5 mM), hydrogen peroxide (H₂O₂) levels increase up to 3-fold as a result of increased activities of Cu, Zn-superoxide dismutase and inactivation of the H₂O₂-degrading enzymes catalase and ascorbate peroxidase (Rao *et al.*, 1997).

SA improvement of seed germination under abiotic stress. Interestingly, when low doses are applied exogenously, SA significantly improves *Arabidopsis* seed germination and seedling establishment under different abiotic stress conditions (Rajjou *et al.*, 2006; Alonso-Ramírez *et al.*, 2009). Under salt stress (100–150 mM NaCl) only 50% of *Arabidopsis* seeds germinate, but in the presence of SA (0.05–0.5 mM) seed germination increases to 80%. Exogenous application of SA also partially reverses the inhibitory effect of oxidative (0.5 mM paraquat) and heat stress (50 °C for 3 h) on seed germination (Alonso-Ramírez *et al.*, 2009). These observations are in agreement with the delayed germination phenotype observed in the *Arabidopsis sid2* mutant under high salinity (Alonso-Ramírez *et al.*, 2009).

This mutant is affected in the isochorismate synthase gene and thus contains low SA levels (Table 1). However, *NahG* transgenic lines expressing a bacterial salicylate hydroxylase also have lower SA levels than wild-type plants, but germination is not affected by high salinity (Borsani *et al.*, 2001). This apparent discrepancy is due to the antioxidant effect of catechol, the product of the salicylate hydroxylase that accumulates in the *NahG* seeds and seedlings (Lee *et al.*, 2010). Thus the germination promotion effect of SA under high salinity conditions is by reducing oxidative damage. Moreover, proteomic analyses showed that two superoxide dismutases are induced by SA in *Arabidopsis* germinating seeds, which might contribute to an enhanced antioxidant capacity (Rajjou *et al.*, 2006). SA treatment (0.5 mM for 24 h) also causes a strong up-regulation of translation initiation and elongation factors, proteases, and two subunits of the 20S proteasome, supporting the hypothesis that SA improves seed germination by promoting the synthesis of proteins that are essential for germination, and the mobilization or degradation of seed proteins accumulated during seed maturation. In addition, the biosynthesis of several enzymes involved in metabolic pathways such as the glyoxylate cycle, the pentose phosphate pathway, glycolysis, and gluconeogenesis is also strongly activated by SA, suggesting that SA promotes the release from a quiescence state to the establishment of a vigorous seedling (Rajjou *et al.*, 2006).

SA cross-talk with ABA and GAs during germination. During this early developmental stage, a complex interaction between SA and both ABA and GAs determines germination outcome. In *Arabidopsis*, GAs have a role in SA biosynthesis and the SA pathway. Imbibition of 50 μ M GA₃ by seeds for 24 h, as well as the overexpression of a GA-stimulated gene from beechnut (*FcGASA₄*) in *Arabidopsis* plants, induces a 2-fold increase in SA levels compared with seeds imbibed in water and wild-type plants. Furthermore, increased expression of the *ICSI* (*isochorismate synthase*) and *NPR1* (*nonexpressor of PR-1*) genes, involved in SA biosynthesis and perception, respectively, is observed in *FcGASA₄*-overexpressing lines, and in Col-0 seedlings grown in the presence of GA₃. Interestingly, exogenous SA (50 μ M) partially rescues seed germination in the GA-deficient mutant *gal-3*, whereas exogenous GA₃ (50 μ M) slightly improves the germination of the SA-deficient *sid2* mutants under 150 mM NaCl stress (Alonso-Ramírez *et al.*, 2009). Although these results suggest a synergistic relationship between SA and GA, an antagonistic relationship was observed during barley germination that could be explained by the addition of a higher dose of SA. The inhibition of barley seed germination and post-germination growth by SA is accompanied by suppression of GA-induced α -amylase (*Amy32b*) expression through induction of a WRKY repressor (HvWRKY38). Expression of *HvWRKY38* in aleurone cells is down-regulated by GAs, but up-regulated by SA and ABA, so this transcription factor might serve as a converging node of the SA and ABA signal pathways involved in suppressing GA-induced seed

germination (Xie *et al.*, 2007). Additional evidence supporting the cross-talk between ABA and SA signalling is the increased synthesis of ABA-regulated proteins, such as late embryogenesis abundant (LEA) proteins, dehydrins, and heat shock proteins, in *Arabidopsis* seeds germinated in the presence of 0.5 mM SA (Rajjou *et al.*, 2006).

The ubiquitin–proteasome system (UPS) pathway in hormone signalling integration. Because GAs and ABA have opposing roles in the regulation of germination, SA might act as a rheostat contributing with both hormones. Recent biochemical evidence points to the UPS as a mechanism to balance the antagonistic control of seed germination between ABA and GAs (Zentella *et al.*, 2007; Piskurewics *et al.*, 2008). In fact, in the UPS, many hormone signalling pathways converge (Santner and Estelle, 2009; Vierstra, 2009; Santner and Estelle, 2010) thus influencing many aspects of plant growth and development. Recently it was found that NPR1, the key transducer of SA signalling in plant defence responses, associates in the nucleus with Cullin3-based E3 ligases and other components of the COP9 signalosome, which controls proteasomal degradation. Moreover, NPR1 proteasome-mediated turnover is promoted by SA-induced phosphorylation of the Ser11 and Ser15 residues (Spoel *et al.*, 2009). Initially, it was found that the activity of NPR1 is regulated by its subcellular localization, because the transcriptional co-activator is predominantly sequestered in the cytoplasm as an oligomer, but in pathogen-infected cells SA accumulation promotes partial reduction of the NPR1 oligomer to a monomer, which is targeted to the nucleus by a bipartite nuclear localization sequence (Mou *et al.*, 2003). Interestingly, NPR1 also enters the nucleus when basal SA levels are low and no infection is occurring, and it has been suggested that it may regulate additional genes. If this scenario could be confirmed, it would be interesting to analyse the contribution of these genes to the regulation of germination, plant growth, and development.

It is also worth mentioning the role of the DELLA proteins as potential integrators of phytohormone signalling in the regulation of germination, cell redox state, growth, and stress responses (reviewed by Smirnov and Grant, 2008; Grant and Jones, 2009; Harberd *et al.*, 2009). DELLA proteins are repressors of GA signalling and, in turn, GA derepresses its pathway by promoting proteasomal degradation of the DELLA protein RGA (Dill *et al.*, 2004). There are five DELLA genes in *Arabidopsis*: *GAI* (GA insensitive), *RGA* (repressor of GA1-3), *RGL1*, *RGL2*, and *RGL3* (RGA-like). *RGL2* is considered to be the main DELLA factor repressing germination (Lee *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 2004), although the other DELLA genes also contribute to regulate germination (Cao *et al.*, 2005). Recently, it was found that *RGL2* expression is strongly stimulated by ABA, and that RGL2 protein is necessary to elevate endogenous ABA and *ABI5* (another germination repressor) expression levels, specifically when GA levels are low (in *gal-3* mutants, or in the presence of GA synthesis inhibitors). Moreover, RGL2 is necessary to repress testa

Table 1. Examples of *Arabidopsis* genotypes with altered SA levels showing abnormal growth phenotypes

| Transgene or mutation | Gene function | Effect on SA levels | Growth phenotype | References |
|-----------------------|---|---|--|--|
| <i>NahG</i> | Bacterial salicylate hydroxylase | Reduction about 2- to 4-fold in leaves of healthy plants, and up to 20-fold in defence response against pathogens. | Increased growth (leaf rosette biomass at early stages of reproduction 1.7-fold more than wild type). Faster growth rate at low temperature (4 °C) associated with enlarged cell size, extensive endoreduplication, and increased expression of CycD3. | Abreu and Munné-Bosch (2009) Scott <i>et al.</i> (2004); Xia <i>et al.</i> (2009) |
| <i>sid2</i> | Isochorismate synthase | | Increased growth (leaf rosette biomass at early stages of reproduction 1.7-fold more than wild type). | Abreu and Munné-Bosch (2009) |
| <i>eds5/sid1</i> | Multidrug and toxin extrusion transporter | | Slightly less growth than wild type at 23 °C, but at 5 °C its growth is significantly greater compared with the wild type and very similar to <i>NahG</i> . | Nawrath and Métraux (1999); Scott <i>et al.</i> (2004) |
| <i>acd5</i> | Ceramide kinase | Accumulation (from 2- to 200-fold of total SA) | Reduced stature compared with the wild type, which is totally or partially suppressed by <i>NahG</i> and <i>npr1</i> , respectively. | Greenberg <i>et al.</i> (2000); Liang <i>et al.</i> (2003) |
| <i>acd6</i> | Encodes a novel protein with putative ankyrin and transmembrane regions | | Reduced stature compared with the wild type, which is totally or partially suppressed by <i>NahG</i> and <i>npr1</i> , respectively. Interestingly, <i>acd6 npr1</i> double mutants develop abnormal growths that protrude above the abaxial leaf surface. | Rate <i>et al.</i> (1999) |
| <i>acd11</i> | Sphingosine transmembrane transporter | | Dwarf phenotype that is fully suppressed by <i>NahG</i> . | Brodersen <i>et al.</i> (2002, 2005) |
| <i>agd2</i> | Member of ARF GAP domain (AGD) | | Altered leaf morphology, enlarged cells and mild dwarfism. SA depletion with <i>NahG</i> cause tumour-like growths and cells with highly endoreduplicated DNA. Partial blockage of SA signalling by <i>npr1</i> decreases cell number and increases the ploidy of mesophyll cells compared with the wild type. | Rate and Greenberg (2001); Vanacker <i>et al.</i> (2001); Song <i>et al.</i> (2004) |
| <i>atsr1</i> | Ca ²⁺ /calmodulin-binding transcription factor (CAMTA3) | | Reduced growth at 19–21 °C, but no significant difference (compared with the wild type) at 25–27 °C. Not only does <i>NahG</i> expression revert the phenotype, but <i>atsr1 NahG</i> plants are bigger than the wild type. | Du <i>et al.</i> (2009) |

Table 1. Continued

| Transgene or mutation | Gene function | Effect on SA levels | Growth phenotype | References |
|-----------------------|---|---|---|--|
| <i>cpr1</i> | Unknown | Accumulation from 2- to 200-fold of total SA | Small, narrow, dark green leaves densely covered with trichomes on the adaxial surface and relatively long siliques compared with the wild type. Growth much more inhibited at 5 °C. The dwarf phenotype reverts when grown under high light (HL) conditions. | Bowling <i>et al.</i> (1994) Scott <i>et al.</i> (2004) Mateo <i>et al.</i> (2006) |
| <i>cpr5</i> | Unknown | | Significantly smaller than the wild type, and reduction in both trichome number and development. The dwarf phenotype partially reverts under HL conditions. | Bowling <i>et al.</i> (1997) Mateo <i>et al.</i> (2006) |
| <i>cpr6</i> | Unknown | | Loss of apical dominance and a reduction in overall plant size. The dwarf phenotype partially reverts under HL conditions. | Clarke <i>et al.</i> (1998) Mateo <i>et al.</i> (2006) |
| <i>dnd1</i> | Cyclic nucleotide-gated ion channel (AtCNGC2) | | Dwarf, and partially reverts under HL conditions. | Yu <i>et al.</i> (1998); Clough <i>et al.</i> (2000); Mateo <i>et al.</i> (2006) |
| <i>dnd2</i> | Cyclic nucleotide-gated ion channel (AtCNGC4) | | Dwarf | Yu <i>et al.</i> (2000); Jurkowski <i>et al.</i> (2004) |
| <i>lsd6</i> | Unknown | | Dwarf with distorted and curled leaves. | Weymann <i>et al.</i> (1995) |
| <i>ssi1</i> | Unknown | | Reduced size | Shah <i>et al.</i> (1999) |

rupture (Piskurewicz *et al.*, 2008). Other phytohormones such as AUXs and ET also modulate plant growth and morphogenesis through a DELLA-dependent mechanism (Achard *et al.*, 2003, 2006, 2007; Fu and Harberd, 2003).

Interestingly, DELLAs modulate the balance of SA/JA signalling in disease resistance, promoting JA perception and/or signalling, and repressing SA biosynthesis and signalling (Navarro *et al.*, 2008). However, it is necessary to determine whether this modulation of SA/JA signalling by DELLA proteins also occurs during growth and development. DELLAs also modulate the levels of reactive oxygen species (ROS), which are also involved in growth-regulatory mechanisms (Achard *et al.*, 2008). Because ROS are closely associated with SA signalling in an autoamplification loop (Shirasu *et al.*, 1997), it has been proposed that the attenuation of SA signalling by DELLAs is the result of diminishing ROS levels (Grant and Jones, 2009).

Photosynthesis

SA effects on leaf and chloroplast structure, and RuBisCO activity. Recent evidence also suggests that SA is an important regulator of photosynthesis because it affects leaf and chloroplast structure (Uzunova and Popova, 2000), stomatal closure (Mateo *et al.*, 2004; Melotto *et al.*, 2006), chlorophyll and carotenoid contents (Rao *et al.*, 1997;

Chandra and Bhatt, 1998; Fariduddin *et al.*, 2003), and the activity of enzymes such as RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) and carbonic anhydrase (Pancheva and Popova, 1998; Slaymaker *et al.*, 2002).

Again, it has been observed that the effects of exogenous SA on photosynthesis parameters differ depending on the dose and plant species tested. High SA concentrations (1–5 mM) cause a reduction in the photosynthetic rate (P_N) and RuBisCO activity in barley plants (Pancheva *et al.*, 1996), and reduced chlorophyll contents in cowpea, wheat, and *Arabidopsis* (Rao *et al.*, 1997; Chandra and Bhatt, 1998; Moharekar *et al.*, 2003). The decline of RuBisCO activity was attributed to a 50% reduction in protein levels compared with non-treated plants (Pancheva and Popova, 1998), while total soluble protein decreased ~68%. Exogenous SA induces alterations in leaf anatomy that consist of a reduced width of the adaxial and abaxial epidermis, and of the mesophyll tissue. Such changes correlate ultrastructurally with an increase in chloroplast volume, swelling of grana thylakoids, and coagulation of the stroma (Uzunova and Popova, 2000). Thus, the diminished photosynthetic activity at high concentrations of SA is due to its effects on the thylakoid membranes and light-induced reactions linked to them.

A lower concentration of SA (10 μ M) improves the photosynthetic net CO₂ assimilation in mustard seedlings.

As P_N increases, carboxylation efficiency, chlorophyll content, and the activities of carbonic anhydrase and nitrate reductase are also up-regulated (Fariduddin *et al.*, 2003). It was suggested that the beneficial effects of this low dose of SA in photosynthesis might be related to the prevention of AUX oxidation by SA, since elevated AUX levels increases P_N and nitrate reductase activity (Ahmad *et al.*, 2001).

SA-mediated protection to oxidative stress. An additional positive effect of SA on photosynthesis is the protection conferred to barley seedlings and maize plants against oxidative stress induced by paraquat (Pq) and cadmium, respectively (Ananieva *et al.*, 2002; Krantev *et al.*, 2008). Pq is a non-selective contact herbicide that accepts electrons from photosystem I (PSI) and transfers them to molecular oxygen. This reaction results in accumulation of ROS that cause extensive damage including lipid peroxidation, chlorophyll breakdown, loss of photosynthetic activity and membrane integrity, as well as electrolyte leakage. Treatment of barley seedlings with 0.5 mM SA for 24 h in the dark, followed by 6 h exposure in the light, decreases photosynthesis and transpiration rates by 25% compared with non-treated controls. Pre-treatment of seedlings with the same SA concentration 24 h before exposure to 10 μ M Pq and light reduces Pq-induced chlorophyll losses, H_2O_2 production, lipid peroxidation, and electrolyte leakage, and completely blocked the inhibitory effect of the herbicide on photosynthesis. Similar results are observed in maize plants pre-treated with 0.5 mM SA before exposure to 10–25 μ M cadmium (Krantev *et al.*, 2008). The observed protection of photosynthesis conferred by SA could be the result of a very rapid detoxification of ROS. It has been demonstrated in different plants species that pre-treatment with low concentrations of SA enhances tolerance toward most kinds of abiotic stresses due to an enhanced antioxidant capacity (reviewed by Horváth *et al.*, 2007).

SA contribution to light acclimation and redox homeostasis. In *A. thaliana* the SA signalling pathway contributes to achieving optimal photosynthetic activity through regulating light acclimation processes and redox homeostasis. The significant interplay between ROS and SA signalling was uncovered when applications of H_2O_2 and SA to tobacco and *Arabidopsis* plants induced each other, suggesting they are involved in a self-amplifying feedback loop (Leon *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1997; Shirasu *et al.*, 1997). SA inhibits the antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase (Chen *et al.*, 1993; Durner and Klessig, 1995, 1996), thus contributing to stabilizing H_2O_2 levels.

The role of SA in photosynthetic parameters and short-term acclimation to high light (HL) was deduced from the phenotypes shown by *A. thaliana* plants with contrasting endogenous SA levels. The *Arabidopsis* mutants *dnd1-1* and *cpr5-1*, with high constitutive SA levels, exhibit decreased maximum efficiency of PSII (F_v/F_m), reduced the quantum yield of PSII (Φ_{PSII}), increased thermal dissipation of absorbed light energy (NPQ), and reduced stomatal conductance in low light (LL; 100 μ mol $m^{-2} s^{-1}$) conditions. In

contrast, decreased SA levels in *sid2-2* and *NahG* plants slightly impaired PSII operating efficiency and enhanced thermal energy dissipation in LL (Mateo *et al.*, 2006). SA deficiency in these genotypes correlates with reduced damage to PSII (indicated by the F_v/F_m ratios) compared with wild-type plants, and does not significantly alter leaf water, nutrient contents, and chlorophyll levels (Abreu and Munné-Bosch, 2009). However, the reduced SA levels in *NahG* and *sid2* impair its acclimation to HL (750 μ mol $m^{-2} s^{-1}$), whereas plants with high SA levels (*dnd1-1*, *cpr5-1*) acclimate similarly to wild-type plants (Mateo *et al.*, 2006). Impairment of the light acclimation process in lines with a low SA content is attributed to a higher oxidative stress since the amount of anthocyanins after short-term HL treatment is higher in *NahG* and *sid2* compared with wild-type plants.

These results are consistent with the fact that the SA signalling pathway is activated during light acclimation (Mühlenbock *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009). Foliar levels of conjugated SA, ascorbate, and glutathione increase 1.5-, 1.8-, and 2-fold, respectively, in *Arabidopsis* plants cultivated in HL (450 μ mol $m^{-2} s^{-1}$), compared with plants cultivated in LL (100 μ mol $m^{-2} s^{-1}$; Chang *et al.*, 2009). Likewise, excess excitation energy (EEE; 2200 μ mol $m^{-2} s^{-1}$) induces a 2-fold increase in foliar SA levels (Mühlenbock *et al.*, 2008). This documented regulation of light acclimation by SA is probably the result of the integration of multiple hormonal and ROS signalling pathways because accumulation of ET and ROS precedes SA accumulation in *Arabidopsis* leaves in response to EEE exposure, and the light stress also induces the expression of genes regulated by ET, ROS, glutathione, SA, ABA, AUX, and sugar signalling (Mühlenbock *et al.*, 2008).

Additional evidence supporting SA involvement in light acclimation is that the *Arabidopsis* response to EEE is regulated by *LSD1* (*LESION SIMULATING DISEASE1*), *PAD4* (*PHYTOALEXIN DEFICIENT4*), and *EDS1* (*ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1*), all genes of the SA signalling pathway leading to disease resistance (Rustérucci *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2004). *LSD1* is a negative regulator of SA-dependent programmed cell death and plant disease resistance (Dietrich *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2005), whereas *EDS1* and *PAD4* exert a positive regulation on the SA pathway in plant immunity (Wiermer *et al.*, 2005). Both *EDS1* and *PAD4* modulate ET and ROS production in EEE stress signalling, while *LSD1* limits the spread of cell death, induced by EEE or avirulent pathogens, by suppressing ROS production through the regulation of superoxide dismutase and catalase gene expression and activities. From these results, it was proposed that *LSD1*, *EDS1*, and *PAD4* constitute a ROS/ET homeostatic switch to control acclimatory and pathogen defence mechanisms (Mühlenbock *et al.*, 2008).

SA's role in stomatal closure. Stomatal closure is another important factor for photosynthesis and is subjected to control by various phytohormones (reviewed by Acharya and Assmann, 2009). Recent evidence links stomatal closure

to innate plant immunity, highlighting the role of SA in the function of the guard cells (Melotto *et al.*, 2006). In *Arabidopsis*, 0.4 mM SA induces rapid stomatal closure within 2 h and a 4-fold reduction of stomatal gas exchange (Mateo *et al.*, 2004). Endogenous SA levels promote stomatal closure upon pathogen attack. Both human- (*Escherichia coli*) and plant-pathogenic bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) can induce stomatal closure within the first hour of contact with *Arabidopsis* leaves. This response is compromised in the SA-deficient *NahG* and *eds16-2* genotypes, and in the ABA-deficient mutant *aba3-1*, suggesting that a positive cross-talk between SA and ABA is required to promote stomatal closure upon pathogen perception (Melotto *et al.*, 2006). The stomatal closure promoted by ABA involves calcium (Ca^{2+}) and sphingosine-1-phosphate (Coursol *et al.*, 2003), so it would be interesting to evaluate the relationship to or dependence of SA-induced stomatal closure on these signalling molecules to determine if they are specific or common elements in the phytohormonal control of stomatal aperture, and maybe in development regulation since a close relationship between sphingolipid metabolism and SA signalling profoundly affects plant growth (Table 1).

Respiration

SA regulation of the alternative oxidase (AOX) pathway. SA is involved in the regulation of the AOX pathway in thermogenic and non-thermogenic plants by inducing its gene expression (Kapulnik *et al.*, 1992; Rhoads and McIntosh, 1992). In tobacco cell suspension culture, addition of 2–20 μM SA causes an increased cyanide-resistant O_2 uptake within 2 h, which is accompanied by a 60% increase in the rate of heat evolution from cells, measured by calorimetry (Kapulnik *et al.*, 1992). Moreover, SA treatment induces *NtAOX1* gene expression in a concentration-dependent manner, which correlates with protein abundance. *NtAOX1* transcript abundance increases 2- to 6-fold after 4 h of SA treatment and decreases nearly to basal levels after 24 h (Norman *et al.*, 2004).

AOX couples ubiquinol oxidation with the reduction of molecular oxygen to yield water in a reaction that is insensitive to inhibitors of the cytochrome oxidase pathway. Because AOX is a non-proton-driven carrier, it allows a flexible control of ATP synthesis to maintain growth rate homeostasis (Moore *et al.*, 2002) and is a potential target of SA for plant growth regulation. In addition, AOX is thought to limit ROS production in mitochondria. In cultured tobacco cells, overexpression of *AOX* results in a 57% decrease of ROS abundance, whereas antisense suppression of *AOX* causes a 5-fold increase in ROS levels compared with wild-type cells. It has been suggested that a second oxidase downstream of the ubiquinone (UQ) pool could maintain upstream electron transport components in a more oxidized state, thereby lowering ROS generation by the respiratory chain (Maxwell *et al.*, 1999).

Inhibition of mitochondrial electron transport. Besides the induction of the alternative respiration pathway, that is dependent on the expression of the *AOX* gene, SA might control electron transport and oxidative phosphorylation in plant mitochondria (Xie and Chen, 1999; Norman *et al.*, 2004). SA at concentrations as low as 20 μM inhibits both ATP synthesis and respiratory O_2 uptake within minutes of incubation in tobacco cell cultures, although a significant inhibition occur only at SA concentrations >50 μM . Treatment with 500 μM SA decreases ATP levels by 50% within the first 30 min of incubation, after which the ATP levels continue to decrease to as low as 15% of control levels (Xie and Chen, 1999).

The SA-induced inhibition (from 20 μM to 500 μM) of ATP synthesis in tobacco cell cultures probably does not depend on the induction of the alternative pathway because it occurs within minutes after the addition and does not require *de novo* protein synthesis. In contrast, the induction of alternative respiration by SA is associated with *de novo* synthesis of AOX and requires hours to reach maximum levels (Kapulnik *et al.*, 1992).

Further experiments using a range of substrates and well-coupled isolated mitochondria showed that low concentrations (<1 mM) of SA stimulate the respiration (O_2 uptake) of whole cells and isolated mitochondria in the absence of added ADP by acting as an uncoupler. At higher concentrations (1–5 mM), SA inhibits respiration apparently by preventing electron flow from the substrate dehydrogenases to the UQ pool. Because of its phenolic nature, it has been suggested that SA at millimolar concentrations may act as a quinone analogue, preventing the interaction between dehydrogenases and the UQ pool (Norman *et al.*, 2004). Respiration in isolated mitochondria can be partially recovered from inhibition by isolating the organelles from SA-treated tobacco cells and resuspending them in fresh reaction medium (Xie and Chen, 1999; Norman *et al.*, 2004). The impact of SA on mitochondrial function is not unique to tobacco as similar uncoupling and inhibitory effects on soybean mitochondria (Norman *et al.*, 2004) and SA uncoupling of mammalian mitochondria have also been reported (Jorgensen *et al.*, 1976). It is possible that both the uncoupling and inhibitory effects of SA in respiration would act to lower cell ATP levels in the *Arabidopsis* mutants that accumulate SA, restricting their growth.

Growth

The role of SA in plant growth has been little studied compared with other plant hormones. Most reviews on this topic do not include SA, or its role is barely described (Santner and Estelle, 2009; Santner *et al.*, 2009; Wolters and Jürgens, 2009).

Effects of exogenous SA on vegetative growth. The effect of exogenous SA on growth depends on the plant species, developmental stage, and the SA concentrations tested. Growth-stimulating effects of SA have been reported in soybean (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998), wheat

(Shakirova *et al.*, 2003), maize (Gunes *et al.*, 2007), and chamomile (Kováčik *et al.*, 2009). In soybean plants treated with 10 nM, 100 μ M, and up to 10 mM SA, shoot and root growth increase ~20% and 45%, respectively, 7 d after application. Wheat seedlings treated with 50 μ M SA develop larger ears, and enhanced cell division is observed within the apical meristem of seedling roots (Shakirova *et al.*, 2003). Likewise, 50 μ M SA stimulates the growth of leaf rosettes and roots of chamomile plants by 32% and 65%, respectively, but higher concentrations (250 μ M) have the opposite effect (Kováčik *et al.*, 2009). It has been suggested that the growth-promoting effects of SA could be related to changes in the hormonal status (Shakirova *et al.*, 2003; Abreu and Munné-Bosch, 2009) or by improvement of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance (Stevens *et al.*, 2006).

In *A. thaliana*, exogenous SA (100 μ M and 1 mM) has a negative effect on trichome development because its application reduces trichome density and number (Traw and Bergelson, 2003). Although the biochemical events involved in the regulation of cell division and growth by SA are still unknown, these results correlate well with the antiproliferative properties in mammalian tumour cell lines of the acetylated derivative (Rüschhoff *et al.*, 1998; Dihlmann *et al.*, 2001).

Relationship between the SA signalling pathway and Arabidopsis growth rate. More direct evidence supporting the key role of endogenous SA in the regulation of plant cell growth comes from the characterization of *Arabidopsis* mutant or transgenic plants affected in the SA signalling pathway (Table 1). *Arabidopsis* plants that overexpress the SA-inducible *DOF* (DNA binding with one finger) transcription factor *OBP3* show a decreased growth rate in both roots and aerial parts of the plants, which in the most severe cases led to death (Kang and Singh, 2000). This dwarf phenotype is also observed in *Arabidopsis* mutants that have constitutively high levels of SA, such as *cpr5* (constitutive expressor of *PR5*; Bowling *et al.*, 1997), *acd6-1* (accelerated cell death; Rate *et al.*, 1999), and *agd2* (aberrant growth and death; Rate and Greenberg, 2001). In contrast, the SA-depleted *Arabidopsis NahG* transgenic plants have a higher growth rate (Abreu and Munné-Bosch, 2009; Du *et al.*, 2009) that is reflected by a 1.7-fold increase in leaf biomass when compared with wild-type plants (Abreu and Munné-Bosch, 2009). The effects of SA depletion on plant growth are more evident at low temperature; *Arabidopsis NahG* transgenic plants grow faster at 4 °C than wild-type plants and show a similar growth phenotype to the *amp1* mutant that has increased CK levels (Xia *et al.*, 2009). The elevated CK levels or the decreased SA levels improve plant growth at low temperatures through different mechanisms. The higher growth rate of *amp1* in the cold is associated with a continuous cell division rather than enhanced cell expansion, whereas the increased growth of *NahG* plants at 4 °C results from enhanced cell expansion rather than continuous cell division (Scott *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2009). Moreover, the enlarged cell size of *NahG* plants is associ-

ated with an extensive endoreduplication. *NahG* plants have approximately one additional endocycle compared with wild-type plants, resulting in DNA values as high as 32C. It has been suggested that SA negatively regulates expression of cyclin D3 (*CYCD3*; which drives the G₁/S phase transition) because an increased expression is found in *NahG* plants grown at 4 °C (Xia *et al.*, 2009). These results suggest an unexplored cross-talk between SA, CK, and BR signalling pathways since the latter two are positive regulators of *CYCD3* expression (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000).

Although most of the evidence suggests that SA is a negative regulator of cell division, its role is much more complex. Depletion of SA levels through *NahG* transgene expression reverts the *acd6-1* phenotype, but lead to the appearance of abnormal tumour-like growths in the *agd2* mutant background. The same effect is also observed in *acd6 NahG* plants treated with the SA analogue benzothiazole *S*-methyl ester (BTH; Rate *et al.*, 1999). In *acd6-1* mutants, SA stimulates endoreduplication and cell enlargement, while in the *agd2* background SA suppresses both processes. This discrepancy could possibly be the result of SA interaction with multiple receptors or signalling pathways that control cell growth and development.

NPR1 involvement in the balance of growth regulation and cell death. The transcriptional regulator NPR1 is the key transducer of the SA signal as *npr1* mutants are SA insensitive. Despite NPR1 is required for SA perception, it is not considered to be the SA receptor, which has not yet been identified. Although there are five paralogues of *NPR1* in the *Arabidopsis* genome, there is a partial redundancy in SA perception as determined by the insensitivity to BTH in a high-throughput mutant screening (Canet *et al.*, 2010a, b). The *npr1-1* mutation in the *acd6* background causes a reduction and delay in the cell death phenotype and partially reverts the reduced stature of *acd6* mutants. However, the *acd6 npr-1* double mutants develop abnormal growths that protrude on the abaxial leaf surface (Vanacker *et al.*, 2001). It would be interesting to determine whether NPR1 is involved in a cross-talk with other phytohormones which could help to explain the abnormal growth, and whether this interaction resembles those between NPR1 and the JA, ABA, and ET pathways, to modulate plant defence responses against pathogens (Spoel *et al.*, 2003; Yasuda *et al.*, 2008; León-Reyes *et al.*, 2009).

Evidence of a cross-talk between SA and AUX signalling during vegetative growth. The discovery that the SA-inducible *DOF* transcription factors *OBP1*, *OBP2*, and *OBP3* are also responsive to AUXs (Kang and Singh, 2000) provides a strong link between the SA and AUX signalling pathways. The increased cell division rate observed in wheat seedlings treated with 50 μ M SA correlates with an increase in the endogenous levels of the AUX indole acetic acid (IAA; Shakirova *et al.*, 2003). Interestingly, the reduced apical dominance and stunted growth phenotypes in the *Arabidopsis cpr5*, *cpr6*, and *sncl* mutants that contain

increased endogenous SA levels are reminiscent of AUX-deficient or AUX-insensitive mutants. This association indicates that SA might interfere with the AUX-mediated responses. In support of this link, these SA-accumulating mutants contain lower endogenous levels of free IAA and reduced sensitivity to AUXs compared with wild-type plants, although exogenous treatment of wild-type plants with SA had little effect on free AUX levels (D. Wang *et al.*, 2007). Moreover, the cross of the AUX-overproducing mutant *yucca* with the SA-accumulating mutants *cpr6* or *sncl* suppresses most of the phenotypes associated with *yucca*. This suppression is due to a repression of the AUX response and not to a reduction in its synthesis. Transcriptomic analysis of *Arabidopsis* plants treated with the SA analogue BTH showed that 21 genes involved in AUX signal transduction are repressed, including *AUX1* and *PIN7* (encoding an AUX importer and exporter, respectively), *TIR1* and *AFB1* (genes for AUX receptors), and *Aux/IAA* family genes (D. Wang *et al.*, 2007). AUX is not the only growth phytohormone targeted by SA because several *Arabidopsis* genes involved in the GA pathway are also down-regulated in response to BTH treatment (Wang *et al.*, 2006).

An additional interesting finding is that the inhibitory growth effect of high SA levels in several *Arabidopsis cpr* mutants is partially overcome at HL intensities. The dwarf phenotype of *cpr6-1*, *cpr5-1*, and *dnd1-1* is partially reverted under HL conditions, whereas *cpr1-1* reverts to almost normal growth. Growth retardation in these mutants is due to impaired photosynthetic activity, and they are able to improve the operating efficiency of PSII during acclimatory responses to HL (Mateo *et al.*, 2006). Although the precise mechanisms are still unknown, SA appears to be a key molecule to maintain a proper balance between photosynthesis and growth.

The SA, ROS, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in plant growth regulation. A very important aspect to consider in plant growth regulation is the tight and complex relationship between SA, ROS, and MAPK cascades, although this has been more thoroughly described for the plant defence response. *Arabidopsis* MPK6 is the orthologue of tobacco SIPK (SA-induced protein kinase; Zhang and Klessig, 1997), and its activity is essential for normal growth and development (Bush and Krysan, 2007; H. Wang *et al.*, 2007, 2008). *Arabidopsis* MPK4 is also closely related to the SA signalling pathway by acting as a negative regulator. The *mpk4* mutants have a severely dwarf phenotype that might be due to SA accumulation. Two lines of evidence support this conclusion because mutations that disrupt SA biosynthesis (*eds1* and *pad4*) or overexpression of the *NahG* transgene partially revert the *mpk4* phenotype (Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006). Further evidence linking SA to *Arabidopsis* growth comes from the characterization of the null *mkp1* (*map kinase phosphatase1*) and *ptp1* (*protein tyrosine phosphatase1*) mutants, which are negative regulators of MPK6 and MPK3 (Bartels *et al.*, 2009). The *mkp1* and *mkp1 ptp1*

mutants have growth defects, increased levels of endogenous SA, and constitutive defence responses including *PR* gene expression and resistance to the bacterial pathogen *P. syringae*. Reduction of SA levels by the *NahG*, *pad4*, or *eds1* genotypes largely suppresses the *mkp1* and *mkp1 ptp1* dwarf phenotypes and the constitutive *PR* gene expression. In addition, *mpk6* and *mpk3* null mutations partially and differentially suppress the *mkp1* (Col-0) phenotype. From these results it is concluded that MKP1 and PTP1 regulate plant growth homeostasis (with MKP1 having the predominant role) acting as repressors of the stress-induced MAPK pathway involving MPK3 and MPK6, which leads to SA biosynthesis and expression of *PR* genes (Bartels *et al.*, 2009).

MAPK cascades are important mediators of the interplay between SA, other phytohormones, and ROS signalling in cell growth regulation. ROS produced by NADPH oxidases are important regulators of polarized growth of root hairs and pollen tubes, by controlling cell wall rigidity and cell signalling events involving Ca²⁺ and MAPK cascades (Foreman *et al.*, 2003; Potocký *et al.*, 2007). *Arabidopsis* PTP1 and MPK6 activities are redox regulated; PTP1 is reversibly inactivated by 1 mM H₂O₂, whereas MPK6 is strongly activated under these conditions, suggesting that PTP1 could be a primary target for ROS signalling in plants (Gupta and Luan, 2003).

Flowering

Flowering-inducing activity of SA. The contribution of SA to flowering regulation has been well known for a long time. Initially it was found that 4 µM SA promotes flower bud formation from tobacco callus (Lee and Skoog, 1965). SA was later identified as the phloem-transmissible factor secreted in the aphid honeydew responsible for inducing flowering in *Lemna gibba* plants kept under a non-photoinductive light cycle (Cleland and Ajami, 1974). SA (3–10 µM) also stimulates flowering in various genera of the Lemnaceae family, including long day (LD), short day (SD), and photoperiod-insensitive types (Khurana and Cleland, 1992). In the SD species *Pharbitis nil*, flowering is induced by poor-nutrition stress. However, flowering under this condition was prevented by treatment with amino-oxyacetic acid, a phenylalanine ammonia-lyase inhibitor, but is restored by SA application. Such behaviour is observed only under stress conditions; thus it appears that SA might be necessary but not sufficient to induce flowering (Wada and Takeno, 2010; Wada *et al.*, 2010).

Further studies have demonstrated that the inflorescences of thermogenic plants have high endogenous SA levels (Raskin *et al.*, 1990), and that in non-thermogenic plants such as tobacco and *Arabidopsis*, SA levels increase 5- and 2-fold in their leaves at the initiation of or during transition to flowering, respectively (Yalpani *et al.*, 1993; Abreu and Munné-Bosch, 2009). In accordance with these findings, SA-deficient *Arabidopsis* plants (*NahG*, *sid1eds5*, and *sid2*) exhibit a late-flowering phenotype under both SD (8 h light

and 16 h dark) and LD (16 h light, 8 h dark) conditions, which suggests an interaction of SA with photoperiod and autonomous pathways (Martínez *et al.*, 2004).

A key element linking SA and flowering was recently described in sunflower. The transcription factor HAHB10 belongs to the HD-Zip II family and, when it is constitutively expressed in *Arabidopsis*, induces flowering by up-regulating specific flowering transition genes and repressing genes related to biotic stress. Interestingly, HAHB10 expression is induced after SA treatment and after infection with *P. syringae* (Dezar *et al.*, 2011).

SA interaction with the photoperiod and autonomous pathways. Flowering is regulated by an integrated network of several pathways in *Arabidopsis*, and the role of many genes has been characterized. *CONSTANS* (*CO*) is a key regulator of the photoperiod pathway, the gene *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) is a flowering repressor that integrates autonomous and vernalization pathways, and these pathways converge on a small number of integrators such as *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*). The photoperiod and autonomous pathways converge on the *SOC1* gene that encodes a MADS box protein which is activated by *CO* and repressed by *FLC* (Mouradov *et al.*, 2002). Recent discoveries have demonstrated that SA is involved in regulating transcription of these genes (Martínez *et al.*, 2004).

The late-flowering phenotype of SA-deficient plants correlates with a 2- to 3-fold higher expression of the floral repressor gene *FLC*, and decreased levels of the *FT* transcript compared with wild-type plants, under either SD or LD conditions. Moreover, exogenous application of 100 μ M SA to *Arabidopsis* wild-type plants causes a decrease in *FLC* transcript levels, and UV-C light irradiation that induces SA accumulation activates *FT* expression. Interestingly, although SA seemed to be a repressor of *FLC* expression, this gene is not essential for the late-flowering phenotype of SA-deficient plants because *flc-3 NahG* mutant transgenic lines do not differ in flowering time compared with their parental plants grown under LD and SD conditions. Likewise, expression of other genes such as *CO* and *SOC1* in SA-deficient plants is different under SD and LD conditions. In LD-grown SA-deficient plants, levels of *CO* and *SOC1* transcripts decrease \sim 50% when compared with wild-type plants, but in SD-grown SA-deficient plants the transcript levels of *CO* increase 2- to 3-fold and *SOC1* expression does not change, compared with wild-type plants. Genetic analysis of the interactions of SA with these components of the photoperiod pathway showed that exogenous SA (100 μ M) could revert the late flowering phenotype of the *co-1* mutant, but not of the *soc1* mutant, under LD conditions. Thus, this evidence suggests that SA regulates flowering by interacting with the photoperiod-dependent pathway through a CO-independent branch (Martínez *et al.*, 2004).

Arabidopsis SIZ1 is a key flowering regulator through the control of SA-mediated floral promotion. Loss-of-function

siz1 mutants have an early flowering phenotype under SDs that correlates with high SA levels. Upon *NahG* overexpression in these mutants, the early flowering is suppressed. *SIZ1* positively regulates *FLC* expression, probably through sumoylation of *FLD* (*FLOWERING LOCUS D*), a plant orthologue of the human histone demethylase 1 (Jin *et al.*, 2008).

Additional evidence obtained from genetic approaches has shown that the transition to flowering promoted by SA also depends on *LD*, *FVE*, and *FCA* genes of the autonomous pathway. Application of 100 μ M SA to *ld-1*, *fve-3*, and *fca-9* mutants does not affect their delayed flowering phenotype. Moreover, *fve-3 NahG*, and *fca-9 NahG* plants flower later than their parental plants under SD conditions, but under LD conditions only *fca-9 NahG* plants flower after *fca-9* does. It has been suggested that in LD-grown plants, SA regulates flowering time through an *FCA*-independent pathway that may be the one mediated by *FVE*, whereas under LD conditions, SA could exert its regulation in parallel to both branches of the autonomous pathway in order to regulate integrator genes such as *FT* and *SOC1*. The vernalization and GA pathways do not appear to be affected by SA as *NahG*-overexpressing plants are fully responsive to cold temperatures, exogenous GAs, or constitutive activation of the GA signalling pathway in the *spy-3* mutant background for flower development (Martínez *et al.*, 2004).

Further research must answer key questions such as how the SA signalling pathway interacts with other hormones implicated in the control of flowering time in *Arabidopsis*, the mediators of this cross-talk (i.e. MAPKs, transcriptional regulators, or transcription factors), and whether regulation of flowering by SA is mediated by NPR1.

Senescence

SA requirement for senescence regulation. After reviewing the important role of SA in cell redox homeostasis and photosynthesis, it is not surprising that this phytohormone is also involved in senescence regulation. Senescence is characterized by a decline in photosynthetic activity and increased ROS levels due to a loss of antioxidant capacity. These events are probably partially due to SA accumulation. In *Arabidopsis* senescent leaves, SA levels increase \sim 4-fold at the mid-senescent stage. Consistent with this observation, *Arabidopsis* plants affected in SA biosynthesis, such as the transgenic *NahG* and the mutant *pad4*, or with a disrupted SA signalling pathway, such as *npr1*, exhibit altered senescence patterns that include delayed yellowing and reduced necrosis compared with wild-type plants (Morris *et al.*, 2000).

SA regulation of senescence-associated genes (SAGs). Senescence is accompanied by important changes in gene expression, and SA contributes greatly to this process. Transcripts of several SAGs, such as *SAG12*, are considerably reduced or undetectable in SA-deficient *Arabidopsis* plants (Morris *et al.*, 2000). Moreover, SA activates the expression of the *Arabidopsis* senescence-related

genes α VPE, γ VPE, WRKY6, WRKY53, and SEN1 that encode two vacuolar processing enzymes, two transcription factors, and a protease, respectively (Kinoshita *et al.*, 1999; Robatzek and Somssich, 2001; Miao *et al.*, 2004; Schenk *et al.*, 2005).

The involvement of the SA signalling pathway in senescence was confirmed through a detailed gene expression analysis in *Arabidopsis* senescent leaves (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Almost 20% of the up-regulated genes during senescence show at least 2-fold reduced expression in SA-deficient *NahG* transgenic plants. Most of the senescence-enhanced genes that are dependent on the SA pathway encode kinases, transferases, and hydrolases, but their function in senescence progression remains to be elucidated. Although a great deal of effort has been put into identifying the signalling factors required for senescence regulation, further research must determine whether SA is involved in different stages of senescence, and the interconnecting networks with other phytohormones that promote (ABA, JA, an ET) or delay (CKs and GAs) senescence.

WRKY53 in the integration of SA and JA signalling for senescence regulation. The transcription factor WRKY53 is a master regulator of senescence, and also a convergence node with the JA signalling pathway by interacting with the JA-inducible protein ESR (epithiospecifier senescence regulator). Expression of WRKY53 and ESR genes is antagonistically regulated in response to JA and SA, and each one negatively influences the other. ESR appears to have a dual function in *Arabidopsis*, one in senescence and the other in pathogen defence, most probably depending on its cellular localization (Miao and Zentgraf, 2007). ESR is localized in the cytoplasm in the absence of WRKY53, where it could function as a cofactor of myrosinase to drive the conversion of glucosinolates into nitriles, which is important for resistance to fungal and bacterial pathogens (de Torres Zabala *et al.*, 2005). In the presence of WRKY53, ESR is directed to the nucleus where it inhibits WRKY53 binding to DNA and affects the transcription of SAGs such as SAG12 and SAG101 (Miao *et al.*, 2004). These results support the hypothesis that the SA-inducible WRKY53 gene is expressed early during leaf senescence, then the increase of JA levels during progression of leaf senescence induces ESR expression to modulate WRKY53 action in the nucleus, and WRKY53 expression is suppressed after the onset of senescence (Hinderhofer and Zentgraf, 2001). Recently, it has been found that WRKY53 degradation is also tightly regulated and is mediated by the HECT E3 ubiquitin ligase UPL5 (Miao and Zentgraf, 2010).

Conservation of the SA signalling pathway in the senescence process of different tissues. The importance of the SA pathway in this developmental stage is highlighted by a comparative analysis of genes expressed during silique, leaf, and petal senescence (Wagstaff *et al.*, 2009). Most of the genes that show SA-dependent expression during leaf senescence (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005) also show

increased expression during senescence in petal and siliques, whereas the other phytohormones cause differential expression profiles in the three plant tissues studied. ET biosynthesis and binding appear to be more important in silique and petal senescence than in leaves (although some elements are conserved in the three tissues), while genes linked to AUX biosynthesis and response are strongly up-regulated in petals but down-regulated in leaves. In contrast, the SA pathway is active in the three tissues during senescence (Wagstaff *et al.*, 2009).

Autophagy induction by SA during developmental leaf senescence. Autophagy is an important process for plant development, especially during senescence and in the defence response (Kwon and Park, 2008). The importance of autophagy in the senescence process became evident by the characterization of *Arabidopsis* knock-out plants affected in different ATG (autophagy) genes (*ATG4*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG9*, *ATG10*, and *ATG18a*). These plants display an enhanced senescence phenotype under nutrient-rich conditions (reviewed by Bassham *et al.*, 2006). The autophagy genes *ATG5*, *ATG8*, and *ATG12* are highly expressed in senescent tissues (Wagstaff *et al.*, 2009). In the *atg5* mutant the senescence phenotype is associated with SA accumulation as its endogenous levels are ~3-fold higher compared with wild-type plants (Yoshimoto *et al.*, 2009). These mutants also accumulate high levels of H₂O₂, and highly express the senescence marker gene *SAG12*, as well as the SA-responsive defence genes *PR1* and *PR2*. Although *atg5* also shows increased levels of other phytohormones (JA, AUXs, and ABA), the early senescence phenotype can be attributed only to SA because disruption of its signalling pathway by *NahG* overexpression or *sid2* and *npr1* mutations reverted the phenotype. In contrast, mutations in the JA (*coil* or *jar1*) or ET (*ein2*) signalling pathways do not affect the *atg5* early senescence phenotype. Interestingly, starvation- and dark-induced senescence in the *atg2* and *atg5* mutants is not suppressed by SA depletion in *NahG*-overexpressing plants. These results correlate with previous findings showing that SA-responsive genes are only up-regulated during developmental leaf senescence, but not in dark-induced senescence (van der Graaff *et al.*, 2006). Autophagy induction by SA was further confirmed by the observation of numerous autophagosome structures in root cells of *Arabidopsis* seedlings expressing green fluorescent protein (GFP)-ATG8a and treated with the SA analogue BTH (100 μ M, 8 h). This response is not present in BTH-treated *atg2* and *atg5* mutant roots, and, notably, NPR1 is essential for this response because *npr1* mutant roots do not show rapid accumulation of autophagic bodies after BTH treatment (Yoshimoto *et al.*, 2009).

Autophagy induced by SA is regulated by ACBP3, an acyl-CoA-binding protein that binds phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, thus interfering with the formation of the ATG5-phosphatidylethanolamine complex and disrupting autophagosome formation and subsequent degradation of ATG8 (Xiao and Chye, 2010; Xiao *et al.*, 2010).

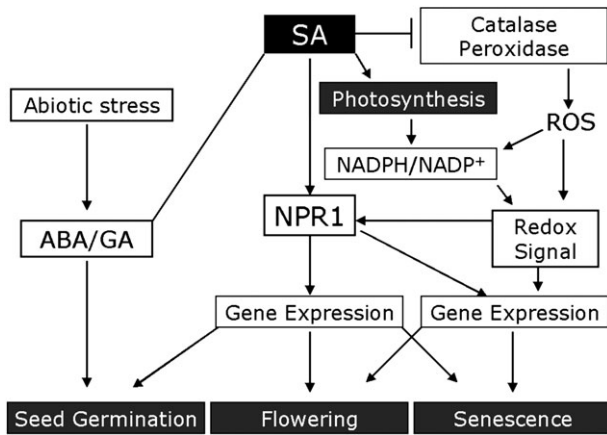


Fig. 2. Descriptive model of salicylic acid function in plant growth and development. SA is perceived by NPR1, a transcriptional activator that regulates gene expression that might participate in seed germination, flowering, and/or senescence regulation. In addition, SA is a key regulator of plant cell redox status by inhibiting catalase and peroxidase activity, and thus modulating reactive oxygen species (ROS) levels. The positive effect of SA on photosynthesis contributes to electron acceptor availability and redox status. NPR1 oligomerization is redox modulated.

Although it is still controversial whether autophagy functions as a cell survival mechanism or as an alternative cell death pathway (Hayward *et al.*, 2009; Hofius *et al.*, 2009; Yoshimoto *et al.*, 2009), SA has a key role in both scenarios, as it has been demonstrated that SA can induce autophagy (generally conceived as a negative regulator of programmed cell death), and proper SA levels are critical to execute cell death fully.

Conclusion

SA is a true plant hormone that goes beyond the defence reaction in plant immunity and response to abiotic stress. In coordination with CKs, ET, AUXs, GAs, JA, and ABA, SA importantly contributes to growth and development regulation, although the biochemical mechanisms that mediate most of these responses remain largely unknown. Further analysis of the dual role of SA in stress responses and development will allow the identification of plant mechanisms devoted to maintaining a proper balance between growth and defence.

Despite the fact that several SA-binding proteins (SABPs) have been identified, the identification and characterization of the SA receptor is probably the most anticipated discovery. Although *NPR1* is not a receptor itself, it is the only known gene that, when mutated, generates plants insensitive to SA (Canet *et al.*, 2010b) and causes a clear phenotype on plant defence response and some effects on development. However, not all SA-induced genes depend on a functional NPR1, as demonstrated in microarray analysis in wild-type and *npr1* genotypes. For example, senescence-associated WRKY53 transcription is induced by SA but, in

the *npr1* mutant, transcript levels are not significantly different from those of the wild type in *Arabidopsis* seedlings treated with 0.5 mM SA for 2.5 h (Blanco *et al.*, 2009). In this context, characterization of NPR1 paralogues and alleles must reveal their function, both during defence response (Zhang *et al.*, 2006), as has been determined for *NPR3* and *NPR4*, and during development (Canet *et al.*, 2010a, b).

In *Arabidopsis* it is clear that NPR1 subcellular localization is regulated through a redox-sensitive mechanism mediated by conserved cysteine residues that form intermolecular disulphide bonds that upon SA accumulation are reduced and the monomers translocated into the nucleus (Mou *et al.*, 2003). Once in the nucleus, the NPR1 monomer functions as a co-activator of gene transcription, and the nuclear levels of this protein are kept in check by proteasome-mediated degradation (Spoel *et al.*, 2009). However, this might not be a universal mechanism in all plant species as it has recently been shown that tobacco NPR1 lacks the conserved cysteine residues, and differs in subcellular localization and transactivation potential from AtNPR1, as well in its sensitivity to SA (Maier *et al.*, 2011). Thus future research should emphasize the functional genomics of NPR1 paralogues in various species, as well as the mechanism through which SA modulates redox potential in the plant cell.

The role of SA in plant growth and development is still a controversial field in plant biology; however, various phenotypes are associated with deregulated SA levels (Table 1) and new discoveries and mutant characterization should shed more light on this topic. SA's complex role is not limited only to its canonical signal transducer, NPR1, but also involves its role in modulating the plant cell redox status (Fig. 2).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the critical comments from Dr Sobeida Sanchez-Nieto and two anonymous reviewers. MR-SV received a doctoral fellowship from CONACYT (170394) for her PhD studies on the Biochemical Sciences Graduate Programme, UNAM. Research in the laboratory of JP is supported by grants from DGAPA-PAPIIT (IN220010), CONACYT (50503) and Facultad de Química (PAIP 6290-08).

References

- Abreu ME, Munné-Bosch S. 2009. Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1261–1271.
- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91–93.

- Achard P, Liao L, Jiang C, Desnos T, Bartlett J, Fu X, Harberd NP.** 2007. DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiology* **143**, 1163–1172.
- Achard P, Renou JP, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P.** 2008. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology* **18**, 656–660.
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP.** 2003. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant Cell* **15**, 2816–2825.
- Acharya BR, Assmann SM.** 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology* **69**, 451–462.
- Ahmad A, Hayat S, Fariduddin Q, Ahmad I.** 2001. Photosynthetic efficiency of plants of *Brassica juncea* treated with chlorosubstituted auxins. *Photosynthetica* **39**, 565–568.
- Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jiménez JA, Nicolás G, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, Nicolás C.** 2009. Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in Arabidopsis seeds. *Plant Physiology* **150**, 1335–1344.
- Ananieva EA, Alexieva VS, Popova LP.** 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* **159**, 685–693.
- Bartels S, Anderson JC, González Besteiro MA, Carreri A, Hirt H, Buchala A, Métraux JP, Pech SC, Ulm R.** 2009. MAP KINASE PHOSPHATASE1 and PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**, 2884–2897.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K.** 2006. Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**, 2–11.
- Blanco F, Salinas P, Cecchini NM, Jordana X, Van Hummelen P, Alavarez ME, Holuigue L.** 2009. Early genomic responses to salicylic acid in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **70**, 79–102.
- Borsani O, Valpuesta V, Botella A.** 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology* **126**, 1024–1030.
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X.** 1997. The *cpr5* mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The Plant Cell* **9**, 1573–1584.
- Bowling SA, Guo A, Cao H, Gordon AS, Klessig DF, Dong X.** 1994. A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **6**, 1845–1857.
- Brodersen P, Malinovsky FG, Hématy K, Newman MA, Mundy J.** 2005. The role of salicylic acid in the induction of cell death in Arabidopsis *acd11*. *Plant Physiology* **138**, 1037–1045.
- Brodersen P, Petersen M, Nielsen HB, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J.** 2006. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* **47**, 532–546.
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen LB, Brown RE, Mundy J.** 2002. Knockout of Arabidopsis *ACCELERATED-CELL-DEATH11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes and Development* **16**, 490–502.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ.** 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal* **42**, 567–585.
- Bush S, Krysan PJ.** 2007. Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence and embryo development. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2181–2191.
- Canet JV, Dobón A, Ibañes F, Perales L, Tornero P.** 2010a. Resistance and biomass in Arabidopsis: a new model for salicylic acid perception. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 126–141.
- Canet JV, Dobón A, Roig A, Tornero P.** 2010b. Structure–function analysis of *npr1* alleles in Arabidopsis reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid. *Plant, Cell and Environment* **33**, 1911–1922.
- Cao D, Hussain A, Cheng H, Peng J.** 2005. Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis. *Planta* **223**, 105–113.
- Chandra A, Bhatt RK.** 1998. Biochemical and physiological response to salicylic acid in relation to the systemic acquired resistance. *Photosynthetica* **35**, 255–258.
- Chang C, Ślesak I, Jordá L, Sotnikov A, Melzer M, Miszalski Z, Mullineaux PM, Parker JE, Karpińska B, Karpiński S.** 2009. Arabidopsis chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiology* **150**, 670–683.
- Chen F, D'Auria JC, Tholl D, Ross JR, Gershenzon J, Noel JP, Pichersky E.** 2003. An Arabidopsis thaliana gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *The Plant Journal* **36**, 577–588.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF.** 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**, 1883–1886.
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B.** 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**, 493–496.
- Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, Loake GJ.** 2004. Drought tolerance established by enhanced expression of the *CCI-NBS-LRR* gene, *ADR1*, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *The Plant Journal* **38**, 810–822.
- Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X.** 1998. Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant Arabidopsis *cpr6-1* mutant. *The Plant Cell* **10**, 557–569.
- Cleland CF, Ajami A.** 1974. Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiology* **54**, 904–906.
- Clough SJ, Fengler KA, Yu IC, Lippok B, Smith RK Jr, Bent AF.** 2000. The Arabidopsis *dnd1* 'defense, no death' gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 9323–9328.

- Coquoz JL, Buchala A, Métraux JP.** 1998. The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiology* **117**, 1095–1101.
- Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM.** 2003. Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**, 651–654.
- Dean JV, Mills JD.** 2004. Uptake of salicylic acid 2-O- β -D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiologia Plantarum* **120**, 603–612.
- Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T.** 2005. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**, 287–296.
- de Torres Zabala M, Grant M, Bones AM, Bennett R, Lim YS, Kissen R, Rossiter JT.** 2005. Characterization of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **66**, 859–867.
- Dezar CA, Giacomelli JI, Manavella PA, Re DA, Alves-Ferreira M, Baldwin IT, Bonaventure G, Chan RL.** 2011. HAHB10, a sunflower HD-Zip II transcription factor, participates in the induction of flowering and in the control of phytohormone-mediated responses to biotic stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1061–1076.
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, Dangl JL.** 1997. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**, 685–694.
- Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M.** 2001. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate beta-catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* **20**, 645–653.
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun T-P.** 2004. The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *The Plant Cell* **16**, 1392–1405.
- Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy ASN, Poovaiah BW.** 2009. Ca^{2+} /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* **457**, 1154–1158.
- Durner J, Klessig DF.** 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 11312–11316.
- Durner J, Klessig DF.** 1996. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 28492–28501.
- Durner J, Shah J, Klessig DF.** 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **2**, 266–274.
- Durrant WE, Dong X.** 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 185–209.
- Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A.** 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* **41**, 281–284.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, et al.** 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant growth. *Nature* **422**, 442–446.
- Freeman JL, Garcia D, Kim D, Hopf AM, Salt DE.** 2005. Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Physiology* **137**, 1082–1091.
- Fu X, Harberd NP.** 2003. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**, 740–743.
- Grant MR, Jones JDG.** 2009. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**, 750–752.
- Greenberg JT, Silverman FP, Liang H.** 2000. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* **156**, 341–350.
- Guan L, Scandalios JG.** 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 5930–5934.
- Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Guneri Bagci E, Cicek N.** 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* **164**, 728–736.
- Gupta R, Luan S.** 2003. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiology* **132**, 1149–1152.
- Gutiérrez-Coronado MA, Trejo-López C, Larqué-Saavedra A.** 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 563–565.
- Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y.** 2009. The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an ‘inhibitor of an inhibitor’ enables flexible response to fluctuating environments. *The Plant Cell* **21**, 1328–1339.
- Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP.** 2009. Autophagy and plant innate immunity: defense through degradation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **20**, 1041–1047.
- Hiderhofer K, Zentgraf U.** 2001. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**, 469–473.
- Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NHT, Mattsson O, Jorgensen LB, Jones JDG, Mundy J, Petersen M.** 2009. Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell* **137**, 773–783.
- Horváth E, Szalai G, Janda T.** 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 290–300.
- Hu Y, Bao F, Li J.** 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **24**, 693–701.
- Janda T, Szalai G, Tari I, Páldi E.** 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* **208**, 175–180.
- Jin JB, Jin YH, Lee J, et al.** 2008. The SUMO E3 ligase, *AtSIZ1*, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through effects on *FLC* chromatin structure. *The Plant Journal* **53**, 530–540.
- Jorgensen TG, Weis-Fogh US, Nielsen HH, Olesen HP.** 1976. Salicylate- and aspirin-induced uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from the mucosal membrane

of the stomach. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **36**, 649–654.

Jurkowski GI, Smith RK, Yu IC, Ham JH, Sharma SB,

Klessig DF, Fengler KA, Bent AF. 2004. *Arabidopsis DND2*, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the 'defense, no death' phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 511–520.

Kang HG, Singh KB. 2000. Characterization of salicylic acid-responsive *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *The Plant Journal* **21**, 329–339.

Kang HM, Saltveit ME. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum* **115**, 571–576.

Kapulnik Y, Yalpani N, Raskin I. 1992. Salicylic acid induces cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures. *Plant Physiology* **100**, 1921–1926.

Khurana JP, Cleland CF. 1992. Role of salicylic acid and benzoid acid in flowering of a photoperiod-insensitive strain, *Lemna paucicostata* LP6. *Plant Physiology* **100**, 1541–1546.

Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 1999. Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *The Plant Journal* **19**, 43–53.

Klessig DF, Malamy J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* **26**, 1439–1458.

Kováčik J, Grúz J, Backor M, Strnad M, Repčák M. 2009. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Reports* **28**, 135–143.

Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology* **165**, 920–931.

Kwon SI, Park OK. 2008. Autophagy in plants. *Journal of Plant Biology* **51**, 313–320.

Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* **138**, 882–897.

Larkindale J, Knight MR. 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* **128**, 682–695.

Lee HI, León J, Raskin I. 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 4076–4079.

Lee HI, Raskin I. 1999. Purification, cloning and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 36637–36642.

Lee S, Chen H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA-like* gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes and Development* **16**, 646–658.

Lee S, Kim S-G, Park C-M. 2010. Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **188**, 626–637.

Lee TT, Skoog F. 1965. Effect of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **18**, 386–402.

Leon J, Lawton MA, Raskin I. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* **108**, 1673–1678.

León-Reyes A, Spoel SH, De Lang ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RAM, Ritsema T, Pieterse CMJ. 2009. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology* **149**, 1797–1809.

Liang H, Nao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT. 2003. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes and Development* **17**, 2636–2641.

Maier F, Zwicker S, Hüchelhoven A, Meissner M, Funk J, Pfitzner AJP, Pfitzner UM. 2011. NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Molecular Plant Pathology* **12**, 73–91.

Malamy J, Hennig J, Klessig DF. 1992. Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *The Plant Cell* **4**, 359–366.

Martínez C, Pons E, Prats G, León J. 2004. Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal* **37**, 209–217.

Mateo A, Funck D, Mühlenbock P, Kular B, Mullineaux PM, Karpinski S. 2006. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1795–1807.

Mateo A, Mühlenbock P, Rusterucci C, Chang CC, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM, Karpinski S. 2004. LESION SIMULATING DISEASE1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiology* **136**, 2818–2830.

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 8271–8276.

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969–980.

Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* **132**, 272–281.

Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U. 2004. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **55**, 853–867.

Miao Y, Zentgraf U. 2007. The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the

jasmonic acid and salicylic acid equilibrium. *The Plant Cell* **19**, 819–830.

Miao Y, Zentgraf U. 2010. A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates *Arabidopsis* leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53. *The Plant Journal* **63**, 179–188.

Moharekar ST, Lokhande SD, Hara T, Tanaka R, Tanaka A, Chavan PD. 2003. Effects of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents on wheat and moong seedlings. *Photosynthetica* **41**, 315–317.

Moore AL, Albury MS, Crichton PG, Affourtit C. 2002. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in Plant Science* **7**, 478–481.

Morris K, Mackerness SAH, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V. 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* **23**, 677–685.

Mou Z, Fan W, Dong X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935–944.

Mouradov A, Cremer F, Coupland G. 2002. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* **14**, S111–S130.

Mühlenbock P, Szechynska-Hebda M, Plaszczyca M, Baudo M, Mateo A, Mullineaux PM, Parker JE, Karpińska B, Karpiński S. 2008. Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 2339–2356.

Munné-Bosch S, Peñuelas J. 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* **217**, 758–766.

Navarre DA, Mayo D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**, 179–188.

Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG. 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology* **18**, 650–655.

Nawrath C, Métraux JP. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell* **11**, 1393–1404.

Norman C, Howell KA, Millar H, Whelan JM, Day DA. 2004. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology* **134**, 492–501.

Pancheva TV, Popova LP. 1998. Effect of the salicylic acid on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in barley leaves. *Plant Physiology* **152**, 381–386.

Pancheva TV, Popova LP, Uzunova AN. 1996. Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal of Plant Physiology* **149**, 57–63.

Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**, 113–116.

Petersen M, Brodersen P, Naested H, et al. 2000. *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111–1120.

Piskurewics U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L. 2008. The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *The Plant Cell* **20**, 2729–2745.

Potocký M, Jones MA, Bezdova R, Smirnov N, Zárský V. 2007. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist* **174**, 742–751.

Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D. 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology* **141**, 910–923.

Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. *Plant Physiology* **115**, 137–149.

Raskin I, Skubatz H, Tang W, Meeuse BJD. 1990. Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals of Botany* **66**, 376–373.

Rate DN, Cuenca JV, Bowman GR, Guttman DS, Greenberg JT. 1999. The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses and cell growth. *The Plant Cell* **11**, 1695–1708.

Rate DN, Greenberg JT. 2001. The *Arabidopsis aberrant growth and death2* mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **27**, 203–211.

Rhoads DM, McIntosh L. 1992. Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *The Plant Cell* **4**, 1131–1139.

Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541–1544.

Robatzek S, Somssich E. 2001. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defence-related processes. *The Plant Journal* **28**, 123–133.

Rüschoff J, Wallinger S, Dietmaier W, Bocker T, Brockhoff G, Hofstädter F, Fishel R. 1998. Aspirin suppresses the mutator phenotype associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer by genetic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**, 11301–11306.

Rustérucci C, Aviv DH, Holt BF, Dangl JL, Parker JE. 2001. The disease resistance signaling components *EDS1* and *PAD4* are essential regulators of the cell death pathway controlled by *LSD1* in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 2211–2224.

Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* **5**, 301–307.

Santner A, Estelle M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* **459**, 1071–1078.

- Santner A, Estelle M.** 2010. The ubiquitin–proteasome system regulates plant hormone signaling. *The Plant Journal* **61**, 1029–1040.
- Schenk PM, Kazan K, Rusu AG, Manners JM, Maclean DJ.** 2005. The *SEN1* gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 997–1005.
- Scott IM, Clarke SM, Wood JE, Mur LA.** 2004. Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 1040–1049.
- Shah J.** 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 365–371.
- Shah J, Kachroo P, Klessig DF.** 1999. The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defense gene expression salicylic acid dependent. *The Plant Cell* **11**, 191–206.
- Shakirova FM, Sakhautdinova AR, Bezrukova V, Fatkhutdinova RA, Fatkhutdinova DR.** 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* **164**, 317–322.
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C.** 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell* **9**, 261–270.
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I.** 1997. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**, 718–721.
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF.** 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant capacity and plays a role in the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 11640–11645.
- Smirnov N, Grant M.** 2008. Plant biology: do DELLAs do defense? *Current Biology* **18**, R617–R619.
- Song JT.** 2006. Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules and Cells* **22**, 233–238.
- Song JT, Lu H, Greenberg JT.** 2004. Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, *ABERRANT GROWTH AND DEATH2* and *AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN* encoding novel aminotransferases. *The Plant Cell* **16**, 353–366.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, et al.** 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* **15**, 760–770.
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genshik P, Dong X.** 2009. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**, 860–872.
- Stevens J, Senaratna T, Sivasithamparam K.** 2006. Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regulation* **49**, 77–83.
- Torres MA, Jones JDF, Dangl JL.** 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **37**, 1130–1134.
- Traw MB, Bergelson J.** 2003. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 1367–1375.
- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun TP.** 2004. DELLA proteins and gibberellins-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 1008–1019.
- Uzunova AN, Popova LP.** 2000. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica* **38**, 243–250.
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flügge U, Kunze R.** 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology* **141**, 776–792.
- Vanacker H, Lu H, Rate DN, Greenberg JT.** 2001. A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **28**, 209–216.
- Vierstra RD.** 2009. The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 385–397.
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF.** 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 177–206.
- Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, et al.** 2008. Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56**, 445–456.
- Wada KC, Takeno K.** 2010. Stress-induced flowering. *Plant Signaling and Behavior* **5**, 944–947.
- Wada KC, Yamada M, Shiraya T, Takeno K.** 2010. Salicylic acid and the flowering gene *FLOWERING LOCUS T* homolog are involved in poor-nutrition stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Physiology* **167**, 447–452.
- Wagstaff C, Yang TJW, Stead AD, Buchanan-Wollaston V, Roberts JA.** 2009. A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *The Plant Journal* **57**, 690–705.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X.** 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens* **2**, e123.
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Hendrickson Culler A, Dong X.** 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* **17**, 1784–1790.
- Wang H, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S.** 2008. Haplo-insufficiency of *MPK3* in *MPK6* mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *The Plant Cell* **20**, 602–613.
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S.** 2007. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally

responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 63–73.

Weymann K, Hunt M, Uknes S, Neuenschwander U, Lawton K, Steiner HY, Ryals J. 1995. Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis* *Isd* mutants. *The Plant Cell* **7**, 2013–2022.

Wiermer M, Feys BJ, Parker JE. 2005. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 383–388.

Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562–565.

Wolters H, Jürgens G. 2009. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics* **10**, 305–317.

Xia J, Zhao H, Liu W, Li L, He Y. 2009. Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures. *Plant Growth Regulation* **57**, 211–221.

Xie Z, Chen Z. 1999. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiology* **120**, 217–225.

Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 6516–6521.

Xie Z, Zhang ZL, Hanzlik S, Cook E, Shen QJ. 2007. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid inducible WRKY gene. *Plant Molecular Biology* **64**, 293–303.

Xiao S, Chye M-L. 2010. The *Arabidopsis thaliana* ACBP3 regulates leaf senescence by modulating phospholipid metabolism and ATG8 stability. *Autophagy* **6**, 802–804.

Xiao S, Gao W, Chen Q-F, Chan S-W, Zheng S-X, Ma J, Wang M, Welti R, Chye M-L. 2010. Overexpression of *Arabidopsis* acyl-CoA binding protein ACBP3 promotes starvation-induced and age dependent leaf senescence. *The Plant Cell* **22**, 1463–1482.

Yalpani N, Shulaev V, Raskin I. 1993. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* **83**, 702–708.

Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell* **3**, 809–818.

Yang ZM, Wang J, Wang SH, Xu LL. 2003. Salicylic acid-induced aluminium tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. *Planta* **217**, 168–174.

Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, et al. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 1678–1692.

Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K. 2009. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 2914–2927.

Yu IC, Fengler KA, Clough SJ, Bent AF. 2000. Identification of *Arabidopsis* mutants exhibiting an altered hypersensitive response in gene-for-gene disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 277–286.

Yu IC, Parker J, Bent AF. 1998. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**, 7819–7824.

Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase E, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara Y, Sun T. 2007. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellins signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 3037–3057.

Zhang Y, Cheng YT, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X. 2006. Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs. *The Plant Journal* **48**, 647–656.

Zhang S, Klessig DF. 1997. Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *The Plant Cell* **9**, 809–824.

Deciphering the link between salicylic acid signaling and sphingolipid metabolism

Diana Sánchez-Rangel[†], Mariana Rivas-San Vicente,
M. Eugenia de la Torre-Hernández, Manuela Nájera-Martínez and Javier Plasencia*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

OPEN ACCESS

Edited by:

Hua Lu, University of Maryland,
Baltimore County, USA

Reviewed by:

Shunyuan Xiao, University of
Maryland, USA
Robin Katrina Cameron, McMaster
University, Canada

*Correspondence:

Javier Plasencia,
Departamento de Bioquímica,
Facultad de Química, Universidad
Nacional Autónoma de México,
04510 México City, México
javierp@unam.mx

†Present address:

Investigador Cátedras CONACyT
adscrita al Instituto de Ecología A. C.,
Red de Estudios Moleculares
Avanzados Carretera Antigua a
Coatepec 351, El Haya, 91070
Xalapa, Veracruz, México

Specialty section:

This article was submitted to
Plant-Microbe Interaction, a section of
the journal *Frontiers in Plant Science*

Received: 14 October 2014

Accepted: 16 February 2015

Published: 09 March 2015

Citation:

Sánchez-Rangel D, Rivas-San
Vicente M, de la Torre-Hernández ME,
Nájera-Martínez M and Plasencia J
(2015) Deciphering the link between
salicylic acid signaling and
sphingolipid metabolism.
Front. Plant Sci. 6:125.
doi: 10.3389/fpls.2015.00125

The field of plant sphingolipid biology has evolved in recent years. Sphingolipids are abundant in cell membranes, and genetic analyses revealed essential roles for these lipids in plant growth, development, and responses to abiotic and biotic stress. Salicylic acid (SA) is a key signaling molecule that is required for induction of defense-related genes and rapid and localized cell death at the site of pathogen infection (hypersensitive response) during incompatible host-pathogen interactions. Conceivably, while levels of SA rapidly increase upon pathogen infection for defense activation, they must be tightly regulated during plant growth and development in the absence of pathogens. Genetic and biochemical evidence suggest that the sphingolipid intermediates, long-chain sphingoid bases, and ceramides, play a role in regulating SA accumulation in plant cells. However, how signals generated from the perturbation of these key sphingolipid intermediates are transduced into the activation of the SA pathway has long remained to be an interesting open question. At least four types of molecules – MAP kinase 6, reactive oxygen species, free calcium, and nitric oxide – could constitute a mechanistic link between sphingolipid metabolism and SA accumulation and signaling.

Keywords: salicylic acid, sphingolipid, ceramide, sphingoid bases, sphinganine-analog mycotoxin

Introduction

Salicylic acid (SA) is a phytohormone involved in local and systemic resistance (Vlot et al., 2009), as well as in the response to abiotic stress, growth, and development (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). The SA signaling pathway requires a functional NPR1 [nonexpressor of pathogenesis-related (PR) genes 1] protein to relay the signal to the nucleus, where it activates PR gene expression (Wang et al., 2005; Kumar, 2014; Seyfferth and Tsuda, 2014). SA biosynthesis occurs either through the phenylalanine (PAL) or isochorismate (ICS) pathway, and the relative contribution of each route varies in different species (Chen et al., 2009b; An and Mou, 2011). SA production is controlled by multiple positive and negative regulators (Janda and Ruelland, 2014). Exciting new research reveals that several sphingolipid intermediates induce SA accumulation and affect disease resistance. The objective of this review is to assess the experimental data that link sphingolipid metabolism with SA accumulation and signaling. Such evidence is mainly derived from (1) the phenotypes of *Arabidopsis* and *Nicotiana* plants in which genes involved in sphingolipid metabolism are mutated or silenced, and (2) the effects of sphinganine analog mycotoxins (SAMs, namely AAL and FB1) on sphingolipid metabolism.

Sphingolipid Metabolism

Research in plant sphingolipids has been fostered by the use of novel extraction protocols, followed by mass spectrometry analysis and characterization of *Arabidopsis* mutants. Sphingolipids compose ~40% of the lipids of the plasma membrane and are also abundant in other endomembranes. Functional genomics of sphingolipid metabolism genes show that these molecules have essential functions in plant growth, development, and stress responses (Chen et al., 2009a; Pata et al., 2010; Berkey et al., 2012). Sphingolipid biosynthesis starts in the endoplasmic reticulum (ER). L-serine is condensed with palmitoyl-CoA to generate a sphingoid long-chain base (LCB) that is reduced and then *N*-acylated to form ceramide. Ceramides are substrates for the production of complex sphingolipids, including inositol phosphorylceramide (IPC), and glucosylceramide. In addition to hydroxylation, LCBs and ceramides can be phosphorylated (Figure 1) to yield a wide variety of molecules (Markham et al., 2006).

Disruption of Sphingolipid Metabolism Through Mutation and Silencing Affects Salicylic Acid Levels

In Table 1, we summarize the effects of mutation or silencing of genes involved in sphingolipid biosynthesis or metabolism in *Arabidopsis* ecotypes and *Nicotiana benthamiana*, and highlights the effects of altered SA levels and/or signaling on *PR1* gene expression.

Sphingolipid Biosynthesis and Metabolism Long-Chain Base Biosynthesis

Serine palmitoyl transferase (SPT), a heterodimer formed by LCB1 and LCB2 subunits, catalyzes the first reaction in sphingolipid biosynthesis to form LCBs (Figure 1; Chen et al., 2009a). The *Arabidopsis* genome contains one gene encoding the LCB1 subunit and two encoding LCB2. Functional studies using mutant and RNAi suppression lines lacking *LCB1* expression, and double mutants lacking both *LCB2* genes, show that sphingolipids are essential for growth and development (Chen et al., 2006; Dietrich et al., 2008). However, it is unknown whether mutations in any of the *LCB* genes affect the SA pathway. A link between SA and sphingolipid metabolism was established through virus-induced gene silencing (VIGS) of the *N. benthamiana* LCB2 subunit. A 20 to 50% reduction in *NbLCB2* transcript level was sufficient to impair growth and leaf and flower development. Compared to control plants, plants with a ~50% reduction in *NbLCB2* transcripts display elevated SA levels and constitutive *PR1* expression (Table 1), and later, show spontaneous cell death in leaves. These silenced plants are also more susceptible to infection by the fungal necrotroph *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. LCB composition in silenced plants is altered with lower trihydroxylated LCB and higher dihydroxylated LCB levels than those of control plants (Rivas-San Vicente et al., 2013). These results suggest that disruption of LCB homeostasis is accompanied by elevated SA levels and induction of cell death.

However, the identity of the LCB responsible for this phenotype is unknown.

Ceramide Biosynthesis

Ceramide synthase catalyzes the condensation of a LCB with a fatty acid-CoA to yield ceramide (Figure 1). The *Arabidopsis* genome has three ceramide synthase genes –*LOH1*, *LOH2*, and *LOH3*– and each isoform has a selective preference for the type of acyl-CoA and LCB (dihydroxy- or trihydroxy-LCB; Chen et al., 2009a). Mutants for each gene are viable, and only the *loh1* line has a spontaneous cell death phenotype, which occurs late in development. Although SA levels in this mutant are comparable to those in wild type (WT) plants, *PR1* transcription increased 160-fold (Table 1). Furthermore, this mutant exhibits modest changes in sphingolipid content, with a 7 and 19% increase in the proportion of species containing a C16 fatty acid in ceramides and GlcCer, respectively, and a fivefold increase in trihydroxy-LCBs (Ternes et al., 2011). These data narrow-down the identity of the bioactive sphingolipids responsible for triggering cell death to free trihydroxy-LCBs, dihydroxy-LCBs, or ceramide species with a C16 fatty acid.

Ceramide Hydroxylation

Ceramide might be hydroxylated in its LCB moiety by a LCB-C4 hydroxylases (SBH) and/or at the fatty acid residues by fatty acid hydroxylases (FAH; Markham et al., 2006). Although double mutants and RNAi suppression lines of *SBH* genes display necrotic lesions in their cotyledons, and constitutively express *PR* genes (Chen et al., 2008), data on SA accumulation and/or signaling is lacking. Conversely, an analysis of double mutants of the two *FAH* genes (*fah1* and *fah2*) demonstrated a link between sphingolipid biosynthesis and SA metabolism. The *fah1/fah2* double mutant displays a 25% reduction in leaf and root growth compared to WT plants, elevated SA levels, and aberrant constitutive *PR1* expression (Table 1). Despite elevated SA levels, this mutant lacks a spontaneous cell death phenotype. These plants contain lower levels of ceramides and GlcCer with α -hydroxylated fatty acids, but a 10-fold increase in phytoceramides and a fivefold increase in trihydroxylated LCBs (König et al., 2012). Thus fatty acid hydroxylation of ceramides is required for the biosynthesis of complex sphingolipids and its absence leads to the accumulation of LCBs and ceramides. This elevation activates the SA pathway and supports a link between SA signaling and sphingolipid metabolism.

Ceramide Phosphorylation

ACD5 encodes a 608-amino acid protein with ceramide kinase activity that is located in the ER, Golgi apparatus (GA), and mitochondria (Liang et al., 2003; Bi et al., 2014). In the *Arabidopsis* *acd5* mutant, a glycine residue is replaced with an arginine and the mutant enzyme retains only 10% of the activity of the WT. These mutant plants develop normally for 5 weeks and then display spontaneous leaf lesions, accumulate free, and conjugated SA along with reactive oxygen species (ROS), and constitutively express *PR1* (Table 1). Due to reduced ceramide kinase activity, *acd5* plants accumulate ceramides and hydroxyceramides, with a two- to sixfold increase relative to WT plants. Only ceramides

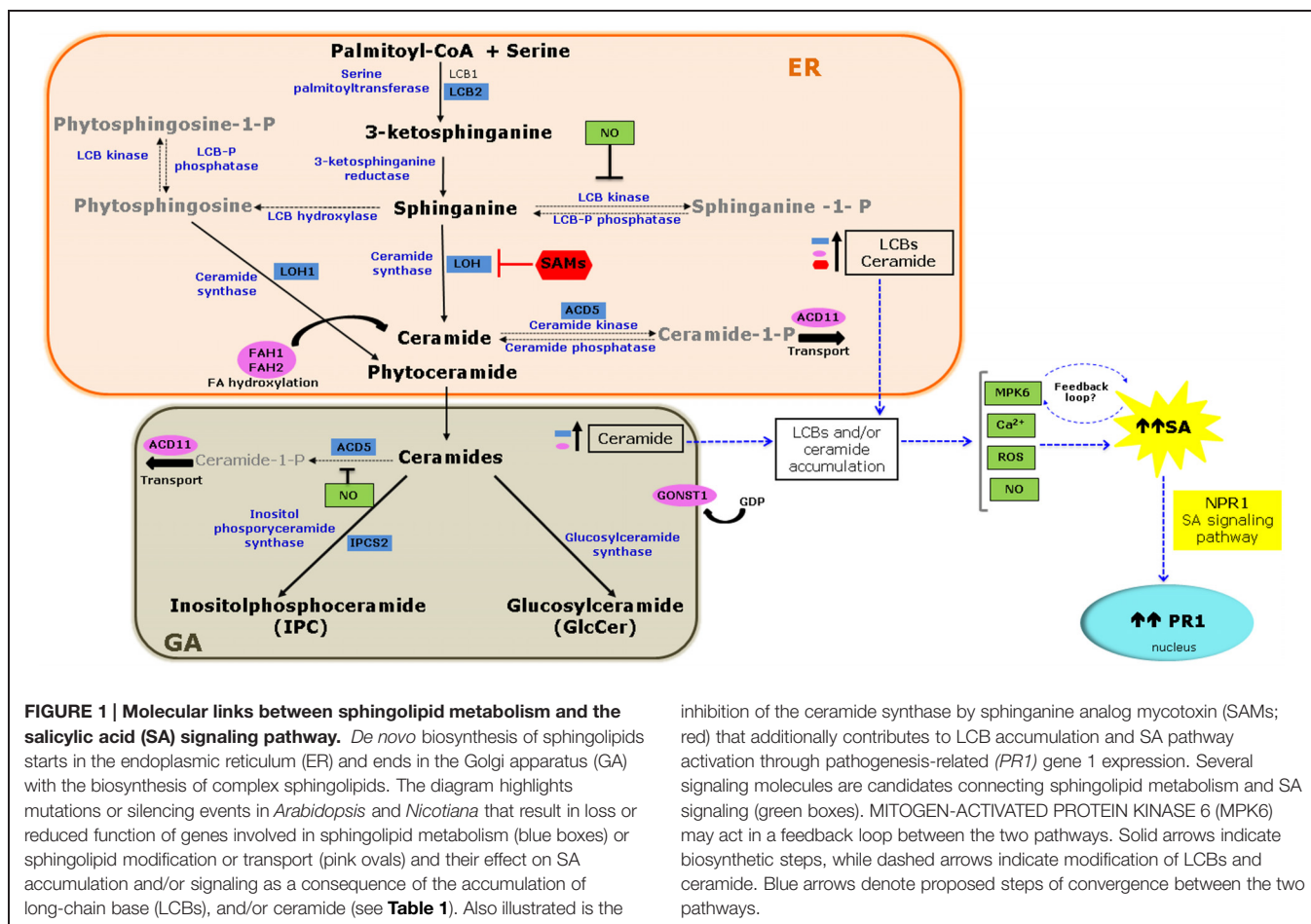


FIGURE 1 | Molecular links between sphingolipid metabolism and the salicylic acid (SA) signaling pathway. *De novo* biosynthesis of sphingolipids starts in the endoplasmic reticulum (ER) and ends in the Golgi apparatus (GA) with the biosynthesis of complex sphingolipids. The diagram highlights mutations or silencing events in *Arabidopsis* and *Nicotiana* that result in loss or reduced function of genes involved in sphingolipid metabolism (blue boxes) or sphingolipid modification or transport (pink ovals) and their effect on SA accumulation and/or signaling as a consequence of the accumulation of long-chain base (LCBs), and/or ceramide (see **Table 1**). Also illustrated is the

inhibition of the ceramide synthase by sphinganine analog mycotoxin (SAMs; red) that additionally contributes to LCB accumulation and SA pathway activation through pathogenesis-related (*PR1*) gene 1 expression. Several signaling molecules are candidates connecting sphingolipid metabolism and SA signaling (green boxes). MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MPK6) may act in a feedback loop between the two pathways. Solid arrows indicate biosynthetic steps, while dashed arrows indicate modification of LCBs and ceramide. Blue arrows denote proposed steps of convergence between the two pathways.

containing long-chain fatty acids (C16) accumulate while levels of ceramides with very-long-chain fatty acids (C24 and C26) are not altered (Bi et al., 2014).

The *acd5* cell death phenotype is SA-dependent as it is suppressed in the *acd5/NahG* genotype. *NahG* encodes a salicylate hydroxylase which converts SA to inert catechol such that these plants do not accumulate SA. Moreover, a functional SA signaling pathway is required because *acd5/npr1* double mutants have an attenuated cell death phenotype (Greenberg et al., 2000; Liang et al., 2003; Bi et al., 2014). Mutation in the *ACD5* gene causes an imbalance in the ceramide to ceramide-1-phosphate ratio and ceramide accumulation might activate the SA pathway.

Inositol Phosphorylceramide Biosynthesis

Ceramides serve as substrates for the formation of complex sphingolipids (**Figure 1**). Inositol phosphorylceramide-synthase (IPCS) catalyzes the transfer of phosphorylinositol to phyto-ceramide to yield IPC. The *Arabidopsis* genome contains three functional *IPCS* genes: *IPCS1*, *IPCS2*, and *IPCS3*. *AtIPCS2* is expressed at higher levels than the other two genes in all organs tested (Mina et al., 2010), and the protein localizes to the *trans*-Golgi network (Wang et al., 2008).

The phenotype associated with *IPCS2* loss of function is only discernible in transgenic plants expressing the resistance gene

RPW8 (*Resistance to powdery mildew*). These plants exhibit spontaneous cell death and were thus named *ehr1* (*enhancing RPW8-mediated hypersensitive response cell death*). *Arabidopsis RPW8* confers broad-spectrum resistance to powdery mildew, and the *ipcs2* mutation in *RPW8* transgenic plants increased sensitivity to fungal infection. The *ipcs2* mutant lines are only 30% the size of the parental line at maturity and exhibit regions of spontaneous cell death. These plants accumulate both free SA and SA conjugates and constitutively express *PR1* (**Table 1**). Spontaneous cell death and constitutive *PR1* expression depend on SA, since both traits are abolished when the *NahG* gene or the *pad4* mutation is introduced. *PAD4* is an upstream regulator of the SA signaling pathway. Again, the precise identity of the sphingolipid molecule responsible for this phenotype remains unidentified, because these mutant plants show increased levels of both ceramides and LCBs (Wang et al., 2008).

Sphingolipid Modification

Complex sphingolipids, such as glycosyl IPC (GIPC), are the most abundant lipids in plant cell membranes (Markham et al., 2006). Glycosylation of the inositol head group occurs in the GA. Monosaccharides such as hexuronic acid, galactose, mannose, and arabinose can be attached to GIPC (Buré et al., 2011). Guanidine diphosphate (GDP) sugars serve

TABLE 1 | Association between sphingolipid metabolism and salicylic acid (SA) levels.

| Gene name | Gene ID | Gene product | Sphingolipid profile in mutant or silenced plants | SA levels in mutant or silenced plants | PR1 expression in mutant or silenced plants | Reference |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|---|---|---|
| NbSPT | NbLCB2 AM902524 | Serine palmitoyl transferase (SPT) | 50% reduction of trihydroxylated long-chain base (LCBs). Fourfold increase of dihydroxylated LCBs | 1.5-fold increase in total SA levels | Constitutive | Rivas-San Vicente et al. (2013) |
| AtLOH1 | At3g25540 | Ceramide synthase | Higher percentage of ceramides (7%) and glucosylceramides (19%) containing C16 fatty acids. Fivefold elevation of trihydroxy-LCBs | SA levels are unaffected | Constitutive; 160-fold raise | Ternes et al. (2011) |
| AtFAH1/ AtFAH2 | At2g34770/ At4g20870 | Fatty acid hydroxylase (FAH) | Fivefold increase of trihydroxylated LCBs; 100-fold reduction of hydroxyceramides; two- to fourfold reduction of phytylglucosylceramides, 10-fold increase of phytoceramides | 3.2-fold higher levels of free SA enriched and 4.3-fold increase in SA conjugates | Constitutive | König et al. (2012) |
| AtACD5 | At3g21630 | Ceramide kinase | Two- to sixfold increase in ceramides and hydroxy-ceramides; no changes in glucosylceramides and LCBs levels | Fourfold increase in free SA and ninefold raise in total SA | Constitutive, but impaired induction. | Greenberg et al. (2000), Briet et al. (2014) |
| AtIPCS2 | At2g37940 | Inositol -P-ceramide synthase 2 | Two- to threefold increase in ceramides and hydroxyceramides. Enriched in trihydroxylated LCBs | Threefold higher levels of free SA and conjugated SA | Constitutive | Wang et al. (2008) |
| AtGONS71 | At2g13650 | GDP-D-mannose transporter | 3.5-fold decrease in the proportion of Hex ₁ GIPCs in membranes. Most (75%) of glycosyl inositol phosphorylceramides (GIPCs) found lack hexosylation | Fourfold increase in free SA levels and sixfold increase in total SA | Constitutive; 10-fold raise. | Mortimer et al. (2013) |
| AtACD11 | At2g34690 | Ceramide-1-phosphate transfer protein | Sevenfold increase in ceramides; threefold rise in hydroxyceramides; twofold increase in GIPC and GlcCer; twofold increase in LCBs and LCB-P | 63-fold increase in total SA | Constitutive | Brodersen et al. (2002, 2005), Simanshu et al. (2014) |

Plants with mutated or silenced genes involved in sphingolipid metabolism show alterations in SA levels and/or PR1 gene expression.

as donors for glycosylation and are transported into the GA. GONST1 (GOLGI-LOCALIZED NUCLEOTIDE SUGAR TRANSPORTER) belongs to a family of nucleotide sugar transporters and stimulates GDP-mannose transport (Baldwin et al., 2001). Knock-out of *GONST1* causes severe dwarfing, poor seed set, formation of spontaneous necrotic lesions on the leaves, accumulation of free and conjugated SA, and constitutive *PR1* expression (Table 1). Overexpression of *NahG* in the *gonst1* background diminishes SA levels and the number of necrotic lesions, and partially alleviates the growth defect. These data suggest that the ability to accumulate SA is partly responsible for the *gonst1* phenotype. The *gonst1* plants do not differ from WT plants in ceramide or LCB content, but do exhibit changes in sphingolipid sugar decoration; the proportion of Hex₁GIPCs in membranes isolated from *gonst1* is 25%, compared to 90% in the WT (Mortimer et al., 2013).

Sphingolipid Transport

ACD11 encodes a protein homologous to a mammalian glycolipid transfer protein (GLTP) with no predicted transmembrane domains or localization motifs. It was initially characterized as a sphingosine transporter (Brodersen et al., 2002), but a recent study showed that this protein contains a lipid recognition center. *ACD11* selectively binds to ceramide-1-phosphate (C1P) and phyto-C1P, but not to related plant sphingolipids such as ceramides, GlcCers, GIPCs, and LCBs (Simanshu et al., 2014).

Arabidopsis acd11 mutant plants show an accelerated cell death phenotype early in development, characterized by ROS generation, necrotic lesions, and constitutive expression of senescence- and defense-related genes (Brodersen et al., 2002). They also accumulate SA and display constitutive *PR1* expression (Table 1). Since the cell death phenotype is suppressed in transgenic *NahG* lines that do not accumulate SA, cell death is SA-dependent. Cell death is also blocked by mutations in *PAD4* and *EDS1*, which are upstream regulators of the SA response (Brodersen et al., 2002). Other mutations in key components of the SA biosynthesis and signaling pathway, such as *SID2* and *EDS5*, also diminish SA accumulation in the *acd11* mutant (Brodersen et al., 2005). *SID2* encodes an ICS synthase, suggesting that SA accumulation is partly responsible for the observed phenotype, and ICS precursors might trigger cell death. The *acd11/eds5* mutant exhibits constitutive *PR1* expression and a similar cell death phenotype as the *acd11* mutants, but limited SA accumulation. *EDS5* encodes an extrusion-like transporter involved in SA export from chloroplasts (Serrano et al., 2013). Exogenous application of the SA analog BTH to *acd11/NahG* and *acd11/sid2* plants restores cell death and induces ceramide accumulation, reinforcing SA role in the signaling pathway that results in this phenotype (Brodersen et al., 2002, 2005).

Both LCBs and ceramides could contribute to the *acd11* mutant phenotype, as levels of these sphingolipid intermediates are elevated in these plants. Because of the functional association between sphingolipid metabolism and SA biosynthesis, a feedback loop might regulate these two pathways (Simanshu et al., 2014).

SA Levels are Affected by the Action of Sphinganine Analog Mycotoxins on Sphingolipid Metabolism

SAMs share structural similarity with LCBs and inhibit ceramide synthase activity (Figure 1) causing LCB levels to increase (Wang et al., 1991; Abbas et al., 1994). The best-characterized SAMs are the AAL-toxin produced by *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, a tomato foliar pathogen, and fumonisin B1 (FB1), produced by *Fusarium verticillioides*, a causal agent of various diseases in maize. Although the hosts and type of diseases caused by these fungi are quite different, genetic evidence supports a role for SAMs in virulence of these fungal pathogens (Sánchez-Rangel and Plasencia, 2010).

Effects of SAMs in *Arabidopsis* Genotypes and Hormonal Crosstalk

Fumonisin B1 causes LCB accumulation in several plant species (Abbas et al., 1994; de la Torre-Hernandez et al., 2010), and in *Arabidopsis*, a 72-h treatment with 10 μ M FB1 triggers a 100- to 7000-fold increase in LCBs concentration (Saucedo-García et al., 2011). This dose also triggers lesions reminiscent of those formed in the pathogen-induced HR, accompanied by callose deposition, ROS and camalexin production, and expression of *PR-1*, *PR-2*, and *PR-5* in *Arabidopsis* leaves (Stone et al., 2000). Very low doses (70 nM) of FB1 cause DNA fragmentation and cell death in *Arabidopsis* protoplasts. Because protoplasts from mutant genotypes defective in SA, jasmonic acid (JA), and ethylene (ET) accumulation or signaling are more tolerant to the toxin, it was concluded that all three signaling pathways are required for cell death caused by FB1 (Asai et al., 2000). However, when 50 μ M FB1 was infiltrated into rosette leaves of *dde2*, *ein2*, *pad4*, and *sid2* single mutants (defective in JA, ET, SA, and SA signaling pathways, respectively) and the corresponding quadruple mutant, enhanced tolerance to FB1 was not observed (Igarashi et al., 2013). The cell type tested – protoplasts vs. intact leaves – and the ~700-fold difference in FB1 dose might account for the observed discrepancies.

From the above data, it is clear that FB1 activates the SA pathway, but also other routes that are antagonistic to SA signaling, thus complicating results interpretation. For instance, *Arabidopsis* possesses five ET receptors (ETR1, ETR2, EIN4, ERS1, and ERS2) and genetic studies show that, in absence of ET, the receptors positively regulate CTR1, which acts as a negative regulator of the ET signaling pathway (Ju et al., 2012). FB1 has contrasting effects in mutants of the five ET receptors; while the *etr1-1* mutant shows hypersensitivity to FB1, the *ein4-1* mutant displays diminished cell death and the other three mutants respond similarly to the WT. These results suggest that ET receptors have distinct roles in toxin sensitivity leading to the HR. While ET induces cell death through EIN4, perception of this phytohormone by ETR1 inhibits cell death. Because ET represses *PR1* transcription, mutations in genes encoding ET receptors increase the expression of SA-inducible genes; for instance the *ers1* and the *ein4* mutants display a 29-fold and 115-fold rise in *PR1* expression, respectively (Plett et al., 2009).

Deciphering the Link Between Sphingolipid Metabolism and the SA Pathway

Since both, LCBs and ceramides, serve as signaling molecules in the activation of defense-related PCD (Berkey et al., 2012), it is reasonable to hypothesize that SA acts as an intermediate in this pathway. So far, evidence provided by mutants in sphingolipid biosynthesis and by experiments with SAMs and exogenous LCBs/ceramides, suggests that sphingolipid intermediates act upstream of SA. Expression of *NahG* or negative regulators of the SA pathway in sphingolipid mutants confirms that this phytohormone is required for the cell death phenotype. However, the remaining question is how perturbations in levels of LCBs/ceramides are perceived to induce the SA biosynthesis pathway? Several signaling molecules, upstream and/or downstream of sphingolipid intermediates, are candidates to connect these two pathways (Figure 1), will be described briefly.

Both, FB1 and LCBs activate MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MPK6) within minutes after the infiltration of *Arabidopsis* rosette leaves. Moreover, *mpk6* mutant seedlings show reduced cell death when exposed to 10 μ M FB1, suggesting that MPK6 is a transducer in the pathway leading to LCB-induced PCD in *Arabidopsis* (Saucedo-García et al., 2011). Although MPK6 was characterized as the ortholog of the tobacco SA-induced protein kinase (SIPK), it is rapidly activated by several microbial elicitors (Nühse et al., 2000) with a similar kinetics as with FB1 and LCBs.

Reactive oxygen species elevation is a common feature displayed by several mutants in sphingolipid biosynthesis that show an enhanced cell death phenotype and SA accumulation. Molecules such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) mediate a variety of cellular responses. In *Arabidopsis*, 10 μ M FB1 causes an elevation of *PAL* transcript and activity, which results in a fourfold increase in total SA. This elevation depends on ROS, as inhibitors that disrupt ROS production prevent this response (Xing et al., 2013). Moreover, exogenous LCBs induce ROS production in leaves of *Arabidopsis* seedlings (Shi et al., 2007). Although data on LCB accumulation is lacking in these reports, FB1 biological activity suggests that LCBs elevation mediate ROS generation.

Another hypothesis is that free calcium levels change in response to a sphingolipid imbalance and transduce a signal. In tobacco BY2 cells, exogenous addition of dihydroxy-LCB causes an immediate (\sim 1 min) dose-dependent elevation of cellular free calcium concentration in the cytosol

and 10 min later in the nucleus, followed by H_2O_2 accumulation and cell death (Lachaud et al., 2010, 2011). Calcium also regulates the expression of the SA biosynthesis gene *ICS1* through the Ca^{2+} /calmodulin-binding transcription factor CBP60g (Wang et al., 2009; Zhang et al., 2010). Another Ca^{2+} /calmodulin-binding transcription factor, AtSR1, is a negative regulator of SA signaling, as it controls *EDS1* expression (Du et al., 2009). Because calcium controls SA levels, free cytosolic Ca^{2+} could link sphingolipid metabolism with the SA pathway. Testing the susceptibility of *atsr1* mutants when challenged to an imbalance of sphingolipids levels through exogenous addition of FB1 or LCBs might shed some light on this question.

Finally, nitric oxide (NO), a universal transducer molecule, might play a role in linking sphingolipids and the SA pathway. In *Taxus* sp. cell cultures, a fungal-produced sphingolipid induces rapid and dose-dependent NO production, and because this molecule is a redox regulator of the NPR1/TGA1 system, it promotes NPR1 translocation into the nucleus (Wang et al., 2007; Lindermayr et al., 2010; Guillas et al., 2013). NO might also act upstream of sphingolipids intermediates. Exposure of *Arabidopsis* plants to cold induce NO production that down-regulates the synthesis of phytosphingosine-phosphate and ceramide-phosphate. In the *nia1/nia2* nitrate reductase mutant, impaired in NO biosynthesis, such suppression does not occur (Cantrel et al., 2011). Thus NO could participate in the fine-tuning of the balance between certain sphingolipids and their phosphorylated derivatives.

Studies of the phenotypes of *Arabidopsis* mutants in sphingolipid metabolism suggest that imbalance of LCBs and/or ceramides levels activate the SA pathway. However, further research is needed to determine the causality of this relationship and to identify the upstream signal transduction molecule(s) responsible for activating the SA pathway. Additional comparisons of the effects of FB1, LCBs, and ceramides on MPK, ROS, calcium, and NO signaling in relevant *Arabidopsis* WT and mutants will reveal the main players in this complex interaction between the sphingolipid and SA signaling pathways.

Acknowledgments

The authors acknowledge both reviewers for their thorough evaluation of the manuscript and valuable suggestions. Research in JP laboratory is supported by grants from DGAPA-PAPIIT (IN220010) and Programa MASAGRO. DS-R is supported by Cátedras CONACYT program.

References

- Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., et al. (1994). Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* 106, 1085–1093.
- An, C., and Mou, Z. (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity. *J. Int. Plant Biol.* 53, 412–428. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x
- Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., et al. (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12, 1823–1835. doi: 10.1105/tpc.12.10.1823
- Baldwin, T. C., Handford, M. G., Yuseff, M. I., Orellana, A., and Dupree, P. (2001). Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2283–2295. doi: 10.1105/tpc.13.10.2283
- Berkey, R., Bendigeri, D., and Xiao, S. (2012). Sphingolipids and plant defense/disease: the “death” connection and beyond. *Front. Plant Sci.* 3:68. doi: 10.3389/fpls.2012.00068

- Bi, F. C., Liu, Z., Wu, J. X., Liang, H., Xi, X. L., Sun, T. J., et al. (2014). Loss of ceramide kinase in *Arabidopsis* impairs defenses and promotes ceramide accumulation and mitochondrial H₂O₂ bursts. *Plant Cell* 26, 3449–3467. doi: 10.1105/tpc.114.127050
- Brodersen, P., Malinovsky, F. G., Hématy, K., Newman, M. A., and Mundy, J. (2005). The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis* *acd11*. *Plant Physiol.* 138, 1037–1045. doi: 10.1104/pp.105.059303
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H. M., Olszak, B., Skov, S., Ødum, N., et al. (2002). Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* 16, 490–502. doi: 10.1101/gad.218202
- Buré, C., Cacas, J. L., Wang, F., Gaudin, K., Domergue, F., Mongrand, S., et al. (2011). Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 3131–3145. doi: 10.1002/rcm.5206
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Reze, N., Lesch, M., Kaiser, W. M., et al. (2011). Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 189, 415–427. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03500.x
- Chen, M., Cahoon, E. B., Saucedo-García, M., Plasencia, J., and Gavilanes-Ruiz, M. (2009a). “Plant sphingolipids: structure, synthesis and function,” in *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*, eds H. Wada and N. Murata (Dordrecht: Springer), 77–115.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., and Fan, B. (2009b). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 493–496. doi: 10.4161/psb.4.6.8392
- Chen, M., Han, G., Dietrich, C. R., Dunn, T. M., and Cahoon, E. B. (2006). The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* 12, 3576–3593. doi: 10.1105/tpc.105.040774
- Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C. R., Jaworski, J. G., and Cahoon, E. (2008). Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 1862–1878. doi: 10.1105/tpc.107.057851
- de la Torre-Hernandez, M. E., Rivas-San Vicente, M., Greaves-Fernandez, N., Cruz-Ortega, R., and Plasencia, J. (2010). Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 337–345. doi: 10.1016/j.pmpp.2010.05.004
- Dietrich, C. R., Han, G., Chen, M., Berg, R. H., Dunn, T. M., and Cahoon, E. B. (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* 54, 284–298. doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.03420.x
- Du, L., Ali, G. S., Simons, K. A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A. S., et al. (2009). Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457, 1154–1159. doi: 10.1038/nature07612
- Greenberg, J. T., Silverman, F. P., and Liang, H. (2000). Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* 156, 341–350.
- Guillas, I., Puyaubert, J., and Baudouin, E. (2013). Nitric oxide-sphingolipid interplays in plant signaling: a new enigma from the Sphinx? *Front. Plant Sci.* 4:341. doi: 10.3389/fpls.2013.00341
- Igarashi, D., Bethke, G., Xu, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2013). Pattern-triggered immunity suppresses programmed cell death triggered by Fumonisin B1. *PLoS ONE* 8:e60769. doi: 10.1371/journal.pone.0060769
- Janda, M., and Ruelland, E. (2014). Magical mystery tour: salicylic acid signaling. *Environ. Exp. Bot.* doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.07.003
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., et al. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 19486–19491. doi: 10.1073/pnas.1214848109
- König, S., Feussner, K., Schwarz, M., Kaefer, A., Iven, T., Landesfeind, M., et al. (2012). *Arabidopsis* mutants of sphingolipid fatty acid α -hydroxylases accumulate ceramides and salicylates. *New Phytol.* 196, 1086–1097. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04351.x
- Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* 228, 127–124. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.014
- Lachaud, C., Da Silva, D., Amelot, N., Béziat, C., Bière, C., Cotelle, V., et al. (2011). Dihydro-sphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Mol. Plant* 4, 310–318. doi: 10.1093/mp/ssp077
- Lachaud, C., Da Silva, D., Cotelle, V., Thuleau, P., Xiong, T. C., Jauneau, A., et al. (2010). Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium* 47, 92–100. doi: 10.1016/j.ceca.2009.11.011
- Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, J. T. (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* 17, 2636–2641. doi: 10.1101/gad.1140503
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., and Durnera, J. (2010). Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* 22, 2894–2907. doi: 10.1105/tpc.109.066464
- Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B., and Jaworski, J. G. (2006). Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J. Biol. Chem.* 281, 22684–22694. doi: 10.1074/jbc.M604050200
- Mina, J. G., Okada, Y., Wansadhipathi, N. K., Pratt, S., Shams-Eldin, H., Schwarz, R. T., et al. (2010). Functional analyses of differentially expressed isoforms of the *Arabidopsis* inositol phosphorylceramide synthase. *Plant Mol. Biol.* 73, 399–407. doi: 10.1007/s11103-010-9626-3
- Mortimer, J. C., Yu, X., Albrecht, S., Sicilia, F., Huichalaf, M., Ampuero, D., et al. (2013). Abnormal glycosphingolipid mannosylation triggers salicylic acid-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 1881–1894. doi: 10.1105/tpc.113.111500
- Nühse, T. S., Peck, S. C., Hirt, H., and Boller, T. (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J. Biol. Chem.* 275, 7521–7526. doi: 10.1074/jbc.275.11.7521
- Pata, M. O., Hannun, Y. A., and Ng, C. K.-Y. (2010). Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* 185, 611–630. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x
- Plett, J. M., Cvetkovska, M., Makenson, P., Xing, T., and Regan, S. (2009). *Arabidopsis* ethylene receptors have different roles in Fumonisin B1-induced cell death. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 18–26. doi: 10.1016/j.pmpp.2009.08.004
- Rivas-San Vicente, M., Larios-Zarate, G., and Plasencia, J. (2013). Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Planta* 237, 121–136. doi: 10.1007/s00425-012-1758-z
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62, 3321–3338. doi: 10.1093/jxb/err031
- Sánchez-Rangel, D., and Plasencia, J. (2010). The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Rev.* 29, 73–86. doi: 10.3109/15569543.2010.515370
- Saucedo-García, M., Guevara-García, A., González-Solís, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, J. E., et al. (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 Phytol.* 191, 943–957. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03727.x
- Serrano, M., Wang, B., Aryal, B., Garcion, C., Abou-Mansour, E., Heck, S., et al. (2013). Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDSS. *Plant Physiol.* 162, 1815–1821. doi: 10.1104/pp.113.218156
- Seyfferth, C., and Tsuda, K. (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front. Plant Sci.* 5:697. doi: 10.3389/fpls.2014.00697
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., et al. (2007). Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 17, 1030–1040. doi: 10.1038/cr.2007.100
- Simanshu, D. K., Zhai, X., Munch, D., Hofius, D., Markham, J. E., Bielawski, J., et al. (2014). *Arabidopsis* accelerated cell death 11, ACD11, is a ceramide-1-phosphate transfer protein and intermediary regulator of phytoceramide levels. *Cell Rep.* 6, 388–399. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.023

- Stone, J. M., Heard, J. E., Asai, T., and Ausubel, F. M. (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 12, 1811–1822. doi: 10.1105/tpc.12.10.1811
- Ternes, P., Feussner, K., Werner, S., Lerche, J., Iven, T., Heilmann, I., et al. (2011). Disruption of the ceramide synthase LOH1 causes spontaneous cell death in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 192, 841–854. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03852.x
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., and Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206. doi: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202
- Wang, D., Weaver, N. D., Kesarwani, M., and Dong, X. (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308, 1036–1040. doi: 10.1126/science.1108791
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., and Merrill, A. H. Jr. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* 266, 14486–14490.
- Wang, J., Zheng, L., and Tan, R. (2007). Involvement of nitric oxide in cerebroside-induced defense responses and taxol production in *Taxus yunnanensis* suspension cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1183–1190. doi: 10.1007/s00253-007-0927-7
- Wang, L., Tsuda, K., Sato, M., Cohen, J. D., Katagiri, F., and Glazebrook, J. (2009). *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog.* 5:e1000301. doi: 10.1371/journal.ppat.1000301
- Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J. E., Tsegaye, Y., et al. (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 3163–3179. doi: 10.1105/tpc.108.060053
- Xing, F., Li, Z., Sun, A., and Xing, D. (2013). Reactive oxygen species promote chloroplast dysfunction and salicylic acid accumulation in fumonisin B1-induced cell death. *FEBS Lett.* 587, 2164–2172. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.034
- Zhang, Y., Xu, S., Ding, P., Wang, D., Cheng, Y. T., He, J., et al. (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18220–18225. doi: 10.1073/pnas.1005225107

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Sánchez-Rangel, Rivas-San Vicente, de la Torre-Hernández, Nájera-Martínez and Plasencia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Anexo G. Referencias que han citado a:

Rivas-San Vicente M., Larios-Zarate G., Plasencia J. (2013) Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Planta* 237:121-136

Búsqueda realizada el 30 de Octubre de 2020:

Arias SL, Mary VS, Otaiza SN, Wunderlin DA, Rubinstein HR, Theumer MG (2016) Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B₁-watered maize seedlings. *Phytochem* 125:54-64

Baldwin TT, Zitomer NC, Mitchell TR, Zimeri AM, Bacon CW, Riley RT, Glenn AE (2014) Maize seedling blight induced by *Fusarium verticillioides*: Accumulation of fumonisin B₁ in leaves without colonization of the leaves. *J Agric Food Chem* 62:2118-2125

Begum MA, Shi XX, Tan Y, Zhou WW, Hannun Y, Obeid L, Mao C, Zhu ZR (2016) Molecular characterization of rice *OsLCB2a1* gene and functional analysis of its role in insect resistance. *Front Plant Sci* 7:1789

Gas-Pascual E, Berna A, Bach TJ, Schaller H (2014) Plant oxidosqualene metabolism: Cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* 9:e109156

González-Solís A, Cano-Ramírez DL, Morales-Cedillo F, de Aquino CT, Gavilanes-Ruiz M (2014) *Arabidopsis* mutants in sphingolipid synthesis as tools to understand the structure and function of membrane microdomains in plasmodesmata. *Front Plant Sci* 5:3

Goralski M, Sobieszczanska P, Obrepalska-Stepłowska A, Swiercz A, Zmienko A, Figlerowicz M (2016) A gene expression microarray for *Nicotiana benthamiana* based on *de novo* transcriptome sequence assembly. *Plant Methods* 12:28

Heuberger AL, Robison FM, Lyons SMA, Broeckling CD, Prenni JE (2014) Evaluating plant immunity using mass spectrometry-based metabolomics workflows. *Front Plant Sci* 5:291

Huby E, Napier JA, Baillieux F, Michaelson LV, Dhondt-Cordelier S (2019) Sphingolipids: towards an integrated view of metabolism during the plant stress response. *New Phytol* doi:10.1111/nph.15997

Janda M, Ruelland E (2015) Magical mystery tour: Salicylic acid signaling. *Environ Exp Bot* 114:117-128

Magnin-Robert M, Le Bourse D, Markham J, Dorey S, Clément C, Baillieux F, Dhondt-Cordelier S (2015) Modifications of sphingolipid content affect tolerance to hemibiotrophic and

- necrotrophic pathogens by modulating plant defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 169:2255-2274
- Mangwanda R, Myburg AA, Naidoo S (2015) Transcriptome and hormone profiling reveals *Eucalyptus grandis* defence responses against *Chrysosporthe austroafricana*. *BMC Genomics* 16:319
- Markham JE, Lynch DV, Napier JA, Dunn TM, Cahoon EB (2013) Plant sphingolipids: Function follows form. *Curr Opin Plant Biol* 16:350-357
- Ning-Jing L, Tao Z, Zhao-Hui L, Xin C, Hui-Shan G, Bai-Hang L, Yuan-Yuan Z, Guo-Zhu L, Qiang-Hui Z, Yong-Mei Q, Yu-Xian Y (2019) Phytosphinganine affects plasmodesmata permeability via facilitating PDL5-stimulated callose accumulation in *Arabidopsis*. *Mol Plant* doi:10.1016/j.molp.2019.10.013
- Traore SM, Eckshtain-Levi N, Miao J, Castro Sparks A, Wang Z, Wang K, Li Q, Burdman S, Walcott R, Welbaum GE, Zhao B (2019) *Nicotiana* species as surrogate host for studying the pathogenicity of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. *Mol Plant Pathol* 20:800-814