



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE ARGONAUTA5 EN
LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE
INDUCIDA POR FLAGELINA 22 EN *Arabidopsis
thaliana*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ILANI YAHIEL GODÍNEZ BAUTISTA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Oswaldo Valdés López
2017**

Los Reyes Iztacala. Edo. de México



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.

La presente investigación fue financiada a través de los proyectos: PAPIIT: IA203815; PAPIIT: IN213017; CONACYT Ciencia Básica: 219759; además, recibí la beca Tesis de Licenciatura y Posgrado otorgada por el COMECYT: 17ABTL0258A. Quiero agradecer al Dr. Oswaldo Valdés López por el gran aporte académico que hizo a mi vida a lo largo de toda la carrera, gracias por los conocimientos, la confianza y el apoyo.

Para Félix, Hortencia, Erick y Sofía...

“We know more about the movement of celestial bodies than about the soil underfoot”

- Leonardo da Vinci

Abstract

Upon perception of microbial-associated molecular patterns (MAMP's) plants trigger immune responses once perceived by pattern recognition receptors (PRRs). MAMP-triggered immunity (MTI), is the first layer that plants induce against attack-pathogen. Currently, Argonaute proteins (AGO) have been shown as essential proteins on related pathways with the immune responses. We found, that *Arabidopsis thaliana* overexpressing AGO5 displayed negative phenotypic effects related with MTI. Suggesting a role for AGO5 as a negative regulator of MTI. Therefore, these plants exhibit low ROS production upon flg22 treatment and down-regulation of some genes related with early stages of MTI as *FRK1*, *PER5* and *WRKY40*. However, Western Blot analysis showed the presence of AGO1 in *Arabidopsis* seedlings Col-0, *ago5-1 (-/-)* and OxAGO5, suggesting a regulatory network governed for the spatiotemporal activity of AGO proteins in the plant immune system.

Resumen

Después de la percepción los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), las plantas activan respuestas inmunes una vez percibidas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). La inmunidad desencadenada por MAMPs (MTI), es la primera línea activa de defensa que la planta induce frente al ataque por patógenos. Actualmente, las proteínas Argonauta (AGO) han sido asociadas como proteínas esenciales en las vías relacionadas con la respuesta inmune. En éste trabajo, se encontró que *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de AGO5 presentó efectos fenotípicos negativos relacionados con MTI, lo que sugiere un papel para AGO5 como regulador negativo de MTI. De hecho, estas plantas mostraron baja producción de ROS cuando se expusieron a flg22 y una regulación a la baja de algunos genes relacionados con las primeras etapas de MTI como *FRK1*, *PER5* y *WRKY40*. Sin embargo, un análisis por Western Blot reveló la presencia de AGO1 en plántulas de *Arabidopsis* Col-0, *ago5-1 (-/-)* y OxAGO5, lo que sugiere una red regulatoria gobernada para la actividad espaciotemporal de las proteínas AGO en el sistema inmune de la plantas.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Justificación e Hipótesis.....	28
3. Objetivos.....	29
4. Materiales y Métodos.....	30
5. Resultados.....	34
6. Discusión.....	42
7. Conclusiones.....	46
8. Información Suplementaria.....	47
9. Referencias.....	49

1. Introducción

1.1. Sistema Inmune

La inmunología tiene como objeto de estudio las respuestas de defensa que tanto plantas y animales usan para defenderse de la invasión de patógenos potenciales (Ausubel, 2005). Asimismo, se encarga de entender los mecanismos moleculares que han permitido a ambos reinos generar “memoria inmunológica” y defenderse del mismo patógeno por varias generaciones (Quintin *et al*, 2014). Un sistema inmune óptimo para organismos de vida larga requiere principalmente de tres cosas: 1) alta especificidad, 2) auto-tolerancia y 3) memoria inmune. El sistema inmune en vertebrados es el más estudiado y aparentemente más sofisticado. En ellos el relativamente inespecífico sistema inmune innato, es complementado por el sistema inmune adaptativo el cual usa un vasto repertorio de receptores de estructura similar con un número casi infinito de especificidades de uniones a antígeno generadas a través de recombinación somática y mutaciones (Reynaud *et al*, 1994). Estos receptores son expresados clonalmente por linfocitos (células B y T), las cuales viajan a través del sistema circulatorio con el fin de detectar la presencia de patógenos o células mutadas (Rydzynski *et al*, 2015). El reconocimiento del antígeno por un receptor genera no sólo la expansión clonal de linfocitos que expresen tal receptor, sino también la formación de células de memoria que producen receptores con la misma especificidad de unión a antígeno, permitiendo que las repuestas inmunes secundarias se vuelvan más rápidas y eficientes. En contraste, el sistema inmune en plantas pareciera ser menos complejo debido a la carencia de un sistema circulatorio y células inmunes móviles, por lo que no pueden usar este tipo de receptores para detectar a los patógenos. Sin embargo, durante los últimos años, evidencia acumulada sobre la amplia variedad de procesos regulatorios que logran montar las plantas frente a patógenos invasores, ha dejado ver la alta especialización de su sistema inmune (Hacquard *et al.*, 2017).

1.2. Sistema Inmune en Plantas.

La fitopatogenicidad es un problema global el cual repercute en la seguridad alimenticia (Muthamilarasan y Prasad, 2013). Los fitopatógenos son divididos comúnmente: 1) en los que matan al hospedero y se alimentan de las sustancias nutritivas (necrótrofos), 2) los que requieren de un hospedero vivo para continuar su ciclo de vida (biótrofos) 3) y los que requieren a un hospedero vivo inicialmente, pero después de cierto periodo de infección lo matan (hemibiótrofos) (Glazebrook 2005). La entrada del patógeno a los tejidos del hospedero es un paso vital para que lleve a cabo sus etapas de infección (Lefer y Robatzek, 2006). El primer obstáculo que encuentran los fitopatógenos para infectar a la planta hospedera, es la pared celular, la cual puede ser reforzada por la deposición de calosa (polímeros de glucano) (Millet *et al*, 2010). Además, existen señales de peligro que pueden ser originadas por agentes infecciosos o por el propio hospedero, las cuales pueden ser subdivididas en dos categorías: 1) las moléculas que son liberadas pasivamente después del daño celular a menudo inducido por enzimas catalíticas secretadas por los patógenos llamados Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMP's, por sus siglas en inglés) y 2) los péptidos que son procesados o secretados después de la infección que regularmente sirven como moduladores de la respuesta inmune (Gust *et al.*, 2017). Posterior a la barrera física impuesta por la pared celular, los patógenos se enfrentan a una segunda barrera de defensa, la cual ocurre a nivel membrana plasmática. Esta línea de defensa, es activada cuando Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMP's, por sus siglas en inglés) como polisacáridos, factores de elongación bacterianos y flagelina (Félix *et al.*, 1999; Che *et al.*, 2000) son detectados por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PPR's, por sus siglas en inglés) (Dodds and Rathjen 2010; Beck *et al*, 2012). Aunque hay algunas semejanzas estructurales entre los PRR's de plantas y animales, como el uso del dominio de Repetición Rico en Leucina (LRR, por sus siglas en inglés) para la unión a ligando (Mizel *et al*, 2003), se cree que han surgido a través de una evolución convergente (Mizel *et al*, 2003; Ausubel 2005; Ronald y Beutler, 2010). Una vez detectados los MAMP's se activa una respuesta conocida

como Inmunidad Desencadenada por MAMP's (MTI, por sus siglas en inglés) (Figura 1). La MTI, generalmente produce una amplia resistencia contra una gran variedad de patógenos, principalmente contra patógenos no adaptados (Wang *et al*, 2007). De hecho, este mecanismo de reconocimiento de patógenos por el reconocimiento de MAMPs, ha sido una fuerza que ha contribuido a un proceso coevolutivo entre plantas y patógenos (Spoel y Dong, 2012). Por otro lado, algunos patógenos han desarrollado estrategias para evadir la MTI y en consecuencia, promover la patogénesis. Esta estrategia de evasión, consiste en la inyección de proteínas efectoras por medio de sistemas de secreción bacterianos, que una vez dentro del citoplasma, interactúan con componentes de la MTI y la inactivan (Coburn *et al*, 2007; Dodds and Rathjen 2010; Cui *et al.*, 2015). Debido a este hecho, las plantas han desarrollado un mecanismo para reconocer proteínas efectoras que resulta en una resistencia más fuerte y específica (Göhre y Robatzek, 2008; Katagiri y Tsuda, 2010). Este mecanismo de protección, es activado mediante proteínas de resistencia (R) que son receptores de proteínas efectoras bacterianas (Segonzac y Zipfel, 2011). El reconocimiento del efector activa una tercera línea de defensa de la planta conocida como Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI, por sus siglas en inglés) (Göhre y Robatzek, 2008; Segonzac y Zipfel, 2011) (Figura 1). La ETI a menudo se asocia como una respuesta tipo MTI aumentada, además de amplificar la hipersensibilidad que desencadena la muerte celular en el sitio de infección (Coll *et al*, 2011). Sin embargo, ya que las proteínas efectoras son especies, razas, patotipos o cepas específicas a menudo necesitan una proteína para el reconocimiento específico de cada una de ellas. ETI es bastante específica, a menudo la respuesta inmune de la planta es para genotipos específicos de cualquier especie de patógeno (Cui *et al.*, 2015). Los mecanismos detallados sobre la ETI, tendrán que ser abordados con mayor detalle en otro estudio, debido a que en el presente sólo nos enfocaremos a los eventos moleculares tempranos que subyacen la MTI, por lo que de aquí en adelante, me dedicaré a explicar los últimos avances en nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares del sistema inmune, centrándonos en nuestro modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*.

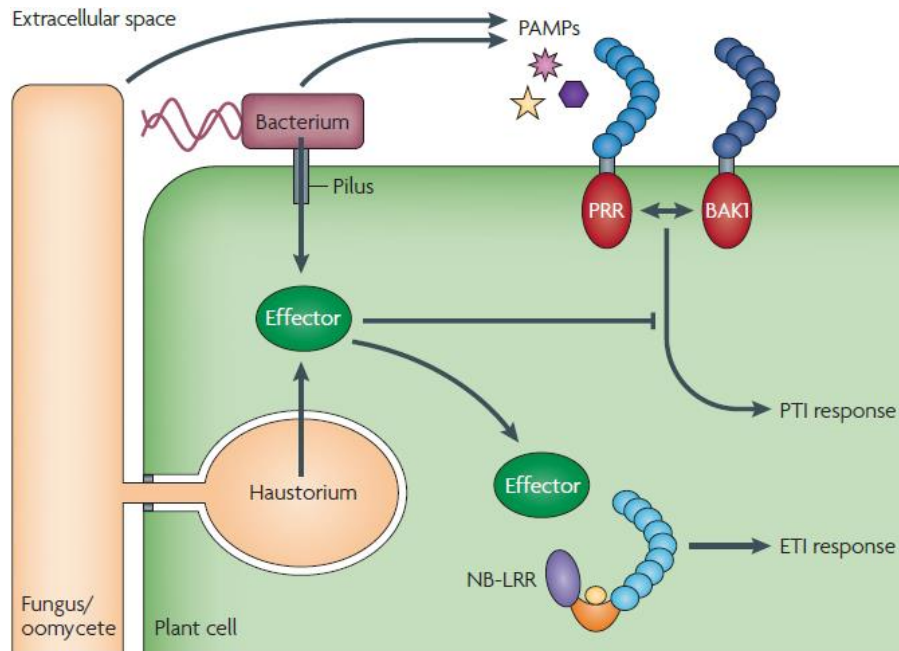


Figura 1. Principios de la Inmunidad Innata en Plantas. Nat Rev. Gen. 2010. 11, 539-538.

1.3. Inmunidad Desencadenada por MAMP's (MTI)

La MTI, denominada inmunidad basal u horizontal, involucra el reconocimiento de estructuras esenciales que son conservadas en todas las clases de patógenos (MAMP's) (Dodds and Rathjen 2010; Beck et al. 2012). Existe una amplia gama de MAMP's que son reconocidos por las plantas, los cuales incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas más pequeñas (Boller y Felix, 2009). La estimulación ocasionada por los MAMP's en los PRR's activa la Inmunidad Desencadenada por MAMP's. Muchos patógenos a menudo secretan enzimas líticas para causar daño en la pared celular de la planta, lo que resulta en una serie de compuestos generalmente desprendidos de esta. Estos productos, generados como consecuencia de la degradación de la pared celular, son llamados Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMP's, por sus siglas en inglés). Estos DAMP's, generalmente situados en el apoplasto, sirven como señales de peligro para desencadenar una inmunidad similar a los MAMP's (Henry *et al*, 2012).

1.3.1. Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR's)

Como se ha mencionado con anterioridad, las plantas carecen de un sistema circulatorio que les permita la detección de moléculas no propias. Debido a esto, cada célula es capaz de desencadenar una respuesta inmune contra un patógeno potencial. Este reconocimiento es llevado a cabo por receptores inmunes especializados localizados en la membrana plasmática que monitorean el espacio extracelular (Dodds y Rathjen, 2010; Dangl *et al*, 2013). Estos receptores, ubicados en la superficie celular, se subdividen en dos grupos; las Cinasas Tipo Receptor (RLK's, por sus siglas en inglés) y las Proteínas Tipo Receptor (RLP's, por sus siglas en inglés) que funcionan como PRR's. Estructuralmente, las RLK's están conformadas por un dominio extracelular que está implicado principalmente con la unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio de señalización interno. Las RLP's tienen la misma conformación estructural, pero carecen de un dominio interno, por lo que necesitan de receptores cinasa reguladores para lograr desencadenar una cascada de señalización (Gust y Felix, 2014). Se puede clasificar a los PRR's de plantas por la naturaleza de su dominio extracelular de unión a ligando. Los PRR's que poseen un dominio LRR se unen principalmente a proteínas y péptidos, por ejemplo, flagelina, factor de elongación Tu y péptidos endógenos (Félix *et al.*, 1999; Che *et al.*, 2000). Por otra parte, los PRR's que contienen motivos de lisina (LysM) tienen preferencia por ligandos basados en carbohidratos como quitina y peptidoglicanos (Zipfel, 2014; Bohm *et al*, 2014).

1.3.2. BAK1, un Regulador Maestro en la MTI.

En general, los PRR's muestran una alta especificidad para los ligandos con los que interactúan; sin embargo, las células contienen co-receptores y proteínas regulatorias que actúan sinérgicamente con los receptores y no tienen necesariamente una alta especificidad para un solo tipo de ligando (Chinchilla *et al.*, 2009; Liebrand *et al.*, 2014). Estos co-receptores y proteínas regulatorias generalmente funcionan como facilitadores o supresores de la cascada de

señalización y también permiten la comunicación de señales entre el medio extracelular y el medio intracelular permitiendo una adecuada señalización en la presencia de diversos ligandos endógenos y exógenos (Figura 2). Ejemplos de estas RLK's co-receptores y reguladores abarcan a miembros de la familia SERK (Chinchilla *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013), miembros de la familia BIR (Gao *et al.*, 2009; Halter *et al.*, 2013), y SORBI1 (Liebrand *et al.*, 2013).

Miembros de la familia SERK han sido identificados en la gran mayoría de las especies de plantas. En *Arabidopsis thaliana* existen 5 miembros (SERK1-5). En general, estas proteínas SERK contienen 5 LRR's en su dominio extracelular y comparten una alta similitud en secuencia y función en ciertos grados. La proteína SERK3, también conocida como BAK1 ha sido reportada como un co-receptor esencial en la respuesta inmune en *Arabidopsis thaliana*, tomate y arroz por la interacción con los PRR's FLS2, EFR, PEPR1, PEPR2 Xa21 Ve1 y Eix1 (Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007; Bar *et al.*, 2010; Fradin *et al.*, 2009; Postel *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014). BAK1 no tiene un papel en el reconocimiento directo del ligando, pero forma un complejo con FLS2 después de la percepción lo que resultará en la fosforilación de ambas proteínas, la cual se da aproximadamente de 30-60 segundos después de la percepción (Schulze *et al.*, 2010). Debido a esto, BAK1 ha sido considerado como un regulador maestro en la respuesta inmune en plantas y por lo tanto, un blanco central de moléculas efectoras patógenas (Shan *et al.*, 2008). Un regulador esencial del complejo FLS2-BAK1 es la proteína cinasa citoplasmática BOTRYTIS-INDUCED KINASE (BIK1). BIK1 ha sido identificada como un regulador potencial debido a que *bik1*, es sobreexpresado después del tratamiento con MAMP's o cepas bacterianas en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Veronese *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que BIK1 interactúa tanto con FLS2 y BAK1 antes de la percepción y parece ser disociada después de ésta (Lu *et al.*, 2010). En experimentos *in Vitro*, BAK1 fosforila a BIK1 y BIK1, fosforila a FLS2 y BAK1 (Lu *et al.*, 2010). *In Vivo* BIK1 se fosforila de 5-10 minutos después del tratamiento con flagelina (Lu *et al.*, 2010), estos picos de fosforilación, se dan después de la fosforilación del complejo FLS2-BAK1. Interesantemente, plantas de *Arabidopsis*

thaliana mutantes en *bik1*, presentan más resistencia a la infección por *P. syringae* que las plantas silvestres (Veronese *et al.*, 2006) como resultado de una sobreproducción de ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés), pero son más susceptibles a la infección por el patógeno fúngico *B. cinerea*. Estos resultados contrastantes dificultan elucidar el papel de BIK1 en la inmunidad de la planta, por lo que son necesarios estudios más minuciosos.

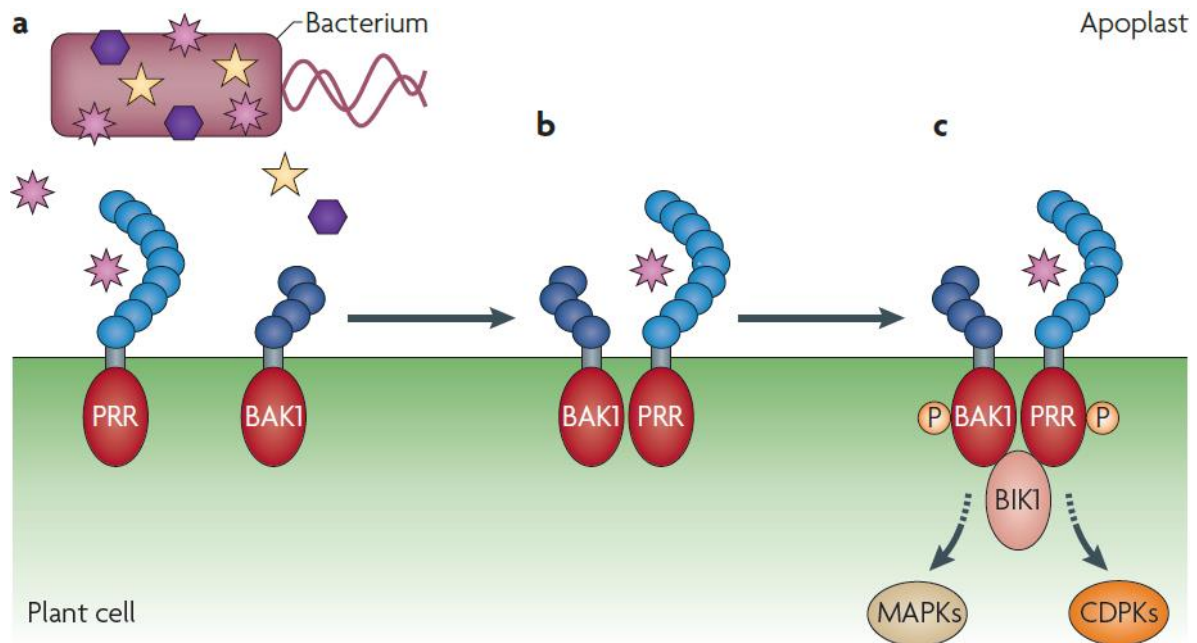


Figura 2. Complejos de Receptores de Reconocimiento de Patrones activos. Nat Rev. Gen. 2010. 11, 539-538.

1.3.3. Eventos Moleculares Tempranos en la MTI.

1.3.3.1. Cambios en el Flujo de Iones en la Membrana Plasmática

El Ca^{2+} es el segundo mensajero de importancia esencial en organismos eucariontes (Seybold *et al.*, 2014). En plantas, los procesos de señalización mediada por Ca^{2+} participan en la regulación de respuestas a estrés abiótico así como en la transducción de señales durante las interacciones con microorganismos simbióticos y patógenos (Dodd *et al.*, 2010). Esta señalización mediada por Ca^{2+} ,

es caracterizada por un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, acompañado de la actividad de canales transportadores que permiten el influjo de Ca^{2+} desde almacenes intracelulares y extracelulares (Dodd *et al.*, 2010). Este cambio trascendente en la concentración de Ca^{2+} citosólico es censado y decodificado por una red compleja de proteínas de unión a Ca^{2+} y proteínas cinasa para traducir la señalización río abajo y regular tanto a proteínas efectoras y la expresión génica (Luan *et al.*, 2009; Boudsocq y Sheen, 2010; Romeis y Herde, 2014; Steinhorst y Kudla, 2014). Además, se cree que la especificidad de la señalización por Ca^{2+} , se confiere principalmente a través de cualidades espaciotemporales, la cual difiere en frecuencia, amplitud y duración de una manera dependiente del estímulo (McAinsh y Pittman, 2009). A pesar de que diferentes MAMP's/DAMP's inducen respuestas inmunes similares, existen diferencias cualitativas y cuantitativas. De hecho, se ha propuesto que la intensidad de la ramificación de la señal ocurre en estadios tempranos en los PRR (Lu *et al.*, 2009). Entre las respuestas celulares tempranas, este cambio de flujo de iones de Ca^{2+} y la ramificación temprana de la señal, después del reconocimiento de MAMPs por los PRR, podría estar coordinada por diferentes amplitudes en los flujos de Ca^{2+} o por estímulos temporales dependientes de las señales de Ca^{2+} . Estos cambios y posibles regulaciones, está apoyado por características específicas durante la exposición a MAMPs como flg22, elf18, Pep1 y quitina (Ranf *et al.*, 2011). De hecho, estudios genéticos realizados en mutantes con cambio en la elevación de calcio (*cce*) después de la percepción de flg22 generó la identificación de 10 alelos de FLS2, 10 de BAK1 y nueve mutantes *cce* aún no caracterizados (Ranf *et al.*, 2012). Por otra parte, la importancia del Ca^{2+} en el sistema inmune ha sido inferido por observación en bacterias patogénicas que secretan exopolisacáridos (EPS, por sus siglas en inglés) quelantes de Ca^{2+} para disminuir la MTI (Aslam *et al.*, 2008).

A pesar de los progresos por entender los mecanismos exactos de la regulación y proteínas decodificadoras de las variaciones de Ca^{2+} intracelular durante la respuesta de defensa han sido considerables, algunas preguntas siguen en espera de ser contestadas.

1.3.3.2. Activación de CPK's

Una de las repuestas tempranas que se da después de la interacción con un patógeno o un MAMP, es un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Las proteínas cinasas dependientes de calcio (CPK's, por sus siglas en inglés) tienen la facultad de censar cambios en las concentraciones de Ca^{2+} y transmitir señales para inducir repuestas de señalización. Miembros de la familia de CPK's median y transmiten señales de defensa en respuesta a MAMP's y a efectores patógenos, además, se ha reportado que las CPK's juegan papeles importantes en el sistema inmune en plantas (Boudsocq y Sheen, 2013; Schulz *et al.*, 2013; Romeis y Herde, 2014).

Diversas CPK's son activadas después de la percepción de flg22 en *Arabidopsis thaliana*. Se ha reportado que un subgrupo de CPK's, el cual incluye a CPK4, 5, 6 y 11, juegan un papel esencial en la señalización desencadenada por flg22 (Boudsocq *et al.*, 2010). Experimentos en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* en *cpk4*, *cpk5*, *cpk6* y *cpk11*, no mostraron efectos negativos en respuesta a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Boudsocq *et al.*, 2010), sin embargo, dobles mutantes en *cpk5/cpk6* y triples mutante en *cpk5/cpk6/cpk11*, presentaron una susceptibilidad muy elevada y una reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por flg22 (Boudsocq *et al.*, 2010), indicando una relación sinérgica entre esta producción y las CPK's. Además, se ha reportado un papel esencial para CPK5 por su capacidad de fosforilar a RBOHD *in vivo*, y debido a que líneas transgénicas que sobreexpresan a CPK5, mostraron muerte celular espontánea, una resistencia a patógenos bacterianos, así como un incremento en la acumulación de SA (Dubiella *et al.*, 2013). Por otra parte, la activación de CKP5 y RBOHD es necesaria para una rápida propagación de la señal inmune entre células mediada por las ROS (Dubiella *et al.*, 2013)

En contraste con CPK4, 5, 6 y 11, las cuales funcionan como reguladores positivos de la respuesta de defensa, CPK28 juega un papel negativo en la señalización

inmune (Monaghan *et al.*, 2014). La pérdida de la función de CPK28, resultó en una MTI mejorada, y su sobreexpresión resultó en una supresión de la MTI. CPK28 posee la facultad de fosforilar a BIK1, que como se ha mencionado con anterioridad, es un importante sustrato de múltiples PRR's y también contribuye a la acumulación de BIK1, sugiriendo una regulación de la respuesta inmune por CPK28 por la modulación de las RLK's (Monaghan *et al.*, 2014). En conjunto, estos datos sugieren un papel de las CPK's en diferentes vías regulatorias incluyendo la producción de ROS, y la activación de vías de señalización de fitohormonas. Sin embargo, los mecanismos primarios de la activación de las CPK's, su regulación, mantenimiento y cómo propagan las señales de defensa aún no son bien entendidos.

1.3.3.3. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas inglés) se producen normalmente como parte del metabolismo en los peroxisomas, cloroplastos y mitocondrias debido a su actividad oxidante y su transporte a la cadena de electrones (Tripathy y Oelmuller, 2012). En organismos superiores, la producción de ROS puede ser autónoma y puede ser utilizada como moléculas señal para una amplia gama de procesos biológicos. En plantas, se ha reportado que las ROS juegan un papel esencial en crecimiento, desarrollo, respuesta a estrés biótico, abiótico e inmunidad (Asai y Yoshioka, 2008). Las oxidasas de NADPH son las encargadas de la producción de ROS, transfiriendo electrones de NADPH o NADH citosolicas al oxígeno apoplástico, generando la producción de superóxido (O_2^-). El O_2^- producido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la proteína superóxido dismutasa (Suzuki *et al.*, 2011; Marino *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2012).

En mamíferos, las oxidasas de NADPH son divididas en 3 subfamilias: NOX1-4, NOX5 y DUOX (Bedard y Krauze, 2007; Rada y Leto, 2008). Todas estas enzimas comparten sitios de unión a NADPH y FAD, además de un dominio funcional oxidasa encargado de la producción de O_2^- . A diferencia de las enzimas NOX1-4,

NOX5 y DUOX, tienen motivos de mano EF en el N-terminal, sugiriendo una regulación por unión a Ca^{2+} . En plantas, las oxidasas de NADPH pertenecen a la familia de oxidasas homólogas de respiración oxidativa (RBOH, por sus siglas en inglés), y consta de 10 miembros en *Arabidopsis thaliana* (Torres y Dangl, 2005). De manera similar a las proteínas NOX en mamíferos, todas las proteínas RBOH's tienen un sitio de unión a NADPH y NADH, 6 dominios transmembrana, un dominio funcional oxidasa y también motivos de mano EF de unión a Ca^{2+} (Figura 3).

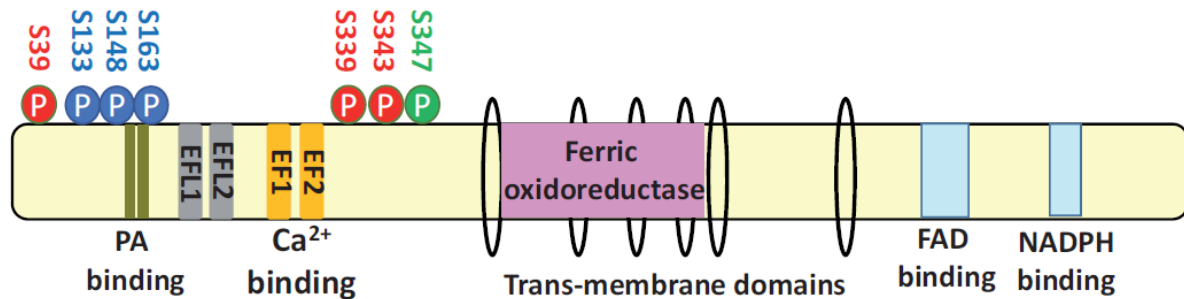


Figura 3. Representación esquemática de los dominios de RBOHD. Plant Cell Physiol. Rev. 2015. 56(8): 1472-1480.

La percepción de MAMP's genera una serie de eventos de señalización inmune, entre ellos, la producción de ROS es una de las repuestas tempranas que se inician a los pocos minutos después del tratamiento con MAMP's. Se ha propuesto que las ROS actúan como agente antimicrobiano, bloqueado el acceso del patógeno a la célula y como un mensajero secundario para desencadenar respuestas inmunes adicionales como la expresión de genes de defensa y cierre de estomas (Lamb y Dixon, 1997; Suzuki *et al.*, 2011; Nathan y Cunningham-Brussel, 2013; Gilroy *et al.*, 2014). Durante las respuestas MTI y ETI, la producción de ROS depende mayoritariamente de RBOHD, de hecho, plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes en *rbohD* no producen ROS después del tratamiento con MAMP's o lo producen escasamente cuando son infectadas con cepas patogénicas que desencadenan la ETI (Zhang *et al.*, 2007).

Aunque la producción de ROS inducida por patógenos se documentó hace más de 30 años (Doke, 1983), los detalles sobre su mecanismo de activación permanecen poco claros. Desde que se identificó que las RBOH's poseen motivos de mano EF de unión a Ca^{2+} en su dominio N-terminal, se pensó que el Ca^{2+} era importante para su regulación. Actualmente, se ha demostrado que el Ca^{2+} apoplástico es necesario para la producción de ROS (Kadota *et al.*, 2004; Ranf *et al.*, 2011; Segonzac *et al.*, 2011; Kadota *et al.*, 2014) (Figura 4). Por otro lado, estudios recientes han demostrado una regulación directa independiente de Ca^{2+} , llevada a cabo por el complejo PRR's (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014) (Figura 4). Se ha reportado por medio de análisis bioquímicos que RBOHD se asocia *in vivo* con el complejo PRR y que BIK1 fosforila directamente a RBOHD después de la percepción del MAMP (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Mientras que esta asociación se ha propuesto como constitutiva, otro estudio ha reportado que RBOHD se disocia de BIK1 después de la percepción del MAMP (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, en ambos casos, se mostró que BIK1 fosforila los residuos Ser39, Ser 339, Ser 343 y Ser 347 situados en el dominio N-terminal de RBOHD. Además, estudios fosfoproteómicos cuantitativos, demostraron que sólo BIK1 tiene la facultad de fosforilar a Ser39, Ser339, Ser343, mientras que tanto BIK1 y CPK's pueden fosforilar a Ser347 (Figura 3). La fosforilación mediada por BIK1 puede ocurrir en ausencia de Ca^{2+} o en plantas mutantes en *cpk5*, *cpk6* y *cpk11*, mostrando que esta fosforilación es independiente de Ca^{2+} . Sin embargo, la fosforilación de Ser 163 es dependiente de Ca^{2+} y no es fosforilada por BIK1, sugiriendo que esta fosforilación es específica de CPK's. A pesar que en los últimos años, se ha logrado un gran avance en nuestro entendimiento sobre los mecanismos regulatorios de la producción de ROS, se requieren estudios más profundos sobre otros posibles reguladores de esta producción.

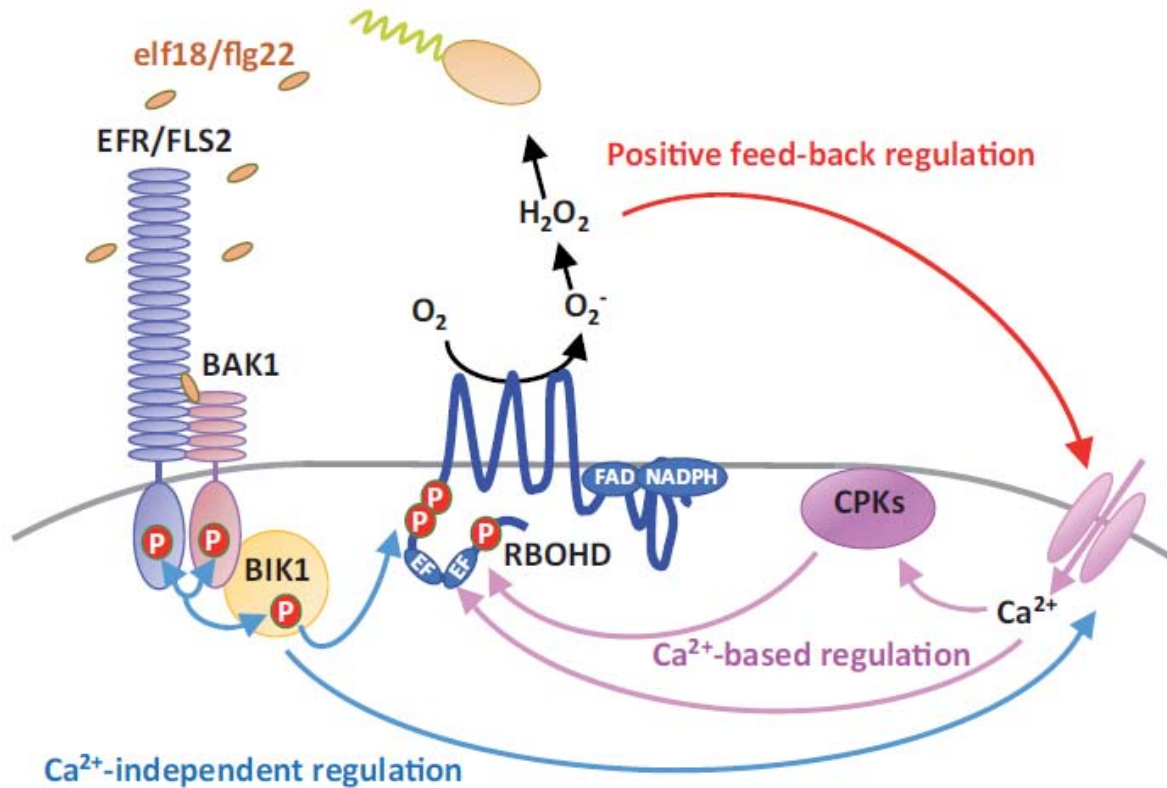


Figura 4. Modelo dual para la activación de RBOHD durante la inmunidad. *Plant Cell Physiol.* (2015). 56(8): 1472-1480.

1.3.3.4. Activación de MAPK.

Las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) juegan un papel esencial en las vías de señalización inmune intracelular. En general, la señalización MAPK es iniciada por un estímulo que desencadena la activación de una MAPKKK (Hirt y Scheel 2000; Nurnberger y Scheel, 2001; Tena *et al.*, 2001). La activación de esta MAPKKK, puede ser directa o indirectamente afectada por un PRR que a su vez genera la fosforilación y activación de una MAPKK río abajo. Subsecuentemente, la MAPKK fosforila a una MAPK generando cambios en la localización celular y/o fosforilación de substratos incluyendo a factores de transcripción, los cuales pueden alterar los patrones de la expresión génica (Figura 5). Algunos de los PRR mejor estudiados que pueden estimular la red de señalización MAPK sobre la percepción de MAMP's incluyen al receptor de flagelina FLS2 (Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez y Boller, 2000), el receptor del

factor de elongación bacteriano EF-tu, EFR (Zipfel *et al.*, 2006) y el receptor de quitina CERK1 (Miya *et al.*, 2007). El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para 60 MAPKKK, 10 MAPKK y 20 MAPKs (Ichimura *et al.*, 2002), lo que sugiere que las cascadas de señalización MAPK podría no simplemente consistir en un simple MAPKKK, MAPKK y MAPK conectados en conjunto (Rasmussen *et al.*, 2012). De hecho, se ha sugerido que podría existir un nivel de redundancia y que las actividades espaciotemporales tendrían que ser estrictamente reguladas para evitar interferencia en la red de señalización MAPK (Rasmussen *et al.*, 2012). Las MAPK mejor estudiadas en plantas son MAPK3, MAPK4 y MAPK6, éstas MAPK han sido implicadas en la señalización de la defensa desde hace más de una década (Petersen *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002). MAPK11, un homólogo cercano a MAPK4, ha sido reportado recientemente por activarse durante tratamientos con MAMP's (Bethke *et al.*, 2012). MAPK3, MAPK4 y MAPK6 son activadas por el MAMP flg22 y elf18 (Felix *et al.*, 1999; Zipfel *et al.*, 2006). Sin embargo, estas tres MAPK son reguladas diferencialmente por los PRR. Por ejemplo, los dos receptores cinasa BAK1 y BIK1 regulan genéticamente la señalización de MAMP a través de las interacciones con sus PRR afines (Roux *et al.*, 2011; Schwessinger *et al.*, 2011). El alelo mutante de BAK1, *bak1-5* lleva una sustitución adyacente Cys408Tyr en su dominio catalítico cinasa (Roux *et al.*, 2011). Lo que afecta su actividad cinasa regulada por flg22 e inhibe la fosforilación de MAPK4. Sin embargo, el complejo catalítico formado entre *bak1-5* y FLS2 es capaz de inducir la fosforilación de MPK3 MPK6 (Roux *et al.*, 2011; Schwessinger *et al.*, 2011).

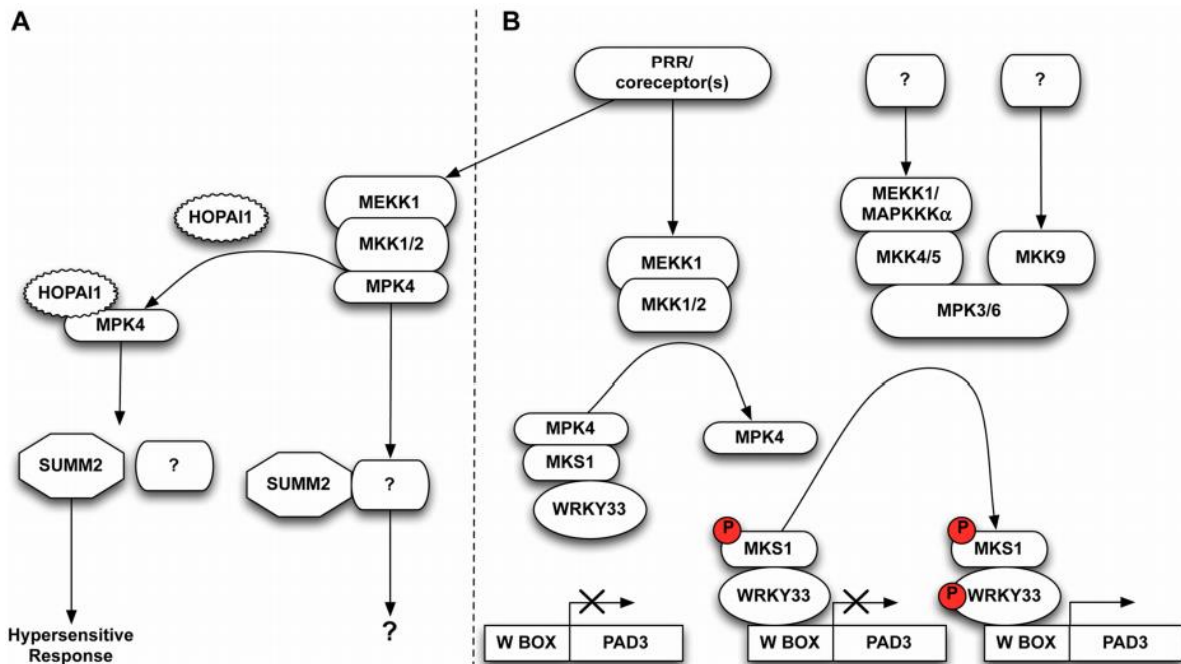


Figura 5. Cascadas de señalización en la respuesta inmune en *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 3.

Un miembro de la familia de los factores de transcripción WRKY, en específico WRKY33 induce la transcripción del gen de Deficiencia de Fitoalexina 3 (PAD3, por sus siglas en inglés) el cual codifica una monooxigenasa 71B15 del citocromo P450 que es requerida para la síntesis del compuesto antimicrobiano camalexina (Qiu *et al.*, 2008a) (Figura 5). Interesantemente, la actividad de MAPK3 y MAPK6 también induce la producción de camalexina. La sobreexpresión constitutiva de mutantes fosfomiméticas de MAPK4 y MAPK5, las cuales están río arriba de MAPK3 y MAPK6 ha sido reportada por inducir la transcripción de PAD2, el cual codifica a una sintetasa γ -glutamilcisteína que funciona en la síntesis de glutatión, y PAD3 (Ren *et al.*, 2008). Además, tanto PAD2 y PAD3 son necesarias para la producción de camalexina (Parisy *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008).

Mao *et al.*, (2011), propusieron un modelo en *Nicotina benthamiana* para delinear la relación entre MAPK3 y MAPK6, donde reportan que WRKY33 es un sustrato para la actividad de MAPK3 y MAPK6, además, la sobreexpresión de formas no

fosforiladas de WRKY33 podría no completar la incapacidad de mutantes en *wrky33* de expresar PAD3 y acumular camalexina (Figura 5).

Aunque en los últimos años, los esfuerzos por el entendimiento de la red reguladora MAPK han sido extensos, los mecanismos moleculares y factores extra asociados en la regulación aún no han sido comprendidos. Esta situación requiere de tecnología más precisa para poder entender la actividad espaciotemporal de la actividad de las cascadas de señalización de las MAPK y evidentemente, estudios sobre esto son necesarios.

1.3.3.5. Reprogramación Transcripcional

La invasión por patógenos a menudo induce una profunda y dinámica reprogramación de la expresión génica en la planta, la cual es de vital importancia para una respuesta efectiva por parte de ésta (Buscaill y Rivas, 2014; Tsuda y Somssich, 2015). Durante la percepción de diferentes MAMP's por los PRR's, como flg22, elf18, peptidoglicano y quitina, un conjunto de genes son comúnmente sobreexpresados (Zipfel *et al.*, 2006; Gust *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Además, tratamientos con DAMP's como oligogalacturonidos (OGs) y fragmentos de pectina liberados de la pared celular de la planta por enzimas fúngicas, activan una reprogramación transcripcional similar a las inducidas por flg22 (Denoux *et al.*, 2008). De hecho, perfiles transcripcionales han revelado que la expresión de miles de genes es alterada significativamente durante la MTI. Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, expuestas a flg22 de 30-60 minutos mostraron una expresión de un conjunto de genes involucrados en la percepción y traducción de señales, así como la regulación transcripcional (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004). Los genes prominentes que fueron inducidos por el tratamiento con flg22 en etapas tempranas durante la MTI, fueron miembros de la familia de Factores de Transcripción (TF) WRKY. De hecho, 15 miembros de esta familia, fueron altamente inducidos 30 minutos después del tratamiento con flg22 incluyendo a WRKY18, WRKY33 y WRKY40 (Zipfel *et al.*, 2004) que recientemente han sido caracterizados

como importantes “HUBs” funcionales dentro de la red regulatoria WRKY (Choura *et al.*, 2015). La importancia de los factores de transcripción WRKY en la regulación temprana de la MTI fue reportada por los análisis en la secuencia de promotores de genes inducidos por flg22, los cuales revelaron una sobre representación de elementos de DNA enriquecidos en motivos W-box, que en el sitio de unión de los factores de transcripción WRKY (Navarro *et al.*., 2004). De manera similar, los motivos W-box, fueron altamente representados en promotores de un largo grupo de genes que codifican RLK igualmente inducidos por los tratamientos con flg22 (Zipfel *et al.*, 2004). Los factores de transcripción WRKY han sido reportados como importantes reguladores de funciones esenciales durante las respuestas celulares desencadenadas por patógenos en numerosas especies de plantas (Rushton *et al.*, 2010; Tsuda y Somssich, 2015). Por ejemplo, se ha revelado el papel de AtWRKY33 como un regulador positivo clave durante la resistencia contra el hongo necrotrófico *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinérea* (Zheng *et al.*, 2006; Birkenbihl *et al.*, 2012). AtWRKY18 y WRKY40, actúan redundantemente regulando negativamente la resistencia contra el hongo hemibiotrófico obligado *Golovinomyces orontii* (Pandey *et al.*, 2010). Por otra parte, estudios genéticos han revelado que estos dos factores de transcripción WRKY tienen funciones duales, actuando como reguladores negativos de la MTI y como regulador positivo de la ETI mediada por el principal gen de resistencia RPS4 y en la resistencia contra el herbívoro *Spodoptera littoralis* (Xu *et al.*, 2006; Lozano-Durán *et al.*, 2013; Schön *et al.*, 2013; Schweizer *et al.*, 2013). En el caso de WRKY11 y WRKY17, se ha reportado un papel en la regulación negativa de la resistencia basal contra cepas virulentas de *Pseudomonas syringae* pv. 3000, debido a que en mutantes en *wrky11*, se presentó un incremento en la resistencia y dobles mutantes en *wrky11* y *wrky17* mostraron una resistencia mejorada frente a la enfermedad inducida por la misma cepa (Journot-Catalino *et al.*, 2006).

Otros procesos celulares involucrados en la reprogramación transcripcional, son las modificaciones en la cromatina y la interacción con sRNAs por parte de los factores de transcripción WKRY's. Por ejemplo, se ha reportado que WRKY38 y 62

interaccionan con la desacetilasa de histonas 19 (HDAC19), un factor de remodelación de la cromatina que contribuye a la represión global de la transcripción (Kim *et al.*, 2008). La sobreexpresión de HDAC19 mejoró la resistencia a *P. syringae*, mientras que mutantes en *hdac19* fueron comprometidas en la resistencia. A su vez, los procesos de sRNAs relacionados con la adaptación a estreses de tipo biótico y abiótico han incrementado considerablemente. Por ejemplo, tratamientos con fitohormonas inducen la expresión de varios miRNA's en arroz (Liu *et al.*, 2009). Además, objetivos previstos para miRNAs codifican para factores de transcripción WRKY's (Zhang *et al.*, 2008), sugiriendo una regulación mediada por sRNAs de los factores de transcripción WRKY. Claramente, los cambios masivos transcripcionales relacionados con el sistema inmune en plantas implican un extensivo interactoma entre los factores de transcripción y las regiones de unión dentro del genoma. Y pesar del progreso que se ha realizado estos últimos años, la maquinaria exacta por la cual los factores de transcripción, sRNAs, modificaciones en la cromatina y posibles proteínas asociadas a esta maquinaria, sigue permaneciendo poco claro.

1.3.3.6. Deposición de Calosa

Además de la HR para un colapso rápido de las células atacadas por el patógeno (Coll *et al.*, 2011), la producción de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas (Badnaker y Osbourn, 2009) y biosíntesis de enzimas para descomponer la pared celular del patógeno (Mauch *et al.*, 1998). Existen modificaciones en la pared celular de la planta durante la MTI y la ETI como la deposición de calosa, un polímero (1,3)- β -glucano (Aist, 1976). Esta deposición es llevada a cabo en el sitio de infección y se piensa que interviene como una barrera física para retardar la invasión del patógeno (Stone y Clarke, 1992). Comparado con otras respuestas de defensa que pueden ser específicas para cada especie de patógeno, la deposición de calosa puede ser considerada como una respuesta ubicua debido a que parece ser inducida en todas las plantas después del ataque de un patógeno. En general, la deposición de calosa es una respuesta temprana y

puede contribuir a la inmunidad en las plantas (Jones y Dangl, 2006; Schwessinger y Ronald, 2012). Para retardar la invasión del patógeno en el tejido infectado, la calosa puede ganar tiempo para generar respuestas de defensa adicionales que a menudo requiere la activación y expresión de genes específicos (Boller y Felix, 2009). Las zonas de la pared celular ricas en calosa, no solo se ha encontrado en casos de resistencia exitosa sino también en sitios de penetración por patógenos (Aist, 1976). Las sugerencias sobre el fortalecimiento de la pared celular mediada por calosa y su contribución en la resistencia frente a la penetración de patógenos, fue apoyada por estudios en mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Mutantes carente de una sintasa de calosa inducida por estrés (*RPM4* o *GSL5*) mostraron ausencia de deposición en sitios de intento de penetración fúngica, además, mostraron una inesperada mejora en la resistencia contra especies que provocaban oídio (Nishimura *et al.*, 2003). Estos resultados, demostraron que en hojas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, los niveles de calosa no contribuían a la resistencia en los sitios de penetración frente a especies adaptadas que provocaban oídio. Sin embargo, la deposición de calosa fue requerida para el mantenimiento de una alta tasa de resistencia a penetración frente al patógeno no adaptado *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, el cual fue evaluado también en plantas mutantes en *rpm4* (Ellinger *et al.*, 2013). Interesantemente, estudios adicionales de microarreglos mostraron que la resistencia frente a patógenos adaptados se debió a una hiperactividad de la vía del SA en mutantes de *rpm4* (Nishimura *et al.*, 2003). La resistencia mediada por el SA en las mutantes en *rpm4*, podría no estar directamente relacionada con la ausencia de calosa debido a que el éxito en la penetración de especies inductoras de oídio no fue diferente en plantas Col-0 y en las mutantes en *rpm4* en las etapas tempranas de infección (Consonni *et al.*, 2010; Ellinger *et al.*, 2013). Por otra parte, el confinamiento espacial de la calosa entre la pared celular y la membrana plasmática sugieren un transporte directo de calosa y enzimas de síntesis de la pared celular, lo cual podría implicar un proceso de polarización de la pared celular (Schmelzer, 2002; Koh *et al.*, 2005). El reordenamiento del citoesqueleto, parece jugar un papel importante en este proceso. Los filamentos de actina podrían estar involucrados en la liberación de vesículas y el transporte de organelos (como el aparato de Golgi o

el núcleo) al sitio de infección. Esto ha sido apoyado por experimentos donde la formación y el reordenamiento de actina fueron inhibidos, resultando en un decremento en la resistencia frente a patógenos fúngicos (Kobayashi *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 2003). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en el reforzamiento de la pared celular no se han limitado al reordenamiento del citoesqueleto y al papel de gen *RPM4*, sino también al papel de las proteínas argonauta, en especial de AGO1. Experimentos en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* en *ago1-25* y *ago1-27* sometidas al tratamiento con flg22 mostraron una reducción significativa en la deposición de calosa comparada con la Col-0 (Li *et al.*, 2010).

Durante la última década, numerosos estudios han revelado la funcionalidad de la deposición de calosa como un mecanismo protector frente al ataque por patógenos. Sin embargo, la medida de su contribución en la inmunidad, así como en la resistencia a la penetración, aún es objeto de discusión. Por otra parte, estudios actuales evidencian el papel de proteínas adicionales que podrían tener un papel en la regulación de esta respuesta de defensa, lo que ha suscitado dudas sobre el posible papel de otros miembros de la familia de las proteínas AGO u otros factores de regulación.

1.4. Proteínas Argonauta

Las proteínas Argonauta (AGO's) fueron originalmente descritas como importantes reguladoras en el desarrollo de la planta (Moussian *et al.*, 1998; Bohmert *et al.*, 1998) y en la división celular de células madre en *Drosophila melanogaster* (Lin y Spradling, 1997). Éstas proteínas tienen la capacidad de interactuar con RNA's pequeños no codificantes para formar el denominado Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés), el cual es un componente crítico en las vías de silenciamiento de la expresión génica (Bartel, 2009). Estos RNA's pequeños (sRNA's) con cargados en las proteínas AGO's y regulan negativamente la expresión de genes blanco con secuencias complementarias (Hutvanger y

Simmard, 2008). A diferencia de los animales, las plantas poseen al menos 10 genes que codifican para distintas AGO's (Vaucheret, 2008). Las proteínas AGO's poseen cuatro dominios distintos, un N-terminal, PAZ, Mid y PIWI. De hecho, todas las proteínas AGO's que juegan un papel en los mecanismos de regulación génica mediada por sRNA's, siempre cuentan con estos dominios. El dominio PAZ se encuentra en las proteínas AGO's y Dicer, dos proteínas protagonistas en los mecanismos de RNAi, este dominio alberga dos subdominios, uno de los cuales cuenta con un plegamiento tipo OB (de unión a oligonucleótido u oligosacárido), el cual indica que el motivo PAZ podría unirse a ácidos nucleicos de cadena sencilla (Song *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003; Lingel *et al.*, 2003). De hecho, estudios cristalográficos combinados con enfoques bioquímicos mostraron que el dominio PAZ se une a ssRNA's (RNA de cadena sencilla, por sus siglas en inglés) con baja afinidad de una manera independiente de la secuencia (Ma *et al.*, 2004; Lingel *et al.*, 2004). Una característica del dominio PAZ, es que puede reconocer el 3' final de ssRNA's, debido a que tanto miRNA's y distintos tipos de siRNA's (RNA's pequeños interferentes, por sus siglas en inglés) son cortados por la acción secuencial de la enzima RNasa de tipo III (Drosha y Dicer en animales, o sólo Dicer en levaduras y plantas), la cual deja un característico 3' "overhangs" en el producto procesado, por lo que el dominio PAZ puede distinguir inicialmente RNA's regulatorios de RNA's derivados de vías no relacionadas por la unión a su respectivo 3' overhangs. Por otra parte, durante las investigaciones sobre las proteínas argonauta en archaeas y bacterias y en la proteína con dominio PIWI de la archaea *Archaeoblobus fulgidus*, las cuales carecen de los dominios N-terminal y Paz, revelaron que el dominio PIWI tiene un pliegue tipo RNasa-H, con la capacidad de escindir RNA usando un templado de DNA. Esta catálisis requiere de un motivo conservado de Asp-Asp-Glu/Asp en el centro catalítico y la unión de dos iones metálicos divalentes por una ribonucleasa. Las proteínas argonauta con la facultad de escisión, tienen un centro catalítico ligeramente más degenerado (Asp-Asp-Asp/Glu/His/Lis) y requieren la unión de un catión divalente para su actividad (Tolia y Joshua-Tor, 2007). Además, sus productos escindidos contienen un 3'-OH y 5'-fostato, los cuales son también característicos de procesamiento de la enzima

RNasa-H. Análisis filogenéticos en *Arabidopsis thaliana*, agrupan a las proteínas AGO's en tres clados. AtAGO1, AtAGO5 y AtAGO10 dentro del primer clado; AtAGO2, AtAGO3 y AtAGO7 dentro del segundo; y AtAGO4, AtAGO6, AtAGO8 y AtAGO9 dentro del tercer clado (Figura 6) (Morel *et al.*, 2002). El primer miembro de la familia de las proteínas AGO's fue identificado a través de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que exhibían defectos de desarrollo pleiotrópicos (Bohmert *et al.*, 1998). Éstas mutantes fueron nombradas como *Argonauta1*, debido a que sus defectos en las hojas parecían tentáculos de un pequeño calamar del género *Argonauta*.

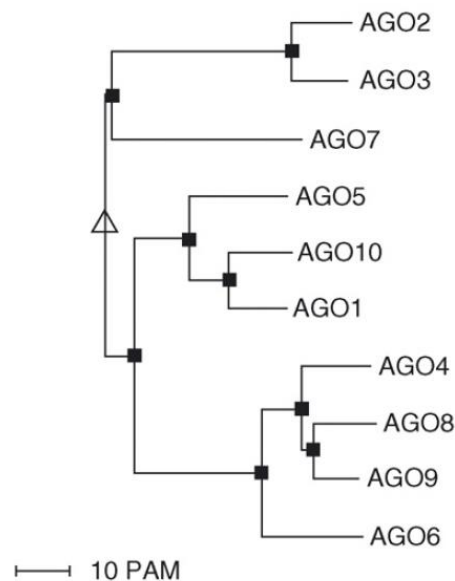


Figura 6. Clasificación filogenética de proteínas AGO en *Arabidopsis thaliana*. Trends Plant Sci. 13:350–358.

Actualmente, estudios han revelado papeles para estas proteínas en conjunto con sRNA's en varios procesos celulares, tales como desarrollo, respuesta a estrés, metabolismo, mantenimiento e integridad del genoma, control de la síntesis proteica, estabilidad del RNA, y en la producción de conjuntos específicos de RNA's pequeños no codificantes (Hutvagner y Simard, 2008). Sin embargo, la evidencia de la participación de estas proteínas en el sistema inmune en plantas ha permanecido poco esclarecido hasta hace algunos años que se ha reportado la

importancia de sRNA's endógenos del huésped y componentes de la vía de sRNA's en las respuestas inmunes contra varios patógenos como bacterias, hongos, oomicetos y virus. Las respuestas de defensa mediadas por sRNA's son reguladas a través de diversas vías y de componentes de sus propias vías, como proteínas tipo Dicer, Polimerasas de RNA dependientes de RNA (RDR, por sus siglas en inglés), proteínas AGO's y RNA polimerasa IV y V, las cuales exhiben especificidades funcionales y en algunos casos redundancia (Sea *et al.*, 2013). Los sRNA's, son moléculas de RNA a menudo cortas y no codificantes que guían el silenciamiento génico a través del silenciamiento génico transcripcional (TGS, por sus siglas en inglés) o por medio del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) (Baulcombe 2004). Éstos sRNA's se subdividen en dos subgrupos, microRNAs (miRNAs) y RNA's pequeños interferentes (siRNAs), basados en su origen y biogénesis. En plantas, los siRNA's se pueden clasificar como trans-acting siRNA's (ta-siRNA's), siRNA's heterocromáticos (hc-siRNA's), siRNA derivados de transcritos de antisentido natural (nat-siRNA's), o siRNA's largos (lsiRNA's) (Chapman y Carrington 2007; Katiyar-Agarwal y Jin 2010). Durante la última década estudios han revelado las diversas vías, incluyendo una amplia variedad de componentes celulares que regulan la biogénesis de los sRNA's y su modo de acción, y aunque hay características específicas entre las vías, existen en general tres pasos críticos: 1) la generación de un RNA de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés), 2) el procesamiento del dsRNA en un sRNA's y 3) el silenciamiento de los genes blanco por complejos efectores incorporados a los sRNA's.

Aunque los sRNA's tienen papeles en la regulación de una multitud de procesos biológicos básicos, incluida la respuesta inmune, existe evidencia que indica que los componentes celulares asociados en la vía de sRNA's son también involucrados en las respuestas de defensa contra patógenos (Figura 7).

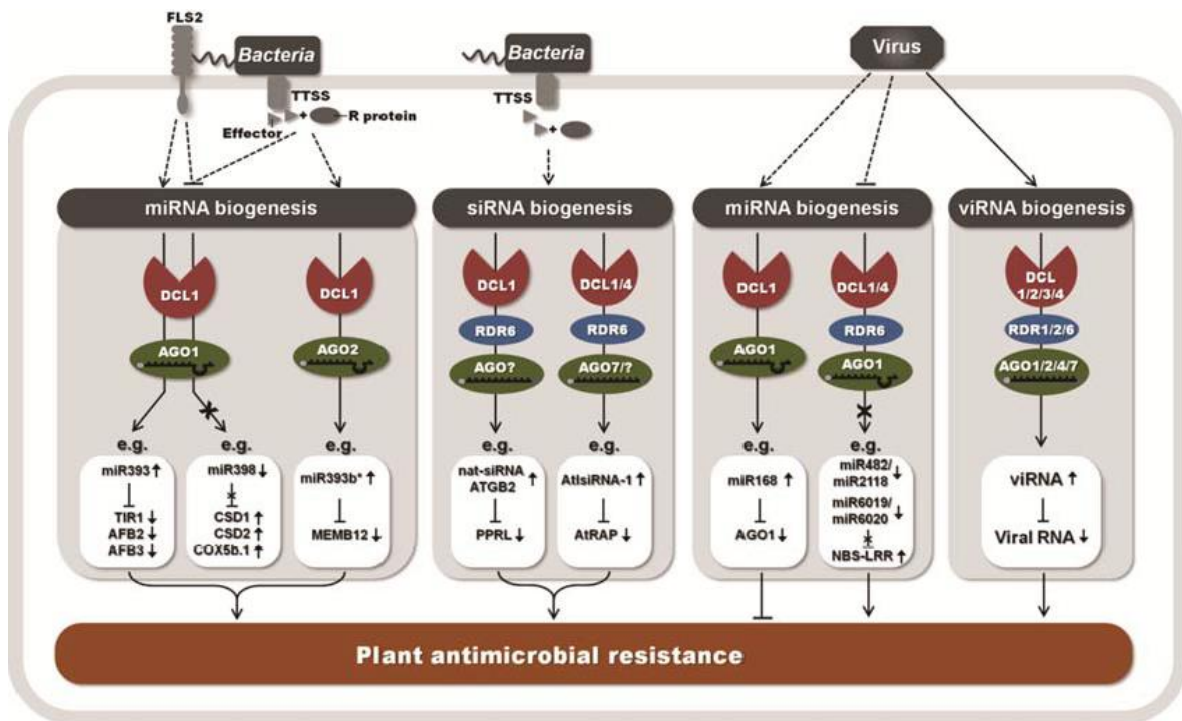


Figura 7. Contribución de las vías regulatorias de sRNAs en la respuesta inmune. Mol. Plant-Microbe Interact. 26:617–25

En *Arabidopsis thaliana* AGO1, AGO2, AGO5 y AGO7, se unen principalmente a sRNA's de 21 a 22 nucleótidos (tanto a miRNA's o siRNA's endógenos o exógenos) y dirigen el PTGS (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008), mientras que AGO4, AGO6 y AGO9 se unen a sRNAs de 24 a 26 nt y son involucrados en el TGS (Zilberman *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007; Havecker *et al.*, 2010).

El papel de AGO1 en la inmunidad innata en plantas, es apoyado por evidencia que muestra que plantas mutantes en *ago1*, presentaron respuestas disminuidas durante la MTI (Li *et al.*, 2010). AGO1 funciona principalmente a través de la asociación con miRNA's. De hecho, algunos miRNA's regulan positivamente la MTI, por ejemplo, miR393 es inducido por el elicitor bacteriano flg22, contribuyendo a la resistencia bacteriana por la escisión del RNA mensajero (mRNA) que codifica para el receptor de auxina, de respuesta a inhibición de transporte 1 (TIR1) y proteínas relacionadas, por lo tanto, regulando negativamente la señalización de auxina y trasladando la energía para procesos de crecimiento a la defensa basal (Figura 7)

(Navarro *et al.*, 2006). Por otro lado, otros miRNA's regulan negativamente la inmunidad innata, por ejemplo, flg22 y cepas no virulentas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, regulan a la baja a miR398, resultando en una sobre regulación de sus genes blanco, como superóxido dismutasa de cobre/zinc, dando lugar a una regulación positiva de la resistencia bacteriana (Jagadeeswaran *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Por otra parte, un estudio reciente ha mostrado que AGO2 juega un papel esencial en las respuestas inmunes antibacterianas. De hecho de las diez proteínas argonauta contenidas en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, AGO2 es altamente inducida por la infección tanto con la cepa virulenta de *P. syringae* pv. tomato y la cepa no virulenta *P. syringae* pv. tomato (*avrRpt2*), y plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* en *ago2* presentaron una alta susceptibilidad a ambas cepas (Zhang *et al.*, 2011). Interesantemente, la secuenciación de los sRNAs pequeños asociados a AGO2 después de la inmunoprecipitación, mostró que uno de los miRNA's más abundantes en AGO2 fue miR393*, mientras que miR393, el cual juega un papel en la MTI, se asocia principalmente con AGO1. La formación del complejo AGO2-miR393* tiene como objetivo un gen que se localiza en el aparato de Golgi, MEMB12, el cual codifica a una proteína SNARE que controla el tráfico retrógrado. La inducción de AGO2 permite un incremento en la formación del complejo AGO2-miR393* promoviendo el silenciamiento de MEMB12, el cual suprime la endocitosis proteica y el reciclaje, dando como resultado un aumento en la exocitosis de proteínas relacionadas con la patogénesis bacteriana (PR1). Por otro lado, AGO7, un proteína perteneciente al clado de AGO2 y AGO3, mostró una disminución en la ETI mediante la infección de *P. syringae* pv. tomato (*avrRpt2*) pero no mostró efectos obvios en la MTI (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). AGO7 participa en la biogénesis de AtlsiRNA-1, un siRNA endógeno que regula la ETI mediada por RPS2 (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2007). Además, AGO7 se asocia principalmente con miR390, el cual desencadena la producción del ta-siRNAs TAS3 que subsecuentemente regula la expresión de componentes de la vía de señalización de auxinas, nombrados genes ARF (Fahlgren *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2008), los cuales pueden regular tanto positiva como negativamente las respuestas de

defensa. Por otra parte, durante un screen genético se identificó una mutante de *ago4* que exhibía una resistencia reducida tanto a la cepa virulenta *P. syringae* pv. tomato y a la cepa no virulenta *P. syringae* pv. tomato (*avrRpm1*), indicando que AGO4 es requerida para la resistencia bacteriana en *Arabidopsis thaliana* (Agorio y Vera, 2007). Sin embargo, AGO4 y AGO6, son reguladas a la baja por la infección bacteriana y por el tratamiento con el elicitor flg22, implicando un papel negativo de estas proteínas en la inmunidad antibacteriana (Yu *et al.*, 2013).

AGO5, una proteína perteneciente al clado de AGO1 y AGO10, es el segundo parálogo más cercano a AGO1 (después de AGO10) (Figura 6). Mutantes de *Arabidopsis thaliana* no han sido recuperados hasta ahora por medio de “screens” genéticos, sin embargo, mutantes en *ago5*, recuperados por genética inversa no exhiben defectos obvios en el desarrollo (Vaucheret, 2008). Sin embargo, y de acuerdo a nuestros conocimientos, éste es el primer estudio donde se ha logrado recuperar una sobreexpresante de AGO5 por medio de screens genéticos, además de usar una mutante *ago5-1* (-/-) previamente reportada (Brosseau y Moffett, 2015). AGO5 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, además, experimentos de inmunoprecipitación han mostrado que AGO5 se asocia preferencialmente con sRNA's con citosina en el extremo 5'-terminal (5'C) (Takeda *et al.*, 2008). De hecho, miR169 es uno de los pocos miRNA's con 5'C y a pesar de los papeles que juega en la floración en plantas como petunia (Cartolano *et al.*, 2007) y en la nodulación de *Medicago* (Combier *et al.*, 2007), el papel de AGO5 en *Arabidopsis thaliana* aún no ha sido descifrado, haciendo difícil evaluar la disfunción de miR169 en plantas mutantes de *ago5*. Interesantemente, el genoma de arroz cuenta con seis probables parálogos de AGO5 en *Arabidopsis*. Uno de estos genes corresponde a la Meiosis arrestada en Leptoteno 1, nombrado después de la identificación de la semilla mutante estéril *mel1*. MEL1 es esencial para la mitosis pre-meiótica y la progresión de la meiosis durante la esporogénesis (Nonomura *et al.*, 2007). Sin embargo, plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* alteradas en el único gen de AGO5 no mostraron efectos obvios en el desarrollo, mientras que en plantas de arroz, la alteración de uno de los genes parálogos de AGO5, causó esterilidad en las plantas.

Sugiriendo que la función de MEL1 en arroz, es realizada por otra proteína AGO en *Arabidopsis thaliana*. Por otra parte, un reporte actual, ha revelado un papel para AGO5 en la coloración de la semilla en *Glycine max*, además, cuando el gen de AGO5 no era funcional, se presentó una distribución alterada de siRNA's (Cho *et al.*, 2017). Actualmente, los conocimientos sobre el papel de AGO5 durante la respuesta inmune innata en *Arabidopsis thaliana*, se han limitado a elucidar algunas de sus principales características durante la defensa contra virus. Por ejemplo, un reporte reciente ha demostrado que todas las proteínas AGO son capaces de marcar al virus de la papa X (PVX, por sus siglas en inglés) carente de un supresor de silenciamiento viral (VSR), P25. Pero que solo AGO2 y AGO5 son capaces de marcar al PVX silvestre (Brosseau y Moffett, 2015). Además, demuestran que tanto AGO2 y AGO5 poseen sitios catalíticamente activos para escindir sRNA's y que la expresión de AGO5 durante la infección se da principalmente en tejidos sistémicos. Sin embargo, el papel de AGO5 durante los eventos moleculares tempranos de la MTI aún es desconocido.

2. Justificación e Hipótesis

2.1. Justificación

La fitopatogenicidad es uno de los problemas con mayor incidencia a nivel mundial, los efectos de ésta a menudo resultan en la muerte o en un déficit en la producción de frutos y semillas. Actualmente, diversas proteínas AGO han sido caracterizadas en *Arabidopsis thaliana* como importantes reguladoras de los eventos moleculares tempranos que subyacen entre la interacción planta-patógeno. Sin embargo, de acuerdo a nuestros conocimientos, el papel de AGO5 en la regulación de la MTI no ha sido revelado. Por lo que el propósito de este estudio, es demostrar el posible papel de AGO5 en los eventos moleculares tempranos de la MTI. Entender los mecanismos moleculares que subyacen durante las etapas tempranas de infección nos brindaría la posibilidad de tener líneas genéticas más resistentes frente al ataque por patógenos. Además permitiría comprender y mejorar la primera línea de defensa que es montada frente a la percepción de MAMP's, lo cual reduciría notablemente el costo energético que necesita la planta para activar la ETI.

2.2. Hipótesis

La sobreexpresión de AGO5 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* presentarán características fenotípicas mejoradas en comparación con los demás genotipos empleados, así como una probable regulación negativa en genes marcadores de una MTI exitosa y una producción de ROS deficiente.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

3.1.1. Determinar el papel de AGO5 en la regulación de la respuesta inmune inducida por flagelina 22 en *Arabidopsis thaliana*.

3.2. Objetivos Particulares

3.2.1. Determinar la sobreexpresión de AGO5 por Western Blot y qRT-PCR.

3.2.2. Describir el efecto de AGO5 sobre las respuestas morfológicas inducidas por flagelina 22.

3.2.3. Evaluar el efecto de AGO5 en la producción de ROS como una respuesta inmune en presencia de flagelina 22.

3.2.4. Evaluar los niveles de expresión de los genes marcadores de una MTI exitosa inducidos por flagelina 22: *WRKY11*, *WRKY18*, *WRKY33*, *WRKY40*, *FRK1* y *PER5*.

4. Materiales y Métodos

4.1. Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento

Para los experimentos de evaluación fenotípica, producción de ROS y análisis de expresión génica, se empleó la línea de *Arabidopsis thaliana* Col-0, y un conjunto de mutantes que consistió en una sobreexpresante de AGO5 (OxAGO5), una knockout (KO) de AGO5 (*ago5-1 (-/-)*) y una mutante KO de FLS2 (*fls2 (-/-)*) como control negativo (Tabla Suplementaria 1). Todas las líneas usadas en estos experimentos han sido validadas previamente, incluyendo *ago5-1 (-/-)* (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2008; Brosseau y Moffett, 2015) y *fls2 (-/-)* (Heese *et al.*, 2007). Las semillas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y el conjunto de mutantes, fueron desinfectadas con etanol al 70% durante un minuto, posteriormente se agregó una solución de cloro comercial con Tween 20 al 0.05% y se dejaron reposar durante 5 minutos, finalmente las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril de 5-6 veces. Para el crecimiento *in vitro* de las semillas de *Arabidopsis thaliana* se empleó medio MS 1/4 (Murashige y Skoog, 1962) sólido y líquido suplementado con sacarosa al 1%, pH de 5.7 y agarosa al 1% (para el medio MS sólido). La temperatura fue de 20-21 °C, 65% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

4.2. Obtención y secuencia del MAMP flg22

El MAMP flg22 empleado en todos los experimentos de este estudio fue obtenido a través de la compañía GeneScript (USA), el cual tuvo la secuencia: QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA.

4.3. Ensayo de Inhibición de Crecimiento

Se realizaron 10 réplicas biológicas independientes, cada una de ellas conteniendo 12 plantas por tratamiento de cada genotipo (n=12). Plántulas de *Arabidopsis*

thaliana de 5 días de edad crecidas en medio MS sólido fueron pasadas a placas de microtitulación de 24 pozos con medio MS líquido suplementado con 100 nM de flg22. A los 10-12 días posteriores al tratamiento con el MAMP flg22 se realizó una evaluación fenotípica que incluyó la medición de la raíz principal de las plántulas. Para el análisis de datos se realizó el método de ANOVA de un factor con los datos de la longitud de la raíz con el paquete estadístico de R. Los datos fueron presentados como porcentaje de inhibición comparados con el control (Mock).

4.4. Ensayo de ROS

Para los ensayos de producción de ROS se realizaron 4 réplicas biológicas independientes, cada una de ellas conteniendo 16 plantas por tratamiento de cada genotipo empleado (n=16). Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 5 días de edad crecidas en medio MS sólido, fueron pasadas a placas de microtitulación de 96 pozos con medio MS líquido y se dejaron 7 días más para la posterior cuantificación de ROS. Un día antes de realizar el ensayo, la placa de microtitulación que contenía las plántulas de *Arabidopsis thaliana* fue puesta en oscuridad durante toda la noche. En el día 12, el medio MS líquido fue retirado cuidadosamente y se sustituyó con agua ultrapura para el Mock y para el tratamiento se colocó una mezcla que contenía peroxidasa al 0.2% (Sigma Aldrich), luminol sensible Wako al 0.5% y 100 nM de flg22 por cada mililitro de agua ultrapura. La medición se realizó con un equipo de conteo de fotones de baja intensidad (UVITEC, Cambridge). Para el análisis de datos, se realizó el método de ANOVA de un factor en el programa estadístico R. Para cuantificar la producción total de ROS, se usó el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). La producción total de ROS es representada como conteo total de fotones.

4.5. Análisis por Western Blot

El extracto total de proteínas fue aislado de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 13 días de crecimiento con un buffer de extracción para proteínas (50 mM Na₂P₂O₇,

1mM Na₂MoO₄, 25 mM NaCl, 10 mM EDTA-Na, 0.5% PVP, 250 mM Sacarosa, 50 mM HEPES, 5% glicerol, pH 7.5). Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10% cargando una cantidad de 25 µg por carril. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear con leche entera al 5% libre de grasa, se incubó 16 h con el anticuerpo AntiAGO5 (Agrisera). Posteriormente, se lavó la membrana 7 veces con el buffer TBST (250mM Tris; 1.37mM NaCl; 27mM KCl y 1% Tween-20 por litro) se incubó con el anticuerpo IgPX. Finalmente, se reveló con el kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) y se obtuvo la imagen por medio de un equipo de conteo de fotones de baja intensidad (UVITEC, Cambridge)

4.6. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y qRT-PCR

Para los experimentos de qRT-PCR se realizaron 4 réplicas biológicas independientes, cada una de ellas, conteniendo 12 plantas de cada genotipo empleado (n=12). Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 5 días de edad crecidas en medio MS sólido, fueron pasadas a placas de microtitulación de 9 pozos con medio MS líquido y se dejaron 7 días más para la extracción de RNA. En el día 12, se removió el medio MS cuidadosamente y se sustituyó por medio fresco, para el caso del tratamiento, el medio MS fue suplementado por 100nM de flg22 por cada mililitro. Con el objeto de obtener información sobre los eventos tempranos de la MTI, el tratamiento con el MAMP flg22 fue de 1 hora. La extracción de RNA se realizó de acuerdo a las especificaciones del protocolo del kit de extracción de RNA de Zymo Research. Cada genotipo empleado fue separado y procesado paralelamente. El cDNA sintetizado sometido a qRT-PCR fue diluido 1:1 y se usó 1 µl por reacción con primers específicos para los genes *WRKY11*, *WRKY18*, *WRKY33*, *WRKY40*, *FRK1* y *PER5* (Tabla Suplementaria 2) usando el agente SYBR Green. Los experimentos de qRT-PCR fueron realizados en el Real time PCR StepONE de Applied Biosystem. Los datos fueron analizados usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001) donde los niveles de expresión son indicados como expresión relativa comparados con el gen *house keeping* actina.

4.7. Análisis estadísticos.

Todos los análisis estadísticos y generación de plots se realizaron bajo el ambiente estadístico R (<https://www.r-project.org/>). Para todos los análisis de ANOVA y Tukey HSD se incluyeron los datos de cada una de las réplicas biológicas independientes empleadas en los ensayos. Los códigos de significancia para los análisis estadísticos fueron obtenidos también del programa estadístico R (Tabla suplementaria 3).

5. Resultados

5.1. Detección de AGO5 y AGO1 por análisis de Western Blot y qRT-PCR.

Las plántulas de *Arabidopsis* OxAGO5 empleadas en este estudio, fueron obtenidas mediante la inserción de T-DNA en el promotor del gen (Figura 8a). En orden de validar la sobreexpresión de AGO5 y corroborar la ausencia de *ago5-1* (-/-) de las plántulas de *A. thaliana*, se realizó un análisis por Western Blot usando anticuerpos específicos de las proteínas y un análisis de qRT-PCR con primer específicos del gen, para detectar la presencia y ausencia, respectivamente. Para este experimento se usó como control a AGO1, el segundo parálogo más cercano a AGO5 de todos los miembros pertenecientes a la familia de las proteínas AGO. Los resultados obtenidos en los experimentos de Western Blot confirmaron una acumulación de la proteína de AGO5 sólo en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5, validando de esta forma, todos los resultados obtenidos en este estudio. Interessantemente, la presencia de AGO1 fue detectada en todas las plántulas de *A. thaliana*, además, se observó una mayor acumulación de la proteína en plántulas de *Arabidopsis* OxAGO5 y *ago5-1* (-/-) en comparación con las plántulas Col-0 (Figura 8c). Con el propósito de complementar los datos arrojados en los experimentos por Western Blot, se realizó un qRT-PCR para medir los niveles de expresión de AGO5 usando primers específicos del gen, los resultados obtenidos nuevamente confirmaron la sobreexpresión del gen AGO5 en plántulas de *Arabidopsis* OxAGO5 y una expresión nula en las plántulas *ago5-1* (-/-) (Figura 8b).

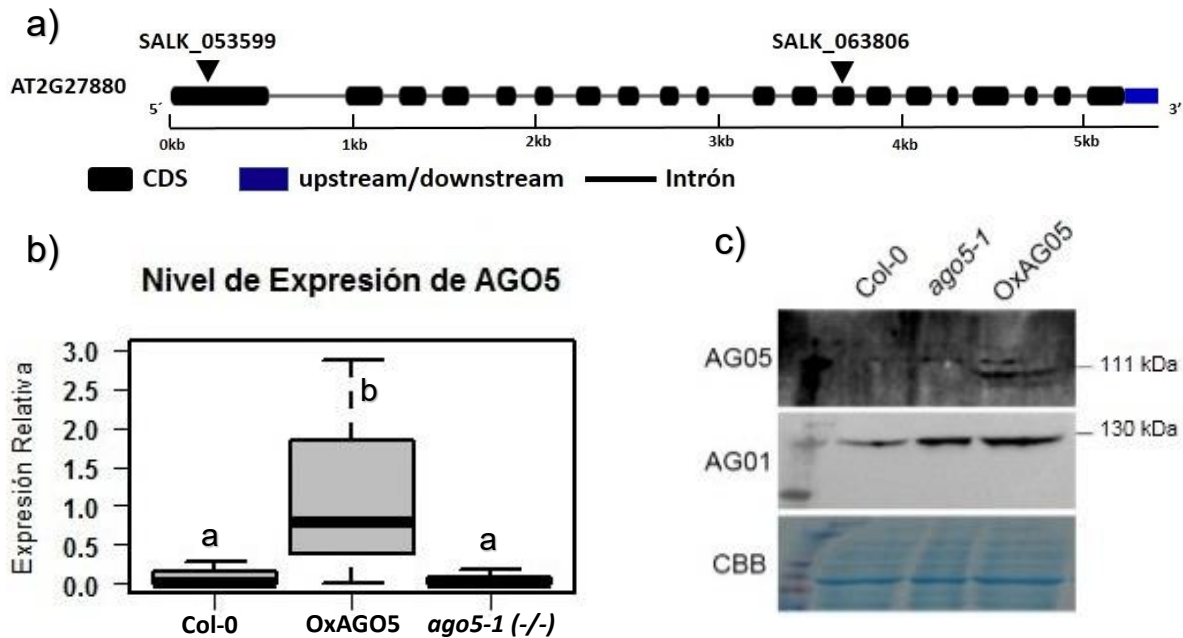


Figura 8. Detección de AGO5 por análisis de Western Blot y qRT-PCR.

Localización de inserción de T-DNA de líneas de mutantes *Arabidopsis thaliana* a). El Fold Change fue calculado de tres réplicas biológicas independientes, cada una conteniendo 12 plantas (P value <0.05) b). El extracto total de proteínas fue obtenido de plántulas de *A. thaliana* de 13 días de crecimiento separadas con SDS-PAGE, seguido de una inmunotransferencia con el anticuerpo AntiAGO5. Las proteínas AGO marcadas con el anticuerpo AntiAGO5 fueron inmunoprecipitadas del mismo extracto y sometidas a la inmunotransferencia con el anticuerpo IgPx. En el panel inferior, se observa la tinción con azul brillante de Coomassie de proteínas del mismo extracto y muestra una carga igual c) Letras diferentes reflejan una diferencia significativa (p value <0.05).

5.2. Tratamiento con flg22 indujo fenotipos diferenciales en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

La flagelina bacteriana y los péptidos que comprenden la región más conservada de la parte N-terminal de la molécula de flagelina, actúan como potentes inductores de la respuesta inmune en una gran variedad de especies de plantas incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Felix *et al.*, 1999). La disminución en el crecimiento de la planta en presencia de MAMP's/DAMP's ha sido bien documentada, sin embargo, parece haber diferencias en órganos específicos (Krol *et al.*, 2010).

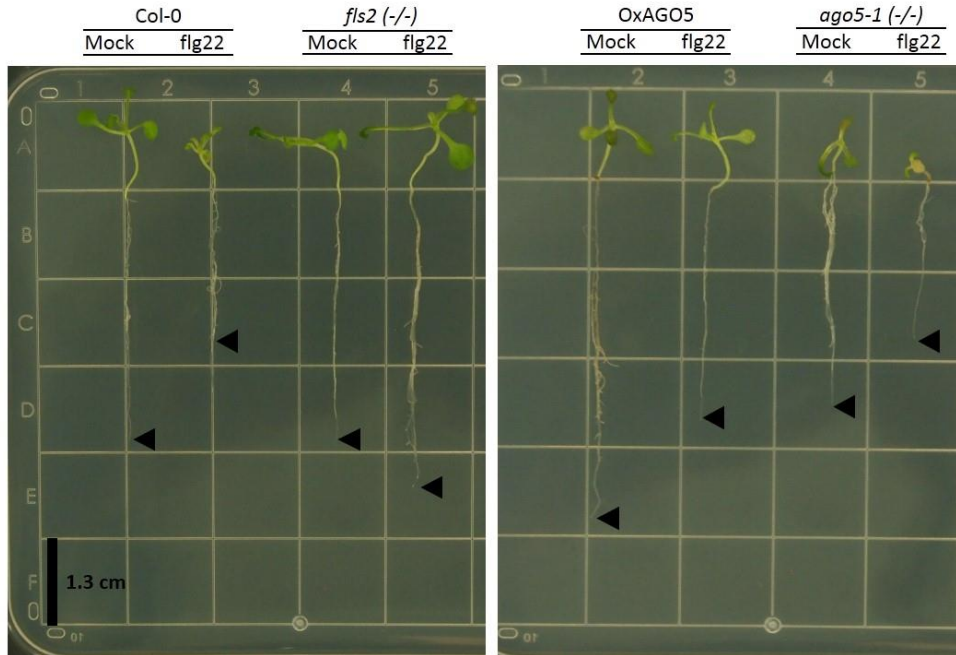


Figura 9. Flg22 indujo una disminución de crecimiento diferencial en distintos genotipos de *Arabidopsis thaliana*.

Fotografía representativa tomada 10 días después del tratamiento con flg22. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 mostraron una disminución en el tamaño de la raíz principal, una coloración amarillenta y un tamaño variable en hojas. La mutante de *ago5-1 (-/-)*, mostró una hipersensibilidad al tratamiento con flg22, sin embargo, las plántulas sobreexpresantes de OxAGO5 presentaron una aparente regulación negativa de la inhibición del crecimiento.

En este estudio, se realizó una reevaluación de las respuestas morfológicas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, OxAGO5 y *ago5-1 (-/-)* tratadas con el MAMP flg22, utilizando como control negativo una mutante KO en el receptor de flagelina (*fls2 (-/-)*, de aquí en adelante). Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 presentaron una disminución significativa en el tamaño de la raíz principal ($\pm 40\%$), así como una coloración amarillenta y un tamaño variable en las hojas (Ranf *et al.*, 2011). Interesantemente, las plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 presentaron una aparente regulación negativa de la inhibición del crecimiento ($\pm 20\%$), en contraste con las plántulas mutantes *ago5-1 (-/-)*, las cuales mostraron una mayor inhibición en el tamaño de la raíz ($\pm 44\%$), además de una elevada hipersensibilidad al tratamiento con flg22 (Figura 9 y Figura 10).

Inhibición de Crecimiento de la Raíz Principal

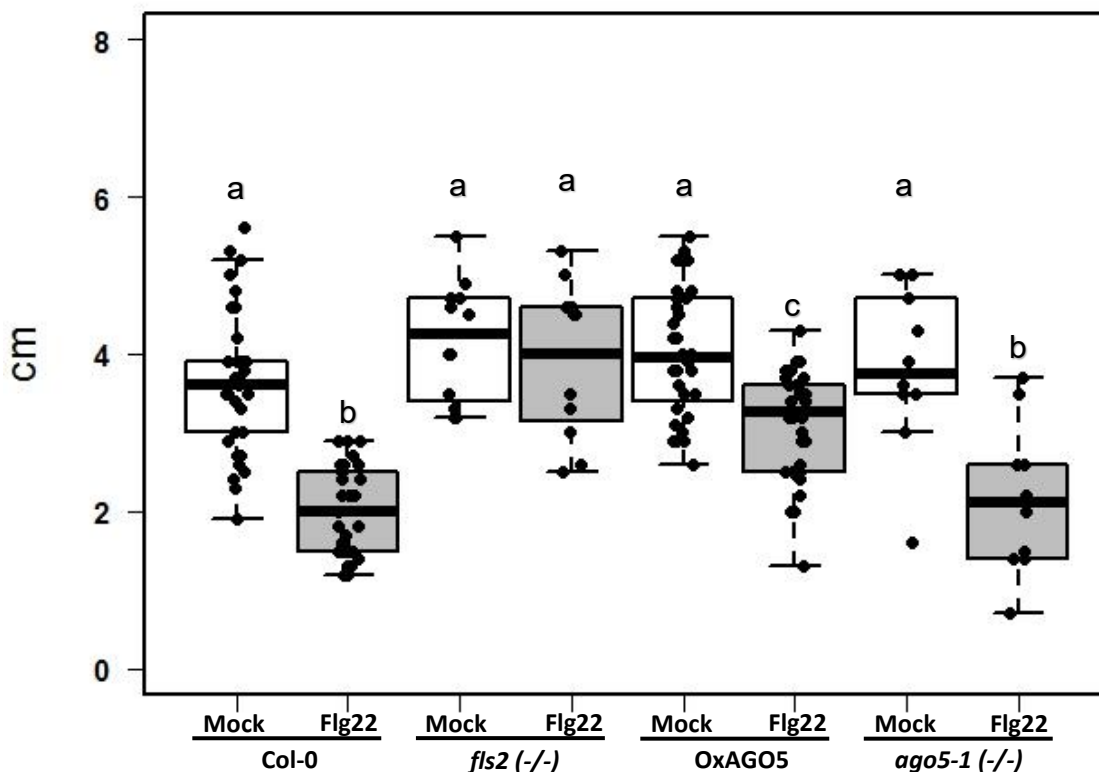


Figura 10. El análisis de distribución de muestras corroboró lo observado en las fotografías de una manera estadística. Donde se encontraron diferencias significativas en las plántulas Col-0, OxAGO5 y *ago5-1 (-/-)*. Sin embargo, la disminución del crecimiento de las plántulas OxAGO5 mostraron el nivel más bajo de significancia, indicando una menor disminución en el crecimiento (Tabla Suplementaria 3). Los datos mostrados, fueron obtenidos de una prueba de ANOVA de un factor y Tukey HSD con los datos de 10 réplicas biológicas independientes, cada una conteniendo 12 plantas. Letras diferentes reflejan una diferencia significativa ($p \text{ value} < 0.05$).

5.3. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 presentan una deficiencia en la producción total de ROS

La producción de ROS durante la respuesta inmune fue reportada por primera vez en 1983 inducida por la infección del hongo *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (Doke, 1983). Actualmente, estudios han reportado un papel esencial para las ROS como agentes antimicrobianos y además, como importantes propagadoras y

reguladoras de la respuesta inmune (Wendehenne *et al.*, 2014). Con el propósito de validar una relación entre la producción de ROS inducidas por el MAMP, se realizó un monitoreo de la producción total de ROS en etapas tempranas después de la percepción del MAMP flg22 (Figura 11)

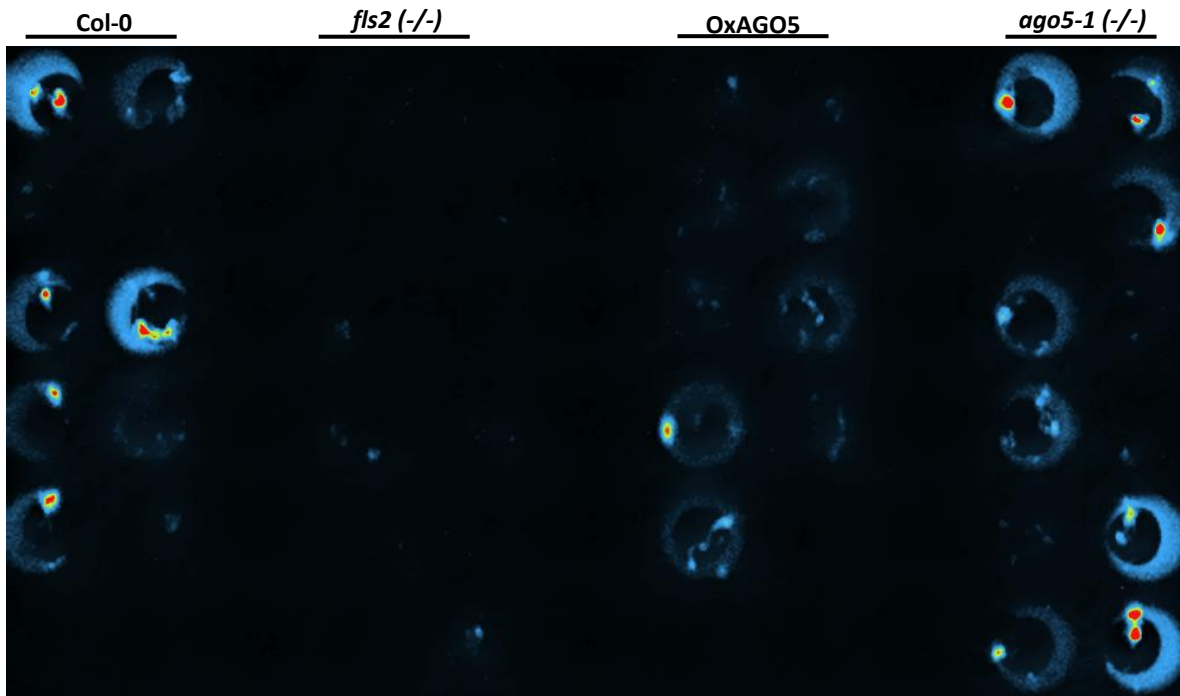


Figura 11. Producción diferencial de ROS en diferentes genotipos de *Arabidopsis thaliana*. Fotografía tomada a los 20 minutos de plántulas de 12 días de crecimiento tratadas con el MAMP flg22. *Arabidopsis ago5-1 (-/-)* mostró una elevada producción de ROS comparada con la producción en plántulas Col-0. Sin embargo, las plántulas de *Arabidopsis OxAGO5* presentaron un compromiso en la producción de ROS. Las plántulas *fls2 (-/-)* usadas como control negativo, sólo presentaron la producción basal de ROS, producto del metabolismo de cloroplastos y peroxisomas.

Interesantemente, los resultados obtenidos en estos experimentos revelaron que plántulas de *Arabidopsis thaliana ago5-1 (-/-)* presentan una elevada producción de ROS en comparación con las plántulas Col-0. Sorprendentemente, las plántulas de *Arabidopsis thaliana OxAGO5* mostraron indicios de una regulación negativa de MTI debido a que presentaron compromiso en la producción total de ROS inducida por flg22 (Figura 11 y Figura 12).

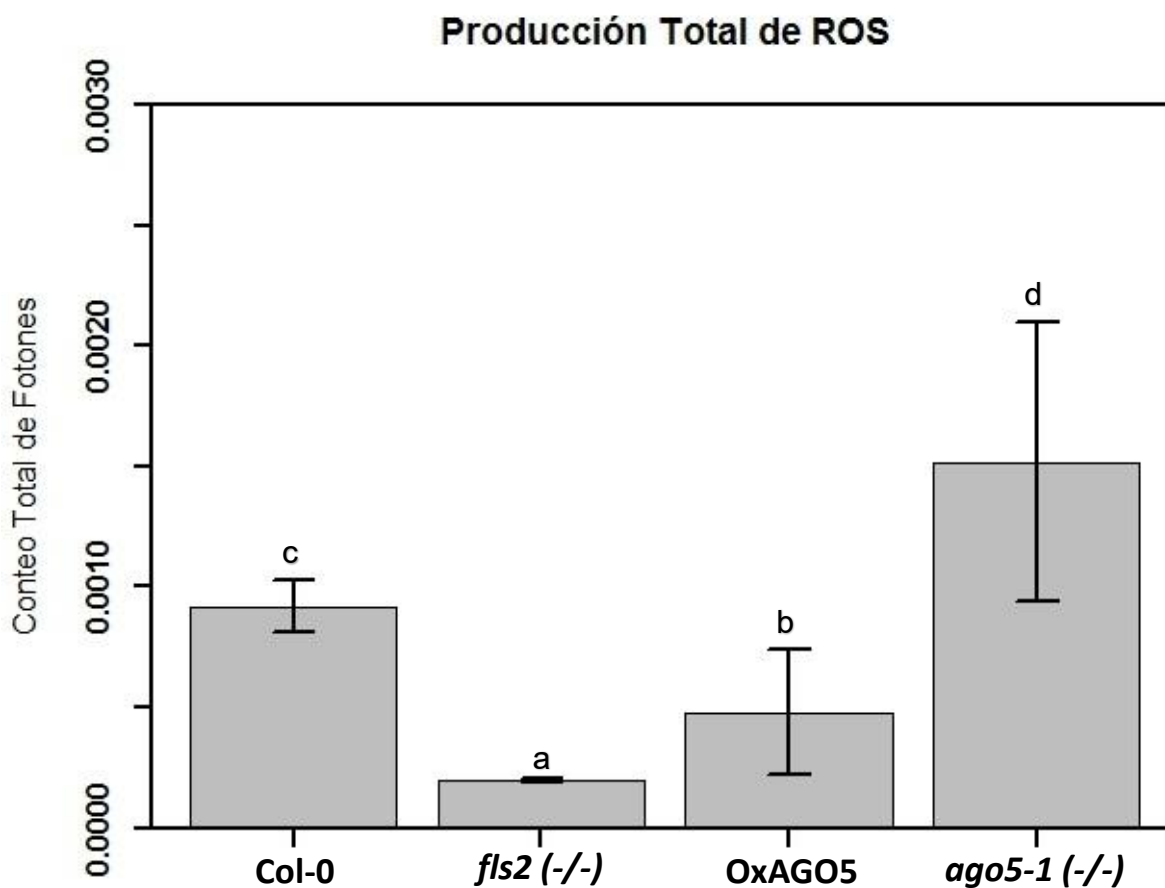


Figura 12. Producción diferencial de ROS en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Tres réplicas independientes de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (n=12) fueron sometidas al tratamiento con flg22. La producción total de ROS se tomó a los ± 10 min después de la aplicación del MAMP. Los resultados corroboraron lo observado en las fotografías, revelando una diferencia significativa en la producción de ROS en plántulas de *Arabidopsis thaliana ago5-1 (-/-)* comparada con las plántulas Col-0. Por otra parte, plántulas de *Arabidopsis thaliana OxAGO5* mostraron una disminución significativa en la producción total de ROS comparada con los demás genotipos empleados. Letras diferentes reflejan una diferencia significativa ($p \text{ value} < 0.05$).

5.4. Genes indicadores de la MTI son regulados a la baja en plántulas de *Arabidopsis thaliana OxAGO5*

Con el propósito de evaluar los niveles de expresión de genes marcadores de la MTI y determinar una posible participación de AGO5 en los eventos tempranos, se midió los niveles de expresión de *WRKY11/18/33/40*, *FRK1* y *PER5*. Los datos

obtenidos en los experimentos por qRT-PCR no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión de *WRKY11* y *WRKY18* (Figura 13a). Interesantemente, *WRKY11* fue el único gen que mostró una expresión basal aún sin tratamiento con flg22 (datos no mostrados). Por otro lado, el nivel de expresión inducido por flg22 en *WRKY33* solo presentó una ligera sobreexpresión en plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 en comparación con plántulas Col-0 y *ago5-1 (-/-)*. Sin embargo, el nivel de expresión de *WRKY40* tuvo una sobreexpresión significativa en plántulas OxAGO5 en contraste con los demás genotipos empleados (Figura 13b).

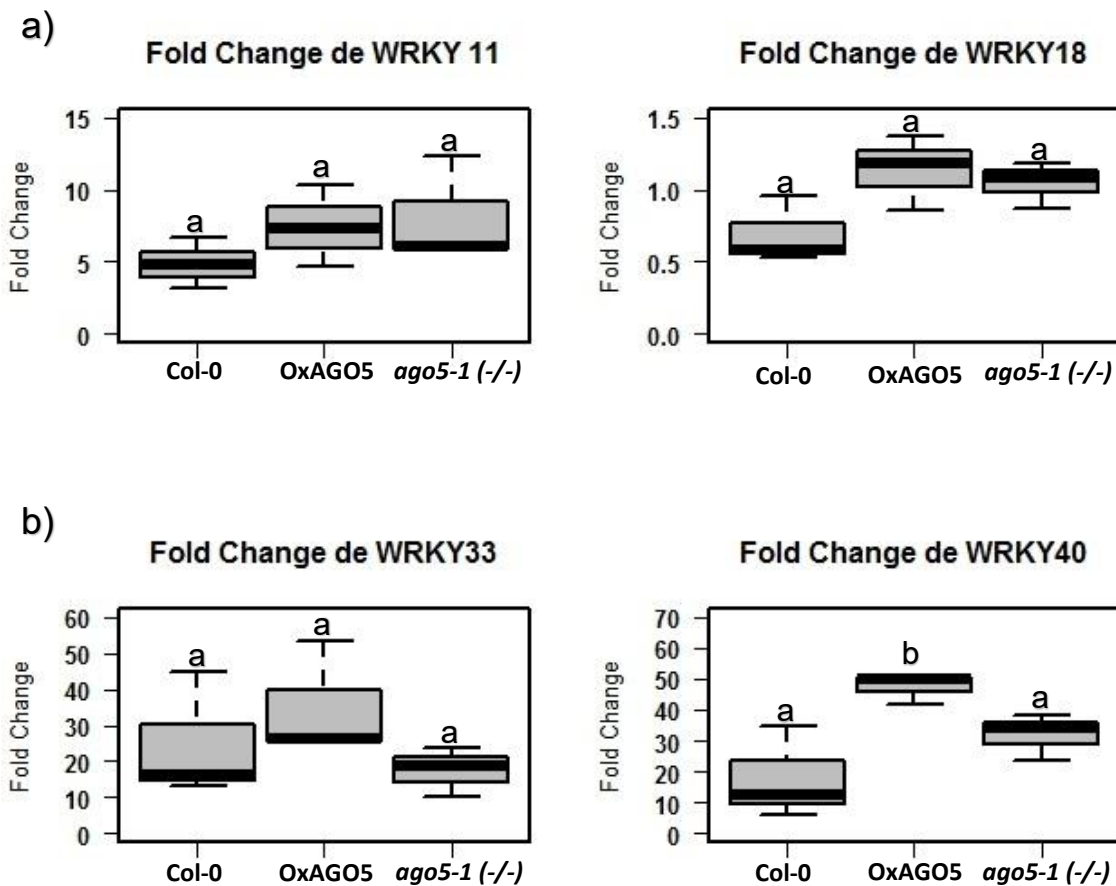


Figura 13. Fold Change de *WRKY11/18/33/40* inducido por flg22 en *Arabidopsis thaliana*.

El RNA fue obtenido de plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, OxAGO5, *ago5-1 (-/-)* sometidas a 1 hr de tratamiento con flg22 y fue analizado usando primers específicos del gen. a) Se observa el Fold Change de *WRKY11/18* calculado de tres réplicas biológicas independientes, cada una conteniendo 12 plantas por tratamiento. b) Se muestra el Fold Change de *WRKY33/40* calculado de tres réplicas biológicas independientes, cada una conteniendo 12 plantas por tratamiento. Letras diferentes reflejan una diferencia significativa ($p \text{ value} < -0.05$).

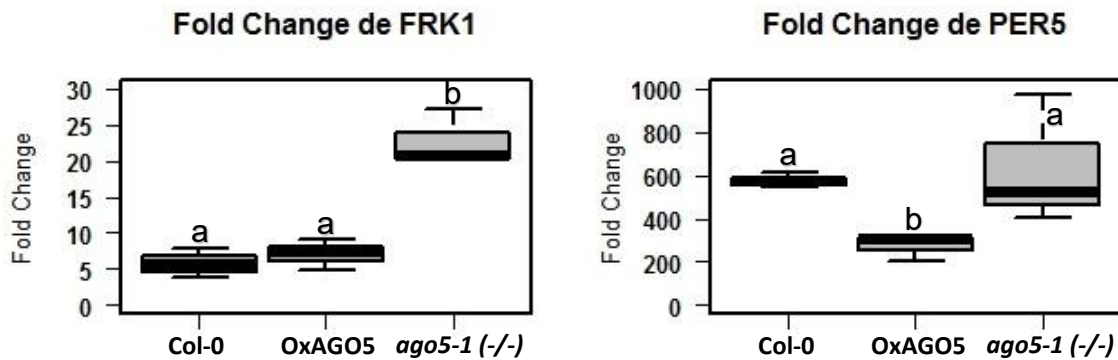


Figura 14. Fold Change de *FRK1* y *PER5* inducido por flg22 en *Arabidopsis thaliana*.

El RNA fue obtenido de plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, OxAGO5, *ago5-1 (-/-)* sometidas a 1hr de tratamiento con flg22 y fue analizado usando primers específicos del gen. Se observa el Fold Change y los niveles de expresión relativa de *FRK1* y *PER5* calculado de tres réplicas biológicas independientes, cada una conteniendo 12 plántulas por tratamiento. Letras diferentes reflejan una diferencia significativa ($p \text{ value} < 0.05$).

Por otra parte los niveles de expresión de *FRK1* revelaron una inducción significativa en plántulas *Arabidopsis thaliana ago5-1 (-/-)*, en comparación con plántulas Col-0 y OxAGO5 (Figura 14). Interesantemente, las plántulas OxAGO5 mostraron una regulación a la baja de *PER5*, que en acuerdo con resultados previos en este estudio, apoyan la baja productividad de ROS en las mismas plántulas (Figura 13). La evidencia demostrada en este estudio, como la baja producción de ROS, la regulación a la baja de *PER5* y la sobreexpresión de *WRKY40* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5, dan indicios al menos, de un probable papel de OxAGO5 en las vías regulatorias de la respuesta inmune innata en *Arabidopsis thaliana* especulativamente en una respuesta no excesiva probablemente por el bajo nivel de la propagación de la señal inmune ocasionado por la baja producción de ROS.

6. Discusión

Uno de los principales motivos de la carencia de estudios funcionales de AGO5, ha sido la dificultad de su recuperación por medio de screens genéticos (Vaucheret, 2008). Sin embargo, durante la última década los experimentos de inserción mediante T-DNA han facilitado la obtención de una amplia colección de mutantes como las utilizadas en éste estudio (Figura 8a). *A. thaliana ago5-1 (-/-)* ha sido validada como homocigota en previos reportes (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2008; Brosseau y Moffett, 2015), sin embargo, la obtención de una mutante sobreexpresante de AGO5, así como su validación no ha sido revelado hasta ahora. La detección de AGO5 en los análisis por Western Blot y qRT-PCR aportó una pieza clave a este estudio, ya que demostró que en la única plántula donde se encontró expresada ésta proteína fue en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5. Sin embargo, la detección de AGO1, una proteína reportada por su papel en la regulación del crecimiento vegetal, la expresión génica y la deposición de calosa durante la respuesta inmune (Li *et al.*, 2010) fue detectada en los tres genotipos (Figura 8). El hecho de que en plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 presentara la presencia de AGO1, una proteína que ha sido reportada por ser el segundo parólogo más cercano a AGO5, podría implicar algún nivel de redundancia para las dos proteínas en los eventos tempranos de la MTI, en contraste con plántulas Col-0 y *ago5-1 (-/-)*, donde el papel regulatorio de las vías inmune permanece exclusivo para AGO1. Durante la última década, el papel de diferentes proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas AGO ha sido revelado (Weiberg y Jim 2015). Sin embargo, de acuerdo a nuestros conocimientos actuales, no existe evidencia del papel de AGO5 en la regulación de los procesos vinculados a la MTI que son inducidos por flg22. En este estudio, encontramos algunos indicios que involucran a AGO5 como un regulador negativo de la MTI. Los fenotipos marcadores de una MTI exitosa, a menudo reflejan una disminución en el crecimiento de la planta, acompañada de cambios en la coloración y tamaño de las hojas (Ranf *et al.*, 2012). Éste fenotipo clásico de MTI fue observado en plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, sin embargo las plántulas OxAGO5 no presentaron

una disminución notable en el tamaño de su raíz principal ni cambios morfológicos en el tamaño y color de hojas (Figura 9 y 10). Una de las consideraciones que deben ser tomadas en cuenta para entender los mecanismos empleados por la planta para sobrevalorar la inversión de energía en defensa a costa de desarrollo, es la actividad de las giberelinas en la presencia o ausencia de microbios. Las giberelinas, son una clase de fitohormonas implicadas en la ruptura de la dormancia y desarrollo de la semilla, además del crecimiento vegetativo y floral (Davière y Achard, 2013). La producción de las giberelinas, desestabiliza a una clase de proteínas relacionadas con la represión del crecimiento de la planta (DELLAs), por lo tanto, promueven el crecimiento. Sin embargo, cuando un microbio es censado, una cascada de señalización inmune es iniciada superando la actividad desestabilizadora de las giberelinas y restablece la represión del crecimiento mediado por las proteínas DELLAs (Navarro *et al.*, 2008). El hecho de que las plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 fueran el único genotipo que mostrara efectos fenotípicos minimizados relacionados con la MTI, provee al menos evidencia morfológica de un papel para AGO5 en los mecanismos regulatorios fisiológicos que determinan las compensaciones entre inmunidad y crecimiento. En apoyo a esto, se observó que plántulas de *Arabidopsis thaliana ago5-1 (-/-)* presentaron una hipersensibilidad inducida por el tratamiento con flg22, mostrando una inmunidad descontrolada en comparación con los demás genotipos (Figura 9).

La producción de ROS después del censado de un MAMP es una característica de una MTI exitosa, además de tener un importante papel como mensajero secundario en la intensidad de la propagación de la señal inmune (Wendehenne *et al.*, 2014). En este estudio, encontramos una producción diferencial de ROS entre los genotipos empleados de *Arabidopsis thaliana*. Las plántulas OxAGO5 mostraron una deficiencia en la producción de ROS inducida por el tratamiento con flg22, en comparación con las plántulas Col-0. (Figura 11 y 12). Estos resultados, además de dar indicios de una participación de AGO5 en la regulación de la producción de ROS, podrían explicar porque los síntomas fenotípicos asociados a la MTI se ven disminuidos en plántulas OxAGO5. Por otra parte, las ROS han sido relacionadas

con una respuesta hipersensible, que a menudo se da en el sitio de ataque del patógeno y generalmente desencadena la muerte celular programada para impedir la proliferación del patógeno (Mur *et al.*, 2008). En apoyo a esto, los resultados obtenidos en este estudio revelaron que plántulas de *Arabidopsis thaliana ago5-1* (-/-) presentaban una elevada producción de ROS en comparación con los demás genotipos empleados, por lo que la amplificación de la señal inmune, así como la muerte celular programada se vio aumentada (Figura 9). Además, aunque los niveles de inducción de PER5, una enzima perteneciente a la familia de las peroxidasas clase III involucrada en el estrés oxidativo e inducida por flg22 (Tognolli *et al.*, 2002; Boudsocq *et al.*, 2010) fueron relativamente semejantes en plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *ago5-1* (-/-), plántulas OxAGO5 presentaron una regulación negativa en la expresión génica de PER5, lo cual en apoyo a previos reportes, donde se ha indicado que la familia de las peroxidasas de la clase III son esenciales para la producción y destoxificación de ROS en respuesta a flg22, aporta evidencia sobre un posible papel como regulador negativo para AGO5 en la producción de ROS y explicaría en parte, los efectos fenotípicos decadentes relacionados con la MTI.

Actualmente, diferentes perfiles transcripcionales han revelado la expresión de miles de genes durante los eventos tempranos de la MTI (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004). Entre ellos, los factores de transcripción WRKY's han sido involucrados como reguladores esenciales durante la MTI, de hecho, se ha reportado la unión de estos factores de transcripción a promotores de genes específicos relacionados con la MTI ricos en motivos W-box (Birkenbihl *et al.*, 2017). Por otro lado, existe evidencia de genes de inducción temprana de la MTI como *FRK1*, que codifica a una cinasa de tipo receptor inducida por flg22 (Asai *et al.*, 2002) y *PER5*, una proteína de la superfamilia de las peroxidasas involucrada en el estrés oxidativo (Tognolli *et al.*, 2002) y también inducida por el tratamiento con flg22 (Boudsocq *et al.*, 2010). WRKY11 ha sido reportado por ser inducido en la zona de elongación de la raíz en plántulas de *Arabidopsis thaliana* después del tratamiento con flg22 (Millet *et al.*, 2010) y como un regulador negativo de la resistencia basal (Journot-Catalino

et al., 2006). En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de éste factor de transcripción (Figura 13a), sin embargo, se encontró una expresión constitutiva en plántulas no tratadas con flg22, lo que indica un posible papel para WRKY11 en vías regulatorias no relacionadas con la respuesta inmune. Por otra parte, WRKY33, un factor de transcripción que ha sido involucrado como un regulador positivo de la resistencia contra hongos necrotróficos (Zheng *et al.*, 2006; Birkenbihl *et al.*, 2012) y por interactuar directamente con MAPK4 para inducir la síntesis de camalexinas (Qiu *et al.*, 2008), no mostró una expresión diferencial significativa entre los fenotipos de *Arabidopsis thaliana* empleados en este estudio, no obstante a esto, las plántulas OxAGO5 mostraron un ligero nivel de inducción en la expresión de WRKY33 (Figura 13b). Además de los factores transcripcionales mencionados con anterioridad, en este estudio se evaluaron los niveles de los factores de transcripción WRKY18 y WRKY40, reportados recientemente por tener un papel en la regulación negativa de la inmunidad basal en *Arabidopsis thaliana* (Birkenbihl *et al.*, 2017). Los datos reportados en este estudio, mostraron una inducción en el nivel de expresión de WRKY18 en plántulas *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 y *ago5-1 (-/-)*, en comparación con plántulas Col-0 (Figura 13b). Interesantemente, la inducción de WRKY40 representada por el Fold Change, mostró un incremento en plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 (Figura 13b), estos datos, en apoyo a resultados previamente publicados sobre el papel de WRKY40, podría explicar los efectos fenotípicos mostrados en las plántulas OxAGO5. Además, FRK1, un gen que codifica para una cinasa de tipo receptor también inducida por flg22 que ha sido considerado como un intermediario de la respuesta inmune (Asai *et al.*, 2002) mostró una regulación a la baja en los niveles de expresión en plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5, en comparación con las plántulas Col-0 y *ago5-1 (-/-)*.

7. Conclusiones

A pesar de que los esfuerzos actuales sobre el entendimiento de la respuesta inmune innata en plantas han sido considerables, nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares tempranos subyacentes durante la interacción planta patógeno han permanecido elusivos en algunos aspectos. Durante la última década, los reportes sobre la participación de las proteínas AGO han brindado una nueva perspectiva para esclarecer algunos de los procesos regulatorios de las respuestas de defensa que las plantas logran montar frente al ataque de patógenos potenciales. El propósito fundamental de este estudio, fue la caracterización de AGO5, un miembro de la familia de las proteínas AGO de la cual se desconoce la mayoría de las implicaciones en distintos procesos regulatorios en la planta, incluida la respuesta inmune. Aquí, hemos mostrado al menos tres indicios de que las plántulas de *Arabidopsis thaliana* OxAGO5 presentan efectos negativos en los síntomas inmunes comunes de la MTI, como un déficit en la disminución del crecimiento inducido por flg22, deficiencia en la producción de ROS, y la regulación a la baja de genes marcadores de una MTI exitosa como *FRK1* y *PER5*, además de la inducción a la alta de *WRKY40* recientemente reportado como un regulador negativo de la MTI. Sin embargo, estudios moleculares más detallados son necesarios para comprender el nivel de redundancia o la competencia espaciotemporal que pueda existir entre AGO1 y AGO5 en los eventos tempranos de MTI en *Arabidopsis thaliana*.

8. Información Suplementaria

Tabla suplementaria 1.

Genotipo	Uso en Experimentos	Nombre	N° de Acceso	Background Genético	Fuente de la semilla
Col-0	Ensayos de inhibición de crecimiento, cuantificación de ROS, qRT-PCR y Wester Blot.	Columbia-0	N/A	N/A	Laboratorio de Oswaldo Valdés-López, U.N.A.M. México.
<i>fls2</i>	Ensayos de inhibición de crecimiento y cuantificación de ROS.	<i>Arabidopsis thaliana</i> Knockout <i>fls2</i> (-/-)	SALK_093905	Col-0	Laboratorio de Scott Peck, Missouri, USA.
OxAGO5	Ensayos de inhibición de crecimiento, cuantificación de ROS, qRT-PCR y Wester Blot.	<i>Arabidopsis thaliana</i> sobrexpresante de AGO5	SALK_053599	Col-0	Laboratorio de Oswaldo Valdés-López, U.N.A.M. México.
<i>ago5-1</i>	Ensayos de inhibición de crecimiento, cuantificación de ROS, qRT-PCR y Wester Blot.	<i>Arabidopsis thaliana</i> Knockout <i>ago5-1</i> (-/-)	SALK_063806	Col-0	Laboratorio de Peter Moffett, Quebec, Canadá.

Tabla Suplementaria 2.

Nombre	N° de Acceso	Forward	Reverse
Actina	AT2G37620	GTATGTTGCCATTCAGGCCGTTCTTTCTC	CGACCCGCAAGATCAAGACGAAGGA
Argonauta 5	AT2G27880	CGGCTCTCGGTTATCTCTTTT	GTCATCATCTGAAACCAAAACG
WRKR11	AT4G31550	AAGGAGAGCACCGTCATAACC	AAGCCGAGGCAAACACTAAAT
WRKY18	AT4G31800	GGAGCAATCTAGAACATGAACG	CCTAATCGAAAGACACAATTCG
WRKY33	AT2G38470	GATTCGTTTATGCCCTGAAGA	GTAAAATCCTTTGGTGGCAGA
WRKY40	AT1G80840	GTGGAGCAAATGGCTTCTTC	GATACAATTTTCCGGTAACAGC
FRK1	AT2G19190	CTGATCAGGAAAACACTACGATGAC	CTACCTTGCTCGAGGAACCAT
Proteína de la Superfamilia de las Peroxidasas.	AT1G14550	CGGCATTGTGTCGGAATATAG	TCCATTAGAGCCAGTGAGAGG

Tabla Suplementaria 3.

Códigos de Significancia Tomados del Programa R.	
Código	Valor de Significancia
"d"	0.001
"c"	0.01
"b"	0.05
"a"	0.1

9. Referencias

1. Agorio, A., y Vera, P. (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:3778-3790.
2. Aist, J. R. (1976). "Papillae and related wound plugs of plant cells," in *Annual Review of Phytopathology*, eds K. F. Baker, G. A. Zentmeyer, and E. B. Cowling (Palo Alto: Annual Reviews mlnc.), 145–163.
3. Asai S, y Yoshioka H. (2008). The role of radical burst via MAPK signaling in plant immunity. *Plant Signaling & Behavior*, 3:11, 920-922.
4. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977–983.
5. Ausubel F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6 973–979 10.1038/ni1253.
6. Axtell, M. J. & Staskawicz, B. J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112, 369–377.
7. Bar M, Sharfman M, Ron M, Avni A (2010). BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant Journal* 63: 791–800.
8. Bartel DP. (2009). MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136 (2):215–233.
9. Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
10. Beck M, Heard W, Mbengue M y Robatzek S (2012). The Ins and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Curr. Opin. Plant Biology*. 15 367–374.
11. Bedard, K. y Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiology. Review.* 87:245–313.

12. Bednarek, P., y Osbourn, A. (2009). Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324, 746–748.
13. Bethke, G., Pecher, P., EschenLippold, L., Tsuda, K., Katagiri, F., Glazebrook, J., Scheel, D., y Lee, J. (2012). Activation of the Arabidopsis thaliana mitogenactivated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Molecular. Plant Microbe Interaction.* 25, 471–480.
14. Birkenbihl RP, Kracher B, Somssich IE. (2001). Induced genome-wide binding of three WRKY transcription factors during early MAMP-triggered immunity. *Plant Cell* 2017, 29:20-38.
15. Bohm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A. & Nurnberger, T. (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr. Opin. Plant Biology.* 20, 47–54.
16. Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., y Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO Journal.* 17, 170–180.
17. Boller, T. y Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biology.* 60, 379–406.
18. Boudsocq, M., y Sheen, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Science.* 18: 30-40.
19. Boudsocq M, Sheen J. Stress signaling II: calcium sensing and signaling. En: Pareek A, Sopory SK, Bohnert HJ, editores. (2010). *Abiotic Stress Adaptation in Plants SE- 4.* Netherlands: Springer; 2010. pp. 75–90.
20. Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., y Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464: 418-422.
21. Buscaill, P., y Rivas, S. (2014). Transcriptional control of plant defence responses. *Current. Opinion. Plant Biology.* 20, 35–46.

22. Brosseau, C., y Moffett, P. (2015). Functional and genetic analysis identify a role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *Plant Cell* 27, 1742–1754.
23. Cartolano, M., Castillo, R., Efremova, N., Kuckenberg, M., Zethof, J., Gerats, T., Schwarz-Sommer, Z. y Vandebussche, M. (2007). A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nature Genetics*. 39, 901-905
24. Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III secretion systems and disease. (2007) *Clin Microbiol Rev*; 20:535–49.
25. Coll, N. S., Epple, P., y Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ*. 18, 1247–1256.
26. Combier, J.P., Frugier, F., Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie', T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Development*. 20: 3084–3088.
27. Consonni, C., Bednarek, P., Humphry, M., Francocci, F., Ferrari, S., Harzen, A., *et al.* (2010). Tryptophan-derived metabolites are required for antifungal defense in the *Arabidopsis mlo2* mutant. *Plant Physiology*. 152, 1544–1561.
28. Cui, H., Tsuda, K., y Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual review of plant biology*, 66, 487-511.
29. Chapman, E. J., and Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature. Review. Genetics*. 8:884-896.
30. Chen X, Zuo S, Schwessinger B, Chern M, Canlas PE, *et al.* (2014). An XA21- Associated Kinase (OsSERK2) regulates immunity mediated by the XA21 and XA3 immune receptors. *Molecular Plant*.
31. Che, F.S., Nakajima, Y., Tanaka, N., Iwano, M., Yoshida, T., Takayama, S., Kadota, I., y Isogai, A. (2000). Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *Journal. Biology. Chemistry*. 275 32347–32356.

32. Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B. (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Science* 14: 535–541.
33. Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, *et al.* (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497–500.
34. Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. y Staskawicz, B. J. (2006). Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814.
35. Choura, M., Rebai, A., y Masmoudi, K. (2015). Unraveling the WRKY transcription factors network in *Arabidopsis thaliana* by integrative approach. *Network Biol.* 5, 55-61.
36. Dangl, J. L., Horvath, D. M. y Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341, 746–751.
37. Dangl, J. L. y Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
38. Davière, J.-M, y Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development* 140: 1147–1151.
39. Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., y Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular. Plant* 1, 423–445.
40. Dodds, P.N. y Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature. Review. Genetics.* 11, 539-538.
41. Doke, N. (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction with suppressors of hypersensitivity. *Physiology. Plant Pathology.* 23: 359–367.
42. Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.P., Schulze, W.X., and Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal

propagation. Proceedings of the National Academy of Science. USA 110: 8744-8749.

43. Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., *et al.* (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 161, 1433–1444.
44. Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., y Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*. 18, 265–276.
45. Fradin EF, Zhang Z, Juarez Ayala JC, Castroverde CDM, Nazar RN, *et al.* (2009) Genetic dissection of Verticillium wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiology* 150: 320–332.
46. Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y. (2008) MEKK1, MKK1/MKK2 y MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res* 18:1190–1198.
47. Gao M, Wang X, Wang D, Xu F, Ding X, *et al.* (2009). Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. *Cell Host Microbe* 6: 34–44.
48. Gay, N. J. y Gangloff, M. (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual review. Biochemistry*. 76, 141–165.
49. Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.G., Toyota, M., Devireddy, A.R., *et al.* (2014). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Science*. 19: 623–630.
50. Göhre V, Robatzek S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual review of phytopathology* 46: 189–215.
51. Gómez-Gómez, L., y Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* 5, 1003–1011.
52. Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., y Nurnberger, T. (2007). Bacteria

derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 282, 32338–32348.

53. Gust, A. A. y Felix, G. (2014). Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Current opinion. Plant Biology.* 21, 104–111.
54. Gust, A. A., Pruitt, R., & Nürnberger, T. (2017). Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science.*
55. Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology.* 43:205–227.
56. Grant JJ, Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease. *Plant Physiology* 124: 21–29
57. Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R y Schulze-Lefert P. (2017) Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annual review of phytopathology.* 55(1).
58. Halter T, Imkampe J, Mazzotta S, Wierzba M, Postel S, *et al.* (2013). The Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase BIR2 Is a Negative Regulator of BAK1 in Plant Immunity. *Current Biology.*
59. Havecker, E. R., Wallbridge, L. M., Hardcastle, T. J., Bush, M. S., Kelly, K. A., Dunn, R. M., Schwach, F., Doonan, J. H., y Baulcombe, D. C. (2010). The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation Argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22:321–334.
60. Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, *et al.* (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Science, U S A.* 104: 12217–12222.
61. Hirt, H. y Scheel, D. (2000). In *Results and Problems in Cell Differentiation: MAP Kinases in Plant Signal Transduction* (ed. Hirt, H.) 85±93 (Springer, Heidelberg).

62. Hutvagner, G., y Simard, M.J. (2008) Argonaute protein: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biology*. 9, 22-32.
63. Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B. E., Morris, P. C., Innes, R. W., Ecker, J. R., Scheel, D., Klessig, D. F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., and Walker, J. C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Science*. 7, 301–308.
64. Jagadeeswaran, G., Saini, A., and Sunkar, R. (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta*. 229:1009-1014.
65. Jessica Quintin, S.-C. Cheng, W.M. van der Meer Jos, M.G. Netea. (2014). Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Current opinion of Immunology*. 29; 1–7.
66. Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal*. 19, 4004–4014.
67. Jones, J. D. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
68. Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3289–3302.
69. Kadota, Y., Goh, T., Tomatsu, H., Tamauchi, R., Higashi, K., Muto, S., *et al.* (2004). Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca²⁺ transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant Cell Physiology*. 45: 160–170.
70. Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., *et al.* (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular Cell* 54: 43–55.

71. Katagiri F, Tsuda K. (2010) Understanding the plant immune system. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 23: 1531–1536.
72. Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A., y Jin, H. 2007. A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes Development*. 21:3123-3134.
73. Katiyar-Agarwal, S., y Jin, H. (2010). Role of small RNAs in host– microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathology*. 48:225-246.
74. Kim BH, Kim SY, Nam KH (2013). Assessing the diverse functions of BAK1 and its homologs in arabidopsis, beyond BR signaling and PTI responses. *Molecular Cell*. 35: 7–16.
75. Kim KC, Lai Z, Fan B, Chen Z (2008). Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell* 20: 2357–2371.
76. Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi, I., and Kunoh, H. (1997). Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant Cell Physiology*. 38, 725–733.
77. Koh, S., Andre, A., Edwards, H., Ehrhardt, D., y Somerville, S. (2005). Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible Erysiphe cichoracearum infections. *Plant Journal*. 44, 516–529.
78. Lamb, C. y Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant physiology*. *Plant Molecular Biology*. 48: 251–275.
79. Lefert PS y Robatzek S. (2006). Plant pathogens trick guard cells into opening the gates. *Cell* 126 831–834.
80. Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., *et al.* (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15: 329–338.
81. Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., y Zhou, J. M. (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern- triggered plant innate immunity. *Plant Physiology*. 152:2222-2231.

82. Liebrand TW, van den Berg GCM, Zhang Z, Smit P, Cordewener JHG, *et al.* (2013). Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Science, U S A.* 110:10010–10015.
83. Liebrand TW, van den Burg HA, Joosten MH (2014). Two for all: receptor associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends Plant Science* 19: 123–132.
84. Lin, H. y Spradling, A. C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124, 2463–2476.
85. Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. y Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426, 465–469.
86. Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. y Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nature Structure. Molecular Biology.* 11, 576–577.
87. Liu Q, Zhang YC, Wang CY, Luo YC, Huang QJ, Chen SY, Zhou H, Qu LH, Chen YQ. (2009). Expression analysis of phytohormone-regulated micro-RNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Letters* 583: 723–728
88. Lozano-Durán, R., Macho, A.P., Boutrot, F., Segonzac, C., Somssich, I.E., y Zipfel, C. (2013). The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife* 2, e00983.
89. Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, *et al.* (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Science, U S A.* 107: 496–501
90. Lu X, Tintor N, Mentzel T, Kombrink E, Boller T, Robatzek S, Schulze-Lefert P, Saijo Y. (2009). Uncoupling of sustained MAMP receptor signaling from early outputs in an *Arabidopsis* endoplasmic reticulum glucosidase II allele. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 106: 22522–22527.
91. Luan S. (2009). The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Science.* 14:37–42

92. Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5' -end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434, 666–670
93. Ma, J. B., Ye, K. y Patel, D. J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318–322.
94. Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Dangl, J. (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2- mediated resistance. *Cell* 112, 379–389.
95. Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A. y Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1- mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* 108, 743–754.
96. Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., y Zhang, S. (2011). Phosphorylation of aWRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 1639–1653.
97. Marino, D., Dunand, C., Puppo, A. y Pauly, N. (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Science*. 17: 9–15.
98. Mauch, F., Mauch-Mani, B., y Boller, T. (1988). Antifungal Hydrolases in Pea Tissue: II. Inhibition of Fungal Growth by Combinations of Chitinase and beta-1,3-Glucanase. *Plant Physiology*. 88, 936–942.
99. Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G. J., y Qi, Y. (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis Argonaute complexes is directed by the 5'-terminal nucleotide. *Cell* 133:116-127.
100. Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., y Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 104, 19613–19618.
101. Mizel, S.B., West, A.P., y Hantgan, R.R. (2003). Identification of a sequence in human Toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *J. Biol. Chem.* 278, 23624–23629.

102. Monaghan, J., Matschi, S., Shorinola, O., Rovenich, H., Matei, A., Segonzac, C., Malinovsky, F.G., Rathjen, J.P., MacLean, D., Romeis, T., y Zipfel, C. (2014). The calcium-dependent protein kinase CPK28 buffers plant immunity and regulates BIK1 turnover. *Cell Host Microbe* 16: 605-615.
103. Morel, J.-B., Gordon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., y Vaucheret, H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14, 629–639.
104. Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman, E. J., Fahlgren, N., Allen, E., y Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133:128-141.
105. Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jurgens, G. & Laux, T. (1998). Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *EMBO Journal*. 17, 1799–1809.
106. Muthamilarasan M, Prasad M (2013). Plant innate immunity: an updated insight in defense mechanism. *Journal Bioscience*. 38 433–449
10.1007/s12038-013-9302-2
107. McAinsh MR, Pittman JK. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist*. 181:275–294.
108. Nathan, C. y Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature review of Immunology*. 13: 349–361.
109. Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., y Jones, J.D.G. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current opinion of biology*. 18: 650–655
110. Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., y Jones, J. D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*. 312:436-439.

111. Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., y Jones, J.D.G. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with 906 avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology*. 135, 1113-1128.
112. Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H., y Somerville, S. C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301, 969–972.
113. Nonomura K, Morohoshi A, Nakano M, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H, Kurata N (2007). A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* 19: 2583–2594
114. Nuhse, T. S., Peck, S. C., Hirt, H. y Boller, T. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK6. *J. Biol. Chem.* 275, 7521±7526 (2000).
115. Nurnberger, T. y Scheel, D. (2001). Signal transmission in plant immune response. *Trends Plant Science*. 6, 372±379.
116. Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., y Mauch, F. (2007). Identification of PAD2 as a γ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 49, 159–172
117. Parker, J. S., Roe, S. M. y Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO Journal*. 23, 4727–4737.
118. Pandey, S.P., Roccaro, M., Schön, M., Logemann, E., y Somssich, I.E. (2010). Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 64, 912-923.
119. Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B., y Mundy,

- J. (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103, 1111–1120.
120. Postel S, Kuffer I, Beuter C, Mazzotta S, Schwedt A, *et al.* (2010). The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *Eur J Cell Biol* 89: 169–174.
121. Qi, Y.J., He, X.Y., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J., and Hannon, G.J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443:1008-1012.
122. Qiu, J.-L., Fiil, B. K., Petersen, K., Nielsen, H. B., Botanga, C. J., Thorgrimsen, S., Palma, K., SuarezRodriguez, M. C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K. D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J., y Petersen, M. (2008). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO Journal*. 27, 2214–2221
123. Rada, B. y Leto, T.L. (2008). Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib. Microbiol.* 15: 164–187.
124. Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. y Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant Journal*. 68: 100–113.
125. Rasmussen M. W, Roux M, Petersen M y Mundy J. (2012). MAP kinase cascades in Arabidopsis innate immunity. *Frontiers in plant science*, 3.
126. Ren, D., Liu, Y., Yang, K.-Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., y Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 105, 5638–5643.
127. Reynaud, C. A., B. Bertocci, A. Dahan, y J.-C. Weill. (1994). Formation of the chicken B cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement and diversification by gene conversion. *Adv. Immunol.* 57:353–378.

128. Romeis, T., y Herde, M. (2014). From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. *Current opinion of plant biology*. 20: 1-10.
129. Ronald, P. C. y Beutler, B. (2010). Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science* 330, 1061–1064.
130. Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F. G., Tör, M., De Vries, S., y Zipfel, C. (2011). The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* 23, 2440–2455.
131. Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., y Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Science*. 15, 247-258.
132. Rydyznski C, Daniels KA, Karmele EP, Brooks TR, Mahl SE, Moran MT, *et al.* (2015). Generation of cellular immune memory and B-cell immunity is impaired by natural killer cells. *Nat Commun*. 6:6375.10.1038/ncomms7375.
133. Segonzac, C., Feike, D., Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Zipfel, C. y Rathjen, J.P. (2011). Hierarchy and roles of pathogen-associated molecular pattern-induced responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*. 156: 687–699.
134. Segonzac C, Zipfel C. (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion of Microbiology* 14: 54–61.
135. Seo JK, Wu J, Lii Y, Li Y, Jin H. (2013). Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 26:617–25
136. Seybold H, Trempel F, Ranf S, Scheel D, Romeis T, Lee J. (2014). Ca²⁺ signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca²⁺ decoding mechanisms. *New Phytologist* 204: 782–790
137. Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., y Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structure Biology*. 10, 1026–1032.

138. Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. y Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434–1437.
139. Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. y Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environment*. 35: 259–270.
140. Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A. y Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion of plant biology*. 14: 691–699.
141. Schmelzer, E. (2002). Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Science*. 7, 411–415.
142. Schön, M., Töller, A., Diezel, C., Roth, C., Westphal, L., Wiermer, M., y Somssich, I.E. (2013). Analyses of wrky18 wrky40 plants reveal critical roles of SA/EDS1 signaling and indole-glucosinolate biosynthesis for *Golovinomyces orontii* resistance and a loss-of resistance towards *Pseudomonas syringae* pv. tomato AvrRPS4. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 26, 758-767.
143. Schulz, P., Herde, M., y Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiology*. 163: 523-530.
144. Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., y Chinchilla, D. (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J. Biol. Chem*. 285: 9444–9451.
145. Schweizer, F., Bodenhausen, N., Lassueur, S., Masclaux, F.G., y Reymond, P. (2013). Differential contribution of transcription factors to *Arabidopsis thaliana* defence against *Spodoptera littoralis*. *Frontiers Plant Science*. 4, 13.
146. Schwessinger, B., y Ronald, P. C. (2012). Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual review of plant biology*. 63, 451–482.
147. Schwessinger, B., Roux, M., Kadota, Y., Ntoukakis, V., Sklenar, J., Jones, A., y Zipfel, C. (2011). Phosphorylation-dependent differential regulation of

plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genetics*. 7, e1002046.

148. Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nurnberger T, Martin GB, Sheen J (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* 4:17–27.
149. Spoel SH., Dong X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12, 89–100.
150. Steinhorst L, Kudla J. (2014). Signaling in cells and organisms -calcium holds the line. *Current opinion of plant biology*. 22:14–21.
151. Stone, B. A., y Clarke, A. E. (1992). *Chemistry and Biology of (1→3)-β-glucans*. Bundoora: La Trobe University Press.
152. Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., y Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiology*. 49, 493–500.
153. Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L., y Sheen, J. (2001). Plant MAP kinase signaling cascades. *Current opinion of plant biology*. 4, 392–400.
154. Tolia, N. H. y Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the argonautes. *Nature Chem. Biol.* 3, 36–43.
155. Torres, M.A. y Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion of plant biology*. 8: 397 403.
156. Tripathy, B.C. y Oelmuller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling Behavior*. 7: 1621–1633.
157. Tsuda, K., y Somssich, I.E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist*. 206, 932–947.
158. Van der Hoorn, R. A. y Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20, 2009–2017.

159. Vaucheret H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Science*. 13:350–358.
160. Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., AbuQamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R.A., Hirt, H. y Mengiste, T. (2006). Distinct roles of the membrane anchored BOTRYTIS INDUCED KINASE 1 in Arabidopsis resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell*, 18, 257–273.
161. Wan, J., Zhang, X.C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.Y., Stacey, M.G., y Stacey, G. (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 471–481.
162. Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C., y Zhang, S. (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogenactivated protein kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 63–73.
163. Weiberg A., Jin H. (2015). Small RNAs-the secret agents in the plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26 87–94.
164. Wendehenne, D. (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Current opinion of plant biology.* 20, 127–134.
165. Xu, X., Chen, C., Fan, B., y Chen, Z. (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18, 1310-1326.
166. Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., y Zhou, M.M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 468–474.
167. Yu, A., Lepere, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., Abraham, A. L., Penterman, J., Fischer, R. L., Voinnet, O., y Navarro, L. (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 110:2389-2394.

168. Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T., y Patel, D. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Molecular Cell* 19, 405–419.
169. Yun, B. W., Atkinson, H. A., Gaborit, C., Greenland, A., Read, N. D., Pallas, J. A., *et al.* (2003). Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *Plant Journal*. 34, 768–777.
170. Zilberman, D., Cao, X., y Jacobsen, S. E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299:716-719.
171. Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., y Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764-767
172. Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., y Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749–760.
173. Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion of immunology*. 20, 10–16 (2008).
174. Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunology*. 35, 345–351.
175. Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W. C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H. D., Raikhel, N., y Jin, H. (2011). *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393 (*)-mediated silencing of a Golgilocalized SNARE gene, MEMB12. *Molecular Cell* 42:356-366.
176. Zhang Z, Wei L, Zou X, Tao Y, Liu Z, Zheng Y (2008). Submergence-responsive microRNAs are potentially involved in the regulation of morphological and metabolic adaptations in maize root cells. *Ann Bot (Lond)* 102: 509–519
177. Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., *et al.* (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1: 175–185.

178. Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., y Zhu, J. K. (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. EMBO Journal. 26:1691- 1701.
179. Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. Methods 25, 402-408
180. R Core Team. R (2014): A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org/>.