

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE *ARABIDOPSIS*
INDUCIDA POR LA FB1 REQUIERE DE LA ACUMULACIÓN
DE BASES DE CADENA LARGA Y DE LA SEÑALIZACIÓN
MEDIADA POR LA MPK6**

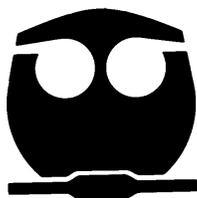
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MARIANA SAUCEDO GARCÍA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Mario Rocha Sosa

Vocal: Dr. Julio Morán Andrade

Secretario: Dr. Ángel Arturo Guevara García

Suplente: Dr. Felipe Cruz García

Suplente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Sitio en donde se desarrolló el tema:
Laboratorio 101. Departamento de Bioquímica
Facultad de Química, UNAM

Asesor del Tema: _____
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Supervisor Técnico: _____
QFB. Consuelo Enríquez Arredondo

Sustentante: _____
Mariana Saucedo García

RECONOCIMIENTOS

Quiero agradecer:

Al CONACYT (Registro No. 185332) y a la DGAPA, UNAM (Proyecto IN211409), por las becas otorgadas para los estudios de doctorado.

A la DGAPA, UNAM (Proyectos PAPIIT IN207806, IN211409 e IN21768) y al CONACYT (Proyectos 55610 y 101521), por el financiamiento de este trabajo.



A la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo (Fac. de Química, UNAM), por la asistencia técnica brindada durante el trabajo de doctorado.

A la Q.A. Ariadna González Solís (Fac. de Química, UNAM), por su colaboración en la extracción de las LCBs.

A la Q.F.B. Guadalupe Lozano Rosas (Fac. de Química, UNAM), por la determinación del crecimiento bacteriano *in planta*.

A la M.C. Maricela Ramos Vega (IBT, UNAM), por su colaboración en el ensayo de actividad de MPKs inducida por las LCBs exógenas.

Al Dr. Ángel Arturo Guevara García (IBT, UNAM), por la donación y caracterización de las mutantes *mpk3/6*.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana (Fac. de Ciencias, UNAM), por el procesamiento de las muestras de TUNEL.

Al Dr. Felipe Cruz García, por la asesoría en el análisis estadístico de los datos de las LCBs, la edición digital de los datos de TUNEL y sus valiosas aportaciones al desarrollo experimental de este trabajo.

Al Dr. Edgar B. Cahoon (Universidad de Nebraska-Lincoln), por su asesoría en la determinación de LCBs durante mi estancia en el Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis, Missouri).

Al Dr. Jonathan Markham (Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri), por el análisis de las LCBs por HPLC-ESI-MS/MS.

Al Méd. Cir. Rodolfo Paredes Díaz (IFC), por el procesamiento de las muestras para la microscopía electrónica de transmisión.

A la Dra. Marina Macías (IFC, UNAM), por su asesoría dentro del comité tutorial.

Al Dr. Diego González Halphen (IFC), por el patrocinio del trabajo de microscopía electrónica.

Al Dr. Charles R. Dietrich (Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri), por la donación de las mutantes *lcb2a-1*, *lcb2a-2* y *lcb2a-3*.

Al Dr. Min Chen (Universidad de Nebraska-Lincoln), por la donación de la mutante *sbh1-1*.

A los Dres. Marina A. González Besteiro y Roman Ulm (Universidad de Ginebra), por la donación de la mutante simple *mkp1-1* y de las mutantes dobles *mkp6 mkp1* y *mpk3 mkp1*.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra (Fac. de Química, UNAM), por el mantenimiento del invernadero.



Al jurado de examen, los Dres. Mario Rocha Sosa, Julio Morán Andrade, Arturo Guevara García, Felipe Cruz García y Rogelio Rodríguez Sotres, por su revisión y sugerencias a este trabajo.



ABREVIATURAS

AAL	<i>Alternaria alternata</i>
ABA	Ácido Abscísico
ACD	Muerte Celular Acelerada
AP1	Cadena Larga de Aminopentol
Avr	Avirulencia
BI	Inhibidor de Bax
CERK	Ceramida Cinasa
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Ceramida Sintasa
DPL1	Fosfato Liasa de Bases de Cadena Larga Fosforiladas
DRMs	Membranas Resistentes a Detergentes
d18:0	dihidroesfingosina o esfinganina
d18:1 ⁴	4-esfingenina o esfingosina
d18:1 ⁸	8-esfingenina
d18:2 ^{4,8}	4,8-esfingedienuina
d18:0-P	dihidroesfingosina o esfinganina-fosforilada
d18:1 ⁴ -P	4-esfingenina o esfingosina-fosforilada
d18:1 ⁸ -P	8-esfingenina-fosforilada
d18:2 ^{4,8} -P	4,8-esfingedienuina-fosforilada
EGGAP	Proteínas Ancladas a Glicosilfosfatidilinositol del Retículo Endoplásmico RE-al-Golgi
EHR	Enriquecimiento de la muerte celular tipo HR mediada por el gen de resistencia <i>RPW-8</i>
ET	Etileno
E1	Enzima Activadora de la Ubiquitina
E2	Enzima Transportadora de Ubiquitina
E3	Ubiquitina-Proteína Ligasa
FB1	Fumonisina B1
<i>fbr 11-1</i>	Mutante de Arabidopsis con deficiencia en la LCB1, subunidad de la serina palmitoiltransferasa
FLS2	Receptor de la Flagelina
GlcCer	Glucosil Ceramida
GLTPs	Proteína de Transferencia de Glicolípidos
HR	Respuesta de Hipersensibilidad
HRGP	Glicoproteína Rica en Hidroxiprolina
IPC	Inositol Fosforil Ceramida
JA	Ácido Jasmónico
LMMs	Mutantes con lesiones que semejan una Respuesta de Hipersensibilidad
LCB	Base de Cadena Larga
LCBK1	Cinasa de Base de Cadena Larga
LCB-P	Base de Cadena Larga Fosforilada
LCD1 y LCD2	Desaturasas de Bases de Cadena Larga

MAPK	Cascada de Cinasa de Proteína Activada por Mitógenos
MCP	Muerte Celular Programada
MPK	Cinasa de la Proteína Activada por Mitógenos
MPKK o MP2K	Cinasa de la MPK
MPKKK o MP3K	Cinasa de la Cinasa de la MPK
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
<i>PR</i>	Genes relacionados a patogénesis
PS	Fotosistema
R	Proteínas de Resistencia
RE	Retículo Endoplásmico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SA	Ácido Salicílico
SAM	Micotoxina Análoga a la Esfinganina
SAR	Respuesta Sistémica Adquirida
SBH	Hidroxilasa de Base Esfingoidea
SBP	Proteína de Unión al Promotor de <i>SQUAMOSA</i>
SIPK	MPK inducida por SA
SMS	Esfingomielina Sintasa
SPHK	Esfingosina Cinasa
SPL	Factor de Transcripción con dominio-SBP específico de plantas
SPT	Serina Palmitoiltransferasa
STP13	Transportador de Alta Afinidad por Hexosas
S1P	Esfingosina-1-Fosfato
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TMV	Virus del Mosaico de Tabaco
t18:0	4-hidroxiesfinganina o fitoesfingosina
t18:1	4-hidroxiesfingenina o fitoesfingosina
t18:0-P	4-hidroxiesfinganina o fitoesfingosina fosforilada
t18:1-P	4-hidroxiesfingenina o fitoesfingosina fosforilada
VPE	Enzima de Procesamiento Vacuolar
WIPK	MPK Inducida por Herida

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Inmunidad innata: integración de una serie finita pero de numerosa reacciones	2
2.1.1. La muerte celular programada como mecanismo de defensa de las plantas en contra de patógenos	3
2.1.2. La señalización mediada por las cascadas de MAPKs en la defensa de las plantas	5
2.1.2.1. Activación de cascadas de MAPKs por PAMPs	7
2.1.2.2. Activación de cascadas de MAPKs en relación con la Respuesta de Hipersensibilidad	7
2.1.2.3. Las especies reactivas de oxígeno y su asociación con las MAPKs en la inmunidad innata	7
2.2. Esfingolípidos: moléculas lipídicas que regulan la defensa y la muerte celular de las plantas	8
2.2.1. Generalidades de las bases de cadena larga de plantas	9
2.2.1.1. Modificaciones covalentes de las bases de cadena larga	10
a) Hidroxilación de LCBs	10
b) Insaturación de las LCBs	11
c) Fosforilación de LCBs	11
d) Defosforilación de LCBs-P	13
e) Degradación de las LCBs fosforiladas	13
2.2.2. Los esfingolípidos en la muerte celular programada de plantas	13
2.2.2.1. Fitotoxinas que alteran la síntesis de esfingolípidos y que producen muerte celular programada en tejidos vegetales	13
a) Fumonisina B1	13
b) Toxinas AAL	14
2.2.2.2. Mutantes afectadas en el metabolismo de los esfingolípidos que son resistentes a altas concentraciones de fumonisina B1	15
a) Subunidad LCB1 de la serina palmitoiltransferasa	15
2.2.2.3. Mutantes afectadas en vías independientes a las del metabolismo de los esfingolípidos y que son resistentes a altas concentraciones de Fumonisina B1	15
a) Factor de transcripción con dominio-SBP específico de plantas (SPL)	15
b) Enzimas de procesamiento vacuolar (VPE)	15
c) Inhibidores de Bax	16
d) RING E3 ligasa	16
2.2.2.4. Mutantes afectadas en el metabolismo de esfingolípidos que semejan una Respuesta de Hipersensibilidad	16
a) Ceramida cinasa	17
b) Proteína de transferencia de esfingosina	17
2.2.3. Participación de los esfingolípidos en las respuestas de inmunidad	17
a) Subunidad LCB2 de la serina palmitoiltransferasa	17
b) Inositolfosforilceramida sintasa (IPCS)	18

3. ANTECEDENTES	19
3.1. Efectos de la FB1 en elementos de diferente localización subcelular	19
3.1.1. Pared celular	19
3.1.2. Membrana plasmática	19
3.1.3. Citoplasma	20
3.1.4. Cloroplasto	20
3.1.5. Núcleo	20
3.2. Efectos de los niveles de esfingalina y fitoesfingosina en la actividad de MPKs y niveles de ácido salicílico	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1. Material biológico	24
7.2. Germinación y tratamiento del material biológico	24
7.2.1. Germinación de las semillas	24
7.2.2. Tratamiento de las plántulas con evocadores	24
7.2.3. Tratamiento de las plántulas con LCBs exógenas	24
7.3. Detección de la fragmentación de DNA	24
7.4. Análisis de ultraestructura celular	25
7.5. Determinación de LCBs libres y fosforiladas (LCBs-P)	25
7.6. Análisis estadístico de la cuantificación de las LCBs libres y fosforiladas (LCBs-P)	25
7.7. Obtención de fracciones citosólicas	25
7.7.1. Preparación de extractos proteicos	25
7.7.2. Determinación de la concentración de proteínas	26
7.7.3. Concentración de las muestras proteicas	26
7.8. Detección de la actividad de MPKs	26
7.9. Inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF	26
7.10. Inoculación bacteriana de las plántulas de <i>Arabidopsis</i> y determinación del crecimiento bacteriano <i>in planta</i>	27
8. RESULTADOS	28
8.1. La modificación de los niveles endógenos de esfingolípidos complejos o de sus intermediarios tienen efectos relevantes en la viabilidad de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	28
8.2. La falta de función de la subunidad LCB2a, que forma parte del complejo de la serina palmitoiltransferasa, evita la muerte de las plántulas de <i>Arabidopsis</i> expuestas a la Fumonisina B1	30
8.3. La mutante <i>lcb2a-1</i> no expresa muerte celular programada después de la exposición con la Fumonisina B1, según parámetros moleculares y celulares	30
8.4. La Fumonisina B1 causa acumulación diferencial del contenido de 10 especies de LCBs para inducir muerte celular programada en <i>Arabidopsis</i>	34
8.5. La falta de expresión de una hidroxilasa de LCBs (<i>sbh1-1</i>) conduce a un fenotipo de susceptibilidad a la Fumonisina B1	41
8.6. La Fumonisina B1 induce la actividad de MPKs en plántulas silvestres y <i>lcb2a-1</i>	41

8.7. La MPK6 participa en la muerte celular programada inducida por la Fumonisina B1	42
8.8. La MPK6 actúa corriente abajo de las LCBs en la muerte celular programada inducida por la Fumonisina B1 y en la desencadenada por una bacteria avirulenta	45
9. DISCUSIÓN	48
9.1. La ceramida revierte los síntomas de muerte celular inducida por la Fumonisina B1 en plántulas de Arabidopsis	48
9.2. El descenso en la actividad o expresión de la serina palmitoiltransferasa atenúa la muerte celular programada inducida por la Fumonisina B1	48
9.3. La isoforma LCB2a del complejo de la serina palmitoiltransferasa es imprescindible para inducirse la muerte celular programada de Arabidopsis en respuesta a la Fumonisina B1	49
9.4. La esfinganina como molécula inductora de la muerte celular programada de Arabidopsis en respuesta a la Fumonisina B1	49
9.5. Posible función de las LCBs-P en la muerte celular programada inducida por la Fumonisina B1	50
9.6. La MPK6 regula la muerte celular programada inducida por las LCBs	51
9.7. La esfinganina y la MPK6 controlan la muerte celular programada de <i>Arabidopsis</i> inducida por la Fumonisina B1	51
9.8. La d18:0 y la MPK6 están asociadas a las reacciones de defensa contra patógenos	53
10. CONCLUSIONES	54
11. MODELO	55
12. PERSPECTIVAS	57
13. APÉNDICE	58
14. BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Comparación de los principales tipos de muerte celular de mamíferos y la Respuesta de Hipersensibilidad de plantas.	4
Tabla II. Mutantes de Arabidopsis que modifican las reacciones de defensa o la sensibilidad a la fumonisina B1	14
Tabla III. Incremento de las LCBs tras la exposición a la FB1 de las plántulas silvestres y <i>lcb2a-1</i>	37
Tabla IV. La acumulación de las LCBs en plántulas silvestres tratadas con FB1 es abate en la mutante <i>lcb2a-1</i>	39
Tabla V. Las principales LCBs acumuladas bajo el tratamiento con la FB1 son la dihidroesfingosina y sus derivados.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de zig-zag que ilustra el sistema de inmunidad innata	3
Figura 2. Secuencia de eventos que conforman la muerte celular programada por apoptosis o por autofagia	5
Figura 3. Cascadas de MAPKs de <i>Arabidopsis</i> inducidas por la flg22, peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂), ácido jasmónico (JA) o patógenos	6
Figura 4. Estructura de la glucosil ceramida.	9
Figura 5. Metabolismo de los esfingolípidos en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	10
Figura 6. Estructura de bases de cadena larga (LCBs) o bases esfingoideas y toxinas análogas a la esfinganina (SAM)	12
Figura 7. Efecto de la miriocina y la ceramida sobre la muerte celular inducida por la FB1	29
Figura 8. Efecto de la mutación en el gen <i>LCB2a</i> en la muerte celular inducida por la FB1	31
Figura 9. Fragmentación del DNA inducida por la FB1 en plántulas silvestres y mutantes <i>lcb2a-1</i>	32
Figura 10. Integridad de la ultraestructura de células silvestres y <i>lcb2a-1</i> tratadas con FB1 durante 3 días	33
Figura 11. Modificaciones en la ultraestructura de las células silvestres producidas por la FB1 a las 36 h de exposición	34
Figura 12. Las principales LCBs libres acumuladas bajo el tratamiento con la FB1 (d18:0, d18:0-P, t 18:0 y t18:0-P) decremantan sustancialmente en la mutante <i>lcb2a-1</i>	35
Figura 13. Las LCBs libres menos elevadas bajo el tratamiento con la FB1 son la d18:1, d18:1-P, d18:2, d18:2-P, t18:1 y t18:1-P	36
Figura 14. Efecto de la falta de expresión del gen <i>SBH1</i> en la muerte celular inducida por la FB1	41
Figura 15. Ensayo de actividad en gel para detectar actividad de MPKs	42
Figura 16. Muerte celular inducida por la FB1 en las mutantes <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	42
Figura 17. Fragmentación del DNA inducida por la FB1 en las mutantes <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	43
Figura 18. Integridad de la ultraestructura de las células de las plántulas mutantes <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i> tratadas con FB1	44
Figura 19. La d18:0 es la LCB inductora de la MCP y requiere de la señalización de la MPK6	46
Figura 20. La MPK6 actúa corriente abajo de las LCBs durante la MCP inducida por la FB1 y durante la defensa contra <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	47
Figura 21. Modelo que considera a las LCBs y a la MPK6 como componentes de la vía de transducción de señales que lleva a la MCP e inmunidad en plantas de <i>Arabidopsis</i>	56

1. RESUMEN

El reciente avance en el estudio de los esfingolípidos vegetales ha revelado una gran diversidad estructural que sugiere un amplio espectro funcional de estos compuestos esfingoides. Las bases de cadena larga (LCBs) son intermediarios de la síntesis de esfingolípidos complejos que funcionan como segundos mensajeros en la muerte celular programada (MCP) en las plantas, cuyos modos de acción no están bien dilucidados. En este trabajo, se indujeron condiciones de MCP en plántulas de *Arabidopsis thaliana* para estudiar la cinética de acumulación de las LCBs y los consecuentes cambios a nivel ultraestructural causados en las células. Se usó una mutante *lcb2a-1*, deficiente en la subunidad LCB2a del heterodímero LCB1/LCB2 que conforma a la serina palmitoiltransferasa (SPT), manteniéndose intacto al complejo alternativo LCB1/LCB2b de la SPT. Esta mutante fue incapaz de desarrollar una MCP en respuesta a la fumonisina B1 (FB1) y acumuló menos LCBs que las plántulas silvestres, revelando que el complejo LCB1/LCB2a es indispensable para inducir la MCP. El análisis del perfil de las LCBs libres y fosforiladas reveló que la dihidroesfingosina (d18:0) fue la principal responsable de evocar la MCP. Adicionalmente se evaluó la participación de la MPK6 y la MPK3 en el entramado molecular de la transducción de señales generadas por la d18:0. La mutante *mpk6* fue tolerante a la FB1 en niveles similares a la *lcb2a-1*, pero no la *mpk3*, indicando que la MCP inducida por la FB1 es mediada por la MPK6. El análisis a nivel ultraestructural de las plántulas silvestres expuestas a la FB1 demostró cambios en la estructura membranal, con características únicas de la autofagia, mismas que estuvieron ausentes en las mutantes *lcb2a-1* y *mpk6* y que consistieron, por ejemplo, en la presencia de vesículas con restos de organelos, comúnmente denominados autofagosomas. Experimentos adicionales con las mutantes de una de las hidroxilasas de LCBs (*sbh1*) y de una fosfatasa de doble especificidad (*mcp1*), así como de las dobles mutantes *mpk3 mcp1* y *mpk6 mcp1*, contribuyeron a reforzar las interpretaciones anteriores. Asimismo, se demostró que la vía de transducción de señales mediada por las LCBs y la MPK6 forma parte de las respuestas desplegadas por el sistema inmune de las plantas ante el ataque de patógenos. Si bien, existen múltiples evidencias que demuestran la asociación entre la MPK6 y la HR-MCP, así como la relación entre los esfingolípidos y la MCP, en esta tesis se demuestra por vez primera que las cascadas de MAPKs y los esfingolípidos son transductores en el mismo esqueleto de señalización que evoca la MCP y que, esta vía opera como una de las estrategias que emplea la planta durante su defensa contra patógenos. Esta investigación contribuye a descifrar la vía de transducción de señales involucrada en la MCP-HR al identificar las formas moleculares específicas de LCBs, de complejos de la SPT y de MPKs implicados.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Inmunidad innata: integración de una serie finita pero de numerosas reacciones

Las plantas son una rica fuente de nutrientes para los microorganismos que se encuentran en los ambientes circundantes. La defensa de las células vegetales, que no depende de la movilidad como ocurre en otros organismos, se basa en mecanismos rápidos y efectivos de reconocimiento y de respuesta para contender con la agresión del patógeno a través de un proceso conocido como inmunidad innata. A diferencia de las células animales, los tejidos vegetales no cuentan con células especializadas para participar en el despliegue de la inmunidad, por lo que, esta limitación ha favorecido evolutivamente el desarrollo de la capacidad y la maquinaria molecular necesarias en todas las células que componen un organismo vegetal, habilitándolas para participar en los mecanismos de defensa.

En general, se conceptualiza a la inmunidad innata como aquella relación que se establece entre una planta y un patógeno, que no lleva a la enfermedad y/o colonización de la planta. Las respuestas de inmunidad de las plantas se clasifican en dos tipos: una respuesta basal a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y una respuesta específica al patógeno mediada por el modelo gen-por-gen (Chisholm *et al.*, 2006). La respuesta basal mediada por las PAMPs ocurre en fases tempranas de la interacción, de hecho, en algunas ocasiones se le refiere como inmunidad innata primaria. Las PAMPs incluyen polisacáridos, péptidos u otro tipo de moléculas derivadas del organismo invasor que son reconocidas por receptores localizados en las membranas plasmáticas de las células huésped. Tras la unión ligando-receptor se activan cascadas de fosforilación que inducen la resistencia basal temprana, diseñada para prevenir la colonización del microorganismo. La inmunidad inducida por las PAMPs es suficiente para detener la infección antes de que el microorganismo se establezca (Chisholm *et al.*, 2006; Fig. 1). Con respecto a la interacción mediada por el modelo gen-por-gen, ésta ocurre horas después de la interacción. En este tipo de inmunidad, llamada secundaria, la célula vegetal sintetiza proteínas de resistencia (R) que reconocen proteínas de avirulencia (Avr) secretadas por el patógeno (Chisholm *et al.*, 2006). Dicha interacción es altamente específica, pues en este caso las reacciones de defensa implementadas por la planta para detener la infección están dirigidas contra cepas, patovares o formas especiales dentro de una especie de patógeno en particular. Las proteínas Avr son proteínas efectoras que se secretan hacia el interior de las células vegetales para promover la virulencia del patógeno al inhibir las reacciones de defensa; sin embargo, el patógeno no logra colonizar a la célula huésped ya que las proteínas R activan respuestas de defensa secundarias que generalmente culminan en una respuesta de hipersensibilidad (HR) (Chisholm *et al.*, 2006; Fig. 1).

La HR es un tipo de muerte celular asociada con las respuestas de defensa inducidas localmente en el sitio de penetración del patógeno que bloquea el crecimiento del invasor (de Wit, 2007). Recientemente, se ha sugerido que en el modelo gen-por-gen coexisten los dos tipos de inmunidad descritos, pues la defensa basal mediada por las PAMPs antecede a la protección mediada por las proteínas de avirulencia (Navarro *et al.*, 2004), produciendo un efecto sinérgico en contra del patógeno.

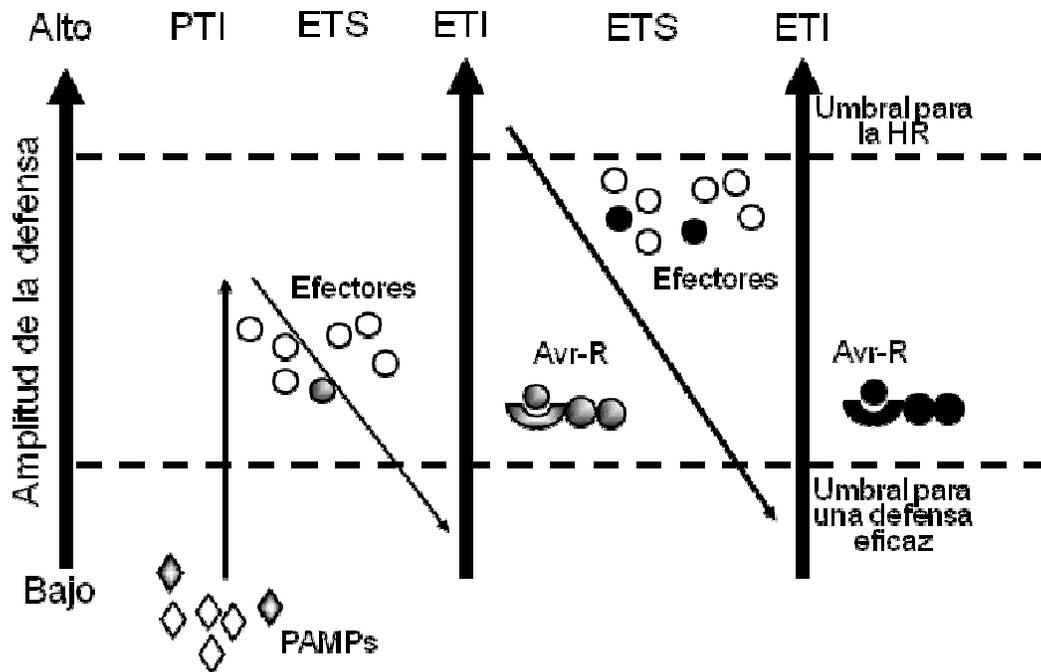


Figura 1. Modelo de zig-zag que ilustra el sistema de inmunidad innata. Las células vegetales detectan la presencia del patógeno en las fases tempranas de la interacción a través de la forma de inmunidad iniciada por el reconocimiento de PAMPs (PTI). Los patógenos que logran vencer esta barrera liberan efectores que interfieren con la PTI. En esta fase existen dos posibilidades: una es que los efectores hagan a las plantas susceptibles a la infección (ETS), o bien, que algún efector (círculo gris) sea reconocido por proteínas de resistencia (R), estableciéndose la inmunidad activada por efectores (ETI), si es que la planta tiene la capacidad de desplegar esa forma de inmunidad contra ese patógeno en particular. La ETI es una versión amplificada de la PTI cuya magnitud generalmente rebasa el umbral para inducir la respuesta de hipersensibilidad (HR). En algunos casos, los patógenos usan como estrategia la pérdida de algunos efectores para evitar su reconocimiento por el hospedero y ganan otros (representados en círculos negros) que les ayudan a suprimir la ETI, de esta manera, se puede producir también la susceptibilidad de la planta al patógeno. Las plantas que producen nuevos alelos de las R son favorecidas por la selección natural, ya que éstos pueden reconocer a efectores recién adquiridos, resultando nuevamente en una ETI (Adaptada de Jones y Dangl, 2006).

Las plantas también se protegen de los patógenos a través de la respuesta sistémica adquirida (SAR), la cual se establece casi simultáneamente a la defensa primaria y/o secundaria en lugares distantes al sitio de interacción planta-patógeno. El objetivo de la SAR es proteger a la planta de ataques subsiguientes. La SAR es muy efectiva contra una gran variedad de patógenos de diferentes estilos de vida (biótrofos, necrótrofos), dependiendo de la fitohormona implicada: ácido salicílico (SA), etileno (ET), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA) o combinaciones de ellas (de Wit, 2007).

2.1.1. La muerte celular programada como mecanismo de defensa de las plantas en contra de patógenos

La HR, que ocurre durante la resistencia de plantas ante el ataque de patógenos (Lam *et al.*, 2001) es una forma de muerte celular programada (MCP). La MCP es un proceso conservado en células eucariontes en el que de manera selectiva y controlada se desechan células dañadas o intactas pero que ya no se requieren para el organismo (Hoeberichts *et al.*, 2001). En tejidos vegetales, la HR es uno de los tipos de MCP más estudiados. En la mayoría de las ocasiones, la HR se puede observar macroscópicamente como una lesión necrótica que se produce

artificialmente cuando se infiltran en un sitio de la hoja dosis anormalmente altas de algún evocador o patógeno en una planta resistente a estos tratamientos. Esta zona de células muertas se localiza en el sitio de infiltración y es incapaz de extenderse a regiones aledañas (Mur *et al.*, 2008). Originariamente, se había postulado que la HR era consecuencia única de la interacción gen-por-gen (Martin, 1999); sin embargo, actualmente se ha postulado que esta respuesta ocurre, en general, en interacciones incompatibles que llevan a la resistencia o a la no enfermedad de la planta (Nürnberg y Lipka, 2005).

La HR comparte cambios morfológicos y/o bioquímicos únicos con la apoptosis (condensación de la cromatina, fragmentación del DNA en fragmentos múltiples de 180 pb, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial o $\Delta\Psi_m$) y con la autofagia (formación de vesículas bimembranales, permeabilización o ruptura del tonoplasto), sugiriendo que la HR es una combinación de los principales tipos de MCP de las células animales (Tabla I; Greenberg, 2005; van Doorn, 2005). Una clara distinción entre la autofagia y la apoptosis, es que en la primera la misma célula lleva a su completa destrucción, mientras que en la apoptosis se requiere de otra célula que la fagocite y degrade los compuestos tóxicos (Fig. 2).

Recientemente, se ha sugerido que la célula vegetal debe decidir entre una muerte similar a la apoptosis o una muerte autofágica dependiendo del tiempo en que requiere la muerte. Por ejemplo, cuando la planta es atacada por un patógeno, ésta requiere de una rápida activación del proceso que la conduzca a la muerte para impedir su avance. En este caso, la mayoría de las características de la muerte de la célula están más relacionadas a la muerte similar a la apoptosis que a otros tipos de muerte cuyo progreso es más lento, como la autofagia. El desarrollo de lesiones necróticas durante la respuesta de defensa refleja la urgencia de limitar la invasión del

Tabla I. Comparación de los principales tipos de muerte celular de mamíferos y la Respuesta de Hipersensibilidad de plantas (Adaptada de Mur *et al.*, 2008)

Marcadores	Muerte celular de animales			HR
	Apoptosis	Oncosis	Autofagia	
Reducción del tamaño del citoplasma	+	-	-	+
Alargamiento del citoplasma	-	+	-	-
Reducción del tamaño nuclear	+	-	-	-
Condensación de la cromatina	+	-	-	+
Degradación de DNA en fragmentos múltiples de 180 pb	+	-	-	-
Protuberancia de las mitocondrias	-	+	-	+
Pérdida de $\Delta\Psi_m$	+	-	-	+
Dependencia de ATP	+	-	-	-
Liberación de citocromo c	+	-	-	+
Interrupción del cloroplasto	NA	NA	NA	+
Activación de caspasas	+	-	-	-
Proteasas de cisteína	+	-	+	+
Intercambio de lípidos entre la bicapa membranal	+	-	-	?
Cuerpos apoptóticos	+	-	+	-+
Vacuolización	-	-	+	+
Vesículas bi-membranales	-	-	+	+

patógeno y puesto que el SA es una fitohormona que se requiere para la formación de la HR, se ha planteado que el SA favorece la MCP similar a la apoptosis sobre la muerte autofágica, mientras que el JA y el ET están involucradas en la autofagia (Love *et al.*, 2008).

Actualmente, se ha postulado que, de la misma forma en que existen señales que estimulan la muerte dentro de la célula programada para colapsarse durante la HR, también existen señales que deben limitar la muerte para evitar la pérdida excesiva de tejido vegetal, por lo que se ha sugerido, que la autofagia controla la dispersión de la señal de muerte (Liu Y. *et al.*, 2005). Un hallazgo en apoyo a la premisa anterior es el de las células de *Nicotiana benthamiana* con silenciamiento de los genes *ATG6/BECLINA*, involucrados en la autofagia, las cuales manifiestan una muerte desbordada en respuesta a la infección por el virus del mosaico de tabaco (TMV; Liu Y. *et al.*, 2005).

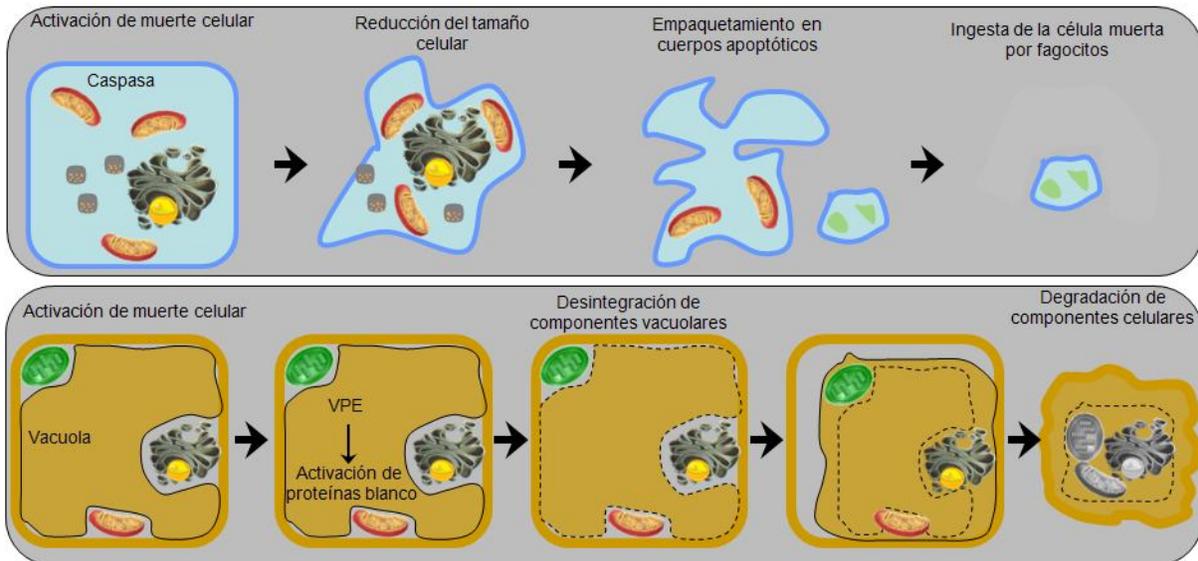


Figura 2. Secuencia de eventos que conforman la muerte celular programada por apoptosis o por autofagia. Apoptosis (sección superior). Estrictamente, la apoptosis involucra el empaquetamiento de las células en proceso de muerte dentro de cuerpos apoptóticos que son degradados por fagocitos. Autofagia (sección inferior). Puesto que las células vegetales contienen una pared celular demasiado rígida, sus materiales deben ser degradados por ellas mismas. (Modificada de Hatsugai *et al.*, 2006).

2.1.2. La señalización mediada por las cascadas de MAPKs en la defensa de las plantas

Las MAP cinasas (MAPKs) son cascadas de proteínas involucradas en la transducción de señales de organismos eucariontes. Estas cascadas, compuestas por tres proteínas citosólicas, amplifican las señales generadas tras la percepción de un estímulo particular a través de reacciones escalonadas de fosforilación. La primera proteína de la cascada en activarse es la cinasa de la cinasa de la MPK (MPKKK o MP3K). Su activación depende de proteínas asociadas a la membrana plasmática cuyas actividades se inducen por receptores membranales. Los intermediarios entre el receptor y la MP3K inducen cambios conformacionales para que ésta sea fosforilada en ciertos residuos específicos situados en el sitio catalítico (Hall *et al.*, 2002). La MP3K fosforilada y, como consecuencia activada, transmite la señal a una cinasa de la MPK (MPKK o MP2K). Esta segunda activación de la cascada, requiere de la interacción física entre ambas proteínas para llevar a cabo la modificación covalente de los residuos catalíticos de Ser o Thr conservados entre los subdominios VII y VIII de la estructura primaria de la MP2K.

Posteriormente, la MP2K activada fosforila los residuos de Thr y Tyr de la secuencia Thr-x-Tyr de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MPKs), en la que x representa a cualquier residuo (Meskiene y Hirt, 2000). En general, en células vegetales se desconocen los componentes inmediatos corriente abajo de las MPKs; sin embargo, se intuye que de manera similar a las MPKs de células animales, inciden en los factores de transcripción que regulan la expresión génica y en cinasas de proteínas, fosfatasa, lipasa o componentes citoesqueléticos (Bögre *et al.*, 2000).

En plantas, las MAPKs están involucradas en la regulación del desarrollo, crecimiento, la MCP y en respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales como frío, calor, especies reactivas de oxígeno (ROS), rayos ultravioleta, sequía y patógenos (Colcombet y Hirt, 2008). El genoma de *Arabidopsis thaliana* (que en el resto del trabajo se denominará *Arabidopsis*) contiene más de 110 genes que codifican MAPKs, de las cuales, 20 corresponden a MPKs, 10 a MP2Ks y más de 80 a MP3Ks. Entre las MPKs de *Arabidopsis*, las mejor caracterizadas son la MPK4, MPK3 y MPK6, las cuales son activadas por una amplia diversidad de estímulos considerados como formas de estrés abiótico, biótico u oxidativo. Mientras que la MPK4 regula negativamente la señalización generada por estrés biótico, la MPK3 y MPK6 actúan como mediadores positivos en las respuestas de defensa contra patógenos (Petersen *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2008). La MPK3 y MPK6 son proteínas con un alto grado de redundancia funcional. Ambas MPKs son reguladores de la respuesta al ABA, del desarrollo de los estomas y de la respuesta a varios tipos de estrés abiótico, así como de la respuesta de defensa en contra de bacterias y hongos (Fig. 3; Colcombet y Hirt, 2008).

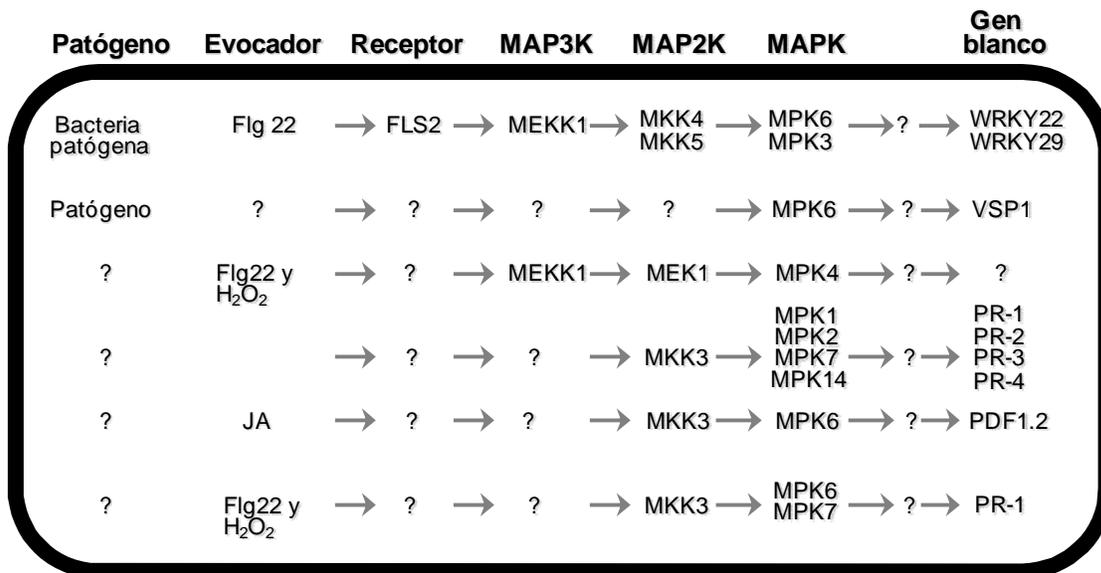


Figura 3. Cascadas de MAPKs de *Arabidopsis* inducidas por la flg22, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido jasmónico (JA) o patógenos. La presencia de evocadores derivados de patógenos, o la misma infección de la planta, activa a receptores membranales que transducen la señal corriente abajo a través de las cascadas de MAPKs. La MAP3K es el primer elemento de la cascada en activarse, seguida de la MAP2K. El último elemento de la cascada en activarse es la MAPK, la cual activa corriente abajo la expresión de genes relacionados con la defensa. En muchos casos, se desconoce al factor de transcripción que pudiera ser blanco directo de la fosforilación mediada por la MAPK (Modificado de Colcombet y Hirt, 2008).

2.1.2.1. Activación de cascadas de MAPKs por PAMPs

La inmunidad accionada por PAMPs requiere que los receptores que los reconocen activen corriente abajo a las cascadas de MAPKs. Por ejemplo, el péptido sintético flg22, que simula a la flagelina bacteriana, produce una rápida y fuerte activación de la MPK3, MPK4 y MPK6. El módulo propuesto como responsable de transmitir la señalización generada por la flg22 está compuesto por MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 (Fig. 3), cabe destacar que éste fue el primer módulo de una cascada de MAP cinasas cuyos componentes fueron identificado en células vegetales (Asai *et al.*, 2002).

De la misma forma en que las plantas activan toda una gama de moléculas de defensa que contrarreste la invasión de patógenos, algunos de éstos inactivan estratégicamente las vías de señalización inducidas por las PAMPs incluyendo a las MAPKs (Fig. 1). Por ejemplo, el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* inyecta varios efectores al interior de las células vegetales, entre ellos AvrPto y AvrPtoB, que interactúan con el receptor de la flagelina FLS2 (Göhre *et al.*, 2008) y con el coreceptor BAK1 (Shan *et al.*, 2008). De esta manera, tanto AvrPto como AvrPtoB interrumpen la transmisión de la señal del patógeno hasta el módulo de las MAPKs, que se encuentra corriente abajo del receptor y del coreceptor. Además, *P. syringae* tiene otro factor que interactúa directamente con los componentes de las cascadas de MAPKs: HopAI1, el cual es una liasa de fosfotreonina que defosforila el residuo de treonina en el cual es activada una MPK por su MP2K corriente arriba. De esta manera, HopAI1 interactúa directamente con la MPK3 y MPK6 atenuando la activación de las MPKs inducidas por la flg22 y las respuestas de defensa corriente abajo (Zhang *et al.*, 2007).

2.1.2.2. Activación de cascadas de MAPKs en relación con la Respuesta de Hipersensibilidad

La asociación entre la activación de MAPKs y la HR se ha descrito principalmente en *Arabidopsis* y *Nicotiana tabacum* (Meskiene y Hirt, 2000; Ren *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, las MPK3 y MPK6, que se inducen por diferentes evocadores derivados de patógenos (Fig. 3; Desikan *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 2002), resultan ser MPKs ortólogas de la WIPK (MPK inducida por herida) y SIPK (MPK inducida por SA), respectivamente y que, también, responden a evocadores en *N. tabacum*. Las plantas transgénicas que expresan de forma inducible las formas funcionales de los activadores inmediatos de la MPK3 y MPK6 (MEK4 y MEK5), producen la activación prolongada de las MPKs y una muerte celular que se asemeja a la HR (Ren *et al.*, 2002). Sin embargo, también la pérdida de función de la MPK6 a través de su silenciamiento, resulta en modificaciones mínimas de la transcripción de genes de defensa y de la inmunidad de la planta contra infecciones posteriores (Menke *et al.*, 2004).

2.1.2.3. Las especies reactivas de oxígeno y su asociación con las MAPKs en la inmunidad innata

Desde hace aproximadamente 2 millones de años el oxígeno molecular se ha producido a partir de los procesos fotosintéticos de los organismos. Las ROS que están parcialmente reducidos o los derivados del oxígeno ($[H_2O_2]$, $HO\cdot$, 1O_2 , O_2^-), son productos altamente reactivos del metabolismo aeróbico. Estas especies derivadas de varias reacciones químicas, pueden producir daño oxidativo a las células (Pitzschke y Hirt, 2009).

Las plantas cuentan con enzimas antioxidativas, compuestos antioxidantes y, también, enzimas que producen ROS para mantener a los niveles de ROS bajo un estricto control; sin embargo, bajo ciertas circunstancias, las plantas producen estratégicamente a estas especies reactivas en

magnitud y temporalidad controladas. Las ROS están involucradas tanto en la muerte similar a la apoptosis como en la autofagia y son, además, componentes claves en la HR y en la activación de genes marcadores de la senescencia.

Como se mencionó anteriormente, la MEKK1 de *Arabidopsis* está involucrada en la señalización generada por la exposición a la flg22 (Fig. 3). Las plantas mutantes que no expresan al gen *MEKK1* acumulan grandes cantidades de ROS y posteriormente producen MCP (Nakagami *et al.*, 2006). Además MEKK1 se requiere para la activación de la MPK4 inducida por ROS (Ichimura *et al.*, 2006), indicando que MEKK1 está corriente arriba de la MPK4 para mantener la homeostasis de las ROS (Fig. 3). Las mutantes independientes *mekk1* y *mpk4* presentan un fenotipo de enanismo y lesiones espontáneas que son revertidos por la expresión de *NahG*, un gen bacteriano cuyo producto es una enzima que degrada al SA, sugiriendo que los fenotipos de ambas mutantes se deben predominantemente a los altos niveles de SA (Petersen *et al.*, 2000; Suarez-Rodríguez *et al.*, 2007).

MKK3 es una MP2K de *Arabidopsis* que se ha relacionado con la señalización generada por estrés biótico y por H₂O₂. La MKK3 restringe el crecimiento bacteriano y es un activador de varias MPKs que se encuentran en el mismo subgrupo (MPK1, MPK2, MPK7 y MPK14; Fig. 3). El H₂O₂ activa a la MPK6 y MPK7, pero sólo la actividad de la MPK7 es más acentuada por MKK3, por lo que estos resultados proponen a la MKK3 como el regulador corriente arriba de la MPK7 en la vía de señalización del H₂O₂ (Fig. 3). Sin embargo, dependiendo de las condiciones ambientales, la MKK3 puede actuar corriente arriba de la MPK6 o de la MPK7, pues las mutantes *mkk3* y *mpk6* son hipersensibles al JA (Fig. 3), adjudicándole otro papel a la MKK3 como regulador de la activación de la MPK6 inducida por esta fitohormona (Takahashi *et al.*, 2007).

La asociación H₂O₂ y MAPKs no sólo se establece en las células del mesófilo, sino también en los estomas. Los estomas son indispensables en el intercambio de gases y en la transpiración. En términos de la defensa, los estomas también tienen un papel relevante en este proceso, pues constituyen sitios de entrada para varios microorganismos. Por ello, la regulación de la apertura y cierre de los estomas es fundamental para restringir la invasión de patógenos bajo el esquema de la inmunidad innata. A pesar de que MPK3 y MPK6 participan en el desarrollo y dinámica de los estomas, sólo la MPK3 parece tener una función en la inmunidad innata a través de su acción sobre la regulación de los mecanismos de movimiento estomático (Gudesblat *et al.*, 2007).

2.2. Esfingolípidos: moléculas lipídicas que regulan la defensa y la muerte celular de las plantas

Los esfingolípidos son componentes de las membranas celulares de los organismos eucariontes. En la membrana plasmática, los esfingolípidos componen cerca del 40% de los lípidos (Sperling y Heinz, 2003). A los esfingolípidos se les ha asignado una función en el incremento de la estabilidad mecánica y resistencia química de la monocapa externa (Kim *et al.*, 2009) y en la integración y organización lateral de las membranas lipídicas, pues se concentran en ciertas regiones denominadas "lipid rafts" o microdominios, las cuales contienen generalmente proteínas relacionadas con vías de señalización (Borner *et al.*, 2005). Durante mucho tiempo se postuló que la función de los esfingolípidos era exclusivamente estructural; sin embargo, desde hace menos de dos décadas se descubrió que algunos metabolitos o intermediarios biosintéticos de células animales funcionan como moléculas de señalización, particularmente, la ceramida (Hannun y Obeid, 1995) y la esfingosina-1-fosfato (Olivera y Spiegel, 1993; Cuvillier *et al.*, 1996).

La función de señalización de los esfingolípidos también se conserva en otros organismos eucariontes, incluyendo plantas (Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2003; 2005; Worrall *et al.*, 2008) y levaduras (Liu K. *et al.*, 2005).

Los esfingolípidos son compuestos anfipáticos cuya hidrofobicidad es conferida por la porción de la ceramida, estructura que consta de una base de cadena larga (LCB) o bases esfingoideas y un ácido graso enlazados entre sí por una unión amida (Fig. 4). La región hidrofílica está configurada por grupos polares (principalmente unidades de carbohidratos) unidas al C1 de las ceramidas (Fig. 4). Los esfingolípidos complejos más abundantes en tejidos vegetales son la glucosilceramida (GlcCer) y los derivados del inositolfosforilceramida (IPC; Markham *et al.*, 2006).

2.2.1. Generalidades de las bases de cadena larga de plantas

Las LCB son cadenas alquílicas que se encuentran en todos los esfingolípidos (Pruett *et al.*, 2008). Este precursor se sintetiza *de novo* a partir de una serie de modificaciones posteriores a la condensación del aminoácido *L*-serina y del palmitoil-CoA (Chen *et al.*, 2009; Fig. 5). Todas las LCB contienen un grupo amino en el C2 y al menos dos grupos hidroxilo: uno en el C1 y otro en el C3. El hidroxilo del C1 y el grupo amino del C2, provienen de la serina y el hidroxilo del C3 del palmitoil-CoA (Chen *et al.*, 2008). La nomenclatura para referirse a las LCBs no está bien estandarizada. Una de las formas más correctas para hacerlo es una versión corta que consta de una letra, generalmente d o t, que significa si está di- o trihidroxilada, un número que indica la longitud de la cadena alquílica y otro número, separado con dos puntos del número anterior, que indica el número de insaturaciones (Fig. 6a; Pruett *et al.*, 2008). La LCB más simple que existe en la naturaleza es la esfinganina (dihidroesfingosina, d18:0), que proviene directamente de la condensación entre la serina y el palmitoil-CoA y carece de insaturaciones o de un tercer grupo hidroxilo (Fig. 5). La longitud de la esfinganina puede variar dependiendo del organismo eucarionte; por ejemplo, en células vegetales la de 18 átomos de carbono es la forma predominante (Pruett *et al.*, 2008). La d18:0 puede sufrir varias modificaciones covalentes catalizada por diferentes enzimas para dar lugar a otras formas de LCBs. En la actualidad, se desconoce si la mayoría de estas alteraciones ocurren antes o después de la síntesis de ceramida por acilación de la esfinganina (Michaelson *et al.*, 2009).

Glucosilceramida

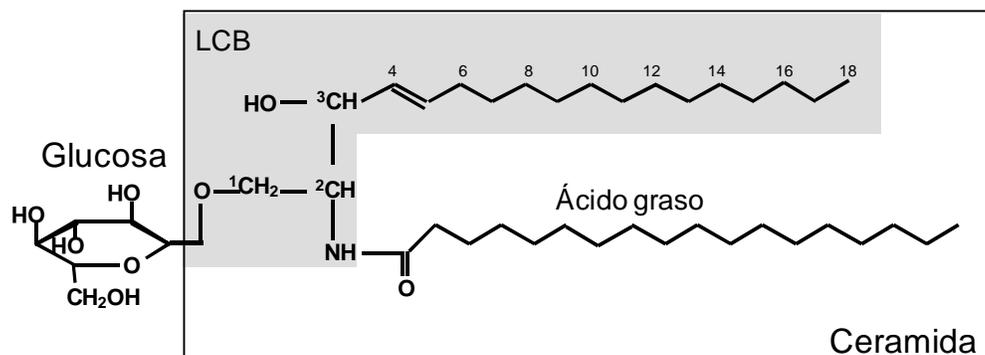


Figura 4. Estructura de la glucosil ceramida. La ceramida es la molécula formada por la unión de una base de cadena larga (en gris) y un ácido graso. La subsiguiente adición de un grupo polar en el C1 de la ceramida da lugar a los esfingolípidos complejos. En la figura se representa a la glucosilceramida, cuyo grupo polar es un residuo de glucosa.

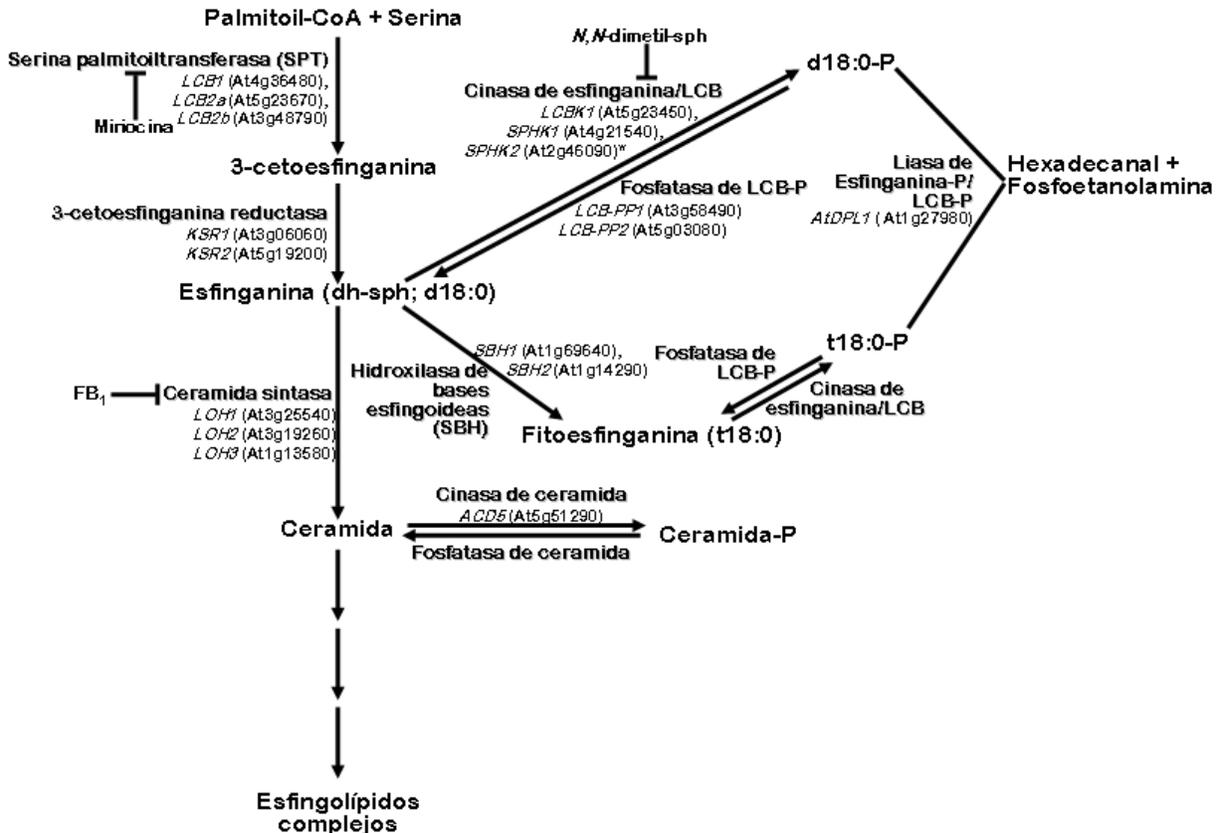


Figura 5. Metabolismo de los esfingolípidos en *Arabidopsis thaliana*. En líneas verticales se indican las reacciones de la síntesis de los esfingolípidos, misma que inicia con la condensación de la serina y el palmitoil-CoA. El producto de la reacción es reducido para formar a la esfinganina, la cual es sustrato de la ceramida sintasa. La adición posterior de grupos polares dentro de la ceramida conlleva a la formación de los esfingolípidos complejos. De lado derecho se muestran algunas de las modificaciones descritas para las bases de cadena larga, incluyendo su catabolismo, cuyos productos finales son el hexadecanal y la fosfoetanolamina. Las letras en negrita señalan a las enzimas involucradas en cada una de las reacciones. Las letras en mayúsculas y cursivas denotan el símbolo de los genes que las codifican y entre paréntesis se indica el gen en su código AGI. En la Figura se muestran tres inhibidores farmacológicos de algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo de los esfingolípidos (Miriocina, inhibidor de la SPT; *N, N*-dimetilesfingosina, inhibidor de la esfinganina cinasa y FB1, inhibidor de la ceramida sintasa).

2.2.1.1. Modificaciones covalentes de las bases de cadena larga

a) Hidroxilación de LCBs: La hidroxilación de la d18:0 para formar a la t18:0 es catalizada por las hidroxilasas de LCBs (SBH). Esta t18:0 es la LCB 4-hidroxiesfingana o fitoesfingosina, que contiene al tercer grupo hidroxilo en el C4 (Chen *et al.*, 2009; Fig. 6a). El genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes *SBH*: *SBH1* y *SBH2* (Chen *et al.*, 2008; Fig. 5). La inserción de T-DNA en ambos genes (*sbh1 sbh2*) produce un incremento en la expresión de genes relacionados a la MCP, que conlleva a la muerte de la doble mutante en la fase reproductiva (Chen *et al.*, 2008). El perfil de esfingolípidos y de otras clases de lípidos en la doble mutante *sbh1 sbh2* revela que, la falta de hidroxilación de las LCBs incrementa el contenido de esfingolípidos, cuyos esqueletos están formados por la d18:0 y por ácidos grasos de 16 átomos de C (C16). El incremento en la demanda de ácidos grasos de cadena corta de la doble mutante *sbh1 sbh2* produce un desbalance en la composición y contenido de lípidos del cloroplasto, ya que se reduce el

contenido de las especies moleculares que contienen ácidos grasos de C16 y C18 (Chen *et al.*, 2008). Estos resultados indican que la hidroxilación de las LCBs es indispensable para la regulación del crecimiento de las plantas y para el mantenimiento de la homeostasis de los esfingolípidos y otros lípidos celulares.

b) Insaturación de las LCBs: Los esfingolípidos de las diferentes membranas celulares contienen con frecuencia LCBs insaturadas en el C4 ($\Delta 4$) y/o C8 ($\Delta 8$). Mientras que en las células animales, la LCB insaturada predominante es la 4-esfingenina o esfingosina (d18:1; Pyne y Pyne, 2000), en células vegetales lo es la 8-esfingenina (d18:1⁸); si bien, en algunos casos se detectan especies esfingoideas con ambas insaturaciones (4,8-esfingadienina, d18:2^{4,8}; Lynch y Dunn, 2004; Markham *et al.*, 2006) (Fig. 6a).

En células animales, la esfingosina se forma por la insaturación en *trans* de la esfinganina *N*-acilada o dihidroceramida y, únicamente, se deriva del catabolismo de los esfingolípidos (Spiegel y Milstien, 2003; Saba y Hla, 2004). En *Arabidopsis* se desconoce al sustrato directo de la única $\Delta 4$ -desaturasa contenida en su genoma; sin embargo, la mutante obtenida tras la inserción de T-DNA, que no presenta alteraciones fenotípicas y no produce esfingolípidos $\Delta 4$ -insaturados, acumula menos glucosilceramidas en los tejidos de floración (Michaelson *et al.*, 2009), sugiriendo que esta modificación se requiere, al menos en cierto grado, para la biosíntesis de esta clase de esfingolípidos.

La mutante $\Delta 4$ -desaturasa de *Arabidopsis* responde similar a las plantas silvestres durante el cierre de los estomas después del tratamiento al ABA, indicando que los esfingolípidos $\Delta 4$ -insaturados y/ o sus metabolitos, específicamente la esfingosina fosforilada, no participan durante el estrés por sequía (Michaelson *et al.*, 2009), como se había documentado ampliamente en años anteriores.

El genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes que codifican para la $\Delta 8$ -desaturasa de LCB: *LCD1* (At3g61580) y *LCD2* (At2g46210). Las insaturaciones en el C8 pueden ser en *cis* o *trans*. La forma predominante varía, dependiendo del organismo vegetal. En *Arabidopsis*, por ejemplo, la insaturación ocurre preferentemente en *trans* (Sperling y Heinz, 2003). Actualmente, se sabe que la expresión de las $\Delta 8$ -desaturasas de varias especies vegetales en levaduras le confieren resistencia a altas concentraciones de aluminio (Ryan *et al.*, 2007), sin embargo, aún no existe un modelo que explique el mecanismo de acción de estas LCBs insaturadas.

c) Fosforilación de LCBs: Las LCBs unidas a un grupo fosfato en el C1 (LCB-P; Fig. 6b), son catabolitos que pueden provenir tanto de la síntesis *de novo* de los esfingolípidos como de la degradación de los esfingolípidos. En células animales, estos intermediarios se han definido como componentes de señalización que actúan en una gran variedad de procesos fisiológicos, especialmente en el control de la proliferación (Olivera y Spiegel, 1993) y la MCP (Cuvillier *et al.*, 1996). Hace más de una década, las LCB-P de plantas adquirieron gran relevancia, pues fueron la primera evidencia de la función de señalización de los esfingolípidos vegetales (Ng *et al.*, 2001).

En *Arabidopsis* se han identificado y caracterizado dos cinasas que usan como sustrato a las LCBs: LCBK1 (At5g51290) (Nishiura *et al.*, 2000) y SPHK1 (At4g21540), llamada así por su homología a la esfingosina cinasa 1 (SPHK1) de humanos (Worrall *et al.*, 2008). Los sustratos de la SPHK1 son la esfingosina, fitoesfingosina, 4-hidroxi-8-esfingenina, 4,8-esfingadienina y esfinganina (Worrall *et al.*, 2008) y los de la LCBK1 son la esfinganina, esfingosina, 4,8-esfingadienina y fitoesfingosina (Imai y Nishiura, 2005).

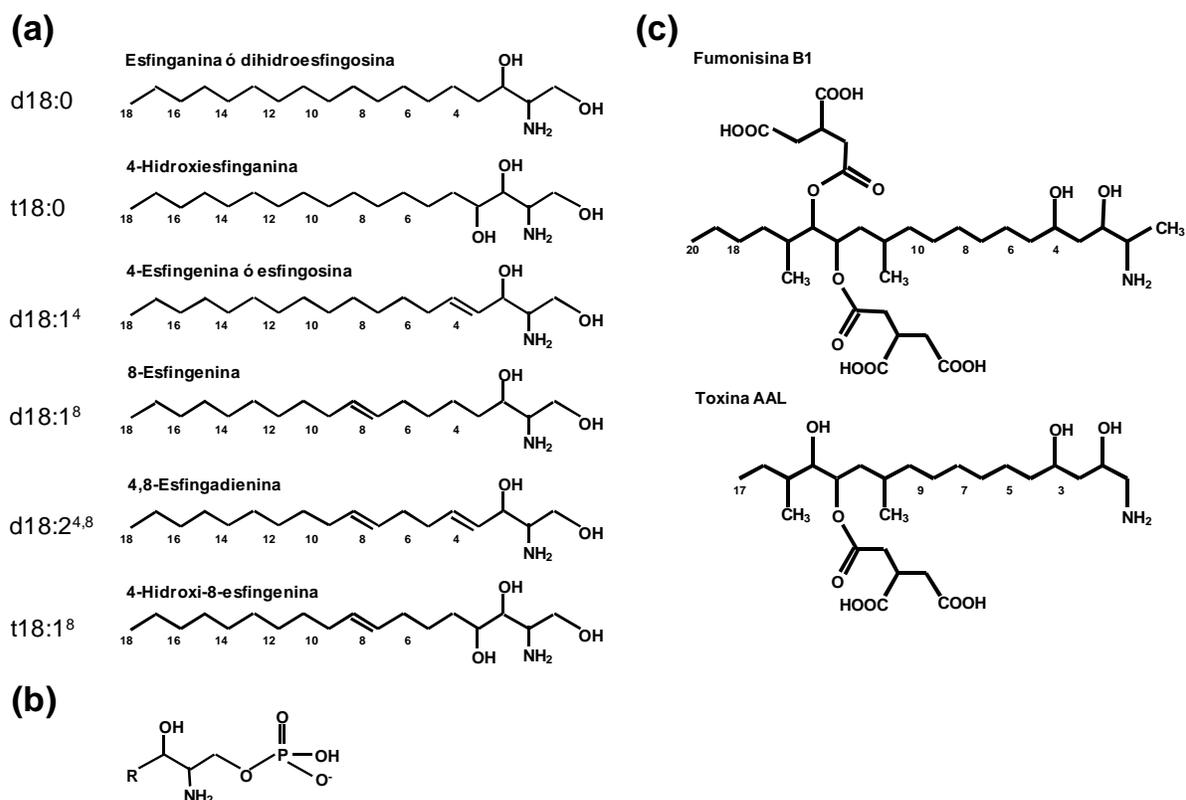


Figura 6. Estructura de bases de cadena larga (LCBs) o bases esfingoideas y toxinas análogas a la esfingalina (SAM). En la sección A se muestran las LCBs más abundantes de los tejidos vegetales cuyos nombres y abreviaciones se muestran para cada especie. En B, se muestra la modificación por fosforilación que sufren las LCBs y en C, los esqueletos estructurales de la fumonisin B1 y la toxina AAL secretada por *Alternaria alternata* para su mejor comparación con la estructura de la esfingalina. (Modificada de Lynch y Dunn, 2004).

Cuando *Arabidopsis* se encuentra en un medio de bajo contenido de agua o es expuesta a ABA exógeno, los transcritos del gen *LCBK1* aumentan. El ABA es una fitohormona que incrementa su síntesis en condiciones de estrés por sequía y que, entre otras funciones, regula el comportamiento de las células guarda al promover el cierre de los estomas e inhibir su apertura, previniendo de esta forma la pérdida de agua (Acharya y Assmann, 2009). La mutación dirigida contra el gen *SPHK1* de *Arabidopsis* (*SPHK1-KD*), que expresa una proteína incapaz de fosforilarse, es menos sensible al ABA que la silvestre, mientras que la sobreexpresión del gen la hace más sensible (Worrall *et al.*, 2008). Estos resultados, en conjunto, indican que ambas cinasas participan durante el déficit de agua y/o en respuesta al ABA.

Los primeros indicios de la función de señalización de los esfingolípidos vegetales sugerían a la esfingosina-1-fosfato (d18:1) como la molécula bioactiva, pues en *Commelina communis* se reportó que sus niveles se incrementaban en hojas de plantas sometidas a riego limitado y que su adición exógena promovía cambios en el turgor de los estomas que llevaban a su cierre (Ng *et al.*, 2001). De igual forma, en *Arabidopsis* se había propuesto que la S1P actuaba como señalizador en respuesta al estrés por sequía o al ABA (Coursol *et al.*, 2003). Sin embargo, posteriormente, se detectó que en *Arabidopsis* al menos, los niveles de la esfingosina eran muy bajos, al igual que la expresión del gen de la $\Delta 4$ -DESATURASA, cuyo producto es la enzima responsable de efectuar la reacción de insaturación (Michaelson *et al.*, 2009). Puesto que las células guarda son específicas

de la epidermis, se intuyó que la S1P no es la molécula bioactiva que está participando durante la sequía o en respuesta al ABA. Para explorar más a este respecto, se evaluó la respuesta al ABA de una mutante con inserción de T-DNA en el gen de la $\Delta 4$ -DESATURASA y no se detectaron diferencias con las respuestas observadas en las plantas silvestres (Michaelson *et al.*, 2009). En conjunto, los resultados excluyen a la S1P como la molécula de señalización que responde a la falta de agua o a la fitohormona. Sin embargo, queda ahora por dilucidar cuál de las LCBs es la que está cumpliendo con esta función en Arabidopsis.

d) Defosforilación de LCBs-P: La reacción de defosforilación es catalizada por fosfatasa de LCBs (Mao *et al.*, 1999). En Arabidopsis, se ha estimado que existe al menos un gen que codifica para esta fosfatasa: *DPL1-PP1* (At3g58490), la cual no ha sido caracterizada bioquímicamente. Recientemente, Worrall *et al.* (2008) reportaron que el silenciamiento de *DPL1* con RNAi no altera la apertura o el cierre de los estomas, sugiriendo que la pérdida de su función no incrementa significativamente los niveles de las LCB-P.

e) Degradación de las LCBs fosforiladas: El rompimiento o lisis de las LCB-P ocurre específicamente en el C2-3. La reacción es catalizada por las enzimas LCB-P liasas para producir aldehídos de cadenas largas y etanolamina fosfato (Saba *et al.*, 1997). Arabidopsis contiene un sólo gen que codifica para la actividad de esta liasa: *DPL1* (Tsegaye *et al.*, 2007). La mutación obtenida tras la inserción de T-DNA en este gen, no produce alteraciones en el fenotipo de la planta ni en el contenido de esfingolípidos, a excepción de un incremento en los niveles de la LCB trihidroxi-C18:1⁸ (t18:1-P; Tsegaye *et al.*, 2007). Estos resultados indican que la actividad de la liasa no es indispensable para la viabilidad de la planta. Asimismo, la mutante *Atdpl1*, que responde de manera similar a las plantas silvestres a diferentes tipos de estrés abióticos, es hipersensible a la FB1 (Tsegaye *et al.*, 2007), sugiriendo que se requiere la actividad de liasa en respuesta a la micotoxina para evitar la acumulación de las LCBs-P y prevenir la aceleración de la muerte celular (Tabla II). De ahí que es posible que esta liasa participe en la homeostasis de los niveles de LCB libres y fosforiladas.

2.2.2. Los esfingolípidos en la muerte celular programada de plantas

2.2.2.1. Fitotoxinas que alteran la síntesis de esfingolípidos y que producen muerte celular programada en tejidos vegetales

Los hongos fitopatógenos producen metabolitos secundarios de bajo peso molecular que participan activamente en el proceso infeccioso de la planta (Möbius y Hertweck, 2009). Estas fitotoxinas reproducen alguna o la mayoría de los síntomas de enfermedad que produce el hongo durante la infección (Oliver y Solomon, 2008). El mecanismo de las toxinas para enfermar a la planta son muy diversos; destacándose la alteración de la expresión de genes o de la integridad de las membranas y la inhibición de la actividad de enzimas para interrumpir la biosíntesis de metabolitos indispensables para la planta (Möbius y Hertweck, 2009). La fumonisina B1 (FB1), secretada por *Fusarium verticillioides*, y la toxina de *Alternaria alternata* (AAL) son micotoxinas análogas a la esfinganina (SAM; Fig. 6c), que inducen muerte celular en sus huéspedes al inhibir la actividad de una enzima que participa en la síntesis de esfingolípidos (Abbas *et al.*, 1994).

a) Fumonisina B1: La FB1 está compuesta por dos ácidos tricarbálicos unidos mediante enlaces éster a una cadena larga de aminopentol (AP1; Fig. 6c). Su similitud con la esfinganina, la hace capaz de inhibir competitivamente la actividad de la ceramida sintasa (CS), enzima responsable de acilar a la esfinganina durante la síntesis *de novo* de esfingolípidos (Fig. 5). Un

modelo que explica el mecanismo de inhibición de la FB1 sobre la CS, sostiene que el cuerpo de aminopentol de la toxina compite con la LCB por la unión a la CS y que los ácidos tricarbálicos de la FB1 interfieren con la unión del acil-CoA (Merrill *et al.*, 2001).

En Arabidopsis, la FB1 actúa como un evocador de respuestas de defensa y de MCP. La FB1 produce en las plantas lesiones similares a la HR, generación de ROS, deposición de callosa y síntesis de fitoalexinas (Stone *et al.*, 2000). La MCP inducida por la FB1 requiere de vías de señalización mediadas por las fitohormonas de JA, ET, y SA (Asai *et al.*, 2000). La FB1, además de inducir la expresión de genes de defensa en Arabidopsis (Stone *et al.*, 2000), incrementa también la expresión de un transportador de alta afinidad por la hexosa (STP13; Norholm *et al.*, 2006), sugiriendo que el transporte de azúcares tiene una función importante en la defensa de la planta y en la MCP.

b) Toxinas AAL: Las toxinas AAL son producidas por *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, patógeno del jitomate. Las AAL son tóxicas únicamente en cultivares sensibles de jitomate, pues actualmente se conocen algunos genotipos resistentes a estas toxinas que expresan al gen *Asc-1*, involucrado en la biosíntesis de esfingolípidos y homólogo a *LAG1* de levaduras. Puesto que *LAG1* facilita el transporte de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol del retículo endoplásmico RE-al-Golgi (EGGAP) en levaduras, se ha propuesto que las plantas resistentes (*Asc*, *Asc*) producen ceramidas alternas, cuando hay inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos y que se restaura el transporte EGGAP (Brandwagt *et al.*, 2000), previniendo de esta forma la MCP.

Tabla II. Mutantes de Arabidopsis que modifican las reacciones de defensa o la sensibilidad a la fumonisina B1

Mutante	Gen Blanco	Tipo de mutación	Efecto con FB1	Referencia
αvpe βvpe γvpe vpe δvpe	αVPE ; βVPE ; γVPE ; δVPE	Inserción de T-DNA	Hiposensibilidad	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2005
<i>fbr1</i>	No reportado	Ácido etil metanesulfónico	Hiposensibilidad	Stone <i>et al.</i> , 2000
<i>fbr2</i>	No reportado	Ácido etil metanesulfónico	Hiposensibilidad	Stone <i>et al.</i> , 2000
<i>fbr6</i>	<i>SPL14</i> (At1g20980)	Inserción de T-DNA	Hiposensibilidad	Stone <i>et al.</i> , 2005
<i>fbr11</i>	<i>LCB1</i>	Inserción de T-DNA	Hiposensibilidad	Shi <i>et al.</i> , 2007
<i>atbi1-1</i> <i>atbi1-2</i>	<i>Inhibidor-1 de Bax</i> (<i>BI1</i>)	Inserción de T-DNA	Acelera PCD	Watanabe y Lam (2006)
<i>atdpl1-1</i> <i>atdpl1-2</i>	<i>Long chain base phosphate lyase</i> (<i>DPL1</i>) (At1g27980)	Inserción de T-DNA	Hipersensibilidad	Tsegaye <i>et al.</i> , 2007

2.2.2.2. Mutantes afectadas en el metabolismo de los esfingolípidos que son resistentes a altas concentraciones de fumonisina B1

a) Subunidad LCB1 de la serina palmitoiltransferasa: La serina palmitoiltransferasa (SPT) es la primera enzima de la síntesis *de novo* de los esfingolípidos (Fig. 5). Su actividad está dada por un heterodímero conformado por las subunidades LCB1 y LCB2. En múltiples estudios se ha postulado que la LCB1 es la subunidad reguladora, mientras que la LCB2 es la que conserva el sitio catalítico donde se efectúa la reacción (Hanada, 2003).

En todos los organismos eucariontes estudiados, existe un solo gen *LCB1*. En *Arabidopsis*, la inserción de T-DNA dentro de este gen produce, dependiendo del sitio de inserción, letalidad (Chen *et al.*, 2006) o resistencia a la FB1 (Shi *et al.*, 2007; Tabla II). Esta última mutante, llamada también *fbr11-1*, a pesar de no presentar alteraciones en el contenido y composición de las LCBs en condiciones normales de crecimiento, no acumula niveles de especies esfingoideas como ocurre en las plantas silvestres, cuando son expuestas a altas concentraciones de la micotoxina (Shi *et al.*, 2007). La atenuación en la formación de LCBs de la mutante *fbr11-1*, está estrechamente relacionada con la falta de la generación de ROS y de la manifestación de MCP (Shi *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren fuertemente que las LCBs son elementos inductores de la MCP que se encuentran corriente arriba de la generación de ROS involucrada en el establecimiento de la MCP.

2.2.2.3. Mutantes afectadas en vías independientes a las del metabolismo de los esfingolípidos y que son resistentes a altas concentraciones de fumonisina B1

A continuación se mencionan las mutantes de resistencia a la FB1 de acuerdo al gen afectado.

a) Factor de transcripción con dominio-SBP específico de plantas (SPL): En plantas existen familias pequeñas de genes que codifican proteínas con dominios SBP (proteína de unión al promotor de *SQUAMOSA*) de unión a DNA. El entendimiento sobre la funcionalidad de estos factores de transcripción exclusivos de plantas es muy escaso. Recientemente, se reportó que la mutación en el gen *SPL14* de *Arabidopsis* (*fbr6*), que codifica al factor de transcripción con dominio-SBP, produce resistencia de la planta a la FB1 (Stone *et al.*, 2005). La función de *SPL14* durante la resistencia de la planta a la toxina se desconoce, pues hasta la actualidad no se ha identificado alguno de los genes blanco de este factor de transcripción.

b) Enzimas de procesamiento vacuolar (VPE): Actualmente, se sabe que un elemento asociado con la MCP inducida por la FB1 en *Arabidopsis* es la enzima de procesamiento vacuolar (VPE; Kuroyanagi *et al.*, 2005). Las VPEs son enzimas cuyas actividades de proteasas de cisteína, a pesar de no presentar homología con las estructuras primarias de las caspasas se ven afectadas por inhibidores específicos de la caspasa-1 de animales (Kuroyanagi *et al.*, 2005). Si bien, las VPEs tienen actividad similar a este tipo de caspasa (Hatsugai *et al.*, 2004) y ambas proteasas son sintetizadas en sus respectivas formas precursoras para ser auto-catalíticamente activadas, también presentan diferencias evidentes como son su localización celular (Kinoshita *et al.*, 1999) y su pH óptimo (Yamin *et al.*, 1996). El genoma de *Arabidopsis* contiene 4 isoformas VPE: 2 únicas de semillas (β VPE, δ VPE) y 2 de tipo vegetativo (α VPE, γ VPE; Kuroyanagi *et al.*, 2005). La mutación nula simultánea de los cuatro genes *VPE* no altera el fenotipo de las plantas; pero sí las hace resistentes a altas concentraciones de FB1 (Kuroyanagi *et al.*, 2005). La γ VPE es la isoforma que se ha postulado que tiene mayor relevancia durante la MCP inducida por la FB1 en hojas de *Arabidopsis* (Kuroyanagi *et al.*, 2005). Dado que la muerte celular mediada por la actividad de las

VPEs induce la ruptura del tonoplasto (Hatsugai *et al.*, 2004; Kuroyanagi *et al.*, 2005) y que en otros sistemas vegetales se ha demostrado que la desintegración de la membrana vacuolar conduce a la degradación de estructuras citoplasmáticas, se ha postulado que la FB1 conlleva al desarrollo de la autofagia como el tipo de MCP.

c) Inhibidores de Bax: Bax es una proteína pro-apoptótica de animales que pertenece a la familia proteica Bcl-2. En células sanas, Bax aparece como monómero y se distribuye en el citosol. Ante una señal de muerte, Bax se inserta en la membrana externa de la mitocondria como un homooligómero que forma espacios físicos suficientes para favorecer la salida de factores como el citocromo *c* (Lovell *et al.*, 2008). En células vegetales, no se ha detectado una estructura primaria similar a Bax; sin embargo, existen evidencias que infieren que el reino vegetal conserva la función de Bax, pues tanto el genoma de arroz como el de *Arabidopsis* contienen al inhibidor-1 de Bax (OsBI-1 y AtBI-1, respectivamente) y cuya expresión en levaduras previene la muerte inducida por Bax (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000). La inserción de T-DNA en el gen AtBI-1 no produce cambios en el fenotipo de las plantas bajo condiciones normales de crecimiento; no obstante, la exposición de las plantas mutantes a la FB1 acelera el progreso de muerte celular (Watanabe y Lam, 2006).

d) RING E3 ligasa: La degradación específica de proteínas es un mecanismo celular que sirve para controlar la cantidad de éstas o para destruir aquellas que no son funcionales (Liu C. H. *et al.*, 2007). La proteólisis mediada por ubiquitinación requiere del etiquetado previo de la proteína blanco con residuos de ubiquitina. El etiquetado de las proteínas es catalizado por varias enzimas a través de una serie de reacciones en cadena. El proceso comienza con la enzima activadora de la ubiquitina (E1), responsable de transferir la ubiquitina activada a una enzima transportadora de ubiquitina (E2). El intermediario ubiquitina-E2 deposita la ubiquitina activada hasta el sustrato que está ligado a la enzima E3 (ubiquitina-proteína ligasa), ya que usa a la E3 como elemento de reconocimiento (Liu C. H. *et al.*, 2007). En *Arabidopsis* se ha estimado que alrededor de 1300 genes codifican para enzimas E3, entre este conjunto se encuentra la proteína RING1 E3 ligasa (RING1), la cual fue recientemente asociada con la MCP inducida por la FB1 (Lin *et al.*, 2008). La expresión del gen *RING1* está hiper-regulada y se activa en regiones cercanas a las lesiones de muerte celular inducidas por la FB1 y por bacterias avirulentas (Lin *et al.*, 2008). RING1 E3 ligasa actúa como un regulador positivo de la MCP, pues su silenciamiento y sobre-expresión hace a las plantas menos y más sensibles a la FB1, respectivamente. La función de RING1 está poco explorada; sin embargo, se ha propuesto que RING1 puede estar implicada en la degradación de algún regulador negativo de la MCP inducida por un estrés biótico (Lin *et al.*, 2008)

2.2.2.4. Mutantes afectadas en el metabolismo de esfingolípidos que semejan una respuesta de hipersensibilidad

Desde la década pasada hasta la actualidad, diversos grupos de investigación se han esforzado en identificar y caracterizar genes involucrados en la HR. Una de las alternativas que comúnmente han empleado para realizar esta búsqueda, es la generación de mutantes que no regulan la formación de muerte celular a nivel macroscópico. Estas mutantes son conocidas como *lesion mimic mutants* (LMMs), ya que son capaces de semejar una HR en ausencia de algún patógeno o evocador (Moeder y Yoshioka, 2008). Dos mutantes LMMs cuyos genes afectados están involucrados en el metabolismo de los esfingolípidos son *acd5* y *acd11* (donde *acd* significa

muerte celular acelerada). A continuación se presenta un breve resumen de su identificación y caracterización.

a) Ceramida cinasa: *ACD5* codifica para una ceramida cinasa (CERK). Las mutantes *acd5* no regulan la muerte celular, pues sufren una muerte prematura antes de que produzcan flores. La mutante *acd5* acumula sustratos de la CERK e inicia la MCP espontáneamente (Liang *et al.*, 2003), sugiriendo que las ceramidas libres o LCBs acumuladas están mediando la muerte. Otra posibilidad, no necesariamente excluyente a la anterior, sugiere que *ACD5* está funcionando como un supresor o atenuador de la MCP, ya que las mutantes *acd5* aceleran la presencia de síntomas de enfermedad cuando son inoculadas con un patógeno virulento (Greenberg *et al.*, 2000). De igual forma, cuando las plantas silvestres son inoculadas con esta misma cepa virulenta se incrementan los niveles de transcrito de *ACD5*, quizá como una estrategia del patógeno de promover una muerte descontrolada y colonizar con mayor facilidad a la planta (Liang *et al.*, 2003).

b) Proteína de transferencia de esfingosina: La falta de función de *ACD11* en *Arabidopsis* activa una MCP (Brodersen *et al.*, 2002). Al igual que la mutante *acd5*, las plantas *acd11* mueren prematuramente y manifiestan lesiones espontáneas (Brodersen *et al.*, 2002). Las plantas *acd11* mantienen activa constitutivamente la maquinaria de defensa, particularmente la mediada por el SA (Brodersen *et al.*, 2002; 2005). *ACD11* codifica una proteína con alta homología a las proteínas de transferencia de glicosfingolípidos (GLTPs) presentes en la mayoría de los organismos eucariontes, si bien la función biológica de ambas proteínas no está aún esclarecida, se sabe que están relacionadas con la transferencia de esfingosina (Brodersen *et al.*, 2002) y glicosfingolípidos (Brown *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2000), respectivamente. Recientemente, se demostró que la expresión del transgen *GLTP* de humanos en las plantas *acd11* puede revertir parcialmente la muerte espontánea de las mutantes, sugiriendo que la transferencia de esfingolípidos o sus intermediarios regula, al menos en cierta medida, la MCP (Petersen *et al.*, 2008). Una posible explicación es que la falta de transferencia de los esfingolípidos o sus intermediarios entre las membranas celulares está acumulando estas especies esfingoideas en niveles que activen la MCP o la maquinaria de defensa mediada por el SA. Otra posible explicación es que la función de la transferencia intermembranal de esfingolípidos es la de suprimir la MCP.

2.2.3. Participación de los esfingolípidos en las respuestas de inmunidad

a) Subunidad LCB2 de la serina palmitoiltransferasa: Como ya se ha mencionado, la subunidad LCB2 es la que contiene el sitio catalítico de la reacción de condensación que cataliza la SPT. Anteriormente, se pensaba que existía un solo gen que codificaba para la subunidad LCB2 dentro de los genomas de organismos eucariontes; sin embargo, recientemente el panorama ha cambiado, pues en células animales se ha identificado y estudiado una tercera subunidad que forma parte de la SPT, nombrada LCB3. Esta subunidad es homóloga a la LCB2 pues contiene el sitio catalítico indispensable para la reacción; no obstante, esta isoforma está involucrada en la síntesis de LCBs de cadena corta de C_{16} (Hornemann *et al.*, 2009), a diferencia de las LCBs de cadena larga formadas por la isoforma LCB2. Análogamente, en *Arabidopsis*, se conservan también dos copias del gen *LCB2*: *LCB2a* y *LCB2b* (Tamura *et al.*, 2001; Dietrich *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2008); sin embargo, en este organismo la actividad de ambas proteínas es redundante

(Dietrich *et al.*, 2008). En varias especies de *Nicotiana* no se ha reportado la existencia de dos isoformas de la LCB2; no obstante, se ha utilizado como modelo de estudio para evaluar la relación que existe entre la LCB2 y las respuestas de resistencia de las plantas. Actualmente, existen dos reportes de estas especies cuyas conclusiones parecieran un tanto contrastantes: Takahashi *et al.* (2009) reportaron que la sobreexpresión de *NbLCB2* de *Nicotiana benthamiana* produce un fenotipo de muerte celular similar a la HR y Gan *et al.* (2009) describieron que la sobreexpresión de *BcLCB2* de *Brassica campestris* ssp. *chinensis* en *N. tabacum* suprime la muerte celular evocada por PB90 (un evocador proteico producido por *Phytophthora boehmeriae*), por la expresión de Bax (una proteína pro-apoptótica de animales que induce una muerte similar a la HR en plantas) y por patógenos virulentos. La razón por la cual en un artículo detectaron la inducción y en otro la supresión de muerte celular al sobreexpresar a la LCB2, sugiere que la diferencia se debe al tiempo de inducción de la sobreexpresión, pues en *N. benthamiana* el fenotipo de HR fue detectado 48 horas después de la inducción, tiempo suficiente para observar macroscópicamente la muerte. En el caso de la sobreexpresión de *BcLCB2*, se podría estar presentando una protección cruzada, es decir, la corta exposición del inductor de la expresión del gen *BcLCB2* (6 h), no es suficiente para producir HR, pero sí para activar mecanismos de defensa que impidan la manifestación de muerte celular inducida por diferentes evocadores. La protección cruzada se refiere a la resistencia a la enfermedad o muerte después de una infección primaria (Jones y Dangl, 2006).

b) Inositolfosforilceramida sintasa (IPCS): Esta enzima utiliza a la ceramida como sustrato para formar a la inositolfosforilceramida. En células vegetales se ha asociado la actividad de esta enzima con la regulación de la HR (Wang *et al.*, 2008); sin embargo, la función que pudiera estar desempeñando aún no está dilucidada. Mediante estudios basados en genética reversa, se sabe que la mutación en el gen que codifica a la IPCS enriquece la manifestación de la HR mediada por la expresión de *RPW-8*, un gen de resistencia involucrado en la defensa de *Arabidopsis* contra el oídio, de ahí que el gen fue nombrado enhance *RPW-8*-mediated HR-like cell death (EHR; Wang *et al.*, 2008). EHR es homóloga a la esfingomielina sintasa (SMS), la cual es una enzima que cataliza la conversión de ceramida a esfingomielina en células de animales (Wang *et al.*, 2008). Puesto que la inhibición de la SMS induce apoptosis (Ding *et al.*, 2008) y la falta de expresión de EHR induce MCP en células vegetales (Wang *et al.*, 2008), se infiere que tanto animales como plantas conservan mecanismos moleculares en común que se hallan involucrados en la regulación de la MCP.

3. ANTECEDENTES

Previamente al empleo de *Arabidopsis* como sistema experimental, en nuestro laboratorio se han utilizado otros modelos como los embriones de maíz y hojas de frijol expuestos a la FB1, con el objetivo de explorar los efectos de esta toxina como compuesto químico derivado de un patógeno y como inhibidor de la síntesis de esfingolípidos. La FB1 es la fumonisina más abundante y tóxica de las secretadas por el hongo *Fusarium verticillioides*. De los estudios emprendidos, se han obtenido resultados que pueden agruparse en dos partes: la acción de la FB1 en blancos membranales y el efecto de la toxina en reacciones asociadas con los mecanismos de defensa celular ante la invasión de patógenos (Gutiérrez, 1999, Garibay *et al.*, 2000; Enríquez *et al.*, 2001; Rivas, 2001; Carmona, 2003; Gutiérrez, 2005).

A continuación, se hace un resumen del trabajo realizado en estos sistemas con el propósito de situar el trabajo de esta tesis en las bases experimentales directas e inmediatas en las que quedó asentado. Los resultados se han agrupado de acuerdo al compartimento celular en el que se describieron y según los componentes celulares que fueron afectados por la FB1, mencionando la información básica pertinente.

3.1. Efectos de la FB1 en elementos de diferente localización subcelular

3.1.1. Pared celular

La pared celular de las células vegetales, representa una barrera a la que se enfrenta el patógeno durante la invasión a la planta. Este componente celular protege y da soporte a las células vegetales. La composición de la pared celular se modifica y moldea continuamente por acción enzimática durante el crecimiento y desarrollo, o bien como resultado de algún tipo de estrés como el de infección por microorganismos. Las proteínas que forman parte de la pared celular son ubicuas y relativamente abundantes en plantas y algas verdes, estas proteínas son ricas en uno o dos aminoácidos, dependiendo de la familia, y contienen dominios con secuencias altamente repetitivas con algunas glicosilaciones (Mousavi y Hotta, 2005).

En embriones de maíz expuestos a la FB1, se detectó un aumento en los transcritos de la glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP), una de las más abundantes de la pared celular (SanJuan, 2001). La presencia de esta proteína se ha relacionado con formas de defensa a nivel estructural. Asimismo, la actividad de la Glucan sintasa II, una proteína de la membrana plasmática que cataliza la formación de 1,3-*D*-glucan, polímero que forma parte de la pared celular y que sirve para fortificarla ante el ataque de patógenos, resultó inhibida parcialmente por la FB1 (Garibay *et al.*, 2000).

3.1.2. Membrana plasmática

El organismo patógeno tiene contacto con la membrana plasmática de la célula hospedera una vez que ha traspasado las barreras de la cutícula y la pared celular (Elmore y Coaker, 2011). En la membrana se desencadenan numerosas reacciones, entre las que se encuentran la apertura de canales iónicos, la formación de ROS, modificaciones en la polaridad y en la actividad enzimática de las NAD(P)H oxidasas, glucosiltransferasas, fosfolipasas, fosfatasa y cinasas (García-Brugger

et al., 2006). Las primeras reacciones desencadenadas en la célula tienen efectos inmediatos en varias rutas metabólicas inductoras de respuestas de defensa (García-Brugger *et al.*, 2006).

En los embriones de maíz expuestos a la FB1 se encontraron las siguientes respuestas:

- i. Un aumento en la fuga de electrolitos que sugiere un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática (Gutiérrez, 1999).
- ii. Un aumento de la fluidez membranal (Gutiérrez, 1999).
- iii. Una inhibición del 25% de la actividad de la ATPasa de H⁺ con 10 μM FB1 (Gutiérrez, 1999).
- iv. Una inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa a una concentración de 10 μM FB1 y una activación a 20 μM FB1 (Rodríguez, 2006).
- v. Una disminución en la peroxidación de lípidos membranales (Palacios, 2002).
- vi. Un ligero incremento en la cantidad de campesterol que indica cambios en la composición de membranas resistentes a detergentes (DRMs) o balsas lipídicas: (Carmona, dato no publicado).

En las preparaciones de membranas plasmáticas de embriones de maíz expuestas a la FB1 se detectaron los siguientes efectos:

- i. Una disminución en la fluidez membranal (Gutiérrez, 1999).
- ii. Una inhibición en la actividad de la ATPasa de H⁺ con una cinética de tipo competitivo que alcanzó una disminución de la actividad del 27 % con 10 μM FB1 (Gutiérrez, 1999).
- iii. Una inhibición en la fosforilación de cinco cinasas y la activación de dos proteínas. La identidad de las cinasas se desconoce (Carmona, 2003).
- iv. No se detectaron cambios en la peroxidación de lípidos membranales (Palacios, 2002).

3.1.3. Citoplasma

Después de la detección del patógeno las células vegetales activan diferentes rutas de señalización mediadas por diferentes fitohormonas (SA, JA o ET) involucradas en la defensa.

En el laboratorio se ha detectado que la FB1 produce:

- i. En embriones de maíz: un incremento del SA (Rivas, 2004).
- ii. En embriones de maíz y hojas de frijol: Un incremento en la actividad de MPKs relacionadas a la defensa similar al de otras especies vegetales (Saucedo, 2007).

3.1.4. Cloroplasto

El cloroplasto es un compartimento celular que ha sido implicado recientemente en las respuestas de defensa. Este compartimento genera ROS que podrían estar implicadas en el establecimiento de la MCP (Liu Y. *et al.*, 2007).

- i. En hojas de frijol expuestas a la FB1 se ha detectado una alta generación de ROS, cuya acumulación se concentra principalmente en el interior de los cloroplastos (González, 2009).
- ii. También en hojas de frijol, la adición de FB1 produjo una inhibición de los parámetros fotosintéticos estudiados *in planta* (Zavaleta *et al.*, 2009).

3.1.5. Núcleo

Una reacción común en las plantas hospedadoras durante la resistencia a patógenos es la degradación del DNA. Mittler y Lam (1997) señalan que dicha degradación es uno de los

mecanismos generales que ocurren en plantas con HR para evitar la incorporación de partículas virales dentro de su genoma.

- i. La FB1 indujo la activación de tres proteínas con actividad de nucleasa en embriones de maíz (Alcántara, 1998). Estos resultados, junto con la detección de la acumulación del SA, sugieren que los embriones de maíz expuestos a la toxina desarrollan una MCP del tipo HR.

3.2. Efectos de los niveles de esfinganina y fitoesfingosina en la actividad de MPKs y niveles de ácido salicílico

Los efectos de la FB1 que se han reportado en células animales y vegetales se asocian básicamente a la inhibición de la ceramida sintasa, que al participar en la ruta biosintética de los esfingolípidos complejos produce una acumulación considerable de las LCBs endógenas.

En nuestro laboratorio se detectó que la FB1 producía un incremento en los niveles endógenos de LCBs en los embriones de maíz y hojas de frijol (Rivas, 2001; Gutiérrez, 2005; Noyola, 2006; Palacios, 2007). Para evaluar si algunas de las modificaciones reportadas en presencia de la FB1 eran consecuencia de las LCBs, se estudiaron varios de los efectos producidos por la toxina, sustituyéndola por LCBs exógenas, reportándose lo siguiente:

- i. En preparaciones de membranas plasmáticas de embriones de maíz, la actividad enzimática de las cinasas membranales inducidas e inhibidas por la FB1 eran las mismas que la esfinganina exógena indujo e inhibió, respectivamente (Carmona, 2003).
- ii. En embriones de maíz y hojas de frijol, la exposición a la esfinganina exógena indujo la actividad de las mismas MPKs activadas por la FB1 (Saucedo, 2007).
- iii. En embriones de maíz, la esfinganina o fitoesfingosina incrementaron los niveles de SA, efecto reportado en presencia de la FB1 (Rivas, 2004).

Todos estos resultados sugieren fuertemente que los efectos detectados tanto en embriones de maíz como en hojas de frijol expuestos a la FB1 se debieron principalmente a la acumulación en los niveles endógenos de LCBs.

4. JUSTIFICACIÓN

El estudio reciente de los esfingolípidos vegetales como moléculas señalizadoras, ha despertado un sinnúmero de interrogantes que se enfocan básicamente en la identificación de los elementos que participan en la transducción de señales generadas por los esfingolípidos. Si bien en los últimos años ha habido un progreso notable y novedoso en las evidencias sobre la función de las LCBs como segundos mensajeros en diferentes tipos celulares o en respuesta a varios tipos de estrés, los mecanismos de transducción subyacentes están pobremente caracterizados. En este trabajo se exploró a las cascadas de MAPKs como integrantes de la vía de señalización mediada por las LCBs. Estas cascadas se postularon como candidatos, ya que constituyen elementos clave en las vías de transducción desencadenadas por varios estímulos, desde los generados por estrés abiótico, hasta los producidos en las respuestas de defensa durante la inmunidad de las plantas. Nuestro planteamiento consideró la importancia de las MPKs como moléculas amplificadoras de señales que pudieran estar incidiendo en la MCP inducida por la acumulación de las LCBs generadas en respuesta a la FB1. La caracterización de las MPKs en la cadena de señalización despertado por las LCBs, aportaría al conocimiento de la bioquímica vegetal un nuevo elemento transductor en la función de las LCBs como segundos mensajeros y sería la primera evidencia de la relación entre ambos transductores en un mismo esqueleto de señalización vegetal. Simultáneamente durante el desarrollo de este trabajo, se identificaron varios rasgos moleculares distintivos de la vía de MCP inducida por LCBs, destacándose el requerimiento del gene *LCB2a* y la selectividad de la esfinganina en el desencadenamiento de la MCP, así como la descripción de los cambios en la ultraestructura celular que acompañan el desarrollo de esta forma de MCP. Finalmente, el panorama experimental delineado, nos permitió establecer que esta MCP, señalizada por LCBs y mediada por una MPK, es una vía que se activa para contender el ataque de un patógeno bacteriano.

5. HIPÓTESIS

Una cascada de MAPKs se activa por un aumento en la concentración de bases de cadena larga inducida por la FB1 para producir muerte celular programada en plántulas de Arabidopsis.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar si la vía de señalización en la que la acumulación de bases de cadena larga conducente a la muerte celular programada tras la adición de la FB1 en Arabidopsis es mediada por una MPK, para así proponer y caracterizar en lo posible, una secuencia de eventos moleculares y celulares involucrados en el proceso de MCP en plantas.

Objetivos particulares

- ↻ Establecer y caracterizar a nivel fenotípico, celular y molecular un modelo experimental que permita estudiar la muerte celular programada inducida por la acumulación de bases de cadena larga en Arabidopsis.
- ↻ Determinar el perfil temporal de acumulación de diez especies de bases de cadena larga en el proceso de muerte celular inducido por FB1.
- ↻ Explorar el impacto de una mutación en uno de los genes que codifican a la SPT sobre la MCP inducida por FB1.
- ↻ Evaluar si la muerte celular programada inducida por la FB1 depende de la acumulación de bases de cadena larga y de la actividad de MPKs.
- ↻ Dilucidar si las bases de cadena larga, como moléculas bioactivas, inciden en la actividad de MPKs implicadas en la defensa contra patógenos.
- ↻ Evaluar si la vía de señalización conducente a la muerte celular programada que involucra a las LCBs y la MPK, opera en la defensa contra patógenos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material Biológico

- Plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (Ecotipo Columbia o Col-0) de tres semanas de edad.
- Plántulas mutantes *lcb2a-1* (SALK_061472), *lcb2a-2* (GABI 216-D07), *lcb2a-3* (SAIL_706-A05), *sbh1-1* (SALK_090881); *mpk6* (SALK_073907), *MPK3* RNAi; *mkp1-1* (inserción de T-DNA; Bartels *et al.*, 2009). Las dobles mutantes *mpk3 mkp1* y *mpk6 mkp1* fueron obtenidas tras el cruce de las mutantes simples. Las plántulas fueron usadas a las tres semanas de germinación.

7.2. Germinación y Tratamiento del Material Biológico

7.2.1. Germinación de las semillas

Como se detalla en el Apéndice III, las semillas de *Arabidopsis* fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 20% estéril (concentración final de cloro activo 1.2%) y Tween-20 concentrado. Después de varios lavados, las semillas se distribuyeron en cajas de petri conteniendo medio sólido de Gamborg suplementado con 1% sacarosa cubierto con círculos de una malla de nylon (con poros de 63 micrometros) estéril de un diámetro ligeramente menor al de las cajas. Las mallas se utilizaron tanto en las condiciones de estratificación/germinación, como en las de los tratamientos subsecuentes. Las semillas se sometieron a estratificación incubándolas durante 2 días a 4°C y en obscuridad. Después de ese periodo, las cajas con semillas se transfirieron para su germinación y crecimiento a cámaras con un fotoperiodo de 8 h de luz por 16 de oscuridad a una temperatura de 22°C durante 2-3 semanas (ver Apéndice III para detalles). La intensidad luminosa fue de (11.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$).

7.2.2. Tratamiento de las plántulas con evocadores

Las plántulas de 2-3 semanas de edad fueron transferidas a un medio de Gamborg fresco que fue suplementado con diferentes concentraciones de FB1, miriocina, ceramida, o combinaciones de químicos. Las plántulas expuestas a los químicos fueron reingresadas a las cámaras de crecimiento, pero ahora bajo luz continua durante el tiempo requerido para cada experimento (ver Apéndice III para detalles).

7.2.3. Tratamiento de las plántulas con LCBs exógenas

Las plántulas de *Arabidopsis* de tres semanas de edad crecidas en cajas Petri (3.5 cm diámetro) fueron asperjadas con una solución 5 μM de d18:0 (Sigma-Aldrich), 5 μM de t18:0 (Sigma-Aldrich) ó 5 μM de d18:0-P (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA; 0.7 ml por caja). Todos los compuestos fueron disueltos en una solución al 0.04 % (v/v) de Silwet L-77 (Chemtura Corporation México, S. de RL de C.V.). Los controles fueron asperjados con la solución de Silwet L-77. Las plántulas se mantuvieron bajo luz continua (11.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$) a 22 °C y los cambios fenotípicos fueron registrados fotográficamente.

7.3. Detección de la Fragmentación de DNA

Las plántulas silvestres, *lcb2a-1*, *mpk3* y *mpk6* expuestas o no a 10 μM FB1 durante 3 ó 5 días se fijaron en una solución de 4% glutaraldehído en PBS y se deshidrataron en series ascendentes de solución de etanol. Terminado el proceso, las muestras fueron embebidas en Paraplast Plus

(Fisher Scientific, Inc.) y seccionadas en cortes de 6 μm de grosor. Los cortes fueron tratados con una solución de proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min a 30°C y enjuagados con PBS dos veces. El DNA celular, fue teñido con 4'6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) y los grupos 3'-OH libres del DNA se marcaron enzimáticamente con 16-UTP fluoresceína por acción de la desoxinucleotidiltransferasa (ensayo de marcaje terminal de mellados con dUTP mediado por la transferasa terminal o reacción de TUNEL; In Situ Cell Death Detection Kit, AP, Roche, Nutley, NJ). Los controles positivos consistieron en muestras digeridas con 3 U/ml de DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA) y teñidas con la reacción de TUNEL. La tinción del DAPI y del TUNEL se observaron con un microscopio confocal Olympus FV1000 (excitación de 460 nm para el DAPI y 494 nm para la fluoresceína).

7.4. Análisis de Ultraestructura Celular

Las plántulas silvestres, *lcb2a-1* y *mpk6* de tres semanas de edad fueron expuestas o no a 10 μM FB1 durante 0, 12, 36 h, 3 y 5 d y la mutante *mpk3* únicamente a 3 y 5 d. Una vez concluido el tiempo de exposición, se cortaron hojas de diferentes plántulas y se fijaron con una solución que contenía 100 mM de amortiguador de fosfatos (pH 7.2) y 3% (v/v) glutaraldehído a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas y embebidas en óxido de Epon:polipropileno en una relación 1:1 (v/v) y se realizaron cortes microtómicos de 80 nm que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol EXII operado a 60 kV. Las imágenes se procesaron con el software PhotoShop, versión 8.0.1 (Adobe Systems, San Jose, CA).

7.5. Determinación de LCBs Libres y Fosforiladas (LCBs-P)

Las plántulas de *Arabidopsis* silvestres y *lcb2a-1* de tres semanas de edad fueron expuestas a la FB1 embebida en el medio de crecimiento de Gamborg's durante 0, 1, 4, 8, 12 y 72 h. Al término del tratamiento, las plántulas completas se colectaron y liofilizaron. Las plántulas fueron expuestas y procesadas por quintuplicado independientemente. El análisis de las LCBs libres y fosforiladas se realizó empleando 30 mg de tejido seco, aproximadamente. La extracción (ver Apéndice III para detalles), separación, identificación y cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa acoplada a ESI-MS/MS, de acuerdo a Markham y Jaworski (2007).

7.6. Análisis Estadístico de la Cuantificación de las LCBs Libres y Fosforiladas (-P)

Los datos del análisis de las LCB libres y fosforiladas se analizaron por un ANOVA factorial usando el software para Windows STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Los promedios se compararon por el método de Tukey. Un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

7.7. Obtención de Fracciones Citosólicas

7.7.1. Preparación de extractos proteicos

Las plántulas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido al cabo de su tratamiento y almacenadas a -70°C hasta su uso. La extracción de las proteínas citosólicas se realizó triturando el tejido con el Tissue Terror (modelo 985-370), durante 3 min en presencia del amortiguador de extracción [Sorbitol 250 mM, HEPES/BTP pH 7.8 50 mM, ditioeritritol (DTE) 5 mM, EDTA 1 mM, KCl 1 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, fluroruro de fenil-metan-sulfonil (PMSF)

1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (40 µg/ml; Roche, Nutley, NJ) en una relación 1:1 (p/v)]. El homogenado crudo se centrifugó a 12 000 g durante 20 min (4°C). Los extractos crudos fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70°C hasta su uso.

7.7.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó de acuerdo al ensayo de Bradford (Protein assay, Kit Bio-Rad) usando suero de albúmina bovina (BSA) como estándar.

7.7.3. Concentración de las muestras proteicas

Cuando la concentración de los extractos proteicos estaba muy diluida para cargar una determinada cantidad de proteína en los geles de poli(acrilamida), se concentraron las proteínas hasta llevarlas a volúmenes menores. Para ello, se tomó un volumen de la muestra (300-500 µl) y se llevó a 1 ml con agua. Se agregaron 100 µl de desoxicolato de sodio al 0.15% y 100 µl de TCA al 50%. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 µl de amortiguador de homogenización.

7.8. Detección de Actividad de MPKs

Se aplicaron 20 µg de proteína por carril en un gel de poli(acrilamida)-SDS al 10% (Schägger y von Jagow, 1987; ver Apéndice III para detalles) embebido con 0.3 mg/ml de proteína básica de mielina (MBP; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) como sustrato de cinasas. Después de la electroforesis (25 mA, 1.5 h), se removió el SDS con tres lavados del amortiguador A (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 10 mM β-glicerolfosfato, 0.5 mg/ml BSA y 0.1% (v/v) Tritón X-100) a temperatura ambiente (30 min por lavado). Posteriormente, las proteínas se renaturalizaron con tres lavados del amortiguador B (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄ y 5 mM NaF) durante 16 h a 4°C en agitación. Finalmente, el gel se lavó una sola vez en el amortiguador C (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EGTA, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄) durante 30 min a temperatura ambiente y después se incubó en 10 ml del amortiguador C en presencia de 5 µM ATP y 50 µCi γ-[³²P]-ATP durante 90 min a temperatura ambiente (modificado de Zhang y Klessig, 1997). La reacción se detuvo con el amortiguador D (5% (v/v) ácido tricloroacético, 1% (p/v) pirofosfato de sodio). La remoción del exceso de γ-[³²P]-ATP se realizó con al menos cinco lavados de la solución D por 3 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y secados en papel Whatman de 3MM y expuestos a películas Medical X-ray General Purpose Blue (Kodak, Rochester, NY). La estimación del tamaño de las proteínas se realizó con base en los marcadores de masa molecular preteñidos BenchMark™ (Invitrogen, Carlsbad, CA).

7.9. Inmunodetección de Proteínas en Membranas de PVDF

Para cada ensayo de inmunotransferencia se separaron electroforéticamente 20-30 µg de proteína del extracto crudo en un gel de poli(acrilamida)-SDS al 10% (Schägger y von Jagow, 1987; ver Apéndice III para detalles) Posteriormente, el gel se colocó en un casete de inmunotransferencia haciendo contacto con una membrana de PVDF y transfiriéndose a 250 mA durante 1 h con circulación de agua a temperatura ambiente.

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-MPK6 (Danvers, MA) y reveladas con fosfatasa alcalina (ver Apéndice III para detalles).

7.10. Inoculación bacteriana de las plántulas de Arabidopsis y determinación del crecimiento bacteriano *in planta*

Se obtuvieron cultivos frescos de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato avrRpm1*, los cuales fueron resuspendidos en 10 mM MgCl₂. La suspensión (10⁷ cfu/ml) fue asperjada sobre las cajas de Petri (2.0 ml por cajas de 8 cm diámetro) que contenían a las plántulas de Arabidopsis de tres semanas de edad que habían sido expuestas o no a 10 μM FB1 durante 12 h (bajo luz continua, 11.5 μmol/m²/seg). Las muestras de las plántulas se cosecharon en los tiempos indicados e inmediatamente se trituraron en 10 mM MgCl₂. Se realizaron unas series de diluciones y se plaquearon en medio de Kings B suplementado con 40 μg/ml de rifampicina y 50 μg/ml kanamicina. Las cajas fueron incubadas a 29°C y se contaron el número de colonias después de 48 h (Yang *et al.*, 2002). Las muestras se procesaron por triplicado y se realizaron 3 experimentos independientes (Lozano, 2010).

8. RESULTADOS

8.1. La modificación de los niveles endógenos de esfingolípidos complejos o de sus intermediarios tienen efectos relevantes en la viabilidad de plántulas de Arabidopsis

Para estudiar diferentes aspectos de la MCP y asociarlos con cambios en los niveles endógenos de esfingolípidos celulares, si bien, en la literatura abunda la descripción de fenómenos relacionados con la MCP-HR en plantas adultas de Arabidopsis, en este trabajo se optó por implementar un modelo que fuera reproducible, rápido, de fácil manipulación y con respuestas de adecuada magnitud fenotípica y molecular. Por ello, se desarrolló un sistema de plántulas de Arabidopsis de dos a tres semanas de edad, crecidas en medio sólido que se podían exponer a la FB1, así como a otros compuestos esfingoideos y a otros tratamientos.

Primeramente, se realizó un análisis del efecto de la FB1 sobre la viabilidad de las plántulas, haciéndose una curva dosis-respuesta, para de ésta elegir una concentración de FB1 que resultara letal para las plántulas. Como se muestra en la Figura 7a, la FB1 inhibió el crecimiento y desarrollo de las plántulas en las zonas fotosintéticas y radicales de manera dosis-dependiente. De acuerdo al grado de severidad del daño de las plántulas, para los experimentos posteriores, se eligió la concentración de 10 μ M FB1 por ser letal en las plántulas, en tiempos relativamente cortos de exposición (9-15 días).

Una vez establecido el sistema experimental, el primer objetivo fue dilucidar la identidad de la(s) molécula(s) causante(s) de la muerte inducida por la FB1 en las plántulas de Arabidopsis. Ya que esta toxina rompe el flujo de reacciones biosintéticas que tienen como producto final a los esfingolípidos complejos (Fig. 5), los candidatos posibles eran las LCBs incrementadas, o bien las ceramidas disminuidas. Para explorar esta última posibilidad se indujo la muerte celular con la FB1 y luego se suplementó al sistema con ceramidas exógenas. Se emplearon diferentes tipos de ceramidas fisiológicas que se encuentran en los tejidos vegetales [ceramida C18:1 y C24:0 (el número indica el número de átomos de carbono del ácido graso unido a la LCB y el número subsiguiente a los dos puntos, el número de insaturaciones)] para evaluar su efecto tras la adición de la FB1. Puesto que las ceramidas son moléculas que incrementan su hidrofobicidad de acuerdo al número de carbonos de sus ácidos grasos, primero se exploró si las ceramidas elegidas, que son fuertemente hidrofóbicas, eran captadas por las plántulas. Como se muestra en la Figura 7b sección superior, la exposición de las plántulas a las ceramidas CeC18:1 o CeC24:0, incrementaron el crecimiento de las plántulas, con respecto a su control, sugiriendo la incorporación de la ceramida a las células, sin descartar la degradación de la ceramida y su uso consecuente como fuente de carbono. Posteriormente, se diseñó un experimento para evaluar si el tratamiento con las ceramidas podía evitar el fenotipo causado por la FB1. Para ello, las plántulas fueron expuestas durante 5 días a la micotoxina y, enseguida, a los diferentes tipos de ceramida (Fig. 7b sección inferior). La remoción de las plántulas del medio que contenía a la FB1, de manera independiente al tratamiento posterior, evitó la muerte celular (notar que en la Fig. 7b las tres secciones inferiores corresponden a las plántulas tomadas posteriormente a la exposición a la FB1 y expuestas por 15 días a las ceramidas respectivas). Si bien, la eliminación de la FB1 promovió la sobrevivencia de las plántulas, pudo observarse que la adición subsecuente de las ceramidas favoreció el crecimiento y, en general, la viabilidad de las plántulas (Fig. 7b sección

inferior), sugiriendo que los bajos niveles de ceramida, al estar inhibida su producción, aceleran el proceso de muerte celular inducida por la FB1.

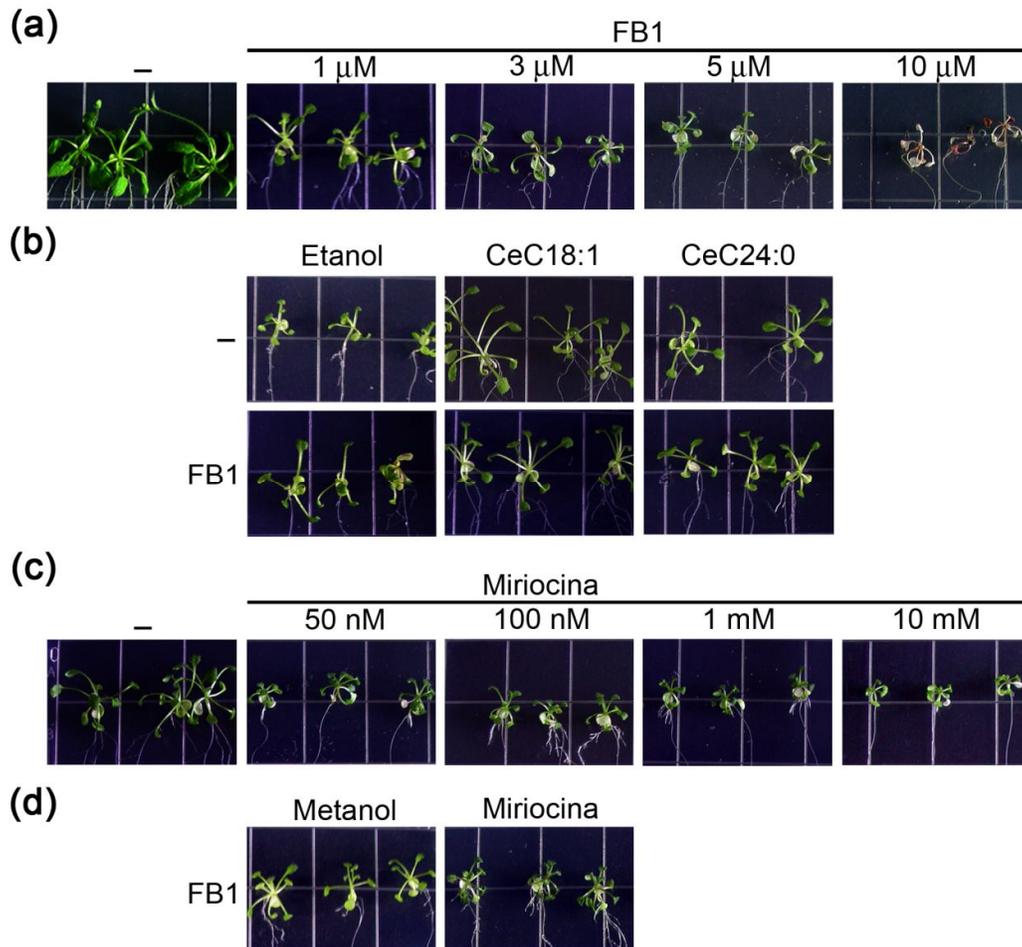


Figura 7. Efecto de la miriocina y la ceramida sobre la muerte celular inducida por la FB1. Los experimentos se llevaron a cabo usando plántulas tipo silvestre de *Arabidopsis* de tres semanas. (a) Efecto dosis-dependiente de la FB1 sobre la viabilidad de las plántulas. Las plántulas fueron expuestas a las concentraciones señaladas de FB1 durante 15 días. (b) Efecto de ceramidas sobre la muerte celular inducida por la FB1. La sección superior corresponde a la exposición de las plántulas a las ceramidas C18:1 o CeC24:0 (10 μM) durante 15 días. La sección inferior muestra a las plántulas expuestas durante 5 días a la FB1 (10 μM), periodo tras el cual fueron expuestas a las ceramidas por 15 días, tiempo en el que se hicieron los registros mostrados. El control de este experimento fue la exposición de las plántulas a etanol, usado como solvente de las ceramidas. (c) Efecto dosis-dependiente de la miriocina sobre la viabilidad de las plántulas. Las plántulas fueron expuestas a las concentraciones señaladas de miriocina durante 15 días. (d) Efecto de la miriocina sobre la muerte celular inducida por la FB1. La sección muestra fotografías de plántulas expuestas durante 5 días a 100 nM miriocina y, posteriormente, expuestas a la FB1 (10 μM) por 15 días. Para (c) y (d), el control incluyó la exposición de las plántulas a metanol usado como solvente de la miriocina. Para todos los casos, se muestran imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

Otra posibilidad señalaba al incremento en los niveles de LCBs como responsable de la muerte celular inducida por la FB1. La estrategia que se siguió para probar esta hipótesis fue inducir una disminución de las LCBs endógenas mediante un pre-tratamiento de las plántulas con miriocina (un inhibidor de la actividad de la SPT, Fig. 5) y luego tratar de promover la MCP mediante la adición de la FB1 (Fig. 5). Para la determinación de las condiciones del pre-tratamiento con la

miriocina, se evaluó el efecto de diferentes dosis (50 y 100 nM y 1 y 10 μ M) sobre las plántulas. Del experimento se elegiría aquella concentración en la que no se detectaran daños letales en las plántulas, pero que sugiriera la alteración en la síntesis de esfingolípidos. Como se muestra en la Figura 7c sección superior, la exposición de las plántulas a la miriocina produjo una inhibición en el crecimiento de las plántulas dependiente de la concentración. Con base en lo observado se eligió la concentración de 100 nM, pues en ésta hubo un efecto en el crecimiento de las plántulas, sin que afectara su viabilidad, a diferencia de las concentraciones en el orden micromolar. Como se muestra en la Fig. 7d sección inferior, el pretratamiento de las plántulas con la miriocina atenuó la muerte celular manifestada en las plántulas expuestas a la FB1. Estos resultados claramente aportaban el primer indicio de la contribución de las LCBs en la muerte de Arabidopsis inducida por la FB1.

8.2. La falta de función de la subunidad LCB2a, que forma parte del complejo de la serina palmitoiltransferasa, evita la muerte de las plántulas de Arabidopsis expuestas a la fumonisina B1

Continuando con la línea de investigación que postulaba la aportación de las LCBs en la muerte de Arabidopsis inducida por la FB1, se emplearon tres líneas mutantes con inserciones de T-DNA en el gen *LCB2a* de la SPT. Esta elección se basó en la consideración de que esta enzima es la que sintetiza al precursor de las LCBs y aunque en estas mutantes no se habían encontrado diferencias fenotípicas ni en el desarrollo ni en los niveles de LCBs (Dietrich *et al.*, 2008), su efecto no se había explorado en relación a la MCP. Las posiciones de las inserciones en cada mutante (reportadas previamente por Dietrich *et al.*, 2008) se muestran en la Figura 8a. El gen *LCB2a* (At5g23670) codifica una de las dos isoformas LCB2 que contiene Arabidopsis, la LCB2a y la LCB2b (At3g48790). Ambas contienen al residuo de Lys indispensable para la actividad catalítica del heterodímero LCB1/LCB2 que conforma a la SPT de las células eucariontes, por lo tanto, las mutantes *lcb2a* no contienen el complejo SPT conformado por LCB1/LCB2a, pero sí el formado por las subunidades LCB1/LCB2b. Dietrich *et al.* (2008), reportaron funciones redundantes entre la LCB2a y LCB2b en condiciones normales de crecimiento y desarrollo; sin embargo, en el presente trabajo se evaluó sólo la contribución de LCB2a en la generación de un incremento de LCBs inducido por la FB1.

Como se muestra en la Figura 8b, las plántulas de las tres líneas mutantes *lcb2a* no mostraron diferencias con respecto a las silvestres en las tasas de crecimiento y desarrollo; no obstante, cuando se expusieron a la FB1, la diferencia entre ambas fue evidente. A pesar de observarse la inhibición de crecimiento de las plántulas, las mutantes mostraron señales de muerte muy atenuadas en comparación con las silvestres en presencia de la toxina. A este fenotipo se le consideró como tolerante a la FB1. Por cuestiones prácticas, el resto de los experimentos se realizó únicamente con la línea mutante *lcb2a-1*.

8.3. La mutante *lcb2a-1* no expresa muerte celular programada después de la exposición con la fumonisina B1, según parámetros moleculares y celulares.

La fragmentación del DNA es un marcador clásico de MCP, una técnica comúnmente empleada para cuantificarla es el método de marcaje catalizado por transferasas de las regiones terminales 3'-OH del DNA con dUTPs. El fundamento de esta técnica aprovecha la alta generación de extremos 3' libres del DNA, producidos por endonucleasas, para insertar dUTPs

marcados que posteriormente son detectados por microscopía de fluorescencia o de luz (Kelly *et al.*, 2002).

Para validar con parámetros más finos la pérdida de viabilidad manifestada por las plántulas bajo los tratamientos ya referidos que implicaban la expresión de una MCP, en este estudio se exploró la fragmentación de DNA empleando el método de TUNEL en las plántulas silvestres y *lcb2a-1* tratadas o no con la FB1. De esta manera, se obtendría un parámetro molecular indicativo de MCP. Como se muestra en la Figura 9, el marcaje específico con fluoresceína del DNA fragmentado (en color verde), no se detectó en las plántulas silvestres y *lcb2a-1* sin tratamiento con la FB1. En contraste, las plántulas silvestres tratadas con la micotoxina contenían células con altos niveles de extremos 3'-OH de DNA que colocalizan con el interior de los núcleos según la tinción correspondiente (en color rojo). Bajo estas mismas condiciones, las mutantes *lcb2a-1* mostraron menos señales positivas de TUNEL, indicando que la interrupción de la expresión del gen *LCB2a* fue suficiente para hacer a las plántulas tolerantes a la FB1, corroborando así las observaciones de la viabilidad sobre las plántulas. La obtención de estos resultados coincidió con la publicación del reporte de Shi *et al.* (2007), indicando que la mutación en el otro gen del complejo heterodimérico de la SPT, *LCB1*, tampoco producía células con fragmentación de DNA en presencia de la FB1.

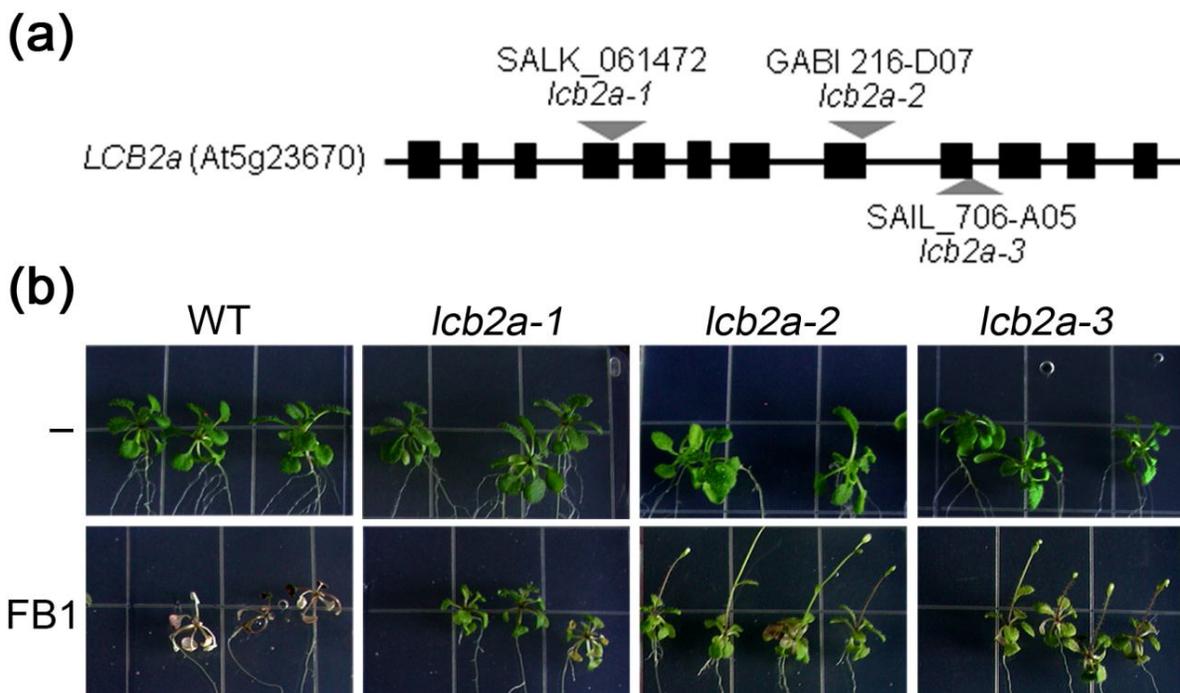


Figura 8. Efecto de la mutación en el gen *LCB2a* en la muerte celular inducida por la FB1. a) Posición de las inserciones de T-DNA en el gen *LCB2a* de tres líneas mutantes. b) Efecto de la FB1 (10 µM) sobre la viabilidad de las plántulas mutantes *lcb2a*, empleando como control plántulas silvestres (WT). Para todos los casos, las plántulas empleadas fueron de tres semanas de edad y expuestas a la FB1 durante 14 d. Para b) se muestran imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

Para confirmar el establecimiento de la MCP en plántulas silvestres tratadas con la FB1 y la tolerancia de la mutante *lcb2a-1* en respuesta a la micotoxina, se evaluó la integridad de las células a nivel ultraestructural usando microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como se observa en la Figura 10, las células de las plántulas silvestres en las condiciones control

presentaron una morfología típica de las células del mesófilo de las hojas: una gran vacuola central que desarrolla una alta presión de turgor, forzando a los organelos a ubicarse en la periferia de la célula (secciones 1, 2 y 3). Los cloroplastos presentaron una morfología de media luna (secciones 1 y 2), con membranas tilacoidales organizando grana bien definidas (acercamiento de la sección 2). Por el contrario, las células de las plántulas silvestres tratadas con la FB1, a los 3 días, mostraron una pérdida en la presión de turgor reflejada en la localización de los organelos lejos de la periferia (señalados con flechas en la sección 7), los cloroplastos perdieron la morfología de media luna y adoptaron unas formas más redondeadas (sección 8), la integridad de los grana se afectó (acercamiento de la sección 8), el número de gránulos de almidón disminuyó, efecto reportado por Yao y Greenberg (2006) y, en algunos casos, se detectó la presencia de vesículas de grandes dimensiones en el interior de las vacuolas que se asemejan a los autofagosomas (sección 9; Liu Y. *et al.*, 2005; Mino *et al.*, 2007). Los cambios detectados en

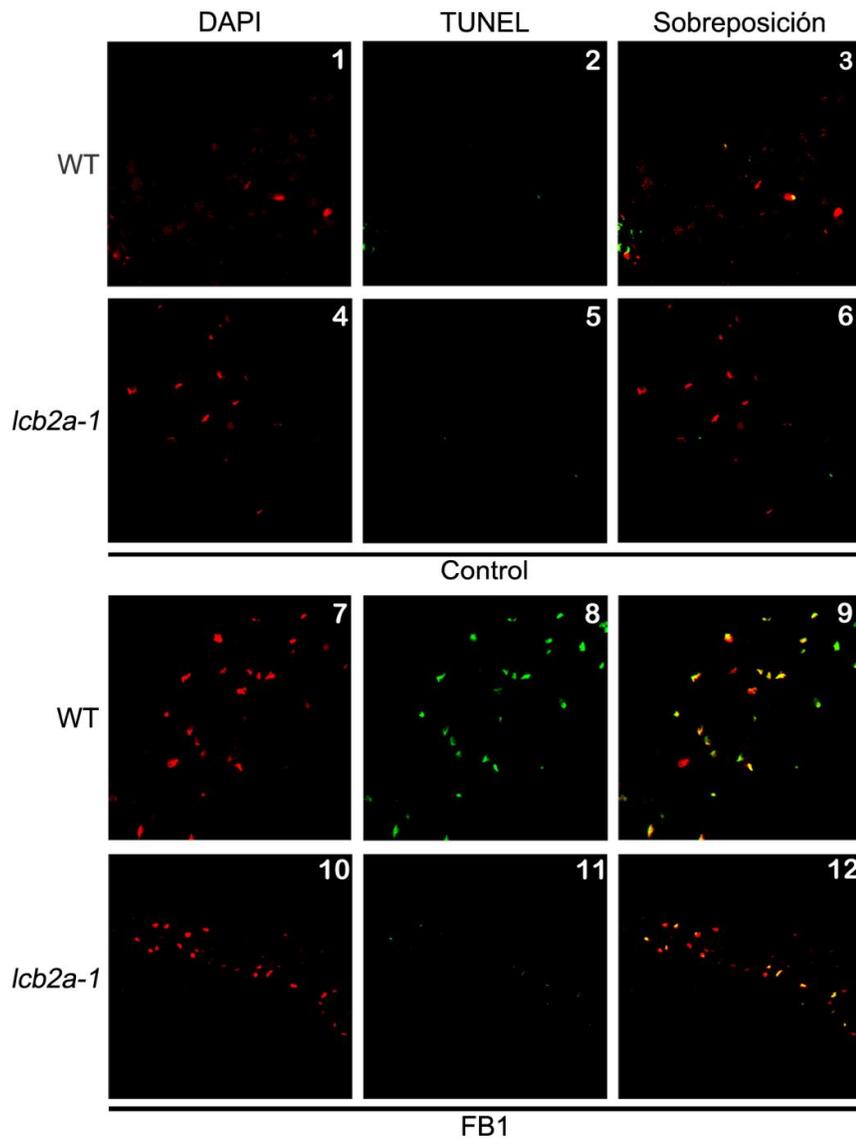


Figura 9. Fragmentación del DNA inducida por la FB1 en plántulas silvestres y mutantes *lcb2a-1*. La fragmentación de DNA fue detectada en hojas de plántulas silvestres y *lcb2a-1* no expuestas (imágenes 1-3, 4-6, respectivamente) o expuestas a 10 μ M FB1 por 5 días (imágenes 7-9, 10-12). Los paneles muestran el núcleo teñido con DAPI, la fluorescencia del DNA fragmentado en el núcleo y las imágenes sobrepuestas, según se indica. Experimento representativo de tres réplicas independientes.

la ultraestructura de las células de las plántulas silvestres que se detectaron a los 3 días de exposición con la FB1, fueron muy similares a los observados a las 36 h de exposición (Fig. 11).

La mutante *lcb2a-1* en condiciones control (sin tratamiento con FB1) no presentó cambios estructurales con respecto a las silvestres en las mismas condiciones (secciones 4, 5 y 6), a excepción de la morfología de los cloroplastos que se presentaron redondeados (sección 4). En las células *lcb2a-1* que fueron tratadas con la FB1 por 3 días, no se observaron cambios en la presión de turgor y en la morfología de los cloroplastos y los grana (secciones 10, 11 y 12). Estos resultados fueron consistentes con las señales detectadas en los ensayos de TUNEL, confirmando que la línea mutante *lcb2a-1* es tolerante a la FB1 ya que no presenta signos severos de MCP.

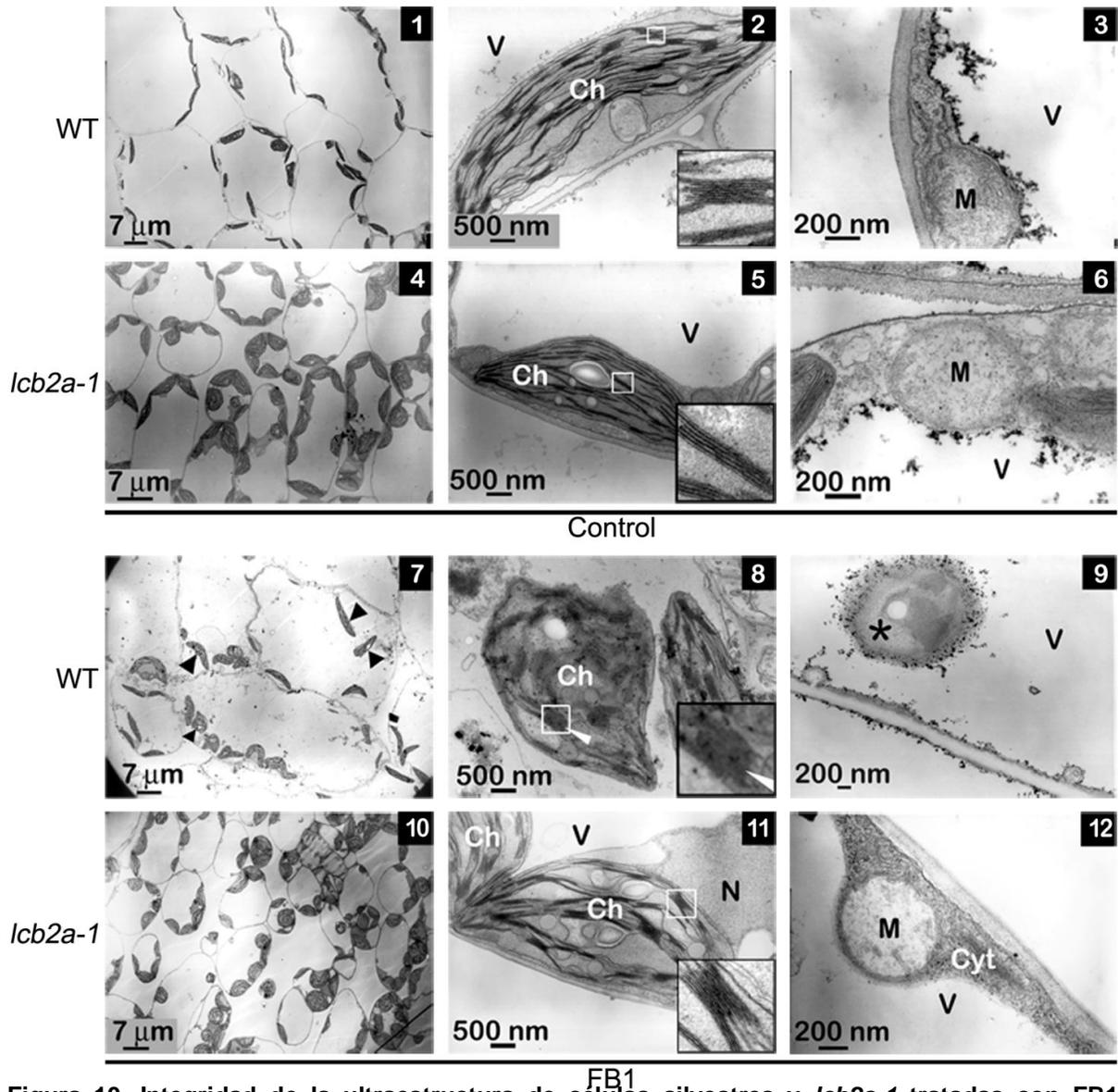


Figura 10. Integridad de la ultraestructura de células silvestres y *lcb2a-1* tratadas con FB1 durante 3 días. Análisis de la ultraestructura de las células de plántulas silvestres y *lcb2a-1* no expuestas (1-3 y 4-6, respectivamente) o expuestas a 10 μM FB1 durante 3 días (7-9 y 10-12). Las flechas señalan diferencias producidas por el tratamiento con la FB1. Ch, cloroplastos; M, mitocondria; V, vacuola; N, núcleo y Cyt, citosol. Los asteriscos muestran un autofagosoma. Los recuadros en las secciones 2, 5, 8 y 11 muestran un acercamiento de la imagen correspondiente. Las barras muestran la magnificación de las imágenes. Experimento representativo de dos réplicas independientes.

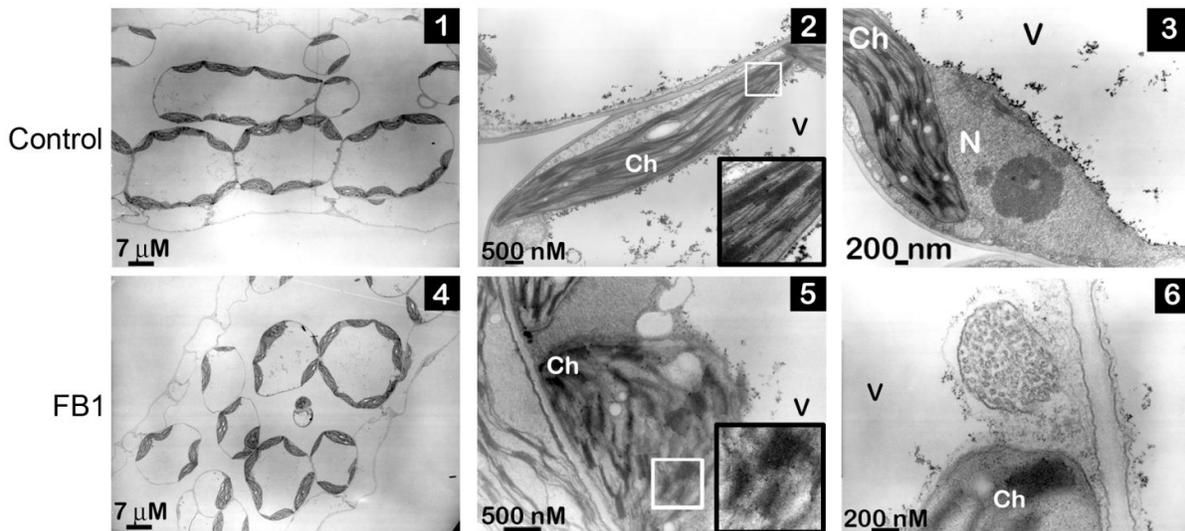


Figura 11. Modificaciones en la ultraestructura de las células silvestres producidas por la FB1 a las 36 h de exposición. Análisis de la ultraestructura de las células de plántulas silvestres no expuestas (1-3) y expuestas a 10 μM FB1 durante 36 horas (4-6). Ch, cloroplastos; M, mitocondria; V, vacuola; N, núcleo y Cyt, citosol. Los recuadros en las Figuras 2 y 5 muestran un acercamiento de la imagen correspondiente. Las barras muestran la magnificación de las imágenes. Experimento representativo de dos réplicas independientes.

8.4. La fumonisina B1 causa acumulación diferencial del contenido de 10 especies de LCBs para inducir muerte celular programada en Arabidopsis

Para asociar los resultados de viabilidad fenotípica y molecular con los niveles de LCBs, en especial el efecto de la tolerancia de la mutante *lcb2a-1* a la FB1, se midieron los niveles de 10 LCBs libres en las plántulas silvestres y en las mutantes *lcb2a-1* tratadas o no con la FB1 por 5-6 tiempos en el intervalo de 0 a 72 h, usando un protocolo que incluía la extracción selectiva de LCBs y su separación e identificación por HPLC en fase reversa acoplada a ESI-MS/MS.

La separación y cuantificación incluyó a las siguientes LCBs libres y fosforiladas: dihidroesfingosina o esfinganina (d18:0), 4-hidroesfinganina o fitoesfingosina (t18:0), 8-esfingenina (d18:1), 4,8-esfingadienina (d18:2) y la 4-hidroxi-8-esfingenina (t18:1). Como se muestra en las Figuras 12 y 13, se encontró que tanto las plántulas silvestres, como las mutantes en condiciones control presentaron un perfil de LCBs en niveles específicos, que permanecieron constantes a lo largo de los tiempos muestreados. De las LCBs libres cuantificadas, la más abundante en condiciones control fue la t18:0 (Fig. 12b) y la menos fue la d18:2 (Fig. 13b), análogo a lo reportado por Markham *et al.* (2006). Con respecto a la cuantificación de LCBs en las plántulas expuestas a la FB1, se observó que las LCBs se incrementaron en función del tiempo, siendo las cantidades absolutas mayores en las plántulas silvestres que en las mutantes *lcb2a-1*. En la Figura 12, se muestra la cuantificación de las especies esfingoideas (d18:0, d18:0-P, t18:0 y t18:0-P), cuyos niveles fueron más afectados tras el tratamiento con la FB1 y en la Figura 13, aquellas (d18:1, d18:1-P, d18:2, d18:2-P, t18:1 y t18:1-P) cuyos niveles permanecieron similares a los detectados en sus condiciones control.

La cinética de acumulación de la d18:0 y la t18:0 en las plántulas silvestres expuestas a la FB1 mostró un incremento gradual que comenzó desde las 4 h y duró hasta las 72 h, tiempo en el que alcanzaron sus máximos niveles (618 y 113 veces, respectivamente; Fig. 12 y Tabla III). Si bien,

las LCBs de las plántulas *lcb2a-1* expuestas a la FB1 mostraron un incremento dependiente del tiempo, se observaron diferencias con respecto a las silvestres. Por ejemplo, el incremento de la d18:0 se observó a partir de las 8 (y no desde las 4 h) y hasta las 72 h. Los incrementos de la d18:0 y t18:0 en las mutantes *lcb2a-1* expuestas a la FB1 por 72 h, fueron de 141 y 41 veces, respectivamente (Tabla III).

La d18:0-P y t18:0-P alcanzaron niveles similares a sus formas no fosforiladas a las 72 h de exposición en las plántulas silvestres y *lcb2a-1* (Fig. 12), pero mostraron diferentes incrementos (7979 y 952 veces en las silvestres; 2186 y 452 veces en las mutantes *lcb2a-1*; Tabla III).

Como se observa en las gráficas de las Figuras 12 y 13, la cinética de acumulación de las LCBs determinadas resultó compleja, ya que cada especie esfingoidea siguió un patrón individual de acumulación. Con objeto de hacer un análisis sistemático y objetivo de la cinética de acumulación de las LCBs, los datos fueron procesados de manera estadística entre las diferentes LCBs de acuerdo al tratamiento con la FB1, el curso temporal y los genotipos.

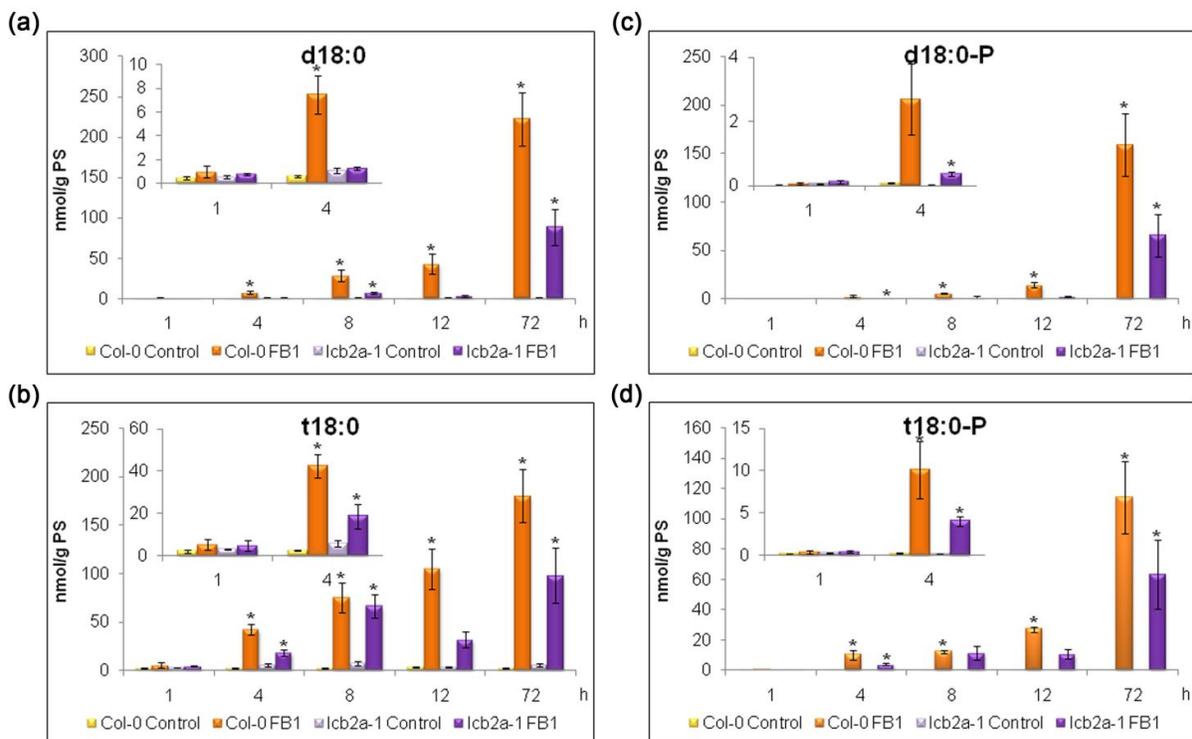


Figura 12. Las principales LCBs libres acumuladas bajo el tratamiento con la FB1 (d18:0, d18:0-P, t18:0 y t18:0-P) decremantan sustancialmente en la mutante *lcb2a-1*. El contenido de las LCBs de las plántulas silvestres y *lcb2a-1* control y de las expuestas a la FB1 por 1, 4, 8, 12 y 72 h se determinó después de extracción, separación e identificación por HPLC-ESI-MS/MS.

(a) Cinética de acumulación de la d18:0 (dihidroesfingosina o esfinganina).

(b) Cinética de acumulación de t18:0 (4-hidroesfinganina o fitoesfingosina).

(c) Cinética de acumulación de d18:1-P (dihidroesfingosina 1-fosfato o esfinganina 1-fosfato).

(d) Cinética de acumulación de t18:1-P (4-hidroesfinganina 1-fosfato o fitoesfingosina 1-fosfato).

Las barras son los promedios de 5 determinaciones independientes \pm ES. Los recuadros muestran secciones amplificadas (1 y 4 h) de las gráficas respectivas.

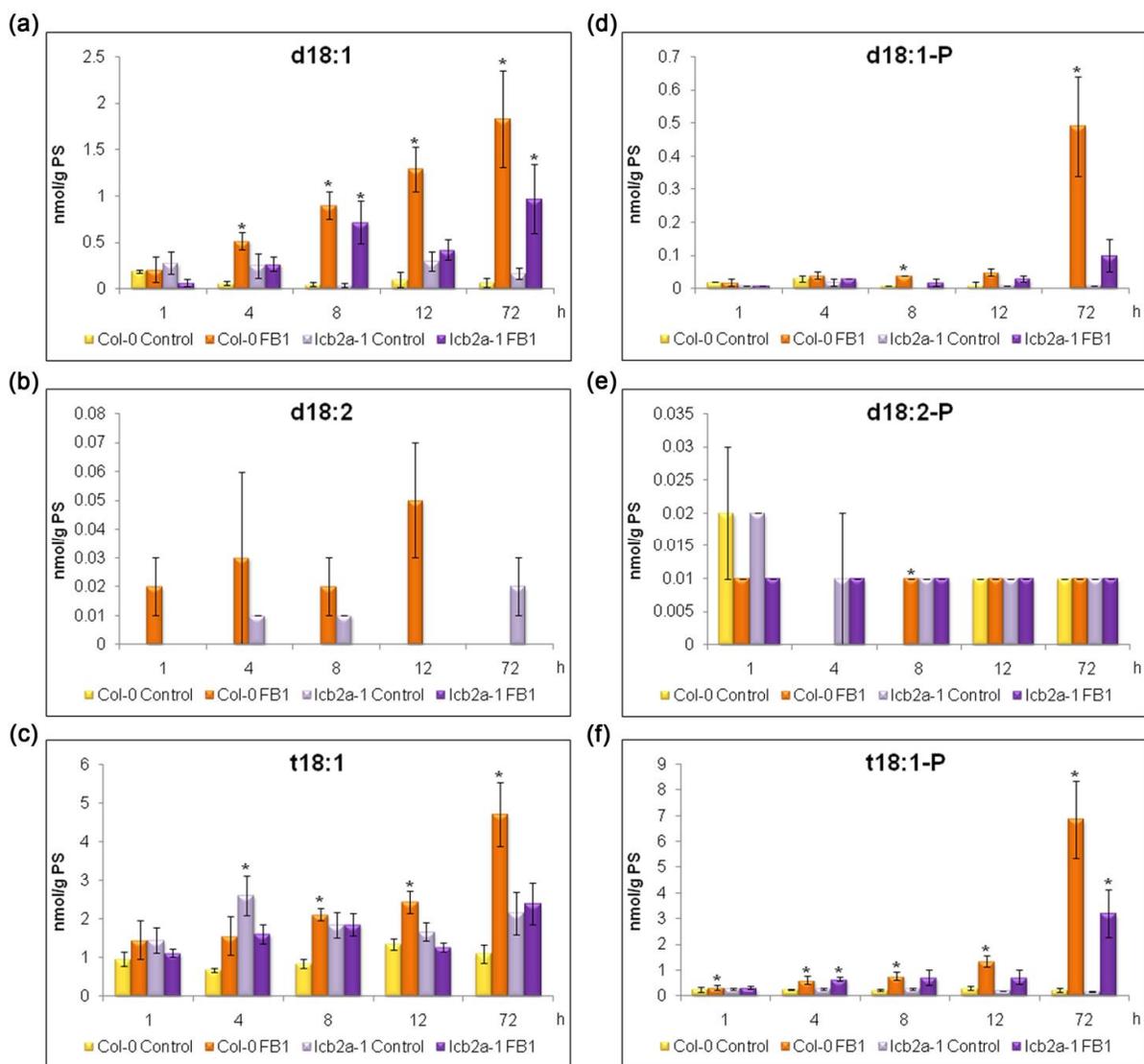


Figura 13. Las LCBs libres menos elevadas bajo el tratamiento con la FB1 son la d18:1, d18:1-P, d18:2, d18:2-P, t18:1 y t18:1-P. El contenido de las LCBs de las plántulas silvestres y *lcb2a-1* control y de las expuestas a la FB1 por 1, 4, 8, 12 y 72 h se determinó después de extracción, separación e identificación por HPLC-ESI-MS/MS.

(a) Cinética de acumulación de la d18:1 (esfingenina o esfingosina).

(b) Cinética de acumulación de la d18:2 (esfingadienina)

(c) Cinética de acumulación de t18:1 (4-hidroxiesfingenina).

(d) Cinética de acumulación de la d18:1-P (esfingenina 1-fosfato o esfingosina 1-fosfato).

(e) Cinética de acumulación de la d18:2-P (esfingadienina 1-fosfato)

(f) Cinética de acumulación de t18:1-P (4-hidroxiesfingenina 1-fosfato).

Las barras son los promedios de 5 determinaciones independientes \pm ES.

Tabla III. Incremento de las LCBs tras la exposición a la FB1 en plántulas silvestres y *lcb2a-1*. Comparación entre el contenido promedio de 5 determinaciones de las LCBs extraídas de plántulas silvestres y *lcb2a-1* expuestas a la FB1 por 1, 4, 8, 12 y 72 h, con respecto a su control a las 0 h. Abreviaturas: d18:0, dihidroesfingosina ó esfinganina; d18:1, 8-esfingenina; d18:2, 4,8-esfingadienina; t18:0, 4-hidroxisfinganina ó fitoesfingosina; t18:1, 4-hidroxi-8-esfingenina. –P indica sus respectivas formas fosforiladas. ND significa no detectada.

Tiempo	d18:0		d18:1		d18:2		t18:0		t18:1	
(h)	WT	<i>lcb2a-1</i>								
1	2.89	1.29	1.40	0.30	0.67	1.00	3.43	1.91	1.83	0.92
4	20.81	1.98	3.47	1.04	1.00	ND	26.74	7.70	1.96	1.33
8	79.00	10.79	6.00	2.77	0.67	1.00	47.38	27.53	2.65	1.52
12	118.28	5.16	8.60	1.62	1.67	1.00	66.10	13.22	3.06	1.03
72	618.47	140.83	12.20	3.73	ND	ND	113.28	40.61	5.89	1.97
Tiempo	d18:0-P		d18:1-P		d18:2-P		t18:0-P		t18:1-P	
(h)	WT	<i>lcb2a-1</i>								
1	3.50	4.00	2.00	1.00	1.00	1.00	3.42	3.29	1.83	1.72
4	134.50	12.00	4.00	3.00	ND	1.00	84.33	28.86	3.44	3.67
8	303.00	63.00	4.00	2.00	1.00	1.00	101.33	82.14	4.28	3.94
12	716.50	72.67	5.00	3.00	1.00	1.00	224.08	76.64	7.44	4.06
72	7 969.50	2 186.33	49.00	10.00	1.00	1.00	952.25	452.29	38.11	17.77

Para establecer la cinética de acumulación de las LCBs en ambas líneas de Arabidopsis, se calculó la relación de acumulación de cada una de ellas en presencia de la FB1 con respecto a su control. Para cada LCB analizada, se tomaron las 5 determinaciones obtenidas para un tiempo determinado y, cada una de ellas, fue dividida sobre el promedio de su control respectivo:

$$\text{Acumulación relativa LCB X} = \frac{\text{LCB } X_{1,2,\dots,5}(\text{FB1})}{\bar{X} \text{ LCB X (C)}} \quad \text{para cada tiempo estudiado}$$

En la Tabla IV, se muestran los promedios de cada una de las relaciones de acumulación para cada LCB en un tiempo determinado. Como se observa, las acumulaciones relativas incrementaron con el tiempo de exposición a la FB1. Para determinar el grado en el que se acumularon las LCBs, se consideraron las acumulaciones relativas individuales para, posteriormente, analizarlas estadísticamente por ANOVA con un nivel de significancia de 0.05 y posteriormente, por un análisis de Tukey (1977; ver superíndices en los valores de las acumulaciones relativas). Las cantidades absolutas de las acumulaciones relativas de todas las LCBs de las plántulas silvestres fueron mayores significativamente a las de la mutante *lcb2a-1* a las 72 h. Tanto en las plántulas silvestres como en la *lcb2a-1*, las principales LCBs que se acumularon por efecto de la FB1 fueron la d18:0-P > t18:0-P > d18:0 > d18:1-P > t18:0. Para establecer una correlación entre la elevación de ciertas LCBs y el fenotipo de la MCP, se comparó la acumulación relativa de cada LCB con respecto a la acumulación relativa de la d18:0 en cada tiempo estudiado. A esta relación se le denominó índice de incremento (Tabla V). La comparación fue hecha con base a la d18:0, ya que ésta es la precursora de las otras LCBs (Fig. 5), de manera que bajo nuestras determinaciones experimentales se podría seguir la cinética de interconversión de esta LCB a sus formas insaturadas, hidroxiladas y fosforiladas. El cálculo que se realizó fue el siguiente:

$$\text{Índice de incremento LCB X} = \frac{\text{Acumulación relativa de la d18:0}}{\frac{\text{LCB } X_{1,2,\dots,5}(\text{FB1})}{\bar{X} \text{ LCB X (C)}}} \quad \text{para cada tiempo estudiado}$$

Como se puede observar, la fórmula consideró las 5 determinaciones independientes de cada una de las LCBs, para después ser analizadas estadísticamente por ANOVA con un nivel de significancia de 0.05 y por un análisis de Tukey, para identificar diferencias significativas entre las plántulas silvestres y las mutantes *lcb2a-1* (ver superíndices en los valores de los índices de incremento). En la Tabla V, se muestran los promedios de los índices de incremento de cada una de las LCBs para cada uno de los tiempos estudiados. En dicha Tabla, se observa que los índices de incremento fueron mayores en las plántulas silvestres que en las mutantes *lcb2a-1* para la mayoría de las LCBs. Un valor de índice menor a la unidad refleja un mayor incremento de una LCB dada bajo el tratamiento con la FB1, comparada con el incremento de la d18:0 después del tratamiento con la micotoxina. De todas las LCBs analizadas, sólo d18:0-P, t18:0-P y t18:0 mostraron valores cercanos a la unidad (el índice de incremento para la d18:0), tanto en las plántulas silvestres, como en las mutantes *lcb2a-1* para la mayoría de los tiempos probados, indicando que estas LCBs, junto con la d18:0, son las LCBs con mayores relaciones de acumulación y que, por tanto, éstas son las que pueden estar relacionadas con la inducción de la MCP.

Tabla IV. La acumulación de las LCBs en plántulas silvestres tratadas con FB1 se abate en la mutante *lcb2a-1*. La comparación entre el contenido de las LCBs de las plántulas silvestres y *lcb2a-1* expuestas sin o con FB1 por 1, 4, 8, 12 y 72 h fue expresado como la acumulación relativa para cada LCB. Las acumulaciones relativas se calcularon usando los valores de las cinco determinaciones de las réplicas divididas sobre el promedio del contenido de la misma LCB en ausencia de la FB1. En esta Tabla se muestran los promedios de las relaciones de acumulación de cada LCB por tiempo de estudio. Abreviaturas: d18:0, dihidroesfingosina o esfinganina; d18:1, 8-esfingenina; d18:2, 4,8-esfingadienina; t18:0, 4-hidroesfinganina o fitoesfingosina; t18:1, 4-hidroxi-8-esfingenina. -P indica sus respectivas formas fosforiladas. Los valores de d18:1 y d18:1-P fueron analizadas pero no incluidos en la Tabla, ya que no mostraron diferencias significativas. El mismo superíndice indica que los valores entre las silvestres y *lcb2a-1* no son estadísticamente diferentes. $P < 0.05$. $n = 5$ experimentos independientes.

Tiempo	d18:0		d18:1		t18:0		t18:1	
(h)	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>
1	2.08 ^a	1.46 ^a	1.07 ^e	0.23 ^e	2.45 ^g	1.53 ^g	1.53 ^j	0.77 ^j
4	12.13 ^b	1.14 ^b	9.08	1.09	16.99 ^h	3.27 ^h	2.29 ^k	0.62 ^k
8	49.52 ^c	4.63 ^c	19.49 ^f	19.69 ^f	31.45 ⁱ	8.88 ⁱ	2.53 ^l	1.00 ^l
12	58.52 ^d	4.22 ^d	13.00	1.71	30.09	10.48	1.83	0.75
72	346.83	56.66	27.85	5.88	77.10	17.23	4.28	1.12
Tiempo	d18:0-P		d18:1-P		t18:0-P		t18:1-P	
(h)	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>
1	2.33 ^m	2.02 ^m	1.41 ^q	1.46 ^q	2.33 ^u	1.76 ^u	1.31 ^x	1.16 ^x
4	36.52 ⁿ	13.36 ⁿ	1.60 ^r	1.41 ^r	41.62 ^v	20.21 ^v	2.40 ^y	2.50 ^y
8	183.96 ^o	39.15 ^o	3.22 ^s	3.95 ^s	62.76 ^w	34.49 ^w	3.56 ^z	2.59 ^z
12	310.26 ^p	79.22 ^p	4.20 ^t	3.76 ^t	91.42	62.48	4.67 ^{&}	4.28 ^{&}
72	5775.63	214.47	110.70	16.88	687.80	192.13	31.19	19.07

Tabla V. Las principales LCBs acumuladas bajo el tratamiento con la FB1 son la dihidroesfingosina y sus derivados. Comparación entre la acumulación relativa de la dihidroesfingosina y la acumulación relativa de cada una de las LCBs analizadas de las plántulas silvestres y *lcb2a-1* tratadas con la FB1. Cada valor constituye el índice de incremento que se obtuvo en todos los casos de la acumulación relativa de la d18:0 (Tabla IV) sobre la relación resultante de cada LCB bajo el tratamiento con la FB1 dividida sobre el valor promedio de su respectivo control. Los valores en esta Tabla fueron tratados estadísticamente para determinar diferencias significativas en los índices de incremento entre los genotipos silvestres y mutantes *lcb2a-1*. Un superíndice igual indica que los valores no son diferentes estadísticamente. $P < 0.05$. n= 5 experimentos independientes.

Tiempo		d18:1		t18:0		t18:1			
(h)		WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>		
0		12.98	7.25	0.27 ^e	0.25 ^e	0.53 ^g	0.48 ^g		
1		2.60	22.36	0.83 ^f	0.96 ^f	1.16 ^h	1.93 ^h		
4		1.34 ^a	2.03 ^a	0.70	0.36	7.41 ⁱ	1.93 ⁱ		
8		2.50 ^b	0.58 ^b	1.55	0.50	20.79	4.55		
12		4.21 ^c	2.56 ^c	1.81	0.36	29.96	4.97		
72		23.22 ^d	19.65 ^d	4.53	3.58	85.27	45.12		
Tiempo		d18:0-P		d18:1-P		t18:0-P		t18:1-P	
(h)		WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>	WT	<i>lcb2a-1</i>
1		41.07	44.19	90.15	127.07	4.61 ^m	4.88 ^m	2.60 ⁿ	3.64 ⁿ
4		1.60 ^j	1.58 ^j	1.47 ^k	5.33 ^k	0.90	1.04	1.46 ^o	1.42 ^o
8		0.52	0.10	8.75	0.87	0.36	0.06	5.18 ^p	0.46 ^p
12		0.30	0.20	15.81	3.37	0.86	0.17	19.29	2.63
72		0.19	0.07	15.72	1.69	0.61	0.09	14.49	1.32

8.5. La falta de expresión de una hidroxilasa de LCBs (*sbh1-1*) conduce a un fenotipo de susceptibilidad a la fumonisina B1

Debido al índice de incremento revelado en la cuantificación de LCBs, la LCB trihidroxilada (t18:0) era candidato a asociarse a la manifestación de la MCP. En este trabajo se evaluó su contribución, usando una mutante homociga con inserción de T-DNA en el gen *SBH1* (Fig. 14a). *Arabidopsis* contiene en su genoma dos genes de hidroxilasas de LCBs: *SBH1* y *SBH2*. Previamente, se había reportado que la mutante *sbh1-1*, utilizada en este proyecto, contiene menos cantidades de las LCBs trihidroxiladas y más de las dihidroxiladas que una planta silvestre (Chen *et al.*, 2008). En esta mutante se evaluó si la disminución de las LCBs trihidroxiladas afectaba la muerte celular de *Arabidopsis* inducida por la FB1. Como se observa en la Fig. 14b, la mutante *sbh1-1* presentó un fenotipo semejante al de la silvestre en condiciones control y en respuesta a la FB1, sugiriendo que las formas trihidroxiladas de las LCBs no son las principales inductoras de la muerte celular inducida por la FB1. El resultado sugirió que la d18:0 es la LCB implicada en el proceso de MCP.

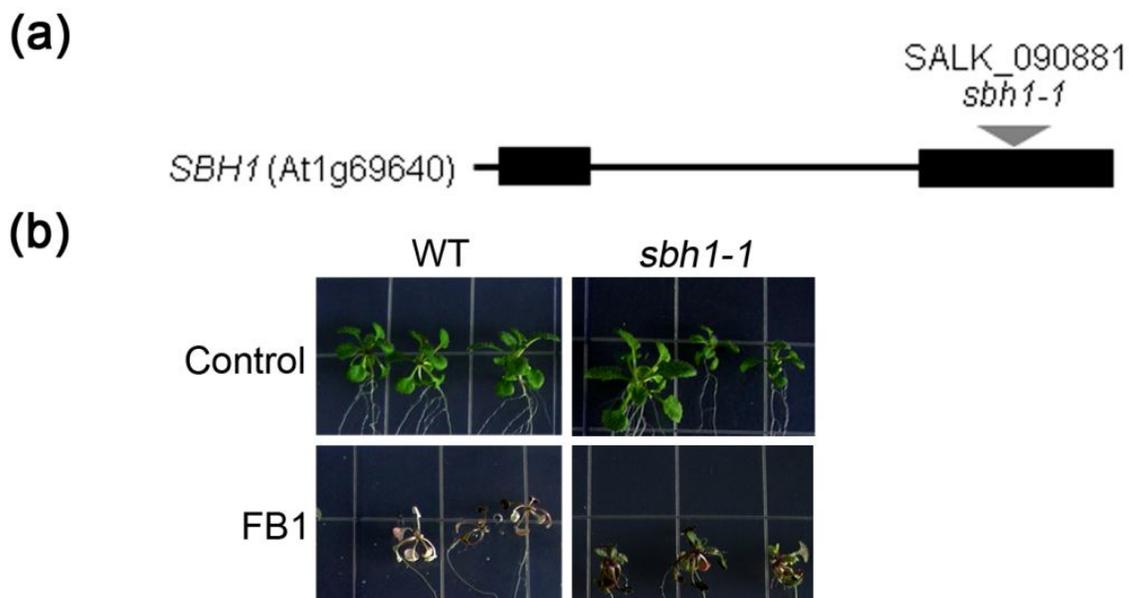


Figura 14. Efecto de la falta de expresión del gen *SBH1* en la muerte celular inducida por la FB1. a) Posición de la inserción de T-DNA en el gen *SBH1*. b) Registro fotográfico de plántulas silvestres y mutantes *sbh1-1* expuestas o no a 10 μ M FB1 durante 15 días.

8.6. La fumonisina B1 induce la actividad de MPKs en plántulas silvestres y *lcb2a-1*

La MCP inducida por la FB1 sugería la participación de vías de señalización mediadas por las cascadas de MAP cinasas, según fue asentado en la Introducción. Para evaluar esta posibilidad, se determinó la actividad de cinasas de MBP empleando ensayos en gel en plántulas silvestres y *lcb2a-1* expuestas o no a la FB1. Como se muestra en la Fig. 15, en las plántulas silvestres y *lcb2a-1* tratadas con la FB1 se observó un incremento en la actividad de una cinasa de MBP de 46 kDa en todo el intervalo estudiado (15-90 min), sugiriendo la actividad de al menos una MPK involucrada en respuesta a la FB1. Sin embargo, era posible que la banda fosforilada fuera consecuencia de la actividad aditiva de varias MPKs con masas moleculares similares.

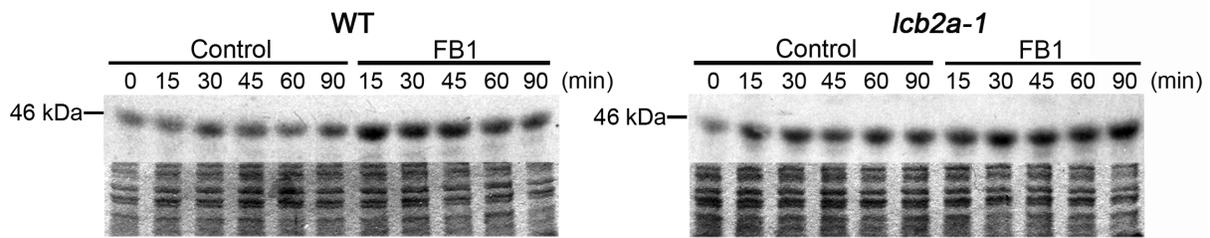


Figura 15. Ensayo de actividad en gel para detectar actividad de MPKs. Plántulas silvestres y *lcb2a-1* de 3 semanas de edad fueron expuestas o no a 10 μ M FB1 en los tiempos indicados. Las partes superiores corresponden al ensayo en gel y las inferiores a geles teñidos con azul de Coomassie como control de carga.

8.7. La MPK6 participa en la muerte celular programada inducida por la fumonisina B1

De acuerdo a la masa molecular aparente de la cinasa de MBP y a su alta actividad bajo el tratamiento con la FB1, se sugirió que la actividad podría corresponder a la MPK6 y/o a la MPK3 (MPKs involucradas en respuesta a patógenos y que presentan una alta redundancia funcional). Bajo esta suposición, se obtuvo una línea mutante con inserción de T-DNA en el gen *MPK6* (*mpk6*) y una mutante con pérdida de función en el gen *MPK3* por RNAi (Fig. 16a). La mutante *mpk6* es un alelo nulo de la MPK6 que tiene incidencia en el desarrollo de los embriones y las flores (Wang *et al.*, 2007; Bush y Krysan, 2007) y en la síntesis del etileno (Liu y Zhang, 2004). En ambas mutantes se evaluó el efecto de la FB1 en su viabilidad. Como se muestra en la Fig. 16b, la pérdida de función del gen de la *MPK6* le confirió a las plántulas tolerancia a la FB1, en niveles muy similares al observado en las mutantes *lcb2a*, mientras que el fenotipo de *mpk3* tratada con la FB1 tuvo un efecto intermedio entre las plántulas silvestres y la mutante *mpk6* bajo el mismo tratamiento. Estos resultados sugirieron la participación de la MPK6 en la MCP inducida por la FB1.

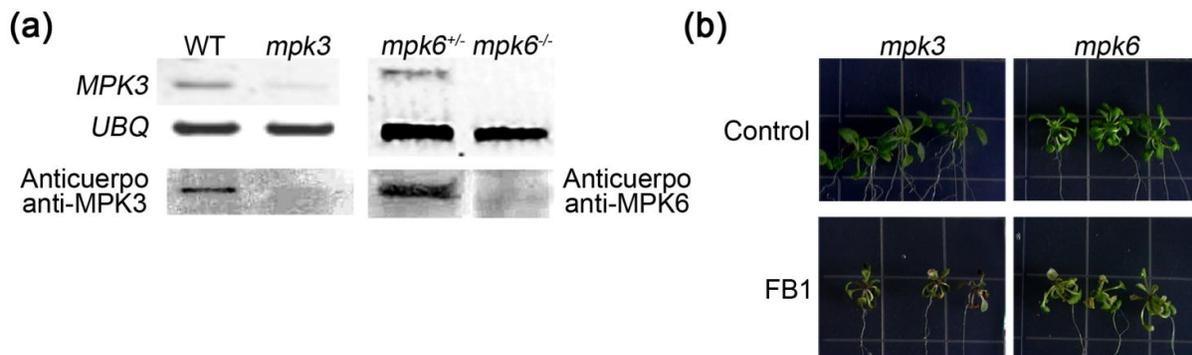


Figura 16. Muerte celular inducida por la FB1 en las mutantes *mpk3* y *mpk6*. a) Caracterización de las mutantes *mpk3* y *mpk6*. En la parte superior izquierda se muestra la baja de expresión de *MPK3* en una línea de silenciamiento con RNAi, a su derecha se muestra la falta de expresión del gen *MPK6* en una línea homociga con inserción de T-DNA. En la parte inferior se muestra la ausencia de la proteína MPK3 y MPK6, en sus respectivas mutantes. b) Registro fotográfico de las mutantes *mpk3* y *mpk6* en presencia o ausencia de 10 μ M FB1 durante 15 días. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

Para caracterizar molecularmente la tolerancia a la FB1 de la mutante *mpk6*, así como la observada, en menor grado, en la *mpk3* en términos de la MCP, se analizó el nivel de fragmentación de DNA inducido por la micotoxina (Fig. 17). Se detectó un bajo nivel de fragmentación de DNA en la mutante *mpk6* tratada con FB1 similar al de la mutante *lcb2a-1*,

mientras que en la mutante *mpk3* se detectó más fragmentación de DNA que en la *mpk6*, pero menos que en las plántulas silvestres. Estos datos fueron consistentes con la evaluación de fenotipos y fragmentación de DNA de las mutantes tratadas con la FB1. Los resultados indican

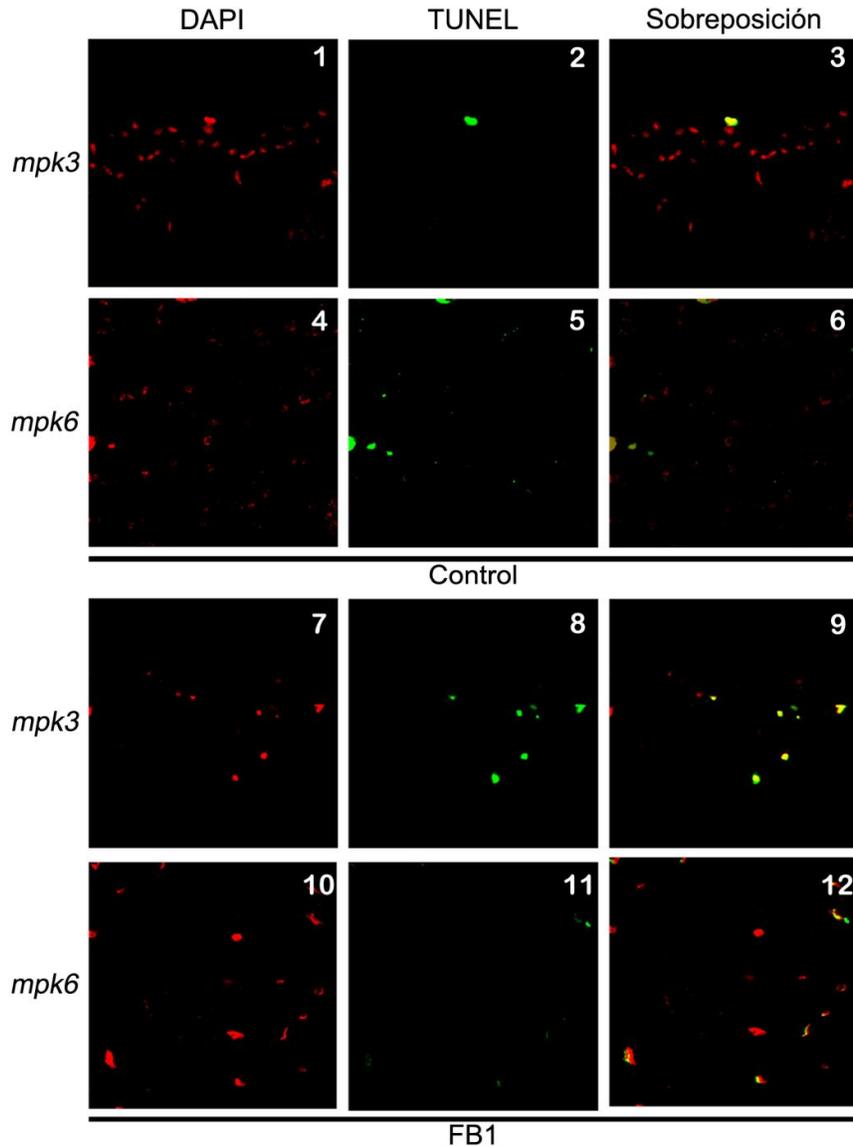


Figura 17. Fragmentación del DNA inducida por la FB1 en las mutantes *mpk3* y *mpk6*. La fragmentación de DNA fue detectada en hojas de plántulas *mpk3* y *mpk6* no expuestas (imágenes 1-3, 4-6, respectivamente) o expuestas a 10 μ M FB1 por 5 días (imágenes 7-9, 10-12). Las secciones muestran el núcleo teñido con DAPI, la fluorescencia del DNA fragmentado en el núcleo y las imágenes sobrepuestas, según se indica. Figura representativa de 2 réplicas.

que las dos MPKs no tienen una función totalmente redundante en respuesta a la FB1.

Por otro lado, el análisis obtenido por TEM reveló que tanto la mutación en el gen *MPK6*, como en el *MPK3*, condujeron a cambios en la morfología de los cloroplastos, particularmente, en el tamaño de los gránulos de almidón (Fig. 18, secciones 2 y 4), y un mayor número de mitocondrias con respecto a la silvestre y *lcb2a-1* (secciones 3 y 6). Bajo el tratamiento de la mutante *mpk3* con la FB1, se detectaron cambios morfológicos a nivel del cloroplasto y mitocondria. Los cloroplastos presentaron menor cantidad de gránulos de almidón por cloroplasto (secciones 7 y 8) y un

apilamiento anormal de la membrana tilacoidal (sección 8). En la mutante *mpk3* se logró detectar la presencia de vesículas de doble membrana con restos citoplásmicos y de organelos en el interior de la vacuola (sección 9), comúnmente denominados autofagosomas, el citoplasma presentó una gran cantidad de vesículas pequeñas (sección 8). En la mutante *mpk6* no se observaron cambios severos en la morfología de las estructuras membranales y de la célula en general (secciones 10-12). Los cloroplastos de las plántulas *mpk6* tratadas con la FB1 fueron similares a su control, excepto en la disminución de la relación de gránulos de almidón grandes por cloroplasto (secciones 10 y 11). En estas mismas condiciones no se detectó pérdida en la presión de turgor de la vacuola, sugiriendo que al menos a ese tiempo, no se alteró la integridad membranal (sección 12).

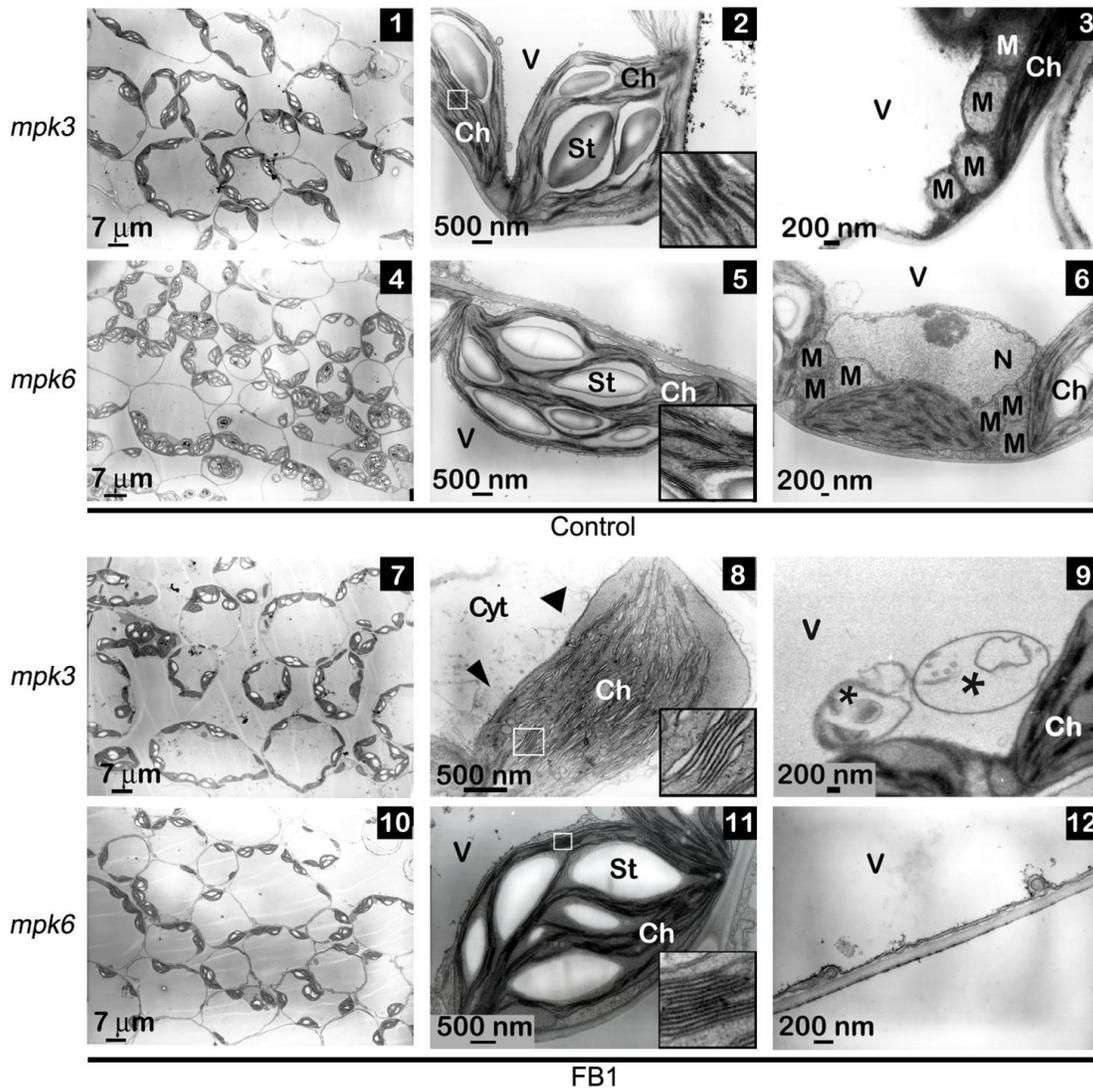


Figura 18. Integridad de la ultraestructura de las células de las plántulas de las mutantes *mpk3* y *mpk6* tratadas con FB1. Análisis de la ultraestructura de las células de plántulas *mpk3* y *mpk6* no expuestas (1-3 y 4-6, respectivamente) o expuestas a 10 μM FB1 durante 3 días (7-9 y 10-12). Las flechas muestran algunas diferencias producidas por el tratamiento con la FB1). Ch, cloroplastos; M, mitocondria; V, vacuola; N, núcleo y Cyt, citosol. Los asteriscos muestran un autofagosoma. Los recuadros en las Figuras 2, 5, 8 y 11 muestran un acercamiento de la imagen correspondiente. Las barras muestran la magnificación de las imágenes. Experimento representativo de dos réplicas independientes.

8.8. La MPK6 actúa corriente abajo de las LCBs en la muerte celular programada inducida por la fumonisina B1 y en la desencadenada por una bacteria avirulenta

Por otro lado, para evaluar si la MPK6 estaba involucrada en la misma vía de señalización que las LCBs durante la inducción de la MCP, se asperjó d18:0, t18:0 o d18:0-P a cajas con medio de Gamborg que contenía plántulas silvestres, *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk3*, *mpk6*, *mkp1*, *mpk3 mkp1*, *mpk6 mkp1*. Como se muestra en la Fig. 19, el efecto de la d18:0 fue muy similar al observado después del tratamiento con la FB1 en las plántulas silvestres (Figs. 7 y 8), *sbh1-1* (Fig. 14), *mpk3* (Fig. 16) y *mpk6* (Fig. 16): las plántulas silvestres, *sbh1-1* y *mpk3* fueron susceptibles, mientras que la mutante *mpk6* fue tolerante al tratamiento. En este caso, la mutante *lcb2a-1* fue susceptible a la adición exógena de d18:0, pues la mutación genera menos LCBs endógenas, pero la planta es capaz de responder a la base exógena. Los tratamientos de las plántulas silvestres, *lcb2a-1*, *sbh1-1* y *mpk3* tratadas con la t18:0 y d18:0-P, indujeron una ligera clorosis, a diferencia de la mutante *mpk6*, en la que no se observaron cambios con respecto a su control. Estos datos en conjunto indican que la d18:0 es capaz de despertar la vía de la MCP y que, aún cuando esta LCB estuvo presente, la ausencia de la MPK6 previno la muerte celular. Para evidenciar más la relación entre las LCBs y la MPK6 en la misma ruta de señalización que lleva a la MCP, se usó una mutante en una fosfatasa citosólica de doble especificidad de Arabidopsis (MKP1), la cual interactúa físicamente con MPK3, MPK4 y MPK6 (Ulm *et al.*, 2001, 2002) y desactiva a la MPK6 activada (Ulm *et al.*, 2002). La mutante *mkp1* tiene la particularidad de expresar constitutivamente reacciones de defensa entre las que destacan la acumulación en los niveles endógenos de SA y camalexina y la expresión de genes relacionados con patogénesis (*PR*; Bartels *et al.*, 2009). Como se observa en la Fig. 19, las mutantes *mkp1* presentaron un desarrollo anormal de las hojas y pedicelos muy largos (fenotipo reportado previamente por Bartels *et al.*, 2009). La doble mutante *mkp6 mkp1* presentó un fenotipo mejorado en el crecimiento comparado con la *mkp1* (Col), aún cuando el tamaño de la plántula se mantuvo ligeramente reducido. De manera similar a la *mpk6*, la mutación en *MPK3* suprimió el fenotipo de *mkp1* (Col). A pesar de que las mutaciones en *MPK3* y *MPK6* suprimieron los fenotipos de *mkp1*, lo hicieron de manera diferencial (todos estos efectos fueron reportados previamente por Bartels *et al.*, 2009).

Como se observa en la Fig. 19, la adición exógena de la d18:0 a la mutante *mkp1* no produjo efectos deletéreos con respecto a su control, sugiriendo que la hiper-regulación de las actividades de la MPK3/6 enriquece las reacciones de defensa constitutivas de la *mkp1*. Este mismo fenotipo de tolerancia se observó en las dobles mutantes *mpk3 mkp1* y en menor grado en la *mpk6 mkp1*, sugiriendo que la MPK6 es la principal MPK que se requiere para el establecimiento de las respuestas de defensa. Los tratamientos de las mutantes *mkp1*, *mpk3 mkp1* y *mpk6 mkp1* con la t18:0 o d18:0-P no produjeron cambios significativos, resultados que coinciden con los observados en las plántulas silvestres y en las mutantes simples.

Finalmente, para demostrar que la MPK6 es la MPK activada por las LCBs, se midió la actividad de MPKs en ensayos en gel en plántulas silvestres expuestas durante 15 min a la d18:0 o t18:0. Como se observa en la Fig. 20a, tanto la d18:0 como la t18:0 estimularon la actividad de una MPK de 46 kDa, masa molecular aparente similar a la detectada en respuesta a la FB1 (Fig. 15). Al comparar la masa molecular de la banda fosforilada en respuesta a la LCB con la observada en la mutante *mpk3*, pero ausente en la *mpk6*, se concluyó que la MPK6 es la que responde a las LCBs.

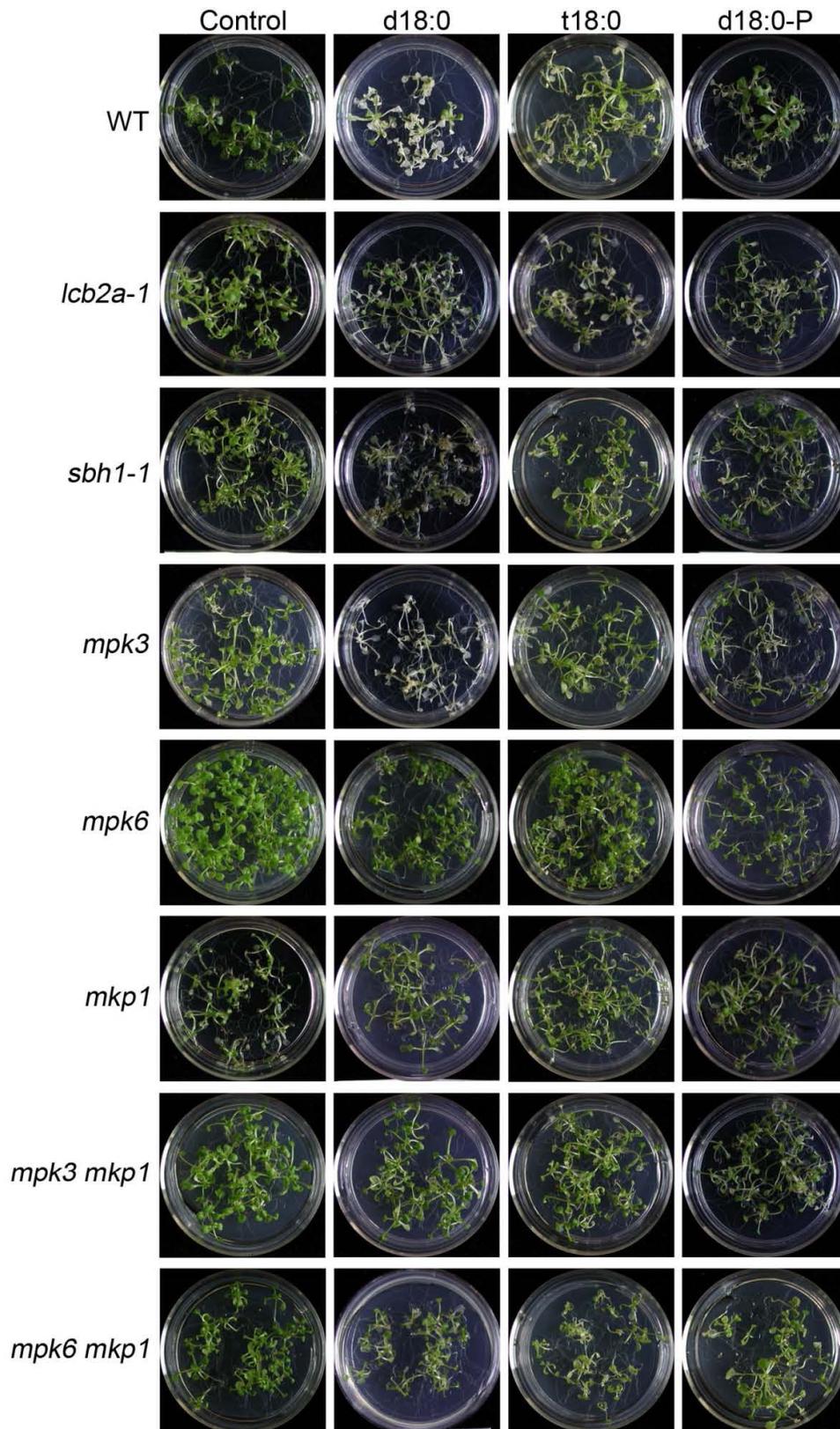


Figura 19. La d18:0 es la LCB inductora de la MCP y requiere de la señalización de la MPK6. Plántulas silvestres, *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk3*, *mpk6*, *mkp1*, *mpk3 mkp1*, *mpk6 mkp1* fueron expuestas la d18:0, t18:0, d18:0-P ó 0.04% de Silwet como control. Las fotografías fueron tomadas después de 4 horas de exposición.

Por otro lado, considerando los reportes que unen independientemente la MPK6 y las LCBs a una MCP similar a la HR, (Menke *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2009), se siguió otra estrategia para evaluar si la actividad de la MPK6 formaba parte de la misma ruta de señalización que las LCBs. De tal manera, se expusieron plántulas silvestres, *lcb2a-1* y *mpk6* a *Pseudomonas syringae* pv *tomato avrRpm1*, una cepa bacteriana avirulenta en *Arabidopsis* (Tao *et al.*, 2003) para inducir una MCP similar a la HR. Las plántulas fueron pretratadas previamente con la FB1 durante 12 h y, posteriormente, expuestas a la bacteria. El objetivo del pretratamiento con la micotoxina fue evaluar si el incremento en las LCBs endógenas despertaba vías de señalización involucradas con la defensa, de manera que al infectar subsecuentemente a las plántulas con la cepa bacteriana, su crecimiento se viera inhibido. Como se muestra en la Fig. 20b, el pretratamiento con la FB1 causó un decremento en la proliferación bacteriana tanto en las plántulas silvestres como en las *lcb2a-1*, comparadas con sus respectivos controles (sin tratamiento con la FB1), indicando la inducción de reacciones de defensa. Sin embargo, el mismo tratamiento en las plántulas *mpk6* no afectó la proliferación bacteriana. Este resultado indicó que tanto las LCBs como la MPK6 se requieren para producir la MCP como una estrategia preventiva de colonización y que la MPK6 actúa corriente abajo de las LCBs en esta vía de señalización.

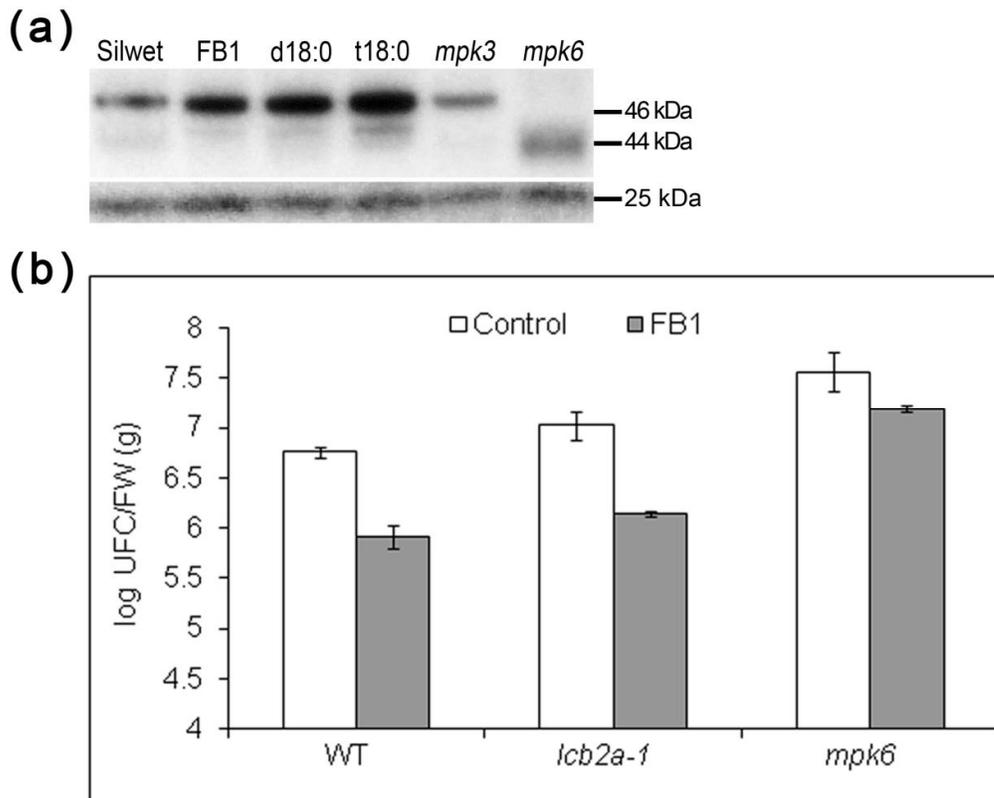


Figura 20. La MPK6 actúa corriente abajo de las LCBs durante la MCP inducida por la FB1 y durante la defensa contra *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. a) Plántulas silvestres de tres semanas de edad fueron expuestas a 5 μ M d18:0, t18:0 ó 0.04% Silwet como control, durante 15 min. Las fracciones citosólicas obtenidas de estas plántulas fueron cargadas en un gel con MBP para detectar actividad de MPKs. Como control de carga se muestra la actividad de una MPK de 25 kDa. b) Las plántulas de los tres genotipos indicados fueron pretratadas durante 12 h en 10 μ M FB1 y, posteriormente, transferidas a un medio inoculado con 10^7 UFC/ml de la cepa bacteriana. Después de 48 h, el crecimiento bacteriano fue medido en los tres genotipos y comparados con sus respectivos controles, sin pretratamiento con la FB1. Las líneas en cada barra representan el error estándar que presentaron las 3 determinaciones realizadas sobre tres réplicas independiente.

9. DISCUSIÓN

9.1. La ceramida revierte los síntomas de muerte celular inducida por la Fumonisina B1 en plántulas de Arabidopsis

La señal de muerte es decisiva en el desarrollo o inhibición de la muerte celular; por ejemplo, si un tejido u organismo recibe la señal de muerte y se le da un tratamiento apropiado antes de que la muerte se ejecute en su totalidad, el tejido puede superar la señal y sobrevivir. En ese caso, el tratamiento que revierte los síntomas macroscópicos de la MCP actúa antes del “punto de no retorno”, que se define como aquel a partir del cual, la célula que está ejecutando la ruta de MCP muere inevitablemente (van Doorn, 2005).

De acuerdo a los datos experimentales de este trabajo y a los reportados previamente, se sabe que la FB1 es una micotoxina que produce MCP en Arabidopsis (Asai *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2007). En condiciones extremas (10 μ M FB1), la MCP se puede detectar inicialmente como un área de clorosis de los tejidos fotosintéticos (Fig. 7a). El tratamiento de las plántulas con la FB1 por 5 días y su posterior transferencia a medios complementados con ceramida evitó la muerte de las plántulas (Fig. 7b). Este efecto ya ha sido explorado en otros sistemas y se ha propuesto que el reverdecimiento está asociado a un incremento en la cantidad de los cloroplastos (van Doorn, 2005). Por otro lado, en diversos tipos celulares animales se ha reportado la función pro-apoptótica de la ceramida, análogamente en Arabidopsis, la mutación de la cinasa de ceramida produce un fenotipo similar a la HR en ausencia de estímulos, lo que ha llevado a la propuesta de que la acumulación de este compuesto esfingoideo acelera la muerte celular y por lo tanto tiene una función favorecedora de la MCP (Liang *et al.*, 2003). Además, la mutación de la inositolfosforilceramida sintasa (IPCS), que utiliza a la ceramida como sustrato para formar a la inositolfosforilceramida, enriquece la manifestación de la HR mediada por la expresión de *RPW-8*, un gen de resistencia involucrado en la defensa de Arabidopsis contra el oídio (Wang *et al.*, 2008). Esta mutante acumula altos niveles de ceramida, reforzando la idea de que los esfingolípidos participan en la modulación de la MCP asociada a la defensa. El trabajo en esta tesis, en el que se observó que por el contrario, la ceramida adicionada después del tratamiento con la FB1 (Fig. 7b) mejoraba el fenotipo de las plántulas, sugiere que la absorción de las ceramidas no fue lo suficientemente alta como para producir efectos letales en las plántulas.

9.2. El descenso en la actividad o expresión de la serina palmitoiltransferasa atenúa la muerte celular programada inducida por la Fumonisina B1

Uno de los objetivos de este trabajo fue identificar a los intermediarios esfingoideos específicos relacionados a la MCP inducida por la FB1. Para evaluar la participación de las LCBs en el proceso, se siguieron dos estrategias que usaron como blanco a la serina palmitoiltransferasa (SPT; Fig. 5). En la primera, se evaluó si el tratamiento de plántulas silvestres con miriocina (inhibidor de la SPT) previo al de la FB1, disminuía la síntesis de LCBs a niveles que impidieran la manifestación de lesiones necróticas de las plántulas. En la segunda, se usaron mutantes en el gen *LCB2a* para responder la misma interrogante. La afectación de la actividad de la SPT a nivel farmacológico (miriocina; Fig. 7c) y genético (mutantes *lcb2a*; Fig. 8b), resultó coincidentemente en una tolerancia a la FB1, indicando que la SPT es fundamental en la MCP inducida por la micotoxina. La función de la SPT como regulador de la MCP se reportó previamente en la mutante

fbr11-1 de Arabidopsis afectada en el gen *LCB1* (la otra subunidad del complejo de la SPT), la cual es resistente a la FB1 (Shi *et al.*, 2007) y en *Nicotiana benthamiana* infectada con el patógeno *Pseudomonas cichorii*, la cual induce la sobreexpresión del gen *LCB2* para favorecer la MCP (Takahashi *et al.*, 2009).

9.3. La isoforma LCB2a del complejo de la serina palmitoiltransferasa es imprescindible para inducir la muerte celular programada de Arabidopsis en respuesta a la fumonisina B1

La SPT de levaduras y células animales está conformada por dos subunidades diferentes: LCB1 y LCB2. La función propuesta para la LCB1 es estabilizar al heterodímero de la SPT, mientras que la de la LCB2 es efectuar la reacción de condensación entre la *L*-serina y el palmitoil-CoA (Hanada, 2003). El genoma de Arabidopsis, además de contener una copia para el gen *LCB1*, contiene dos copias para el gen *LCB2* con una identidad del 89%: *LCB2a* (AT5g23680) y *LCB2b* (AT3g48780) (Dietrich *et al.*, 2008), de manera que la mutante *lcb2a-1* evaluada en este trabajo, mantuvo activo al complejo de la SPT formado por las subunidades LCB1/LCB2b.

En este estudio se demostró que el gen *LCB2a* es indispensable para que la FB1 induzca la MCP en Arabidopsis (Figs. 8b, 9 y 10), pues mientras que las plántulas silvestres tratadas con la FB1 sufrieron una gran variedad de alteraciones celulares y moleculares asociadas a la MCP (fragmentación de DNA, interrupción del sistema membranal que conlleva a la pérdida de presión de turgor y alteraciones en los cloroplastos; Figs. 9, 10 y 11), las plántulas mutantes *lcb2a-1* mostraron una atenuación de todos estos síntomas de MCP en presencia de la micotoxina (Figs. 9 y 10). La causa molecular de esta diferencia se contestó gracias al análisis de LCBs por HPLC acoplado a ESI/MS-MS (Markham y Jaworski, 2007), demostrándose que la mutante *lcb2a-1* tratada con la FB1 acumuló niveles menores de todas las LCBs analizadas, en comparación con los de las plántulas silvestres (Figs. 12 y 13), sugiriendo que el complejo LCB1/LCB2a es el principal generador *de novo* de las LCBs y que, al menos en presencia de la FB1, los complejos de la SPT conteniendo a las subunidades LCB2a y LCB2b no tienen una actividad estrictamente redundante, por lo tanto, hay una regulación diferencial que permite a sólo uno de los dos posibles heterodímeros participar de forma activa en la MCP. La diferencia funcional entre los dos genes *LCB2* se puede deber a que *LCB2a* se expresa en niveles mayores al isógeno *LCB2b* (Dietrich *et al.*, 2008), o bien, a que ambos productos tengan una afinidad diferente por sus sustratos, pues, recientemente, se reportó en células de vertebrados una subunidad alterna de la LCB2 (SPTCL3), la cual usa cadenas de acilo activadas de menor longitud que las que emplea LCB2 para sintetizar moléculas de esfinganina de 16 átomos de carbono (Hornemann *et al.*, 2009).

9.4. La esfinganina como molécula inductora de la muerte celular programada de Arabidopsis en respuesta a la fumonisina B1

En este trabajo se postula a la d18:0 como la principal LCB responsable de inducir MCP con base en tres líneas de evidencias experimentales:

1. La FB1 modificó la cantidad y composición de las LCBs, principalmente la de la esfinganina libre (d18:0) y la fosforilada (Fig. 12, Tablas III, IV y V). El incremento de la d18:0 se correlacionó con el fenotipo de MCP presente en las plántulas silvestres y ausente en las mutantes *lcb2a-1* (Figs. 8, 9 y 10). El conjunto de estos resultados coincide con el modelo de Chen *et al.* (2008), que postula la existencia de dos ceramidas sintetasas en Arabidopsis con afinidades diferentes para su

LCB y longitud del ácido graso. La FB1 estaría inhibiendo preferencialmente a la CS que usa como sustrato a la d18:0.

2. La adición exógena de varias LCBs (d18:0, t18:0, d18:0-P) a plántulas silvestres demostró que la d18:0 fue la única en inducir muerte celular (Fig. 19).

3. La doble mutante de *Arabidopsis sbh1 sbh2*, la cual carece de las dos hidroxilasas de LCBs y de LCBs trihidroxiladas y presenta niveles elevados de la d18:0, desarrolla lesiones espontáneas similares a la HR (Chen *et al.*, 2008), mostrando que el incremento de la d18:0 es la responsable de producir la MCP. Esta interpretación está fundamentada en el presente trabajo, gracias a la ayuda de la mutante sencilla *sbh1-1*, la cual contiene niveles disminuidos de la t18:0 y un enriquecimiento en las LCBs totales. La exposición a la FB1 de la mutante *sbh1-1* no mostró cambios en la susceptibilidad con respecto a las plántulas silvestres (Fig. 14), indicando que las LCBs trihidroxiladas no son intermediarios en la MCP inducida por la FB1. Esta conclusión se basó además con el nivel clorótico de las plántulas silvestres tratadas con la d18:0 que fue mayor al de la t18:0 (Fig. 19).

9.5. Posible función de las LCBs-P en la muerte celular programada inducida por la fumonisina B1

En este trabajo no se desecha el concepto de una función adicional de la d18:0-P y t18:0-P en la MCP inducida por la FB1, ya que las plántulas silvestres expuestas a la micotoxina contuvieron niveles muy elevados de estas LCBs (aproximadamente 8000 y 1000 veces, respectivamente; Fig.12, Tabla III). Si bien, la adición de la d18:0-P produjo un escaso efecto en la viabilidad de las plántulas, éste fue mayor en comparación con el de la t18:0 (Fig. 19).

Es del conocimiento que en plantas, la mayoría de las evidencias sobre las LCBs como segundos mensajeros están reportadas para las LCBs fosforiladas. El cierre de los estomas promovido por el estrés hídrico, está mediado por la actividad de canales iónicos en la membrana plasmática de las células guarda (Schroeder *et al.*, 2001) y por la movilización de Ca^{2+} y elevación en los niveles de la d18:1-P en *Commelia communis* (Ng *et al.*, 2001). En *Arabidopsis* también se ha reportado que la d18:1-P inhibe la apertura y promueve el cierre de los estomas al afectar las actividades de los canales iónicos en la membrana plasmática (Coursol *et al.*, 2003). Sin embargo, Michaelson *et al.* (2009) reportaron la ausencia de los transcritos de la $\Delta 4$ -desaturasa y la escasez de esfingolípidos $\Delta 4$ -insaturados y/o sus metabolitos en hojas de *Arabidopsis*, indicando que las especies derivadas de la d18:1 no tienen un efecto directo en el estrés por sequía, el control de la velocidad de transpiración y el cierre de los estomas. De este resultado emerge la importancia de la participación de la t18:0-P en los mecanismos de transducción en el contexto de los cambios en el turgor, pues se ha demostrado que la t18:0 es un sustrato de la SphK (que se ha propuesto renombrar como LCBK, Michaelson *et al.*, 2009), la cual es una cinasa que ha sido implicada en la señalización mediada por el ABA (Coursol *et al.*, 2003; 2005; Worrall *et al.*, 2008). Acorde con estos datos, se puede sugerir que la t18:0-P es la especie inductora del incremento del Ca^{2+} (y no d18:1-P) en la señalización mediada por el ABA y que en el caso de las células de tabaco, la forma fosforilada de la d18:0 sea la responsable del incremento de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$, pues en células animales se ha reportado que una SphK (SphK2) con localización nuclear, está involucrada en la generación de LCBs-P durante la apoptosis (Maceyka *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, la pérdida de función de la liasa de LCBs-P no modifica el perfil de los niveles de esfingolípidos y el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero sí magnifica la susceptibilidad a la FB1 (Tsegaye *et al.*, 2007),

sugiriendo que al inhibir una de las rutas de catabolismo de las LCBs-P, en condiciones en donde se están acumulando (tratamiento con FB1), las LCB-P alcanzan niveles que resultan letales.

9.6. La MPK6 regula la muerte celular programada inducida por las LCBs

En este trabajo se demostró que la MPK6 tiene una función moduladora en la MCP inducida por las LCBs basándose en tres líneas de evidencias experimentales:

1. La mutante *mpk6* fue tolerante a la MCP inducida por las LCBs, indicando que se encuentra corriente abajo de las bases esfingoideas.
2. La adición exógena de la d18:0 fue incapaz de inducir MCP en las plántulas *mpk6*.
3. La MPK6 mostró una activación en su capacidad fosforiladora de la MBP por el incremento endógeno de las LCBs, producido por la FB1, o por la adición exógena de éstas.

En este trabajo no se identificó al activador directo de la cascada de MAPKs que involucra a la MPK6. Algunos activadores posibles incluyen a las cinasas de proteína con dominios homólogos a la pleckstrina, las cuales pueden reconocer a la FB1 o LCBs (Wang *et al.*, 1991; Popescu *et al.*, 2009); o a las proteínas G, ya que la proteína G heterotrimérica y la GTPasa pequeña de arroz activan al ortólogo de la MPK6 de *Arabidopsis*, en respuesta a un esfingolípido complejo aislado del hongo *Magnaporthe oryzae* (Lieberherr *et al.*, 2005). Este último candidato participa además, en la señalización del ABA, que regula la apertura de los estomas en las células guarda de *Arabidopsis*, ya que la d18:1P está corriente arriba de la proteína G α (Coursol *et al.*, 2003; Pandey y Assmann, 2004).

Recientemente, se reportó que la MPK6 se encuentra abundantemente en el citosol, asociada a la red trans-Golgi (TGN) y a la membrana plasmática, pero está ausente en el RE del meristemo de las raíces de *Arabidopsis* (Müller *et al.*, 2010). Bajo la consideración de que la MPK6 se localiza de manera similar en las células del mesófilo, sugerimos que la MPK6 se asocia a las superficies de las estructuras endomembranales con altos contenidos de la d18:0 para ser activada por los elementos corriente arriba del complejo de la cascada de MAPK, los cuales podrían estar unidos por andamios moleculares.

Un resultado importante de este trabajo es que la MPK6, y no la MPK3, participa selectivamente en la MCP inducida por las LCBs, hallazgo contrario a varios casos fisiológicos en los que ambas cinasas presentan un nivel alto de redundancia funcional (Colcombet y Hirt, 2008), pero que coincide también, con otros tantos en los que se ha denotado esa distinción. Por ejemplo, la MPK3 regula el cierre de los estomas en respuesta a patógenos o H₂O₂ (Gudesblat *et al.*, 2007) y requiere de una regulación transcripcional (Colcombet y Hirt, 2008), a diferencia de la MPK6 que no participa en las reacciones mencionadas en los estomas y no se regula a nivel transcripcional. La MPK6 participa además, en la gametogénesis y desarrollo de órganos reproductivos (Bush y Krysan, 2007).

9.7. La esfingalina y la MPK6 controlan la muerte celular programada de *Arabidopsis* inducida por la fumonisina B1

Para confirmar la tolerancia a la toxina de las mutantes *lcb2a-1*, *mpk6* y en menor grado de la *mpk3*, se analizaron los niveles de fragmentación del DNA a través de las reacciones de TUNEL. Mientras que alrededor del 90% de los núcleos de las plántulas silvestres tratadas con la FB1 contenían en su interior DNA degradado, en las mutantes disminuyó esta proporción

considerablemente: *lcb2a-1* (~25%), *mpk6* (~31%) y *mpk3* (~70%) (Figs. 9 y 17), encontrándose una estrecha correlación entre la integridad del DNA y el fenotipo de muerte celular.

El análisis por TEM reveló que las mutantes empleadas en este estudio exhibieron cambios en la morfología de los cloroplastos (*lcb2a-1*, plastidios redondos; *mpk3* y *mpk6*, gránulos de almidón grandes) y en el número de mitocondrias (sólo para las mutantes *mpk3* y *mpk6*; Figs. 10 y 18). Las mutantes *lcb2a-1* y *mpk6* tratadas con la FB1 mostraron pocas alteraciones subcelulares, a diferencia de la *mpk3*, que exhibió características similares a las silvestres: granas desorganizadas, vacuolas con pérdida de turgor, vesículas membranales conteniendo materiales citoplasmáticos y numerosas vesículas inmersas en el citosol (Figs 10, 11 y 18). La morfología de los cloroplastos de las plántulas silvestres y *mpk3* tratadas con la FB1 se asemejó al de las hojas de tabaco infiltradas con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*; Krzymowska *et al.*, 2007). La alteración en la morfología de los cloroplastos está asociada a la degradación de la clorofila, una disminución en la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Ishiga *et al.*, 2009) y la manifestación de la clorosis en las hojas (van Doorn, 2005).

Las características observadas a nivel subcelular (Figs 10, 11 y 18) fueron consistentes con las de la autofagia, como lo reportó Kuroyanagi *et al.* (2005). La ruptura del tonoplasto de células de *Arabidopsis* promovido por la FB1 requiere de las enzimas de procesamiento vacuolar (VPE), cuyas actividades son similares a la de la caspasa-1 de animales. Es posible que uno de los efectos de la MPK6 esté relacionada a la actividad de la VPE, ya que las mutaciones en los cuatro genes *VPE* preservan la integridad membranal de las células tratadas con la FB1 (Kuroyanagi *et al.*, 2005).

Los eventos que acompañan a la MCP como consecuencia de la acumulación de las LCBs han sido pobremente explorados. Este trabajo demostró que la acumulación de las LCBs inducida por la FB1, no fue suficiente para la desintegración del sistema membranal de las células (Fig. 18) y para la degradación del DNA (Fig. 17), ya que la elevación endógena de las LCBs inducida por la FB1 (Fig. 16b) o la adición exógena de la d18:0, no produjo cambios severos en el fenotipo de las mutantes *mpk6* y/o *mpk1* (Fig. 19). El estrés oxidativo puede ser un buen candidato que explique las perturbaciones a nivel membranal (Levine *et al.*, 1994) observado en las células tratadas con la micotoxina, pues se ha reportado que la MCP inducida por la FB1 está corriente abajo de la generación del H₂O₂ (Shi *et al.*, 2007). Acorde a la asociación MPK6, ROS y MCP, es pertinente citar el trabajo de Liu Y. *et al.* (2007), quienes reportaron que la sobre-expresión de una versión de la MPKK constitutivamente activa (*NtMEK^{DD}*), conduce a una activación prolongada de SIPK, WIPK y Ntf4, inhibe la fijación de carbono en el cloroplasto y produce un exceso de energía de excitación en plantas de tabaco. Las mutaciones en *MPK3* y *MPK6* inciden en el metabolismo del almidón, pues las mutantes presentaron cloroplastos con grandes gránulos de almidón. Dado que SIPK y WIPK son ortólogos de la MPK6 y MPK3 de *Arabidopsis*, respectivamente, es lógico pensar que la pérdida de función de cualquiera de estas dos MPKs de *Arabidopsis* favorece la fijación del CO₂, incrementando la síntesis de carbohidratos almacenados en forma de almidón. La velocidad de fijación del CO₂ influye en la expresión de genes codificados en el núcleo que están relacionados con la fotosíntesis, sugiriendo que la actividad metabólica del cloroplasto es una fuente de señales que están involucradas en la información que va del cloroplasto al núcleo (Fernández y Strand, 2008). De acuerdo a los resultados observados en las mutantes *mpk3* y *mpk6* (Fig. 18), no se puede descartar que en ellas exista una reprogramación de la expresión de

genes codificados en el núcleo a partir de un exceso en la capacidad de utilización de la energía proveniente de los fotones.

La MCP inducida por la FB1, revelada por los análisis de TUNEL y TEM en células del mesófilo de las plántulas, fue sistémica, pues el único tejido que tuvo contacto con la toxina fue la raíz. El resultado sugiere que la FB1 es transportada a otros tejidos a través del tejido vascular, o bien, que existe una señal sistémica de muerte que parte de la zona infectada al resto de la planta (Stone *et al.*, 2000).

9.8. La d18:0 y la MPK6 están asociadas a las reacciones de defensa contra patógenos

En el modelo HR-MCP, la d18:0 parece ser un factor de resistencia durante el ataque de patógenos. Esta sugerencia parte del trabajo de Peer *et al.* (2010), basado en el incremento en los niveles endógenos de la t18:0 tras la inoculación de plantas de *Arabidopsis* con una cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae*. Bajo la suposición que señalaba a la t18:0 como un factor positivo en las reacciones de defensa, inocularon plantas *sbh1-1* con una cepa virulenta de *Pseudomonas*; sin embargo, los autores no observaron cambios en el crecimiento bacteriano, sugiriendo que el ligero incremento de la d18:0 en ese fondo genético, fue suficiente para actuar positivamente en la resistencia a la infección bacteriana. En ese sentido, nuestros datos confirman esta hipótesis, pues la acumulación predominante de la d18:0, inducida por la exposición de las plántulas a la FB1, inhibió el crecimiento bacteriano de una cepa avirulenta de *Pseudomonas* (Fig. 20b).

La asociación entre la MPK6 y la expresión de las reacciones de defensa contra patógenos ha sido objeto de numerosos estudios (Meskiene y Hirt, 2000; Petersen *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2008). En este trabajo, se demostró que las LCBs y la MPK6 están en la misma vía de señalización en las reacciones de defensa que llevan a la inmunidad. Al faltar MPK6, en presencia de LCBs acumuladas por el tratamiento previo con la FB1, se incrementó el crecimiento bacteriano tras la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato avrRpm1* (Fig. 20b), indicando que las LCBs y la MPK6 son parte de las estrategias de inmunidad que implementan las plantas. Asai *et al.* (2000) reportaron que la MCP inducida por la FB1 en *Arabidopsis* requiere de las vías de señalización mediadas por el SA, JA y ET. En este trabajo se infirió que la MPK6 se encuentra corriente arriba a la generación del SA, ya que la mutante *mkp1*, con altos niveles endógenos de SA (Bartels *et al.*, 2009) no mostró fenotipos letales tras la exposición con la d18:0, sensibilidad que se vio comprometida en la doble mutante *mpk6 mkp1*.

La relación entre MPKs y HR-MCP y la de esfingolípidos y HR-MCP ha sido objeto de estudio en un sinnúmero de investigaciones. Este trabajo describe por vez primera que las cascadas de MAPKs y los esfingolípidos forman parte de la misma vía de señalización que ejecuta la MCP y del eslabón de señalización que media reacciones de defensa que invocan la inmunidad. El trabajo logra además, identificar específicamente a los componentes involucrados: la MPK6, dentro de las cascadas de MAPKs; la d18:0, como principal LCB evocadora de la MCP e inmunidad y al complejo SPT formado por las subunidades LCB1/LCB2a, como el principal heterodímero responsable de sintetizar a la d18:0.

10. CONCLUSIÓN

La MPK6 y la dihidroesfingosina, sintetizada por el complejo LCB1/LCB2a, son transductores en la misma cadena de señalización durante las reacciones de defensa que incluyen la manifestación de la MCP derivada de la desintegración de las membranas celulares.

CONCLUSIONES PARTICULARES

- La cinética de acumulación de las LCBs endógenas en plántulas silvestres y *lcb2a-1* expuestas a la FB1, los experimentos de suplementación con LCBs exógenas y la susceptibilidad de la *sbh1-1* a la FB1, indican que la d18:0 es la principal LCB responsable de inducir la MCP.
- La incapacidad de la mutante *lcb2a-1* en establecer una MCP en respuesta a la FB1, revela que el principal complejo de la SPT generador de la d18:0 es el formado por LCB1/LCB2a.
- El incremento de la actividad de la MPK6 por las LCBs endógenas y exógenas, así como la tolerancia de la mutante *mpk6* a la FB1 y d18:0, indican que la actividad de la MPK6 está corriente abajo de la acumulación de esta base esfingoidea.
- La desintegración de las membranas celulares inducida por las LCBs requiere de la actividad de la MPK6. El efector corriente abajo de la MPK6 responsable de inducir estas alteraciones se desconoce.
- El incremento de la tolerancia, dado por el aumento en los niveles endógenos de las LCBs, y la susceptibilidad de la mutante *mpk6* al crecimiento bacteriano, revelan que la MPK6 actúa corriente abajo de las LCBs en las reacciones que conllevan a la inmunidad. En esa cadena de señalización, la MPK6 actúa corriente arriba del SA y genes relacionados a patogénesis (*PR*), ya que la resistencia de la mutante *mkp1*, que expresa constitutivamente estas reacciones de defensa, se ve comprometida en la doble mutante *mpk6 mkp1*.

11. MODELO

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, apoyado de algunos reportados en la literatura, sustentan al modelo ilustrado en la Fig. 21. En este, se sugiere básicamente que la acumulación de la d18:0, favorecida por la actividad de la SPT formada por las subunidades LCB1/LCB2a y por la inhibición preferencial de la FB1 sobre la CSI, desencadena dos vías de señalización (Figs. 8, 9, 10, 11, 12, 13; Tabla V). Una de ellas (ilustrada con estrellas rojas) está relacionada con la manifestación de la muerte y la otra (ilustrada con estrellas verdes) con la expresión de reacciones de defensa. Si bien, pareciera paradójico, ambas rutas bifurcan en un punto en común: la sobrevivencia de las plantas.

Para explicar la función de la d18:0 como operador en la MCP, se cita el trabajo de Lachaud *et al.*, (2010), quienes demostraron que la d18:0 eleva las concentraciones del Ca^{2+} en el citosol y núcleo para la expresión de una MCP similar a la apoptosis en células de tabaco. Nuestro modelo propone esta misma función en plántulas de Arabidopsis. El modelo contempla además, que la cascada de MAPKs que incluye a la MPK6 (Figs. 15, 16, 17, 18), actúa corriente arriba de la generación de ROS durante la MCP (Shi *et al.*, 2007). En tabaco, la activación prolongada de SIPK y WIPK produce ROS en el cloroplasto (Liu Y. *et al.*, 2007) e incide negativamente sobre la integridad de la mitocondria (Takabatake *et al.*, 2007), este último efecto está relacionado con la alta generación de las especies oxidativas. El modelo considera la generación de ROS en ambos compartimentos subcelulares. Por otro lado, el modelo propone que la cascada de MAPKs, que incluye a la MPK6, regula positivamente la actividad de las proteínas VPE, para así promover la manifestación de la MCP, pues Kuroyanagi *et al.* (2005) demostraron que las mutaciones en los cuatro genes *VPE* de Arabidopsis preservan la integridad membranal de las células tratadas con la FB1.

Respecto a la vía de señalización relacionada con las respuestas de inmunidad, el modelo propone que la activación de la cascada de la MPK6 inducida por la d18:0 (Fig. 20), genera altos niveles del SA. Esta fitohormona estaría activando a su vez, la expresión de genes relacionados a la patogénesis (*PR1*, *PR5*) para impedir en conjunto, la colonización de la planta ante la presencia de un patógeno. El modelo infiere que la MPK6 se encuentra corriente arriba a la generación del SA, ya que la mutante *mkp1*, con altos niveles endógenos de SA (Bartels *et al.*, 2009) no mostró fenotipos letales tras la exposición a la d18:0 (Fig. 19).

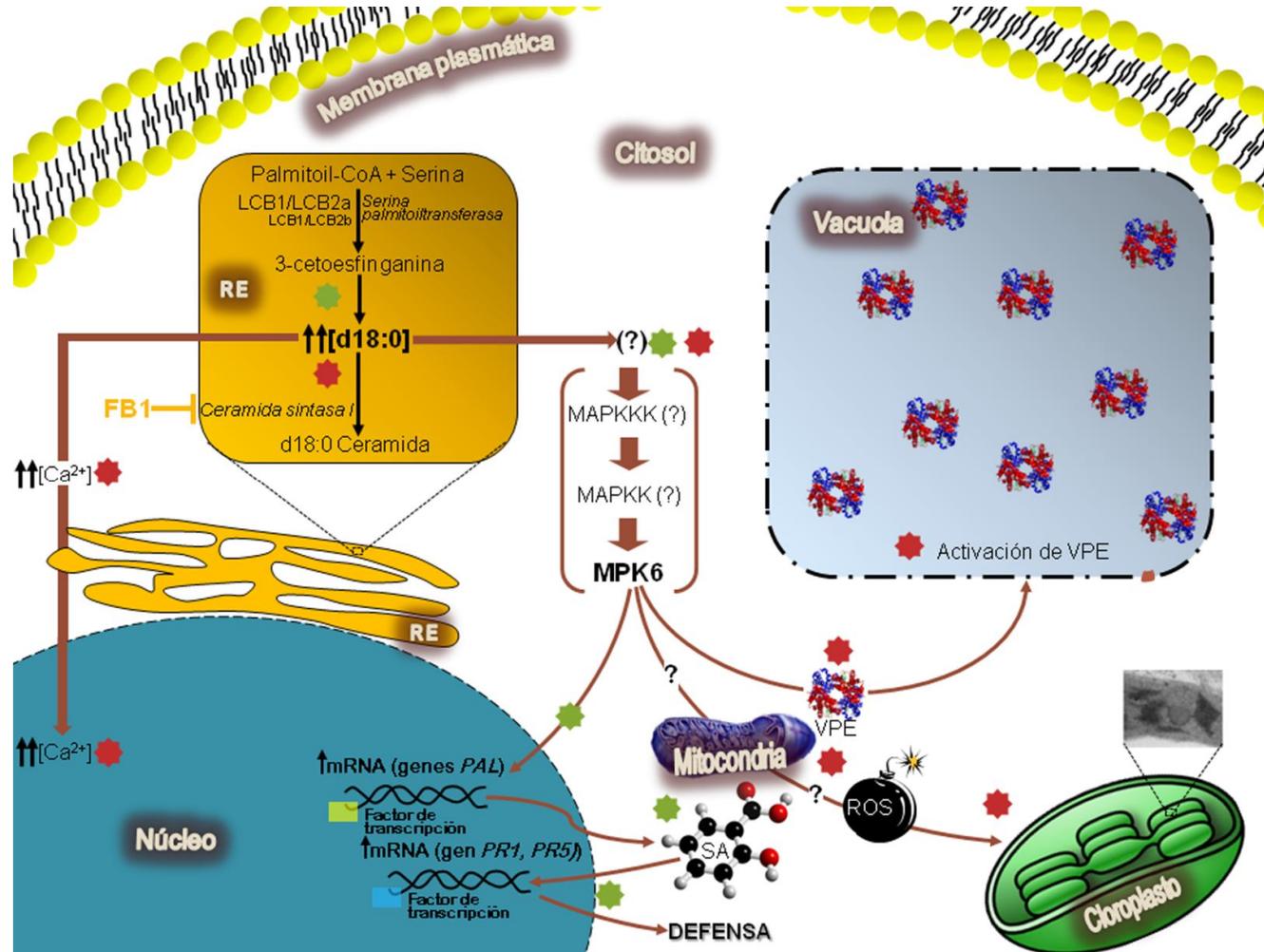


Figura 21. Modelo que considera a las LCBs y a la MPK6 como componentes de la vía de transducción de señales que lleva a la MCP e inmunidad en plantas de Arabidopsis. Los nombres de las enzimas de la síntesis de esfingolípidos están en *itálicas*. PAL, fenil alanina amonio liasa; PR Proteínas relacionadas a patogénesis; RE, retículo endoplásmico; ROS, especies reactivas de oxígeno; SA, ácido salicílico; SPT, serina palmitoiltransferasa; VPE, enzima de procesamiento vacuolar. Los números en rojo indican el eslabón de señales que evocan la MCP, mientras que en verde, las relacionadas a las reacciones de inmunidad

12. PERSPECTIVAS

En este trabajo se identificaron algunos componentes involucrados en la vía de señalización que conduce a la MCP y a la inmunidad en plántulas de *Arabidopsis*. Si bien, el trabajo representa un progreso importante en el conocimiento de la MCP en plantas, sus mecanismos y su aplicación fisiológica, se avanza ahora en el planteamiento de un arsenal de preguntas cuyas soluciones ayudarían a ampliar la visión sobre el mecanismo de la asociación LCBs-MPK6-MCP. Uno de los aspectos que podrían ser resueltos en un futuro, es la temporalidad y la dimensión espacial de ciertos eventos en el tejido vegetal que hacen que por un lado se desencadene la muerte específica de ciertas células, y que por el otro se sintetice y transporte una señal a tejidos sistémicos que alerten y preparen a las células para una posible infección en la planta.

El análisis de los niveles de transcritos por reacciones en cadena de polimerasa tiempo real (RT-PCR) de los genes *SPT* de plántulas tratadas o no con FB1, sería una estrategia importante para responder si existe una regulación positiva entre la FB1 y la expresión de estos genes, pues resultados preliminares obtenidos por PCR sugieren su existencia.

La dilucidación de la función de la autofagia sería otro punto importante de evaluación en esta relación LCBs-MPK6-MCP; pues en la literatura existen evidencias que demuestran la necesidad de la actividad de las VPE para la desintegración del tonoplasto en células de *Arabidopsis* (Kuroyanagi *et al.*, 2005) y contrariamente, en otros sistemas vegetales, se ha propuesto a la autofagia como un muro de contención a las señales de muerte para evitar que los tejidos sistémicos mueran (Liu Y. *et al.*, 2005). Si bien, es probable que ambos eventos ocurran en las células vegetales, la interrogante sería: ¿qué existe corriente arriba que hace que las señales pro-muerte y pro-vida se bifurquen en una circunstancia dada? Una alternativa para dilucidar la función de la autofagia en la MCP, sería evaluar la transcripción de los cuatro genes *VPE* y de la *BECLINA* en las plántulas silvestres y mutantes *mpk6*, para relacionarlos con la ultraestructura de las células en el sitio de infiltración con FB1 y en el tejido sistémico.

El modelo de este trabajo postula al SA como el responsable de ejecutar la inmunidad de las plantas; sin embargo, se desconoce si la síntesis de esta fitohormona se encuentra corriente arriba de la MPK6. Una estrategia experimental para responder esta interrogante es la realización de RT-PCRs en plántulas de *Arabidopsis* silvestres y *mpk6* tratadas o no con la FB1 para evaluar la expresión de los genes *PAL* y de la isocorismato sintasa (*ICS*), cuyos productos están relacionados a la síntesis del SA.

13. APÉNDICE. Procedimientos Experimentales Adicionales.

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE Arabidopsis

Desinfección de semillas

Reactivos para la desinfección:

NaClO al 20%

Tween-20

H₂O estéril

Reactivos para el medio de Gamborg:

Agar al 1%

Sacarosa al 1%

Medio de Gamborg B-5 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 3.2 g/l

Procedimiento:

- a) Colocar las semillas en un tubo eppendorf estéril y agregar 1 ml de NaClO y 1 μ l de Tween-20 (Cf 0.1%). Agitar vigorosamente durante 20 min en un agitador eléctrico.
- b) Centrifugar en una minifuga durante 10 seg y eliminar la solución.
- c) Agregar 1 ml de NaClO y agitar durante 10 min como en el paso a.
- d) Repetir el paso b.
- e) Enjuagar al menos 5 veces con 1 ml de agua estéril en cada ocasión hasta eliminar completamente al NaClO y al Tween. Al término de cada lavado, se centrifuga y se elimina el sobrenadante. Después del último lavado, agregar 1 ml de agar al 0.1% estéril.
- f) Sembrar las semillas en cajas de petri estériles que contienen medio de Gamborg sólido estéril, depositando individualmente en la superficie del agar a las semillas con la ayuda de una micropipeta de 1 ml.
- g) Estratificar a las semillas, almacenando las cajas de petri a 4°C en oscuridad durante 2 días.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CON COMPUESTOS ESFINGOIDEOS O DE INHIBIDORES

Fumonisina:

La solución concentrada de FB1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) se preparó a una concentración 1 mM en agua estéril. El medio sólido de Gamborg se suplementó con 10, 100 nM, 1, 3, 5 ó 10 μ M FB1.

Ceramida:

Las soluciones concentradas de ceramida CeC18:1 (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL), CeC20:0 (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) y CeC24:0 (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) se prepararon a 5.9, 5.6 y 4.3 mM, respectivamente, en etanol absoluto. El medio sólido de Gamborg se suplementó con 10 μ M de cada ceramida.

Miriocina:

La solución concentrada de miriocina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) se preparó a una concentración 2.89 mM en metanol absoluto. El medio sólido de Gamborg se suplementó con 50, 100 nM, 1, ó 10 μ M miriocina.

Esfinganina:

La solución concentrada de esfinganina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) se preparó a una concentración 6.69 mM en etanol absoluto. Se realizó una serie de diluciones en etanol hasta obtener una solución final 5 μ M, la cual fue asperjada en las plántulas crecidas en medio de Gamborg.

Fitoesfingosina:

La solución concentrada de fitoesfingosina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) se preparó a una concentración 2.12 mM en etanol absoluto. Se realizó una serie de diluciones en etanol hasta obtener una solución final 5 μ M, la cual fue asperjada en las plántulas crecidas en medio de Gamborg.

Esfinganina fosforilada:

La solución concentrada de esfinganina fosforilada (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) se preparó a una concentración 3.24 mM en etanol absoluto. Se realizó una serie de diluciones en etanol hasta obtener una solución final 5 μ M, la cual fue asperjada en las plántulas crecidas en medio de Gamborg.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Curva estándar y determinación de la concentración de proteínas citosólicas

Se realizó de acuerdo la Método de Bradford (Bradford, 1976) con el Protein assay, Kit Bio-Rad

Reactivos:

3 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) disuelta en H₂O.

Reactivo concentrado de Bradford [Protein assay, Kit Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA)].

Amortiguador de extracción de proteínas.

Curva de calibración de albúmina sérica bovina

- Preparación de muestras en una serie de concentraciones (Tabla I).
- Después de añadir el reactivo de Bradford, esperar un máximo de 5 min para realizar la lectura espectrofotométrica.
- Leer la absorbencia de las muestras a 595 nm en un espectrofotómetro.
- Calcular la absorbancia real de las lecturas de las muestras considerando el valor del blanco.
- Graficar los valores de absorbencia corregidos contra los μ g de BSA correspondientes.

Tabla I. Curva de calibración de proteína empleando BSA como estándar.

Muestra No.	μ l de agua	μ l de BSA (3 mg/ml)	μ l de reactivo	μ g de proteína
-	1000	-	-	-
Blanco	800	-	200	-
1	799	1	200	3
2	798	2	200	6
3	797	3	200	9
4	796	4	200	12
5	795	5	200	15
6	794	6	200	18

Cuantificación de proteína de las fracciones citosólicas

- Preparación de las muestras (por triplicado):

	µl de agua	µl de amortiguador de extracción	µl de FC	µl de reactivo
Muestras	798	-	2	200
Blanco	798	2	-	200

- b) Leer la absorbencia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm.
- c) Calcular la absorbancia real de cada lectura.
- d) Promediar los valores ajustados del triplicado de cada muestra.
- e) Interpolar en la curva de calibración de BSA los valores de absorbencia corregidos de las muestras, para determinar la cantidad de proteína por unidad de volumen.
- f) Considerar el factor de dilución para obtener la cantidad de proteína por unidad de volumen.

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LAS PROTEÍNAS POR SDS-PAGE

Se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS según Schägger y von Jagow (1987)

Tabla II. Preparación del gel SDS-PAGE (1.0 mm de grosor)

Soluciones y/o reactivos	Gel separador (µl)	Gel concentrador (µl)
Acilamida-bis acrilamida (10.0-0.3%)	1631.9	264.25
Amortiguador del gel (3 M Tris-0.3% SDS), pH 8.9	1631.9	495.5
Glicerol	660.16	-
Agua	990.98	1221.15
Persulfato de amonio (10%)	16.5	16.5
TEMED	1.65	1.65

Soluciones:

Amortiguador del cátodo:

0.1 M Tris

0.1 M Tricina

0.1% SDS.

Amortiguador del ánodo:

0.2 M Tris-HCl, pH 8.9.

Amortiguador de carga:

20% glicerol

10% β-mercaptoetanol

4.6% SDS

0.125 M Tris

0.2% azul de bromofenol

NOTA: Una vez preparada la solución el pH se ajusta a 6.8.

Estándar de proteínas:

BenchMark™ (Invitrogen, Carlsband CA) o SeeBlue® (Invitrogen, Carlsband CA)

Procedimiento:

- a) Armado de la cámara de electroforesis: Ensamblar las placas de vidrio, separadas por espaciadores del grosor requerido.
- b) Colocar sobre el soporte de la cámara y verificar que no existan fugas.

- c) Preparar el gel separador (Tabla II) y verterlo entre las placas de vidrio. Al finalizar, añadir SDS al 3% para evitar la formación del menisco característico de las sustancias líquidas. Dejar polimerizar durante 30 min.
- d) Preparar el gel concentrador (Tabla II) y adicionarlo entre las placas. Inmediatamente, colocar un peine para la formación de carriles del espesor correspondiente al de los espaciadores y dejar polimerizar durante 30 min.
- e) Ensamblar la cámara de electroforesis y adicionar en su interior el amortiguador del cátodo para verificar que no haya fugas.
- f) Preparar las muestras con el amortiguador de carga previamente descrito, en una relación 1:1 proteína:amortiguador. Calentar las muestras a 95°C durante 3-5 min y posteriormente cargar en los pozos respectivos.
- g) Aplicar corriente al gel de 25 mA durante 90-120 min a temperatura ambiente.

TINCIÓN DE LOS GELES CON AZUL DE COOMASSIE

Tabla III. Procedimiento para teñir los geles de SDS

	Fijación	Tinción
Duración	15-20 min	15 min
Composición	Metanol al 50% CH ₃ COOH al 10%	Metanol al 39.4%(v/v) CH ₃ COOH al 21% (v/v) Azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 0.16% (p/v)

Eliminación del exceso del azul de Coomassie

- a) Desteñir el gel con la misma solución fijadora durante 30 min e incubar con 1% glicerol durante toda la noche a temperatura ambiente.

Secado de geles por tratamiento térmico y vacío:

- a) Colocar el gel teñido sobre una hoja de papel absorbente 3M previamente humedecido; colocar una hoja de papel celofán sobre el gel eliminando burbujas.
- b) Secar a 80°C durante 2 h con vacío en un secador de geles (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, modelo 583).

TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF EN CÁMARA SEMIHÚMEDA

Soluciones:

Amortiguador de transferencia:

3g/l Tris base

14.4 g/l Glicina

1 g/l SDS

200 ml Metanol

Procedimiento:

1. Una vez terminada la electroforesis de las proteínas, los geles se colocan en el amortiguador de transferencia durante 15 min.
2. Cortar 6 papeles Whatman (que excedan 1 cm el tamaño del gel).
3. Cortar la membrana del tamaño del gel (lo más exacto posible).
4. Humedecer la cámara con agua destilada por los dos lados.

5. Humedecer la membrana en metanol grado reactivo, enjuagar con agua destilada y dejar en el amortiguador de transferencia junto al gel.
6. Ensamblar el sandwich de transferencia. Para ello, humedecer tres papeles Whatman con el amortiguador de transferencia, examinando en cada ensamblaje que no queden burbujas de aire, colocar la membrana y finalmente el gel de proteínas a transferir (el gel debe ser colocado boca arriba). Finalmente, colocar tres papeles Whatman humedecidos previamente con el amortiguador de transferencia, examinando nuevamente que no haya presencia de burbujas de aire.
NOTA: una forma de disminuir la formación de burbujas es apoyar el papel filtro sobre un extremo e ir acostándolo poco a poco.
7. Sellar la cámara de electroforesis, conectar los electrodos y prender la fuente de poder. Para la transferencia de proteínas del intervalo de 40-50 kDa se emplea un tiempo de transferencia de 40-45 min. Por cada gel a transferir se usan 75 mA y es aditivo, es decir si son tres geles a transferir el amperaje será de 225 mA. El voltaje no debe exceder de los 20-30 V.
8. Una vez concluida la transferencia, armar el sandwich. Al retirar el gel, en la membrana se alcanzarán a distinguir algunas de las proteínas del estándar empleado, los cuales deberán remarcados con tinta utilizando plumas exclusivas para ese uso.

IMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANAS DE PVDF EMPLEANDO UN ANTICUERPO CONJUGADO CON FOSFATASA ALCALINA

Soluciones:

PBS (1x):

0.1 M Tris

0.1 M NaCl

5 mM MgCl₂.

El pH de la solución se ajusta a 9.5.

Solución de Bloqueo:

5% leche baja en grasa

0.1% (v/v) Tween-20. La solución es disuelta en PBS (1x).

NOTA: cada vez que se emplea la solución de bloqueo, se debe mantener a 4°C. Esta solución siempre se prepara en fresco, solamente se puede conservar hasta tres días posteriores a su preparación.

Amortiguador pH 9.5:

12.1 g/l Tris base

5.8 g/l NaCl

1.0 g/l MgCl₂

pH ajustado a 9.5 con HCl.

Solución de revelado (stock):

33 mg/ml nBT en 70% DMSO

17 mg/ml BCIP en 100% DMSO

Región reconocida por el anticuerpo anti-MPK6 que corresponde a los primeros 27 residuos del N-terminal: NH₂-MDGGSGQPAADTEMTEAPGGFPAAAPS-COOH (Menke *et al.*, 2004)

Región reconocida por el Anticuerpo anti-MPK3 que corresponde a los primeros 15 residuos del N-terminal: NH₂-MNTGGGQYTDFAVE-COOH (Menke *et al.*, 2004).

Procedimiento para el bloqueo:

1. Incubar la membrana con la solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.
2. Desechar solución y agregar el primer anticuerpo disuelto en la solución de bloqueo. Se puede dejar toda la noche a 4°C o durante tres horas a temperatura ambiente (TA).
3. Guardar el primer anticuerpo a -20°C y lavar la membrana dos veces con PBS 1X +0.1% Tween-20 durante 5 y 10 min, respectivamente.
4. Agregar el segundo anticuerpo (ab conjugado con fosfatasa alcalina) 1:10 000 e incubar por lo menos 1 h a TA.
5. Lavar con PBS 1X + 0.1% Tween-20 tres veces, 10 min c/u.
6. Incubar la membrana con amortiguador pH 9.5 durante 10 min.

Procedimiento para el revelado:

1. En 10 ml de amortiguador 9.5, agregar 100 µl de nBT y 100 µl de BCIP. Dejar revelar hasta la intensidad deseada. Si se deja mucho tiempo mantener bajo oscuridad
2. Detener la reacción de la fosfatasa con agua y agregar 100 µl de 500 mM EDTA.

14. 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.
- Acharya BR, Assmann SM (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol Biol*, 69: 451-462.
- Alcántara SF (1998) Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la integridad del DNA genómico de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays L.*) durante la germinación. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- 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.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415: 977-983.
- Bartels S, Anderson JC, González Besteiro MA, Carreri A, Hirt H, Buchala A, Métraux J-P, Peck SC, Ulm R (2009) MAP kinase phosphatase 1 and protein tyrosine phosphatase 1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 2884–2897.
- Bögre L, Meskiene I, Heberle-Bors E, Hirt H (2000) Stressing the role of MAP kinases in mitogenic stimulation. *Plant Mol Biol*, 43: 705-718.
- 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.
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
- Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FL, Laurent PL, Kneppers TJ, Hille J, Nijkamp HJ (2000) A *LONGEVITY ASSURANCE* gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 4961-4966.
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jørgensen 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.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ (1990) Purification and characterization of glycolipid transfer protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta*, 1044: 77-83.
- Bush SM, Krysan PJ (2007) Mutational evidence that *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot*, 58: 2181-2191.
- Carmona SL (2003) Identificación de polipéptidos fosforilados diferencialmente en embriones de maíz expuestos a la fumonisina B₁. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química, UNAM.

- 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-Ruíz M (2009) Plant sphingolipids: Structure, synthesis and function. In: Wada H, Murata N, eds. *Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions*. Dordrecht, The Netherlands. Springer, 77-115.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803-814.
- Colcombet J, Hirt H (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochem J*, 413: 217-226.
- Coursol S, Fan L-M, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM (2003) Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cell 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.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381: 800-803.
- de Wit P JGM (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci*, 64: 2726-2732.
- Desikan R, Hancock J T, Ichimura K, Shinozaki K, Nell SJ (2001) Hairpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol*, 126: 1579-1587.
- 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 T, Li Z, Hailemariam T, Mukherjee S, Maxfield FR, Wu MP, Jiang XC (2008) SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. *J Lipid Res*, 49:376-385.
- Elmore JM, Coaker G (2011) The Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Plant-Microbe Interactions. *Mol Plant*. En impresión.
- Enríquez MC, Gutiérrez N, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz M. Cambios cinéticos en la actividad de la glucan sintetasa inducidos por la fumonisina B1 en embriones de maíz durante la germinación. XII Congreso de Bioenergética y Biomembranas, Querétaro, Qro. México. Noviembre 18-22, 2001.
- Fernández AP, Strand A (2008) Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 509-513.
- 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.

- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact*, 19: 711-724.
- Garibay FJ, Enríquez-Arredondo C, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz M. Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la actividad de la glucan sintetasa II de embriones de maíz. XXII Congreso Nacional de Bioquímica. Acapulco, Guerrero. México. Noviembre 19-24, 2000.
- 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.
- González SA (2009) La generación de H₂O₂ en la respuesta de hipersensibilidad mediada por las bases de cadena larga en *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- 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.
- Greenberg JT (2005) Degrade or die: a dual function for autophagy in the plant immune response. *Dev Cell*, 8: 799-801.
- Gudesblat GE, Iusem ND, Morris PC (2007) Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* *MPK3* expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytol*, 173: 713-721.
- Gutiérrez NN (1999) Efecto de la fumonisina B₁ sobre la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Gutiérrez NN (2005) Interacción de la fumonisina B₁ con la membrana plasmática: efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Hall MA, Novikova GV, Moshkov IE, Mur LAJ, Smith AR (2002) Protein kinases in plants in the transduction of abiotic and biotic signals. *Russ J Plant Physiol*, 49: 107-119.
- Hanada K (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1632: 16-30.
- Hannun YA, Obeid LM (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci*, 20: 73-77.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305: 855-858.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2006) A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis*, 11: 905-911.
- Hoeberichts FA, Orzaez D, van der Plas LH, Woltering EJ (2001) Changes in gene expression during programmed cell death in tomato cell suspensions. *Plant Mol Biol*, 45: 641-654.
- Hornemann T, Penno A, Rutti MF, Ernst D, Kivrak-Pfiffner F, Rohrer L, von Eckardstein A (2009) The SPTLC3 subunit of serine-palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J Biol Chem*, 284: 26322-26330.

- Ichimura K; Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 281: 36969-36976.
- Imai H, Nishiura H (2005) Phosphorylation of sphingoid long-chain bases in Arabidopsis: functional characterization and expression of the first *SPHINGOID LONG-CHAIN BASE KINASE* gene in plants. *Plant Cell Physiol*, 46: 375-380.
- Ishiga Y, Uppalapati SR, Ishiga T, Elavarthi S, Martin B, Bender CL (2009) The phytotoxin coronatine induces light-dependent reactive oxygen species in tomato seedlings. *New Phytol*, 181: 147-160.
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.
- Kawai M, Pan L, Reed JC, Uchimiya H (1999) Evolutionally conserved plant homologue of the *BAX INHIBITOR-1 (BI-1)* gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett*, 464:143-147.
- Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC (2002) A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: 1309-1318.
- Kim RH, Takabe K, Milstien S, Spiegel S (2009) Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*, 1791: 692-696.
- 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. *Plant J*, 19: 43-53.
- Krzymowska M, Konopka-Postupolska D, Sobczak M, Macioszek V, Ellis BE, Henning J (2007) Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. *Plant J*, 50: 253-264.
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 280: 32914-32920.
- 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.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411: 848-853.
- 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.
- 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.
- Lin SS, Martin R, Mongrand S, Vandenabeele S, Chen KC, Jang IC, Chua NH (2008) RING1 E3 ligase localizes to plasma membrane lipid rafts to trigger FB1-induced programmed cell death in Arabidopsis. *Plant J*, 56: 550-561.
- Lin X, Mattjus P, Pike HM, Windebank AJ, Brown RE (2000) Cloning and expression of glycolipid transfer protein from bovine and porcine brain. *J Biol Chem*, 275: 5104-5110.

- Liu CH, Goldberg AL, Qiu XB (2007) New insights into the role of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of apoptosis. *Chang Gung Med J*, 30: 469-479.
- Liu K, Zhang X, Sumanasekera C, Lester RL, Dickson RC (2005) Signalling functions for sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans*, 33: 1170-1173.
- Liu Y, Jim H, Yang K-Y, Kim C Y, Baker B, Zhang S (2003) Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signalling. *Plant J*, 34: 149-160.
- 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.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP (2005) Autophagy regulates programmed cell death during plant innate immune response. *Cell*, 121: 567-577.
- Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Gassmann W, Zhang S (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J*, 51: 941-954.
- Love AJ, Milner JJ, Sadanandom A (2008) Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci*, 13: 589-595.
- Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, Andrews DW (2008) Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell*, 135: 1074-1084.
- Lozano RMG (2010) Crecimiento bacteriano en mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteración en la síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química, UNAM.
- Lynch DV, Dunn TM (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist*, 161: 677-702.
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH Jr, Milstien S, Spiegel S (2005) SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem*, 280: 37118-37129.
- Mao C, Saba JD, Obeid LM (1999) The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. *Biochem J*, 342: 667-75.
- 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, 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.
- Martin GB (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr Opin Plant Biol*, 2: 273-279.
- Menke FLH, van Pelt JA, Pieterse CMJ, Klessig DF (2004) Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 comprises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 897-907.
- Merrill AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect*, 109: 283-289.
- Meskiene I, Hirt H (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol*, 42: 791-806.

- 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 $\Delta 4$ -desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 149: 487-498.
- Mino M, Murata N, Date S, Inoue M (2007) Cell death in seedlings of the interspecific hybrid of *Nicotiana glauca* and *N. tabacum*; possible role of knob-like bodies formed on tonoplast in vacuolar-collapse-mediated cell death. *Plant Cell Reports*, 26: 407-419.
- Mittler R, Lam E (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Cell*, 7: 1951-1962.
- Möbius N, Hertweck C (2009) Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 390-398.
- Moeder W, Yoshioka K (2008) *Lesion mimic* mutants: A classical, yet still fundamental approach to study programmed cell death. *Plant Signal Behav*, 3: 764-767.
- Mousavi A, Hotta Y (2005) Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Appl Biochem Biotechnol*; 120: 169-174.
- Müller J, Beck M, Mettbach U, Komis G, Hause G, Menzel D, Samaj J (2010) *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J*, 61: 234–248.
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, 59: 501-520.
- Nakagami H, Soukupova H, Shikora A, Zarsky V, Hirt H (2006) A mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 281: 38697-38704.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with *AVR* gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol*, 135: 1113-1128.
- Ng CKY, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410: 596-599.
- Nishiura H, Tamura K, Morimoto Y, Imai H (2000) Characterization of sphingolipid long-chain base kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Soc Trans*, 28: 747-748.
- Norholm MH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA. (2006) Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Lett*, 580: 2381-2387.
- Noyola ML (2006) Determinación de bases esfingoides y ceramida por TLC tras la adición de la micotoxina FB1 a tejidos vegetales. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Nürnberg T, Lipka V (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol*, 6: 335-345.
- Oliver RP, Solomon PS (2008) Recent fungal diseases of crop plants: is lateral gene transfer a common theme? *Mol Plant-Microbe Interact*, 21: 287-293.
- Olivera A, Spiegel S (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365: 557-560.

- Palacios BS (2002) Efecto de la FB1 sobre la peroxidación de lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Palacios BS (2007) Participación de esfingolípidos membranales en respuesta de defensa. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Pandey S, Assmann SM (2004) The Arabidopsis putative G Protein-Coupled Receptor GCR1 interacts with the G Protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 16: 1616–1632.
- 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: 4053-1056.
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J (2000) Arabidopsis Map Kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103: 1111-1120.
- Petersen NH, McKinney LV, Pike H, Hofius D, Zakaria A, Brodersen P, Petersen M, Brown RE, Mundy J (2008) Human GLTP and mutant forms of *ACD11* suppress cell death in the Arabidopsis *acd11* mutant. *FEBS J*, 275: 4378-4388.
- Pitzschke A, Hirt H (2009) Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol*, 149: 606-615.
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar S (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev*, 23: 80-92.
- Pruett ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liotta DC, Merrill AH, Jr (2008) Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. *J Lipid Res*, 49: 1621-1639.
- Pyne S, Pyne N (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 88: 115-131.
- Qiu J-L, Zhou L, Yun B-W, Nielsen HB, Fill BK, Petersen K, MacKinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC (2008) Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol*, 148: 212:222.
- Ren D, Yang H, Zhang S (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 277: 559-565.
- Ren D, Yang K, Li G, Liu Y, Zhang S (2006) Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant Physiol*, 141: 1482–1493.
- Rivas SM (2001) Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisina B1. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Rivas SM (2004) Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.

- Rodríguez MP (2006) Relación entre la actividad de la NADPH oxidasa, compuestos esfingoides y respuesta a patógenos en células vegetales. Tesis de Licenciatura en Química. Facultad de Química. UNAM.
- Ryan PR, Liu Q, Sperling P, Dong B, Franke S, Delhaize E (2007) A higher plant $\Delta 8$ sphingolipid desaturase with a preference for (*Z*)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. *Plant Physiol*, 144: 1968-1977.
- Saba JD, Nara F, Bielawska A, Garrett S, Hannun YA (1997) The *BST1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J Biol Chem*, 272: 26087-26090.
- Saba JD, Hla T (2004) Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ Res*, 94: 724-734.
- Sanchez P, de Torres Zabala M, Grant M (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J*, 21: 393-399.
- SanJuan BA (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 en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Saucedo GM 2007. Activación de MAPKs por bases de cadena larga en una especie mono y una dicotiledónea. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166: 368-379.
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410: 327-330.
- Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB, Sheen J (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signalling 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.
- Sperling P, Heinz E (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1632: 1-15.
- Spiegel S, Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 397-407.
- Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM (2000) Stimulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) Arabidopsis mutants. *Plant Cell*, 12: 1811-1822.
- Stone JM, Liang X, Neel ER, Stiers JJ (2005) Arabidopsis *AtSPL14*, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J*, 41: 744-754.
- Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su SH, Jester PJ, Zhang S, Bent AF, Krysan PJ (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol*, 143: 661-669.
- Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007) The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is

- an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19: 805-818.
- Takahashi Y, Berberich T, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Kusano T, Terauchi R (2009) Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in nonhost resistance. *Mol Plant-Microbe Interact*, 22: 31-38.
- Tamura K, Mitsunashi 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.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 15: 317-330.
- Takabatake R, Ando Y, Seo S, Katou S, Tsuda S, Ohashi Y, Mitsuhara I (2007) MAP kinases function downstream of HSP90 and upstream of mitochondria in TMV resistance gene *N*-mediated hypersensitive cell death. *Plant Cell Physiol* 48:498-510.
- 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.
- Tsegaye Y, Richardson CG, Bravo JE, Mulcahy BJ, Lynch DV, Markham JE, Jaworski JG, Chen M, Cahoon EB, Dunn TM (2007) Arabidopsis mutants lacking long chain base phosphate lyase are fumonisin-sensitive and accumulate trihydroxy-18:1 long chain base phosphate. *J Biol Chem*, 282: 28195-28206.
- Tukey JW (1977) *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley, MS. ISBN 0-201-07616-0.
- Ulm R, Revenkova E, di Sansebastiano GP, Bechtold N, Paszkowski J (2001) Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in Arabidopsis. *Genes Dev*, 15: 699-709.
- Ulm R, Ichimura K, Mizoguchi T, Peck SC, Zhu T, Wang X, Shinozaki K, Paszkowski J (2002) Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1. *EMBO Journal*, 21: 6483-6493.
- van Doorn WG (2005) Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends Plant Sci*, 10: 478-483.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AH (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem*, 266: 14486-14490.
- 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. *Plant Cell*, 19: 63-73.
- 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 (2006) Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J*, 45: 884-894.
- Worrall D, Liang YK, Alvarez S, Holroyd GH, Spiegel S, Panagopoulos M, Gray JE, Hetherington AM (2008) Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant J*, 56: 64-72.

- Yamin TT, Ayala JM, Miller DK (1996) Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J Biol Chem*, 271: 13273-13282.
- Yang CH, Gavilanes-Ruiz M, Okinaka Y, Vedel R, Berthuy I, Boccara M, Chen JW, Perna NT, and Keen NT (2002) *HRP* Genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Mol Plant-Microbe Interact*, 15: 472-480.
- Yao N, Greenberg JT (2006) Arabidopsis *ACCELERATED CELL DEATH2* modulates programmed cell death. *Plant Cell*, 18: 397-411.
- Zavaleta FCA, Gonzáles SA, Strasser RJ, King-Díaz B, Lotina-Henssen B, Gavilanes-Ruiz M. Análisis del desempeño fotosintético en el proceso de muerte celular programada. XVI Congreso de Bioenergética y Biomembranas Sociedad Mexicana de Bioquímica Boca del Rio, Veracruz. México. Noviembre 8-13 2009.
- 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 S, Klessig D F (1997) Salicylic acid activates a 48-kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell*, 9: 809-824.