

DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “**Caracterización fenotípica y transcriptómica de la mutante *reca1* de *Arabidopsis thaliana***”, que presenta la alumna **Norma Yaniri Aviles Baltazar (10019221)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

| NOMBRE | DICTAMEN | FIRMA |
|---|----------|-------|
| Dr. Armando Hernández Mendoza CIDC-UAEM | APROBADO | |
| Dra. Verónica Lira Ruan CIDC-UAEM | APROBADO | |
| Dr. Luis Cardenas Torres IBT-UNAM | APROBADO | |
| Dr. Mario Alberto Serrano Ortega CCG-UNAM | APROBADO | |
| Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM | APROBADO | |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA | Fecha:2021-01-28 14:05:47 | Firmante

TdmIbWxrD409eNEjMrx8b50NYjFCoS98RHylBqFncZEbEHso2jCXzzkrsZ757w0q1FdMBGG7Q69+7Zb06Cq93OPMPTMJXaDH4tW1R0oaq4aDgpnOKWRnliN03iU+83Zvx7C7u4EtnzeWta81pA0QTJISvKLY90IKrb/jpKJo377glfQ6f9U9ebmlps5QphbNLIwCfjXGsvk2sw+XhR+dcoK7iGJRQIG03SMly5yBwXf5SX1VlCayFNlwwXGe85slyOV2PVvb4tyfd8Ds/VdMTxcF90NHZ69i8imAl8GvtoTWAGA0RzrViBtCLPRJn76PuSFDfjbWdcXccvRASgw1e1w==

LUIS CÁRDENAS TORRES | Fecha:2021-01-28 14:09:40 | Firmante

e7DzJZu5CGzZwhprCfpWtOH+RzVzKLGf7WoRRh0nwb2rbey/xHNR5OPk17SEos4zOgHto+Eyb4ngfvRkN+06e5Q505tOWptVH2qLbDDaitY7yvcNXsCQQjB8PaJ1p41hcNd5GUus/wljl8nHsiii4m8io1Vy/C6Oqm1eZFDwuu50odkS/EkY4NwhuBVVHWqAu0jaUf2JM2Uzn548E5nBR/tvW9FCAPjTxDMa6LYcHyxmt0E28yoyzChbjqs7b9id3UfRvFJQFMb8hBy2skDgaTdp5kPKwv1JW0yx3j6d+0odJMUYaExl6MzJY0V6ZMajaBPIDTvPHYq9LLYn9A==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2021-01-28 14:12:43 | Firmante

bd+puJulj/slrYBxyLiHufKIHZ7Awx6Tof6QT+NX1iZVOHgt0un+ia0FoEIDRecZHMk0i0LLJnZa8s8gTk3pU9uFt7DbD8WYaNxld/KpUInqbaJapU05VEQbB2tF6dH7wjAzkxQK9Dnl1NNk27MT+BoAlpdXC9pEqCAGh8J+Sp3HEORMMDGp6C51b6iZ8Wwxs4UHroNWqNCiJXq0nBTRNvlJhHwYSFCFGnFiab8CjvzGMuQy/i4jk4fWP3hFaHA6OACLXz6a9PSE8oxzZxhYss1Z6aEAsiXs2EgMH1lvDxZugeDWOAtsdTB+YoiOLzYgKu6GOVkrGass2w==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-01-28 15:45:31 | Firmante

fKYOMbFuvR17v0vsEamBHz3AQNUnadkeEz9Xxq12mcWF40NB7zeC+VR0EpiuB8bHmQKIV9aNGC4GyjiKX2qDBikwLOot1ZsJbsRBXPIhdP9zvy63CiZX6hbD2zYohlG4tj+dPt6mnqnbB4O9+I5Dt3bidKFe/PpFyAVHj4bKAJf9o5VqlA11yNkoql2ME96vXX9d4cd1v5qMbpAYtft6AXg3SxMKSj0QwiMFCr7MwTqqn540TF7riW4yJKTJRn2idbmOxbr1Fejj3duEUcfTVeltb4ctfBH3PfwkhWp1Vb1EMoJvDnL/eB26IVWZLrrc1e6NnH9/vhzwSF/lbDSw==

VERÓNICA KATERINA LIRA RUAN | Fecha:2021-01-28 19:50:32 | Firmante

M/QLLARKXB2ldbo5O+s3qKbXf6gR8/N1jwJp48qknceRn+U+uxsDbOg5lt0Tr0WYbQrbr/zsipl9dCEb7t6YWEuGAsmakimBKnuJuGtD6VxR06GziTwx0wKaivXXZcdQe7gRobRxQMFGSvu3JvL2Npp8uzum5Skpc2MsFsU5venfleD+37NHsBVpzH5IMdbRmZL6j8uoALphNNptdfGr8XFOUvHANTgKruJBsvEAj7hEQUyG+CLBf1F/9kj6s48RwDh/YKUWpSTN/QF4vi43Aq3WbB8BRdshUrupD+rmFDkYLGE9MRIG67/YnoHXM4a6zhXjrgqgbAZPdUNSIMlw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3o1v5g

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/m9ErFQI4zOzmUJhD1U5fWeoFT6xvqlM>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

**“Caracterización fenotípica y transcriptómica de la mutante *recal*
de *Arabidopsis thaliana*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

NORMA YANIRI AVILES BALTAZAR

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2021

LISTA DEL JURADO REVISOR DE TESIS

Presidente:

Dr. Armando Hernández Mendoza - CIDC-UAEM

Secretario:

Dra. Verónica Lira Ruan - CIDC-UAEM

Vocal:

Dr. Luis Cardenas Torres - IBT-UNAM

Suplente:

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega - CCG-UNAM

Suplente:

María Angélica Santana Calderón - CIDC-UAEM

RESUMEN

Los genes de respuesta temprana juegan un papel primordial en las rutas de transducción de señales, al ser responsable de amplificar las respuestas a un estímulo determinado. Dentro de estos se encuentran los genes de la familia *ATL*, los cuales son inducidos por elicitores, durante la interacción planta-patógeno, tal es el caso del gen *ATL2*. Con el fin de analizar la regulación de *ATL2*, se aislaron mutantes de *Arabidopsis thaliana* utilizando la línea reportera *ATL2p::GUS*. Las mutantes que mostraron activación constitutiva de los ERGs (incluyendo *ATL2*) así como genes de defensa tardíos, se nombraron *eca* (expresión constitutiva de *ATL2*). Recientemente, se determinó que *eca2* es una mutante cuticular la cual presenta una reducción en el contenido de ceras y cutina. Así mismo, se demostró que *eca2* es resistente al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* y a la bacteria biótrofa *Pseudomonas syringae* y esta resistencia está determinada por la rápida inducción de la inmunidad innata. Por ello, siendo *eca2* la primera mutante cuticular que se ha descrito por ser resistente a dos patógenos de modo de vida diferente, se ha propuesto su uso como modelo de estudio para caracterizar los eventos tempranos que desencadenan la inmunidad innata vegetal.

Con el fin de identificar los elementos genéticos que intervienen en la regulación de *ECA2*, como trabajo de un proyecto de Tesis de Licenciatura se aisló y caracterizó a la mutante *recal* (revertante de *eca2*). La mutante *recal* se caracteriza por presentar reducción en tamaño de la receta, así como un aumento en el número de hojas. Se determinó de igual manera que *recal*, presenta permeabilidad en la cutícula y que es susceptible a *B. cinerea*, pero es resistente a *P. syringae*. Mediante un análisis genético se determinó que el fenotipo *recal* se debe a una mutación recesiva e independiente de la mutación *eca2*. Por lo tanto, *RECA1* podría estar funcionando como un nuevo elemento molecular, el cual regula positivamente la expresión de *ATL2*, ya que de acuerdo con los fenotipos evaluados en *recal*, no se revierten totalmente a los observados en la planta silvestre, si no que en muchos de los casos presentó fenotipos intermedios entre la planta silvestre y la mutante *eca2*. Por lo que en el presente trabajo nos enfocamos en continuar con la caracterización fenotípica de dicha mutante al igual que realizamos su caracterización transcriptómica.

"Este trabajo fue desarrollado bajo la tutoría del Dr. Mario Serrano, Investigador Titular A del Programa de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Gracias al apoyo económico de DGAPA-PAPIIT-UNAM por medio del proyecto IN203720."

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a el CONACYT por el apoyo económico con la beca No.929445 brindado durante la realización de este proyecto.

Al IICBA-UAEM, que me brindo su apoyo durante toda mi estancia, pero en especial a mis maestros y a la oficina del posgrado en ciencias.

A mi director de tesis, el Dr. Mario Serrano quien fue mi asesor durante 5 años desde el servicio social y Tesis de Licenciatura, gracias por permitirme formar parte de su grupo de laboratorio, por el apoyo durante la realización del proyecto, por las oportunidades para asistir a congresos y a estancias y sobre todo gracias por las enseñanzas.

A mis sinodales a la Dra. Verónica Lira, Dr. Armando Hernández, Dr. Luis Cardenas, Dra. Angélica Santana y al Dr. Raúl Peralta (QEPD), por su disponibilidad de tiempo, por sus comentarios y por su retroalimentación tanto en clase como en el proyecto de Tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio; M.C. Wendy Aragón, Dr. Israel Maruri, M.C. Jordan Romero, L.C.G. Emir Padilla, Ing. Domenica Brazales, Ing. Eduardo Martínez, Biól. Ana Karen Ávila, M.C. Ivethe García y L.C. Liz Cerezo, gracias por su ayuda y enseñanzas en el laboratorio, pero, sobre todo, gracias por su compañía y su amistad.

A los trabajadores, técnicos y doctores del Programa de Genómica Funcional de Eucariontes del CCG por su disposición, tiempo y apoyo.

A la Ingeniera Martha C. Torres Basaldua, por su apoyo con el material del laboratorio y del invernadero.

A la Biól. Laura Cervantes por su apoyo con el manejo del equipo del laboratorio y por su disponibilidad de tiempo.

Al Dr. Damien Formey por su apoyo con el análisis de RNA-seq de nuestros datos.

Al Dr. Alexandre Tromas por sus consejos y retroalimentación con el proyecto.

A mis padres Adela Baltazar y Apolinar Hilario, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, por estar siempre a mi lado y por su confianza,

A mis hermanos Rodolfo, Araceli y Omar Antonio por su apoyo y compañía.

A Saúl Luna por siempre apoyarme en todo lo que hago y en especial por impulsarme a continuar mejorando cada día, por acompañarme en las madrugadas a estudiar y por confiar en mí.

Para mis padres; Adela Baltazar Torres y Apolinar Aviles Hilarario

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 2 |
| 2.1 Interacción planta-patógeno | 2 |
| 2.2 Mecanismos de defensa de las plantas | 2 |
| 2.2.1 Mecanismos de defensas constitutivos..... | 3 |
| 2.2.2 Mecanismos de defensa inducibles | 3 |
| 2.3. Respuesta inmune desencadenada por PAMPs (PTI) | 4 |
| 2.3.1 Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) | 4 |
| 2.3.2 Respuestas intracelulares asociadas a la PTI | 4 |
| 2.4. Respuesta desencadenada por efectores (ETI) | 5 |
| 2.5 Genes de respuesta temprana..... | 6 |
| 2.5.1 Arabidopsis Tóxicos en Levadura (<i>ATL</i>) | 7 |
| 2.6.2 Mutantes con expresión constitutiva de <i>ATL2</i> (<i>eca</i> 's)..... | 8 |
| 2.6.3. Caracterización de la mutante <i>eca2</i> | 10 |
| 2.6.4 Identificación de mutantes <i>reca</i> (<i>revertoras de eca2</i>)..... | 11 |
| 2.6.5 Caracterización de la mutante <i>reca1</i> | 14 |
| 2.6.6 Caracterización genética de la mutante <i>reca1</i> | 16 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 17 |
| 5. OBJETIVOS..... | 19 |
| 6.- METODOLOGÍA..... | 20 |
| 6.1 Material vegetal | 20 |
| 6.1.1 Condiciones de crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 20 |
| 6.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> | 20 |
| 6.1.3 Cultivo en tierra | 20 |
| 6.2 Microorganismos patógenos | 20 |
| 6.3 Caracterización fenotípica de <i>reca1</i> | 21 |
| 6.3.1 Caracterización del área foliar de <i>reca1</i> | 21 |
| 6.3.2 Detección de ROS (Especies reactivas de oxígeno)..... | 21 |
| 6.4 Método de infección y de análisis con <i>Botrytis cinerea</i> | 21 |
| 6.5 Método de infección y de análisis con <i>Pseudomonas syringae</i> | 22 |
| 6.5.1 Extracción de RNA y análisis del transcriptoma de <i>reca1</i> | 22 |
| 6.6 Generación de la población de mapeo | 23 |
| 6.6.1 Extracción de DNA, secuenciación masiva y mapeo | 24 |
| 7. RESULTADOS..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 7.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE RECA1 | 25 |
| 7.1.1 Caracterización del área foliar de <i>reca1</i> | 25 |
| 7.1.2 Cuantificación de ROS (especies reactivas de oxígeno) | 27 |
| 7.2 CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA DE RECA1 | 27 |
| 7.2.1 Infección con <i>Pseudomonas syringae</i> y extracción de RNA | 27 |
| 7.2.2 Análisis de genes diferencialmente expresados (DEGs)..... | 29 |
| 7.2.3 Análisis de enriquecimiento de términos de ontologías génicas (GO-term enrichment analysis). | 32 |
| 7.2.4 Análisis de vías metabólicas y regulatorias en KEGG | 32 |
| 7.2.5 Análisis general de la vía del estrés biótico..... | 33 |
| 7.3 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE RECA1 | 38 |
| 7.3.1 Generación de la población de mapeo F ₂ | 38 |
| 7.3.1 Selección de la población de mapeo F ₂ | 39 |
| 8. DISCUSIÓN | 42 |
| 8. 1 La mutante <i>reca1</i> revierte completamente la resistencia a <i>Botrytis cinerea</i> , pero parcialmente a <i>Pseudomonas syringae</i> | 43 |
| 8.2 <i>reca1</i> no presenta acumulación de ROS | 44 |
| 8.3 Cambios morfológicos en la mutante <i>reca1</i> | 45 |
| 8.4 La mutante <i>reca1</i> revierte parcialmente la permeabilidad foliar | 46 |
| 8.5 La mutante <i>reca1</i> no revierte completamente la función de <i>ECA2</i> | 47 |
| 8.5 Caracterización genética de <i>reca1</i> | 48 |
| 9. CONCLUSIONES | 49 |
| 10. PERSPECTIVAS | 50 |
| 12. LITERATURA CITADA | 65 |

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado barreras tanto constitutivas como inducibles que les han permitido responder a múltiples factores de estrés ambiental, así como a ataques de herbívoros y patógenos, ya que pueden detectar señales químicas liberadas durante dichas interacciones y de esta manera iniciar una respuesta de defensa. Esas señales, conocidas generalmente como elicitores, se perciben por receptores específicos de la planta. Las respuestas a los elicitores incluyen, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive Oxygen Species*), incremento de niveles de calcio en el citoplasma, inducción de cascadas de señalización y cambios en la expresión de genes de respuesta temprana (Dangl & Jones, 2001; Serrano & Guzmán, 2004).

Los genes de respuesta temprana (ERGs; *Early Response Genes*) juegan un papel principal en las rutas de transducción de señales, al ser los responsables de amplificar las respuestas a un estímulo determinado. Dentro de éstos se encuentran los genes *ATL* (*Arabidopsis Tóxicos en Levadura*), que se expresan durante las interacciones planta-patógeno (Martínez-García *et al.*, 1996). Varios miembros de esta familia, incluyendo *ATL2*, se inducen por elicitores. Para analizar la regulación de *ATL2* se han aislado cinco mutantes, a las que se nombraron *eca* (*expresión constitutiva de ATL2*), las cuales mostraron la activación tanto de ERGs como de genes de defensa tardíos (Serrano & Guzmán, 2004).

Recientemente, se determinó que la planta mutante *eca2* es resistente al hongo *Botrytis cinerea* y a la bacteria *Pseudomonas syringae* (Blanc *et al.*, 2018). A través de un análisis global de expresión, se observó que los genes involucrados en la inmunidad innata se inducen rápidamente durante la interacción planta-*B. cinerea*, lo cual indica que *ECA2* es un regulador transcripcional negativo de la inmunidad innata vegetal. Adicionalmente, a partir de un análisis bioquímico, se observó que la permeabilidad de la cutícula de la planta *eca2* está modificada, debido a una reducción en el contenido de ceras y cutina. Esta es la primera mutante afectada en estos dos polímeros que se ha descrito y que es resistente a *B. cinerea*, por lo que su estudio se hace muy interesante (Blanc *et al.*, 2018).

Con el fin de identificar a los elementos moleculares que intervienen en la regulación de *ATL2* mediada por *ECA2*, durante la licenciatura aislamos a la mutante *reca1* (*revertante de eca2*), la cual revierte la expresión constitutiva de *ATL2* en el fondo mutante *eca2* (Aviles, 2018). Dando continuidad a esta identificación, durante el presente trabajo se realizó la caracterización fenotípica y transcriptómica de *reca1*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Interacción planta-patógeno

Para poder responder a la amplia gama de patógenos y condiciones ambientales adversas a las que se encuentran continuamente sometidas, las especies vegetales han desarrollado por evolución, una serie de mecanismos moleculares que aseguran su supervivencia y reproducción. Dichos mecanismos permiten que las células vegetales puedan percibir, reconocer y actuar en contra de los patógenos, lo que se traduce en lo que Jones y Dangl (2006) describieron como un sistema de inmunidad innata. Este sistema distingue las señales propias (endógenas) de la planta, de las ajenas (exógenas) derivadas de patógenos, para posteriormente activar mecanismos de defensa en un intento por restringir o prevenir el crecimiento del patógeno.

De manera general, los fitopatógenos están obligados a obtener nutrientes de la planta y para ello necesitan entrar a los tejidos vegetales, esto lo consiguen mediante proteínas que degradan la pared celular de la planta o penetrando directamente a través de heridas o aberturas naturales como los estomas (Madriz, 2002; Ojito-Ramos & Portal, 2010; Riveros, 2010).

Una vez que el patógeno se encuentra dentro de la planta, buscará nutrirse, por lo que pueden clasificarse en tres grupos con base en ese requerimiento; 1) los biótrofos que se distinguen por conservar vivas las células de la planta, debido a que suelen formar estructuras especializadas, a través de las cuales toman agua y nutrientes de la planta, por ejemplo; la bacteria *Pseudomonas syringae*, la cual causa pudrición y/o podredumbre principalmente en las hojas y tallos de las plantas 2) Los necrótrofos que se caracterizan por producir la muerte de las células hospedantes, utilizando diferentes toxinas para degradar el tejido vegetal y facilitar la invasión, obteniendo los nutrimentos que necesitan para su sobrevivencia, por ejemplo: *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris. Y 3) los hemibiótrofos quienes pertenecen a una categoría intermedia, debido a que mantienen vivas a las células de la planta sólo durante la etapa inicial de su ciclo biológico, para posteriormente actuar como un patógeno necrótrofo, por ejemplo: el hongo *Perenospora parasitica*, causante de la enfermedad conocida como “mildiu vellosa” (Castro & García, 2009; Riveros, 2010; Ojito-Ramos & Portal, 2010; AbuQamar *et al.*, 2017).

2.2 Mecanismos de defensa de las plantas

Para que los patógenos colonicen los tejidos vegetales deben superar los mecanismos de defensa de la planta; los cuales están asociados a su morfología y a la acumulación de compuestos

químicos. Este tipo de defensa es mejor conocido como mecanismos de defensa constitutivos, debido a que no sólo protegen a la planta de la invasión, sino que también le dan fuerza y rigidez. Además, existen mecanismos de defensa inducibles, que proveen a la planta de una protección específica (Zipfel, 2008; Escudero, 2014). Los cuales son descritos a continuación.

2.2.1 Mecanismos de defensas constitutivos

Los mecanismos de defensa constitutivos se encuentran localizados en la superficie de la planta, en la cual se inicia el diálogo planta-patógeno o dentro de las células vegetales. Por ello, estos mecanismos de resistencia se dividen principalmente en estructurales (o pasivos) y bioquímicos (o activos) (Riveros, 2010).

Los mecanismos de defensa estructurales se basan generalmente en los atributos de la planta y no involucran una respuesta activa de defensa frente al patógeno. Estos atributos incluyen la composición y grosor de la cutícula y pared celular, la presencia de tricomas, el tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas, la presencia de depósitos de calosa, lignina y la capa de corcho o suberina que se forman en la epidermis (Castro & García, 2009; Ojito-Ramos & Portal, 2010).

Por otro lado, las plantas se caracterizan por poseer un alto contenido de compuestos con actividad antimicrobiana que constituyen una eficiente barrera bioquímica contra diferentes patógenos. Dentro de estos compuestos se encuentran los péptidos antimicrobianos y los metabolitos secundarios. Los péptidos actúan como una barrera frente a un amplio rango de microorganismos patógenos, dentro de este grupo los péptidos mejor caracterizados son las defensinas, las tioninas y las proteínas LTP (*Lipid Transfer Protein*). Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran; fitoanticipinas, fitoalexinas, alcaloides, fenoles, aceites esenciales, terpenos e inhibidores de proteasas. Entre los mecanismos de defensa bioquímico también se pueden incluir a las ROS, que se producen en la célula en respuesta al estrés biótico o abiótico, y que tienen actividad antimicrobiana (Riveros, 2010; Escudero, 2014).

2.2.2 Mecanismos de defensa inducibles

Cuando el patógeno consigue superar las primeras barreras de defensa constitutivas de la planta y penetra la pared celular hasta mantener contacto con la membrana plasmática, debe enfrentarse a los mecanismos de defensa inducibles, los cuales proporcionan una resistencia más

específica frente al patógeno, ya que una vez que las células vegetales logran reconocer al microorganismo, ocurre la activación del sistema de inmunidad innata de la planta el cual puede dividirse en dos niveles de resistencia: PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) y ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones & Dangl, 2006; Boller & Felix, 2009).

2.3. Respuesta inmune desencadenada por PAMPs (PTI)

PTI es la primera línea de resistencia inducible (Jones & Dangl, 2006), la cual se inicia tras la percepción de elicitores que son conocidos comúnmente como PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) o MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*), que se aíslan de agentes infecciosos, señales endógenas de la planta derivadas de la acción del agente patógeno o las señales de microorganismos no patogénicos, respectivamente (Zipfel, 2008; Boller & Felix, 2009; Ojito-Ramos & Portal, 2010). De manera general, estos elicitores son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs; *Pattern Recognition Receptors*).

2.3.1 Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)

De acuerdo con Boller y Yang (2009), los PRRs son proteínas localizadas en la superficie de la célula, que tienen gran afinidad y especificidad, ya que reconocen un PAMP específico en concentraciones por debajo de los nanomoles. Hay dos clases de PRRs: RLPs (*Receptor Like Protein*) y RLKs (*Receptor Like Kinase*). Ambos tipos de proteínas están formadas por un dominio extracelular que percibe a los PAMPs, MAMPs o DAMPs, un dominio transmembranal con función estructural de anclaje y un dominio citoplasmático que en las RLKs es un dominio quinasa que transduce la señal mediante eventos de fosforilación (Göhre & Robatzek, 2008).

2.3.2 Respuestas intracelulares asociadas a la PTI

El reconocimiento de los PAMPs por los PRRs acciona diversos cambios moleculares y fisiológicos. Entre segundos y minutos después del reconocimiento, tal como Dangl & Jones en el 2001 así como Zipfel en el 2008 lo mencionaron, se genera una rápida difusión de iones a través de la membrana plasmática, aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular, activación de MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) o CDPKs (*Calcium-Dependent Protein Kinases*), y la producción de ROS (H_2O_2 y O_2^-).

Entre 5 y 30 minutos después de la percepción del elicitor, un nuevo grupo de transcritos pueden identificarse y comprenden el ~1% del total de los RNA mensajeros; estos codifican para proteínas quinasas y factores de transcripción. Las proteínas quinasas, así como el óxido nítrico (NO; *Nitric Oxide*) y las ROS contribuyen a la activación transcripcional de una batería de genes de defensa, mejor conocidos como ERGs (*Early Response Genes*), entre cuyas funciones se incluye la activación de vías de señalización de defensa dependientes de etileno (ET), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) (Dangl & Jones, 2001). Finalmente, después de horas o días, estas fitohormonas son responsables de la expresión de un segundo conjunto de genes, llamados genes de respuesta tardía (tales como los *PR*; *Pathogen-Related genes*), así como de la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos y la producción de barreras histológicas como calosa o lignina. En general, las fitohormonas inducen vías de señalización que mantienen a otras partes de la planta alerta y en defensa. Se ha demostrado que las vías de señalización específicas de algunas fitohormonas se activan para conferir resistencia en contra de patógenos determinados, por ejemplo: la vía mediada por JA y ET confiere resistencia contra de necrótrofos e insectos herbívoros, ya que controla la expresión de genes *PR-3*, *PR-4* y *PDF1.2* (*Plant Defensin 1.2*); mientras que la vía mediada por SA confiere resistencia en contra de biótrofos (Chassot *et al.*, 2008; Vidhyasekaran, 2013). Las vías de señalización inducidas por hormonas no son simples cascadas lineales o aisladas, sino que pueden comunicarse entre ellas, por lo que se cree proveen a la planta de una poderosa versatilidad, la cual ayuda a la planta a decidir qué estrategia de defensa seguir, dependiendo del tipo de patógeno al que se esté enfrentando.

2.4. Respuesta desencadenada por efectores (ETI)

A pesar de la efectividad de los mecanismos activados por la PTI, algunos patógenos han desarrollado factores para suprimir o evadir este primer nivel de resistencia, mediante la producción de pequeños péptidos conocidos como efectores o proteínas de avirulencia (Avr). Estas moléculas son necesarias para el crecimiento y propagación del patógeno. Sin embargo, las plantas responden mediante proteínas R, que son receptores intracelulares específicos que reconocen a las proteínas Avr, induciendo la segunda cascada de señalización de la inmunidad innata de la planta, la inmunidad desencadenada por efectores (**Figura 1**) (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2008; Coluccia, 2015).

De acuerdo con Jones y Dangl (2006); la mayoría de los genes R codifican para proteínas NB-

LRR (*Nucleotide Binding Leucine-Rich Repeat*), que contienen un sitio de enlace a nucleótidos (NB) y dominios repetidos ricos en Leucina (LRR), estos últimos implicados en el reconocimiento del patógeno. De manera general, si la proteína NB-LRR reconoce a su efector correspondiente se activa la ETI, que es más rápida y fuerte que PTI, ya que culmina en muerte celular programada, conocida como una respuesta hipersensible (HR; *Hypersensitive response*). La HR no se extiende normalmente más allá de la célula infectada; ya que su función es limitar la expansión del patógeno al resto de las células. Esta respuesta es muy eficiente frente a patógenos formadores de haustorios (patógenos biótrofos) donde la HR limita la propagación del patógeno restringiendo la disponibilidad de agua y nutrientes (Göhre & Robatzek, 2008; Escudero, 2014).

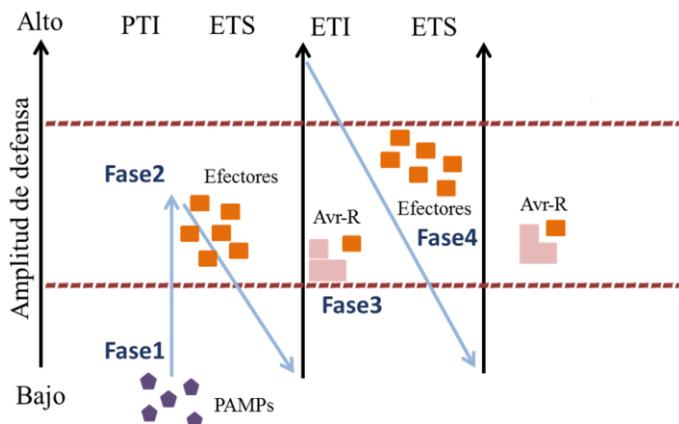


Figura 1. Modelo zigzag de la inmunidad innata en plantas. Fase 1, los PRRs reconocen a los PAMPs, lo que resulta en la activación de la PTI. Fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que contribuyen a la virulencia, los que pueden interferir con la PTI, y esto resulta en una ETS (susceptibilidad desencadenada por efectores). Fase 3, determinados efectores son reconocidos por una de las proteínas NB-LRR, resultando en la activación de ETI, lo que conlleva a la resistencia a la enfermedad y casi siempre, a una respuesta de muerte celular programada en el sitio de infección. Fase 4, la selección natural conduce al patógeno a evitar la ETI adquiriendo efectores adicionales, que les permite evadir la ETI. A su vez, en las plantas, la selección natural da lugar a nuevas especificidades; genes R, que activan la ETI nuevamente (adaptado de Jones & Dangl, 2006).

2.5 Genes de respuesta temprana

De 5-30 minutos después de la percepción del elicitador, en la planta se activa la transcripción de los ERGs, los cuales se encargan de regular la expresión de genes de respuesta tardía (Newman *et al.*, 2013). El tratamiento de *Arabidopsis* con los elicitores *flg22* y *elf18*, causa la inducción de casi 1,000 genes y la inhibición de aproximadamente 200 genes en 30 minutos. El patrón de regulación de *flg-22* (que es el componente principal del flagelo constituido por 22 aminoácidos de la proteína flagelina), inicia la señalización a través del receptor FLS2, la cual le permite a la planta una rápida activación de mecanismos de defensa como el reforzamiento de la pared celular por

calosa, y producción de ROS y la inducción de numerosos genes relacionados con la defensa (Boller & Yang, 2009). De hecho, otros MAMPs tales como la quitina de los hongos y elicitores endógenos parecen inducir un conjunto similar de genes, lo cual sugiere una respuesta similar de activación de genes tempranos para diversos MAMPs y DAMPs (Boller & Felix, 2009). Esto revela que los ERGs juegan un papel importante en la amplificación de las señales inducidas por diversas moléculas elicitoras. Por esta razón, estos genes pueden utilizarse como punto de partida para caracterizar las respuestas tempranas y tardías (Serrano & Guzmán, 2004). Sin embargo, cabe resaltar que los elementos genéticos que participan en la activación y la regulación de ERGs no se conocen completamente.

2.5.1 Arabidopsis Tóxicos en Levadura (ATL)

Entre los genes de respuesta temprana a elicitores se encuentra los *ATL*, que pertenecen a una familia multigénica en *Arabidopsis thaliana* (Familia *Brassicaceae*) y *Oriza sativa* (Familia *Poaceae*) (Serrano *et al.*, 2006) y que codifica para proteínas con dominios zinc-finger RING-H2 (*Really Interesting New Gene*) que han sido descritos por tener funciones de ligasa de ubiquitina E3 (Martínez-García *et al.*, 1996). De esta familia, *ATL2* fue el primer miembro identificado y fue seleccionado por ser un gen de *Arabidopsis thaliana* tóxico cuando se sobreexpresa en *Saccharomyces cerevisiae*, por ello la connotación en el nombre de la familia: genes de *Arabidopsis Tóxicos en Levadura (ATL)* (Martínez-García *et al.*, 1996; Guzmán, 2012).

Desde la caracterización temprana de *ATL2*, Salinas-Mondragón y colaboradores en 1999 mostraron, mediante el empleo de plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo C24 transformadas con la fusión del promotor *ATL2* al gen reportero β -glucuronidasa (*ATL2p::GUS*), que la expresión de *ATL2* es rápida y transitoriamente inducida por MAMPs o DAMPs, tales como quitina, *flg22* o celulosa. Se observó un aumento de la actividad de GUS después de 15 minutos de incubación con quitina o celulosa, la cual continuó aumentando hasta después de 120 minutos de incubación. Lo que sugirió que, dado que los genes de respuesta temprana probablemente tienen funciones reguladoras y se espera que jueguen un papel central en vías de transducción de señales, resultaría interesante estudiar mutantes afectadas en la regulación de este gen.

2.6.2 Mutantes con expresión constitutiva de *ATL2* (*eca*'s)

En un trabajo previo realizado por Serrano y Guzmán en el 2004, observaron mediante pruebas histoquímicas con GUS que, las plántulas transgénicas de *A. thaliana* (*ATL2p::GUS*) en condiciones basales, es decir en ausencia de elicitores, mostraron una baja expresión del reportero GUS la cual se observó en la plántula como un punto azul en el meristemo apical del brote (**Figura 2**). Sin embargo, cuando se incubaban las plántulas durante 120 minutos en medio MS adicionado con el patógeno o elicitor (en este caso fue con celulicina) se observaba una fuerte expresión del reportero en toda la plántula. Utilizando este fenotipo, se mutagenizaron semillas de dichas plantas transgénicas y posteriormente por escrutinios genéticos, se aislaron 5 mutantes a las que nombraron *eca* (expresión constitutiva de *ATL2*), debido a que podía observarse la inducción del gen reportero GUS en toda la plántula independientemente de que hubiera o no elicitor (**Figura 2**).

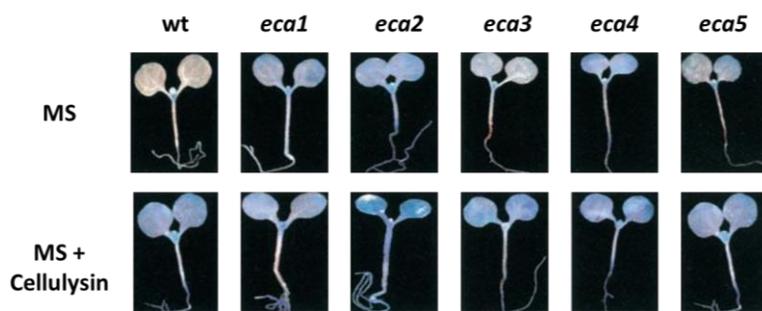


Figura 2. Expresión constitutiva de *ATL2* en plántulas de las mutantes *eca*. Localización histoquímica del gen reportero GUS. Plántulas de 7 días germinadas en medio MS, incubadas durante 120 minutos en MS y en MS con celulosa (100 µg/ml) (Serrano & Guzmán, 2004).

Posteriormente, mediante un análisis genético, se determinó que el fenotipo de las mutantes *eca* se debe a mutaciones recesivas independientes. Por otro lado, dado que *ATL2* responde a quitina, se cuantificó la expresión de otros genes de respuesta temprana que responden también a ese elicitor (*Atlg27730* y *At3g45640*) y se encontró que dichos genes se activan en las cinco mutantes indicando que todas ellas están afectadas en la vía de señalización de respuesta a quitina. Siguiendo con esta caracterización, para determinar si la expresión de *ATL2* estaba ligada a las respuestas de la planta a patógenos, se analizó el nivel de expresión de genes descritos como genes de defensa tardía; *NPR1*, *PAL* y *CHS*, los cuales se activaron en todas las mutantes. Mientras que, por otra parte, en algunas mutantes *eca* se activaron diferentes genes, incluyendo otros miembros de la familia *ATL* y genes relacionados con patogénesis; *PR1* y *PDF2.1*, que son marcadores de vías de respuesta de defensa de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), (Serrano & Guzmán, 2004). Posteriormente, se comprobó que las mutantes *eca* modifican la expresión tanto de genes

tempranos como tardíos, lo que indicaría que las proteínas ECA son reguladores negativos de la inmunidad innata y pudieran jugar un papel importante en la amplificación de los mecanismos de defensa tardíos (Serrano y Guzmán, 2004).

Por lo anterior y con el fin de entender mejor las respuestas de defensa mediadas por las proteínas ECA, Blanc y colaboradores en el 2018, examinaron las respuestas de las mutantes *eca* durante la interacción planta-patógeno, y encontraron que la mutante *eca2* es resistente a la bacteria biótrofa *Pseudomonas syringae* (Figura 3) así como al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* (clasificado como el segundo patógeno necrótrofo más importante en la agricultura) (Figura 4), pero es susceptible a la bacteria hemibiótrofa *Phytophthora brassicae*.

Debido a que sólo la mutante *eca2* es resistente a estos patógenos, los resultados indican que la sobreexpresión de varios miembros de la familia *ATL*, incluyendo *ATL2*, no bastaría para obtener resistencia a patógenos, sino que esto se observa sólo para *eca2*. La mutante *eca2* es, por lo tanto, un interesante modelo para analizar las respuestas de defensas tempranas y tardías inducidas por *A. thaliana* durante la interacción con patógenos muy diversos.

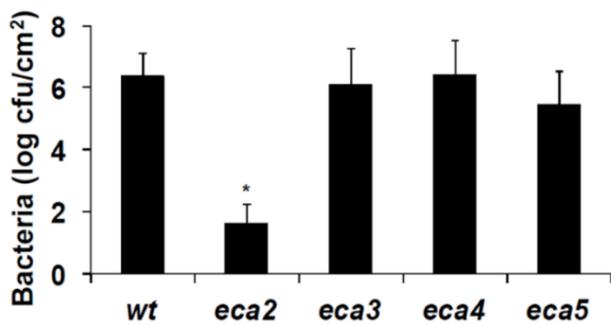


Figura 3. Infección de mutantes *eca* con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Tres discos de hojas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *P. syringae* pv. *maculicola* se homogeneizaron para determinar unidad formadora de colonias (cfu/cm²) 3 dpi (días después de la infección). Los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba T-student ($p < 0,05$) (Blanc *et al.*, 2018).

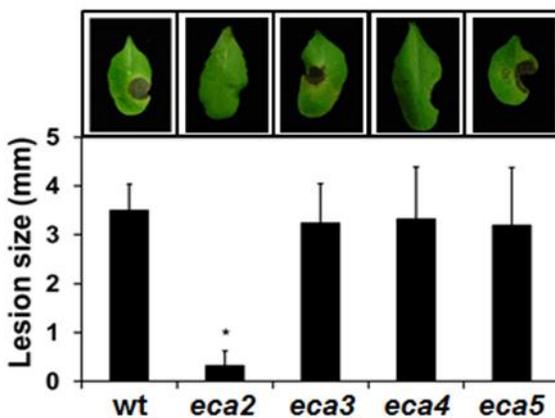


Figura 4. Infección de mutantes *eca* con *Botrytis cinerea*. Plantas de *A. thaliana* fueron infectadas con *B. cinerea* y el tamaño de la lesión se midió 3 dpi. Asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba T-student ($p < 0,05$) (Blanc *et al.*, 2018).

2.6.3. Caracterización de la mutante *eca2*

La acumulación de ROS y la activación de ERGs inducidos por MAMPs son eventos tempranos que están modificados en la mutante *eca2* durante la respuesta inmune innata de la planta. En *eca2*, las ROS se acumulan constitutivamente en plantas no infectadas y aumentan de manera más rápida comparada con la planta silvestre después de la interacción con *B. cinerea* (**Figura 5**). Esto sugiere que se trata de una respuesta de defensa “priming” (lo que se define como la sensibilización de un organismo que rige de manera más rápida y robusta la activación de las respuestas de defensa ante un ataque) (Blanc *et al.*, 2018).

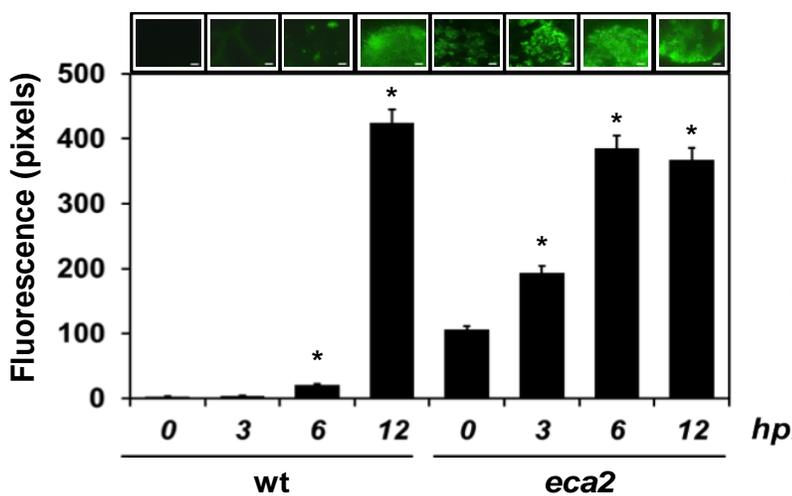


Figura 5. Análisis de respuestas de defensa. La mutante *eca2* presenta un estado de “priming” respecto a la acumulación de ROS ya que puede ser rápida y fuertemente aumentada después de la interacción con *B. cinerea*. En las imágenes de la parte superior, puede observarse la acumulación de ROS en hojas mediante el uso de sondas fluorescentes 5- (y 6)- carboxy-2’7-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCF-DA) (Blanc *et al.*, 2018).

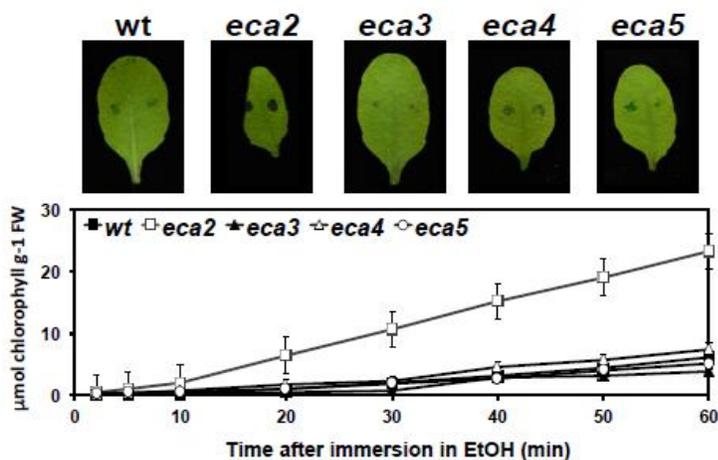


Figura 6. Cuantificación de clorofila. La mutante *eca2* mostró mayor retención de azul de toluidina (fotografías en la parte superior) y significativamente más lixiviación de clorofila en comparación con las plantas wt (como puede observarse en la gráfica) (Blanc *et al.*, 2018).

También se encontró que las plantas mutantes *eca2* presentan una mayor permeabilidad en la cutícula (**Figura 6**), lo cual se debe a la reducción en el contenido de ceras y cutina (**Figura 7**). además de ser resistente a *B. cinerea*, lo cual la convierte en la primera mutante descrita con dichas

características. Finalmente, para determinar los cambios transcripcionales generados por la mutación *eca2*, se realizó un análisis global de expresión y se observó que algunos genes que están involucrados en la inmunidad innata se inducen rápidamente durante las interacciones planta-*B. cinerea* (**Figura 8**) (Blanc *et al.*, 2018). Estos resultados convierten a *eca2* en un modelo interesante para caracterizar bases moleculares para la defensa contra patógenos comenzando en el reconocimiento en la cutícula vegetal y la activación de la inmunidad innata.

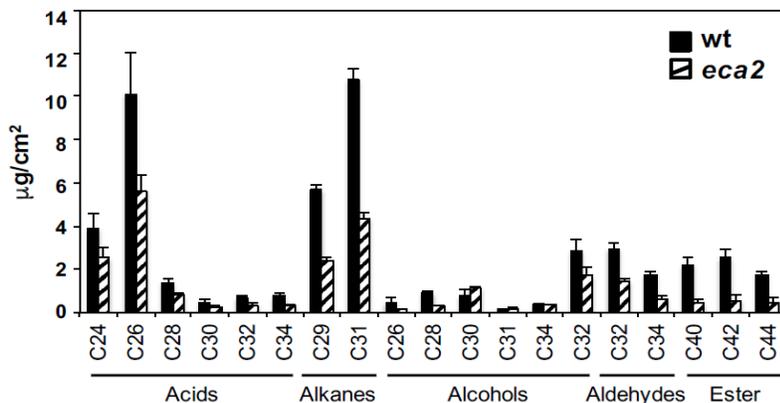


Figura 7. Caracterización de la composición química de las ceras cuticulares en las plantas wt y *eca2*. Componentes cuticulares y de ceras de hojas de *eca2*. (Blanc *et al.*, 2018).

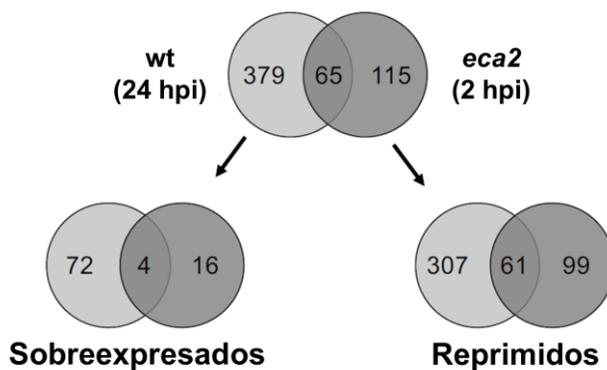


Figura 8. Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados (DEGs). Genes sobreexpresados y reprimidos a 2 hpi (horas después de la inoculación) en *eca2* en comparación a 24 hpi en las plantas wt (Blanc *et al.*, 2018).

2.6.4 Identificación de mutantes *reca* (*revertoras de eca2*)

Con base en los antecedentes, sabemos que la proteína ECA2 es un regulador negativo de la expresión del gen *ATL2* en la planta silvestre (*pATL2::GUS*), ya que en ausencia del patógeno, la expresión de *ATL2* está confinada al meristemo apical del brote (Serrano & Guzmán, 2004). Aunque cuando se expone la planta al patógeno la expresión de *ATL2* se extiende por toda la planta (**Figura 9**). Sin embargo, en la mutante *eca2* el gen *ATL2*, tiene expresión constitutiva

independientemente de la presencia del patógeno (**Figura 10**).

En un intento por identificar nuevos elementos que participaran en la regulación de la expresión de *ATL2* mediada por *ECA2*, se realizó una mutagénesis con EMS de semillas de la mutante *eca2* para identificar mutantes revertoras de la expresión constitutiva de *ATL2*, las cuales regularan negativamente a *ECA2* o bien positivamente a *ATL2*, de manera que se obtuviera el fenotipo silvestre observado en ausencia de MAMPs (**Figura 11**), por lo que, tras el escrutinio con tinciones histoquímicas de GUS de 22,000 plantas M₂, se identificó una mutante a la cual nombramos *recal* (*revertora de eca2*). Posteriormente, demostramos que en dicha mutante no afectamos al gen reportero GUS ni al promotor *ATL2*, ya que al incubar plántulas de 7 días de edad de *recal* en medio MS líquido adicionado con 100µg/ml de celulasa Onozuka RS durante 120 minutos, se observó un aumento en la actividad de GUS, el cual fue más evidente en el caso de la wt y *recal*, ya que en *eca2* se siguió manteniendo el mismo patrón de expresión observado en ausencia de la celulasa (**Figura 12**).

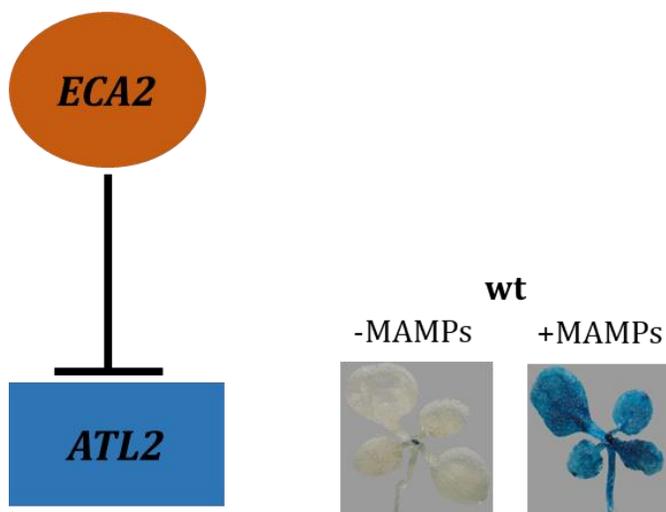


Figura 9. *ECA2* es un regulador negativo de la expresión del gen *ATL2* en las plantas silvestre. Del lado derecho se observa la expresión de *ATL2* en plántulas silvestres (*ATL2p::GUS*) de 7 días de edad en ausencia y presencia de MAMPs (Aviles, 2018).

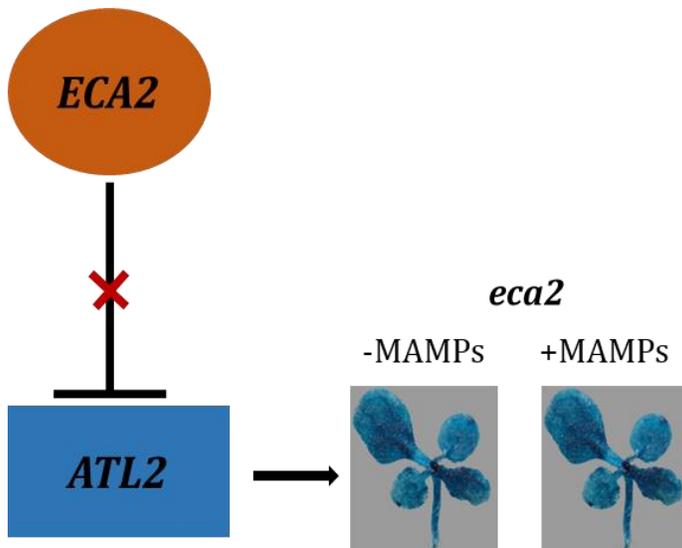


Figura 10. En la mutante *eca2* no está presente la regulación negativa observada en las plántulas silvestres. Del lado derecho se observa la expresión constitutiva de *ATL2* en plántulas de 7 días de edad de la mutante *eca2* (*ATL2p::GUS*) en ausencia y presencia de MAMPs (Aviles, 2018).

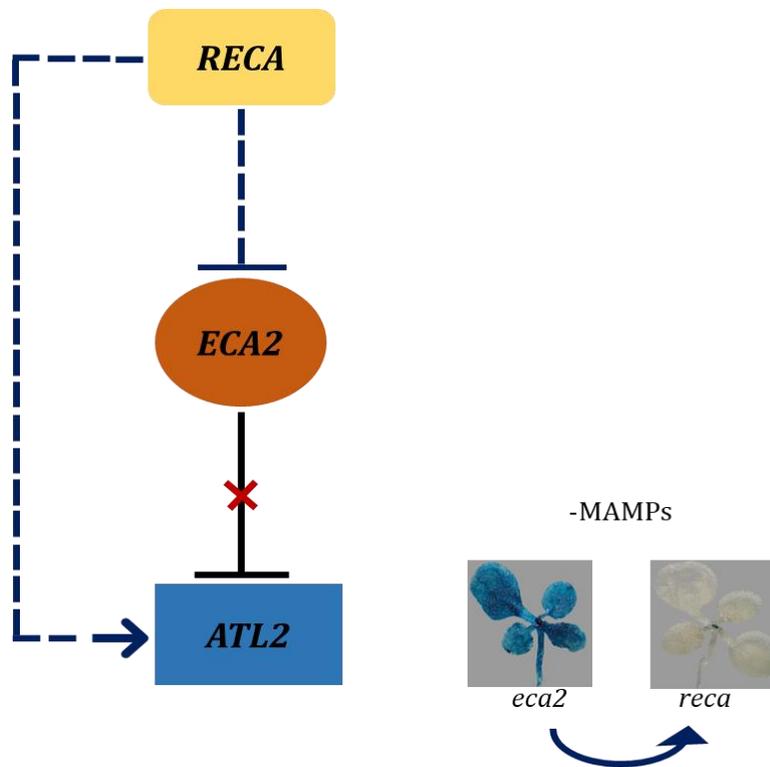


Figura 11. Modelo hipotético de la regulación de *RECA1* sobre *ATL2*. *RECA* podría regular negativamente a *ECA2* o bien podría regular positivamente a *ATL2*, de manera que se obtenga el fenotipo silvestre observado en ausencia de MAMPs a partir de la mutante *eca2* (Aviles, 2018).

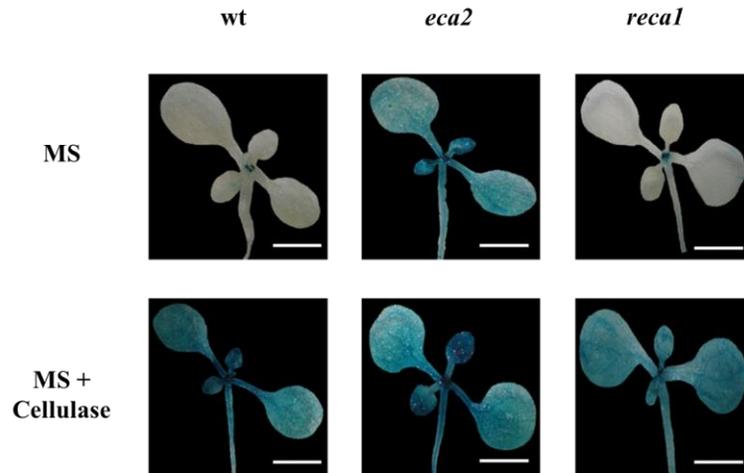


Figura 12. Localización histoquímica del gen reportero GUS. Se muestran imágenes representativas de plántulas de 7 días de edad (germinadas en medio MS) que fueron incubadas 120 minutos en medio MS líquido y medio MS líquido adicionado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de celulasa Onozuka RS (Aviles, 2018).

2.6.5 Caracterización de la mutante *recal*

Además de revertir el patrón de expresión constitutivo de *ATL2*, la mutante *recal* se caracteriza por presentar una roseta más pequeña que la mutante *eca2* (**Figura 13**), así como una cutícula más permeable en comparación con la wt (**Figura 14**).

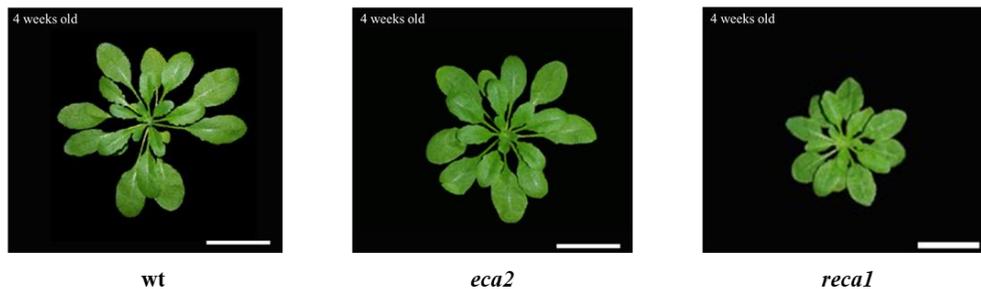


Figura 13. Fenotipo de wt, *eca2* y *recal*. Plantas de 4 semanas de edad. Barra 3 cm.

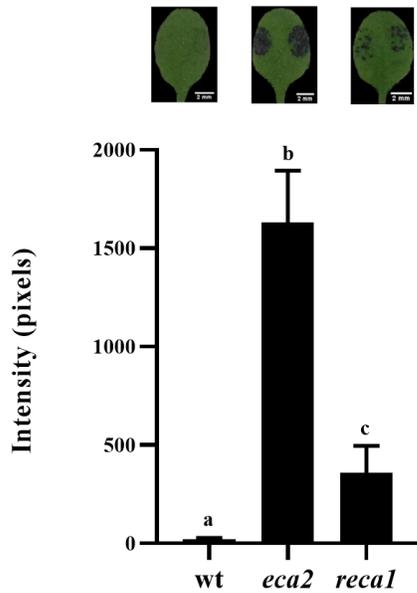


Figura 14. Permeabilidad de la cutícula. Se colocaron gotas (6 ul) de azul de toluidina sobre la superficie de la hoja durante 2 horas y después se enjuagó con agua. La mancha azul permanece en la hoja si la planta presenta una cutícula más permeable. Las imágenes son representativas de un ensayo (n=30). El experimento se realizó tres veces y se obtuvieron resultados similares (Aviles, 2018).

La mutante *reca1* reveló cambios en las respuestas de defensa, ya que como puede observarse en las gráficas de la **Figura 15**, mostró diferentes patrones de expresión de genes involucrados en defensa, así como resultó ser susceptible a *B. cinerea* (**Figura 16**), pero resistente a *P. syringae* (**Figura 17**).

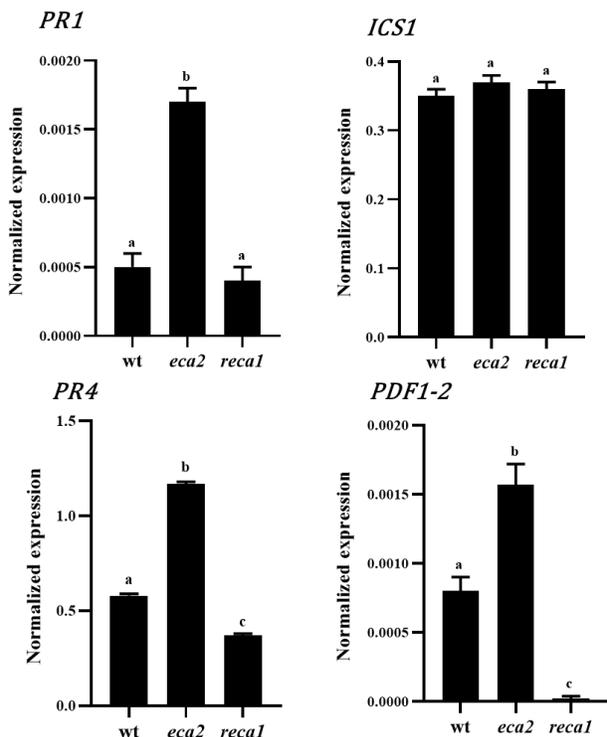


Figura 15. Análisis de expresión génica por qRT-PCR de genes marcadores de SA, ET y JA. La expresión de los genes seleccionados fue determinada a partir de plántulas de 7 días y normalizada con respecto a los genes de referencia (*CF150* y *At4g26410*). Las barras representan las medias (\pm SD) evaluadas de tres experimentos con sus tres réplicas técnicas (n=9). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$) (Aviles, 2018).

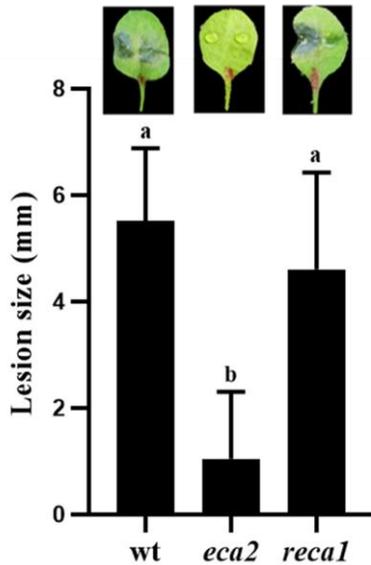


Figura 16. Infección con *Botrytis cinerea*. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* (wt, *eca2* y *reca1*) fueron infectadas con *Botrytis cinerea* y el tamaño de la lesión se midió 3 dpi. En la parte superior se muestran imágenes representativas de la infección. Las barras representan las medias (\pm SD) evaluadas de tres experimentos independientes (n=75). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$) (Aviles, 2018).

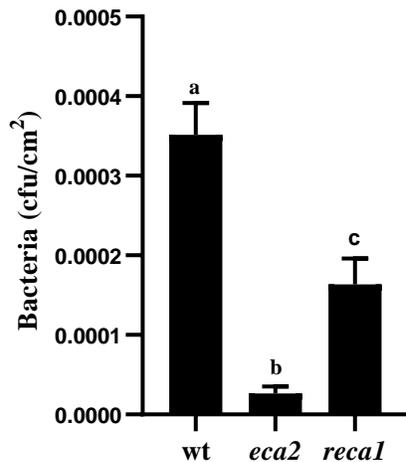


Figura 17. Infección con *Pseudomonas syringae*. Seis discos de hojas de *Arabidopsis thaliana* (wt, *eca2* y *reca1*) inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* se homogeneizaron en $MgCl_2$ (10 mM) para determinar las unidades formadoras de colonias (cfu/cm²) 3 dpi (días después de la infección). Las barras representan las medias (\pm SD) evaluadas de tres experimentos independientes (n=15). Las letras indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$) (Aviles, 2018).

2.6.6 Caracterización genética de la mutante *reca1*

Posteriormente para determinar el genotipo de *reca1*, realizamos el análisis de la generación F₁ de la cruce genética; *eca2* X *reca1*, y se determinó que el fenotipo *reca1* es mediado por un gen independiente de la mutación *eca2* además de que se trata de una mutación recesiva. Por lo tanto, *RECA1* podría funcionar como un elemento molecular que regula positivamente la expresión de *ATL2* en *eca2*, ya que de acuerdo con los fenotipos evaluados en *reca1*, no se revierten totalmente a los observados en la wt, si no que presentó fenotipos intermedios entre la wt y la mutante *eca2* (Figuras 14, 16 y 17) (Aviles, 2018), por lo que el continuar con su caracterización molecular y transcriptómica nos permitirá conocer los mecanismos y elementos moleculares que intervienen en la regulación de *ATL2* lo cual ha sido poco explorado a la fecha.

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas están en constante interacción con múltiples microorganismos, incluyendo patógenos tales como bacterias, virus, nematodos y hongos. Cabe resaltar que entre un 25% a un 50% de los alimentos de origen vegetal se pierden durante la producción y postcosecha, debido al ataque de estos microorganismos. Es por ello que el estudio de los mecanismos de defensa que la planta utiliza en contra de los patógenos tiene relevancia científica y económica. La planta mutante *eca2* modifica la expresión de genes de respuesta temprana y es resistente a el hongo *Botrytis cinerea* y a la bacteria *Pseudomonas syringae*, lo que la convierte en un modelo muy interesante para estudiar la inducción temprana de las defensas vegetales. Por ello, en este trabajo se propuso estudiar a la mutante *reca1*, para identificar las bases moleculares reguladas por el gen *ECA2*. Con este fin, propusimos realizar su caracterización transcriptómica, lo cual nos permitirá establecer vías de regulación tanto para los genes de respuesta temprana, así como para las respuestas a múltiples patógenos de interés agronómico.

4. HIPÓTESIS

La caracterización transcriptómica de la mutante *recal* nos permitirá caracterizar los eventos tempranos en la interacción planta-patógeno.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la caracterización fenotípica y transcriptómica de la mutante *recal*.

Objetivos específicos

- * Realizar la caracterización fenotípica de *recal*.
- * Realizar la caracterización transcriptómica de *recal*.
- * Generar la población de mapeo de *recal*.

6.- METODOLOGÍA

6.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de la mutante *eca2* de *A. thaliana* y de su parental correspondiente (*pATL2::GUS*) (Serrano y Guzmán, 2004) identificada como wt y semillas de *recal*, al igual que se utilizaron semillas de la población F₂ resultantes de la cruce entre *eca2* X *recal* generadas por Aviles (2018).

6.1.1 Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

6.1.2 Cultivo *in vitro*

Las semillas de *A. thaliana*, fueron esterilizadas mediante dos lavados consecutivos con etanol al 70% y 100% durante 15 minutos cada uno. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en cajas Petri con medio sólido ½ MS (Murashige y Skoog: Sigma-Aldrich), 1% de sacarosa y 0.8% de agar, pH 5.7, y se mantuvieron durante 4 días a 4°C. Las cajas Petri se transfirieron a la cámara de crecimiento (conviron CMP6010) con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad a una temperatura de 20-22°C.

6.1.3 Cultivo en tierra

Las semillas se vernalizaron a 4°C durante 4 días y después se colocaron en sustrato *Sunshine* mezcla #3 y vermiculita (3:1), para posteriormente dejarlas germinar y crecer en la cámara de crecimiento (conviron CMP6010) con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad a una temperatura de 20-22°C. A los 7 días se procedió a trasplantar en charolas con sustrato y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero.

6.2 Microorganismos patógenos

Se utilizaron los siguientes patógenos: El hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*, cepa B0.510, Brigitte Mauch-Mamani (Universidad de Neuchatel, Suiza). Y la bacteria briotrofa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 cepa ES4326 proporcionada por el Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, CEIB, UAEM).

6.3 Caracterización fenotípica de *recal*

6.3.1 Caracterización del área foliar de *recal*

Se utilizaron 15 plantas completas de 4 semanas de edad de la wt, *eca2* y *recal*, para realizar una caracterización fenotípica del área foliar, se tomaron las hojas de la roseta de cada planta y tomar los siguientes parámetros: peso fresco, área foliar y peso seco. El análisis del área foliar consistió en colocar todas las hojas por planta, ordenadas de mayor a menor en una hoja de papel negro, tomar una fotografía para posteriormente determinar el área foliar por hoja mediante el programa ImageJ versión 1.44 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

6.3.2 Detección de ROS (Especies reactivas de oxígeno)

De manera general las ROS fueron detectados mediante el uso de la sonda fluorescente 5- (y 6)- carboxy-2'-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCF-DA) como fue descrito previamente por L'Haridon y colaboradores (2011). La acumulación de O₂⁻ (superóxido) y H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) fue determinada usando nitroblue tetrazolium (NBT) y la tinción 3,3-Diaminobencidina (DAB) respectivamente (Chen et al., 1993; Tordal-Christensen et al., 1997). Las imágenes tomadas a microscopio teñidas con DCF-DA fueron procesadas por medio de la cuantificación por densitometría con Imagej versión 1.44. Las hojas NBT y DAB teñidas se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss 37081).

6.4 Método de infección y de análisis con *Botrytis cinerea*

Las esporas del hongo *Botrytis cinera* (cepa B0.510), se germinaron en cajas de Petri con medio PDB durante 15-20 días a 20°C. Una vez que se tuvo el hongo, se colectaron las esporas, mediante lavados con agua destilada estéril y se filtraron a través de puntas de 5 ml que contenían filtros de gasas para eliminar las hifas. La concentración de esporas se determinó por conteo con un hemocitómetro. Posteriormente, se suspendieron 2x10⁵ esporas/ml de *Botrytis cinerea* en medio PDB; 6g/l. Después de 1 hr de incubación a temperatura ambiente, se colocaron gotas de 6 µl en el haz de hojas de 4 semanas de edad. Para una infección óptima, las esporas requieren tener una humedad relativa alta durante el tratamiento, por lo que después de la inoculación, se cubrieron para mantenerlas en oscuridad y a una temperatura de 20-21°C durante tres días. Al final de dicho periodo, se midió el tamaño de la lesión (mm) (L'Haridon *et al.*, 2011).

6.5 Método de infección y de análisis con *Pseudomonas syringae*

Las bacterias de la cepa ES4326 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 conservadas en glicerol a -80°C se sembraron en cajas de Petri con medio LB (Luria Bertani) sólido + rifampicina ($50\ \mu\text{g/ml}$) e incubadas a 28°C durante 48 horas. Para realizar la infección de las plantas, se pusieron a crecer colonias de dicha bacteria en medio LB sólido + rifampicina ($50\ \mu\text{g/ml}$) durante 24-48 horas.

Los cultivos bacterianos en fase logarítmica ($\text{DO}_{600} = 0.6-1$) se centrifugaron a 250 G durante 10 minutos, posteriormente las bacterias se diluyeron en una solución de MgCl_2 (10 mM). La Densidad Óptica (DO) de la suspensión de células bacterianas se cuantificó usando un espectrofotómetro UV-visible (Numak, modelo 752) fijado a 600 nm. Para las infiltraciones con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 se utilizó una $\text{DO}_{600} = 0.2$ (aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colonias (cfu/cm^2)).

Las soluciones bacterianas se infiltraron en el lado abaxial y del lado derecho de las hojas en plantas de 4 semanas de edad, usando una jeringa de 1ml sin aguja. Las plantas se cubrieron con domos para mantener la humedad ($20-22^{\circ}\text{C}$) y se tomó tejido a las 0, 2, 12 y 24 horas para posteriormente hacer extracción de RNA. Una vez infectadas las plantas, independientemente de los tiempos en los que se tomó tejido, se dejaron incubar durante 3 días. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a cortar 3 hojas (réplicas técnicas) de cada una de las réplicas biológicas (3-5) de las plantas wt, *eca2* y *recal*. Las hojas se incubaron con EtOH al 70% durante 1 minuto y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante la homogeneización de discos originarios de las hojas infiltradas en 1ml de la solución de MgCl_2 (10 mM), y se colocaron las diluciones (10^{-2} - 10^{-6}) en medio LB sólido + rifampicina y se dejarán incubar durante 1-2 días a 28°C . Por último, se contó el número de colonias por dilución y se obtendrán las cfu/cm^2 mediante la siguiente fórmula: ((número de colonias x dilución / área del disco) (Fumiaky *et al.*, 2002).

6.5.1 Extracción de RNA y análisis del transcriptoma de *recal*

Dado a que las mutantes *eca2* y *recal* resultaron ser resistentes a la bacteria *P. syringae*, se procedió a realizar un análisis del transcriptoma para evaluar los cambios de expresión en ambas mutantes ante la presencia de dicho patógeno, para lo cual se tomaron plantas de 4 semanas de edad de wt, *eca2* y *recal* las cuales fueron infectadas

con *P. syringae pv tomato* cepa DC3000 (*Pst* DC3000), y la solución de MgCl₂ (10 mM) como control. Posteriormente que tomaron 3 hojas de 5 plantas de 2 experimentos independientes a las 0, 2, y 12 horas después de la infiltración, por lo que, al tener este trabajo, dos factores experimentales: plantas (wt, *eca2* y *recal*) y tiempo (0, 2 y 12 hpi), obtuvimos un total de 18 muestras.

La extracción de RNA del tejido foliar, se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com). La concentración y pureza de la muestra de RNA se evaluó mediante el NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Se realizó el análisis de la calidad de las muestras de RNA siguiendo el protocolo de Agilent Technologies y se mandó a secuenciar el RNA que tuviera un valor de RIN^e por arriba de 7 usando la plataforma Illumina HiSeq200 al Instituto de Genómica de Beijing, BGI. Una vez recibidos los resultados del RNAseq, se procedió a identificar los genes regulados significativamente (*DEGs*; *Differentially expressed genes*) mediante la plataforma IDEAMex del IBt, utilizando el algoritmo DESeq2, de las comparaciones wt vs *eca2*, wt vs *recal* y *eca2* vs *recal* a las 0, 2 y 12 horas post inoculación (hpi).

Sólo se consideraron los transcritos con un Log₂ Fold Change (Log₂FC) de <-1 o > 1 y con un valor de *p*-value <0.05. Los DEG identificados mediante el análisis transcriptómico se analizaron y clasificaron en clases de ontología genética (GO term) utilizando el conjunto de herramientas de análisis agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) descrito anteriormente (Du *et al.*, 2010) al igual que se hizo un análisis de rutas/vías por medio de la base de datos KEGG (https://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html) y MAPMAN (<https://mapman.gabipd.org/>)

6.6 Generación de la población de mapeo

Se sembraron *in vitro* semillas F₂ provenientes de la cruce (*eca2* X *recal*). Posteriormente, a las 2 semanas de edad, se tomó 1 hoja de cada una de las plantas F₂ y se les aplicó la tinción histoquímica de GUS (Jefferson, 1987) y se seleccionaron aquellas plantas que presentaron el fenotipo *eca2* (hojas azules) y el fenotipo *recal* (hojas blancas). Cabe mencionar que anteriormente se analizó la F₁ de la cruce *eca2* X *recal*, por lo que se sabe que la mutación en *recal* es recesiva (Aviles, 2018), por lo que obtuvimos una segregación 3:1, la cual fue analizada mediante la prueba de X².

6.6.1 Extracción de DNA, secuenciación masiva y mapeo

Una vez que se seleccionaron las plantas F₂ segregantes con los fenotipos de interés, se procedió a realizar la extracción de DNA de cada una de ellas de acuerdo con el protocolo de Edwards y colaboradores (1991). Posteriormente para identificar el gen responsable del fenotipo *recal*, se procedió a realizar un *pool* de DNA de plantas con el fenotipo *eca2* y plantas con el fenotipo *recal* y se mandaron a secuenciar dichos *pools* para realizar mapeo por secuenciación (NGS: Next Generation Sequencing) utilizando la plataforma bioinformática SHOREmap (Schneeberger *et al.*, 2009), la cual nos dará una lista de genes candidatos para el gen *RECA1*, que serán validados en plantas transgénicas, de acuerdo con los fenotipos observados en *recal* (expresión de GUS, permeabilidad, resistencia *P. syringae*).

6.7 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de Tukey con el programa Statistica 7 y GraphPad Prism. Las letras en las gráficas indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *RECA1*

7.1.1 Caracterización del área foliar de *recal*

Debido a que observamos diferencias en *recal* en cuanto al tamaño de la roseta en comparación con la *wt* y *eca2* (Figura 13), realizamos un ensayo en el cual tomamos 45 plantas de 4 semanas de edad de *wt*, *eca2* y *recal* (Figura 18), y evaluamos los siguientes parámetros; número de hojas (Figura 19), área foliar (Figura 20), peso fresco (Figura 21) y peso seco (Figura 22) y de acuerdo con las gráficas y estadística (prueba de Tukey ($P < 0.05$)) obtuvimos diferencias significativas entre la *wt*, *eca2* y *recal*, siendo esta última la que presentó un menor; número de hojas, área foliar, peso fresco y peso seco.



Figura 18. Hojas por roseta de plantas de 4 semanas de edad de *wt*, *eca2* y *recal*. Fotos representativas de 3 experimentos independientes. Barra= 3cm.

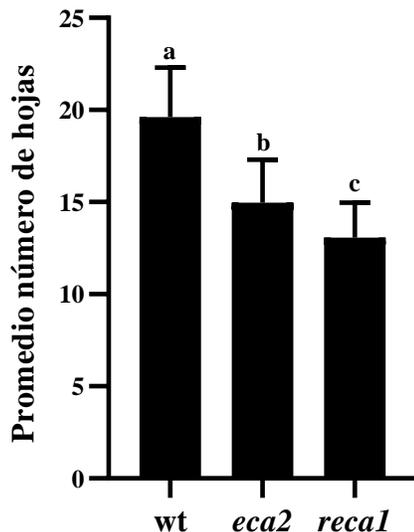


Figura 19. Promedio de hojas por roseta de las plantas de 4 semanas de edad *wt*, *eca2* y *recal*. En la gráfica está representado el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación estándar de una $n=45$ plantas. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

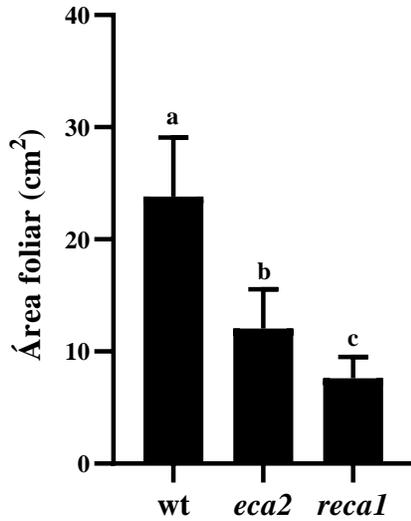


Figura 20. Área foliar de plantas de 4 semanas de wt, eca2 y recal. En la gráfica está representado el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación estándar con una n=45 plantas. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Tukey (P<0.05).

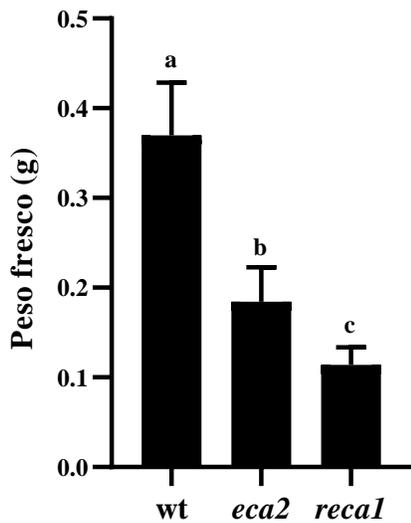


Figura 21. Peso fresco de plantas de 4 semanas de wt, eca2 y recal. En la gráfica está representado el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación estándar con una n=45 plantas. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Tukey (P<0.05)

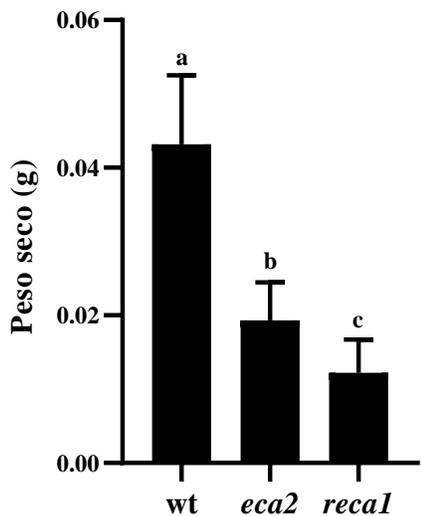


Figura 22. Peso seco de plantas de 4 semanas de wt, eca2 y recal. En la gráfica está representado el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación estándar con una n=45 plantas. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Tukey (P<0.05).

7.1.2 Cuantificación de ROS (especies reactivas de oxígeno)

Continuando con la caracterización de *reca1* y de acuerdo con los fenotipos observados en la mutante *eca2*, determinamos la acumulación de ROS mediante el uso de sondas fluorescentes 5- (y 6)- carboxy-2'7'-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCF-DA), así como la de O_2 utilizando nitroazul de tetrazolio (NBT) y la de H_2O_2 mediante la tinción 3,3-Diaminobencidina (DAB) (**Figura 23**) de manera basal en plantas de 4 semanas de edad.

Como puede observarse en las imágenes de la **Figura 23**, no hubo diferencia en la acumulación de ROS, O_2 y H_2O_2 en *reca1* en comparación con *eca2*, ya que mostró un fenotipo similar al de la wt. Es decir, *reca1* al igual que la wt no presentan acumulación de ROS de manera basal.

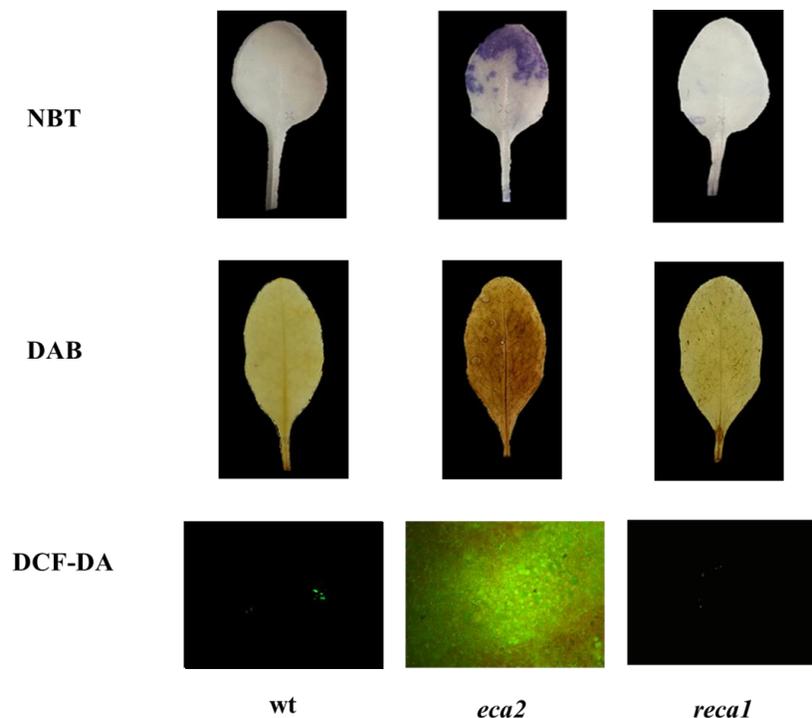


Figura 23. Cuantificación de ROS. Hojas de 4 semanas de edad, teñidas con DCF-DA, NBT y DAB. Fotos representativas de 3 experimentos independientes.

7.2 CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA DE *RECA1*

7.2.1 Infección con *Pseudomonas syringae* y extracción de RNA

Se tomaron hojas de plantas de 4 semanas de edad de wt, *eca2* y *reca1* a las 0 horas antes de la infección con *Pst* DC3000, así como a las 2, y 12 horas después de dicha infección de un total

de 100 plantas (réplicas técnicas) correspondiente a 3 réplicas biológicas como se muestra en la **Figura 24**. Al cabo de 72 horas después de la infección, se recuperó tejido para hacer la evaluación en cajas de Petri con medio LB y rifampicina para confirmar los fenotipos antes obtenidos (wt susceptible, *eca2* resistente y *reca1* resistencia intermedia) (**Figura 25 y 26**) y finalmente se hizo la extracción de RNA y se mandaron a secuenciar las muestras del tiempo 0, 2 y 12 horas de las plantas wt, *eca2* y *reca1* de 2 experimentos independientes al Instituto de Genómica de Beijing, BGI (plataforma Illumina HiSeq200).

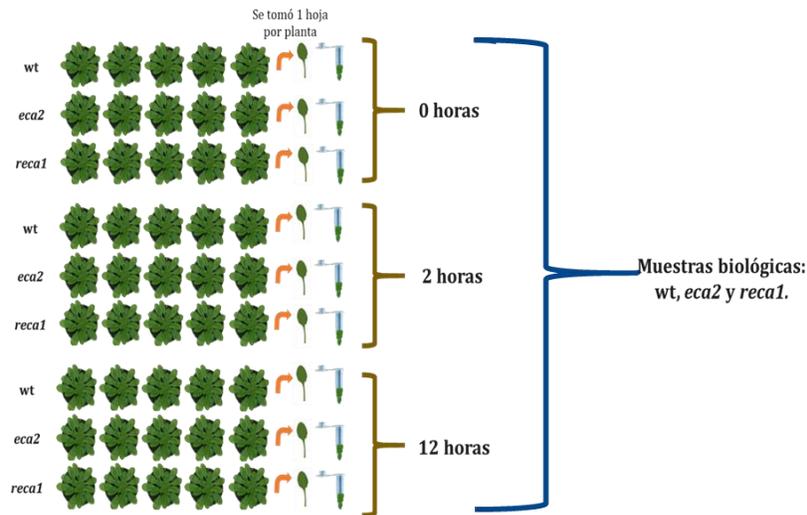


Figura 24. Muestras biológicas de hojas infiltradas con *Pst* DC3000. Se tomaron hojas de 5 plantas diferentes (réplicas técnicas) a las 0, 2, 12 y 24 horas de después de la infección con *Pst* DC3000 wt, *eca2* y *reca1*, y eso se hizo tres veces correspondiente a las 3 muestras biológicas.

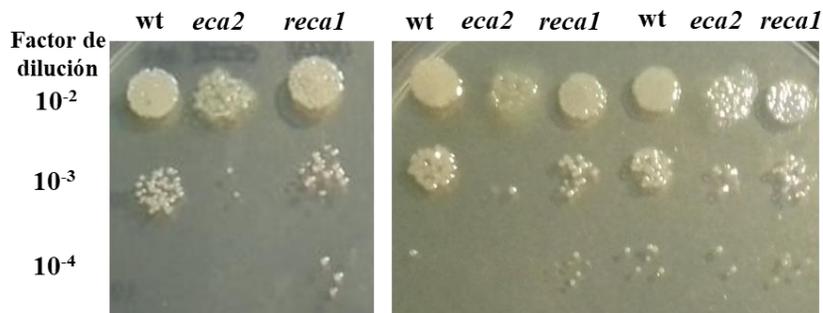
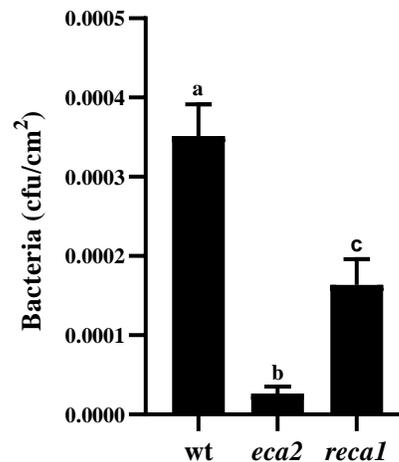


Figura 25. Evaluación de CFU 72 horas después de la infección con *Pst* DC3000. 72 horas post-infección se realizó la evaluación de CFU a partir de tejido de hojas de *A. thaliana* infectadas con *Pst* DC3000.

Figura 26. Plantas de *A. thaliana* infectadas con *Pst* DC3000. Cinco discos de hojas de *Arabidopsis thaliana* (wt, *eca2* y *recal*) inoculadas con *Pst* DC3000 se homogeneizaron en MgCl₂ (10 mM) para determinar las unidades formadoras de colonias (cfu/cm²) 3 dpi (días después de la infección). Las barras representan las medias (± SD) evaluadas de tres experimentos independientes (n=15). Las letras indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Tukey (P<0.05).



7.2.2 Análisis de genes diferencialmente expresados (DEGs).

Con el fin de identificar los mecanismos de defensa tempranos y tardíos durante la interacción planta-patógeno, analizamos los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre plantas de *Arabidopsis thaliana* (wt, *eca2* y *recal*) a las 0, 2 y 12 horas post infección (hpi) con la bacteria *Pst* DC3000, realizando un análisis transcriptómico.

Según el nivel de expresión génica, se identificaron los DEGs entre muestras, para ello se utilizó el algoritmo DEseq2 y los resultados se muestran a continuación:

En comparación con la wt 0 hpi, 917 genes fueron sobreexpresados y 317 genes fueron reprimidos en la muestra *eca2* 0 hpi; 2,977 genes fueron sobreexpresados y 2,177 genes fueron reprimidos en la muestra *recal* 0 hpi. En comparación con la muestra *eca2* 0 hpi, 1,200 genes fueron sobreexpresados y 1,377 genes fueron reprimidos en la muestra *recal* 0 hpi, tal como puede observar en la gráfica de la **Figura 27** y en las gráficas de volcán (volcano plot) de la **Figura 28**.

En cuanto a las muestras de 2 hpi, en comparación con la wt 2 hpi, 574 genes fueron sobreexpresados y 391 genes fueron reprimidos en la muestra *eca2* 2 hpi; 512 genes sobreexpresados y 433 genes reprimidos en *recal* 2 hpi. En comparación con la muestra *eca2* 2 hpi, 395 genes sobreexpresados y 453 genes reprimidos en *recal*.

Y por último con respecto a las muestras de 12 hpi, en comparación con la muestra wt 12 hpi, 470 genes sobreexpresados y 625 genes reprimidos en la muestra *eca2* 12 hpi; 615 genes sobreexpresados y 287 genes reprimidos en la muestra *recal* 12 hpi, y por último en comparación con la muestra *eca2* 12 hpi, 537 genes reprimidos y 576 genes reprimidos en la muestra *recal* 12 hpi (**Figura 27 y 28**). Adicionalmente a lo observado en la gráfica 27, se detectó un mayor número

de DEGs en *recal* en las comparaciones; *wt vs recal* y *eca2 vs recal*, que en la comparación *wt vs eca2* en las muestras de 0 hpi.

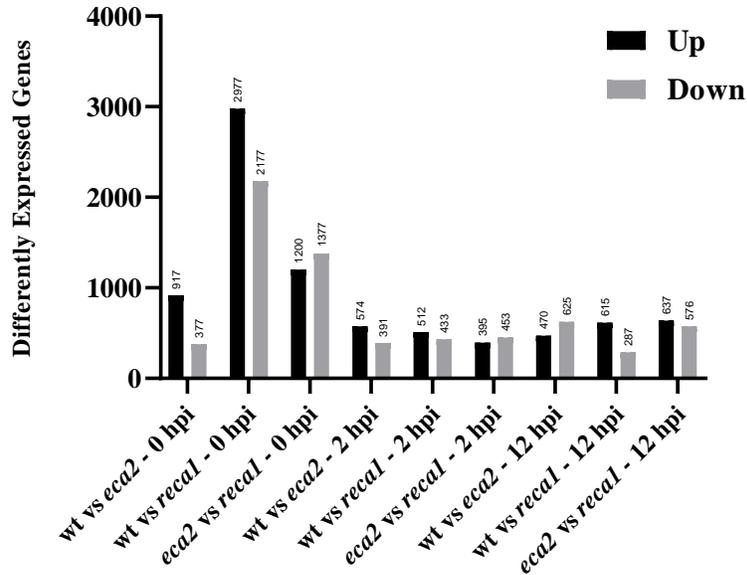
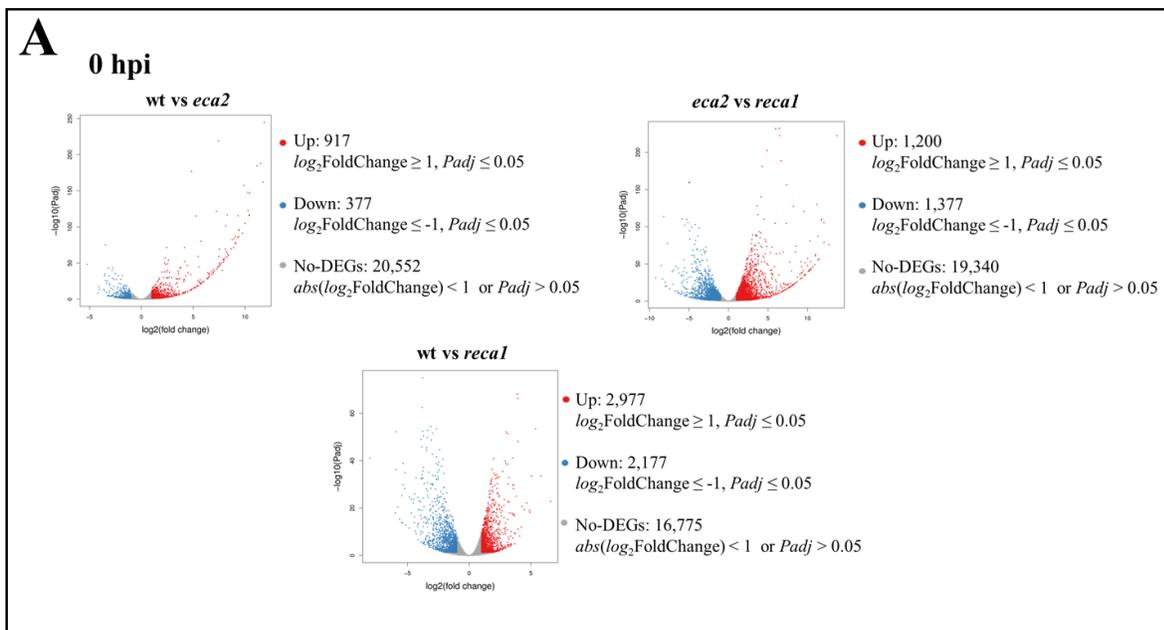


Figura 27. Expresión diferencial de genes. Comparaciones de las muestras *wt*, *eca2* y *recal* a las 0, 2 y 12 hpi con *Pst* DC3000. Las barras de color negro representan los genes sobreexpresados y las barras de color gris representan los genes reprimidos. Los números en la parte superior de cada barra indica el número de genes sobreexpresados y reprimidos según corresponda.



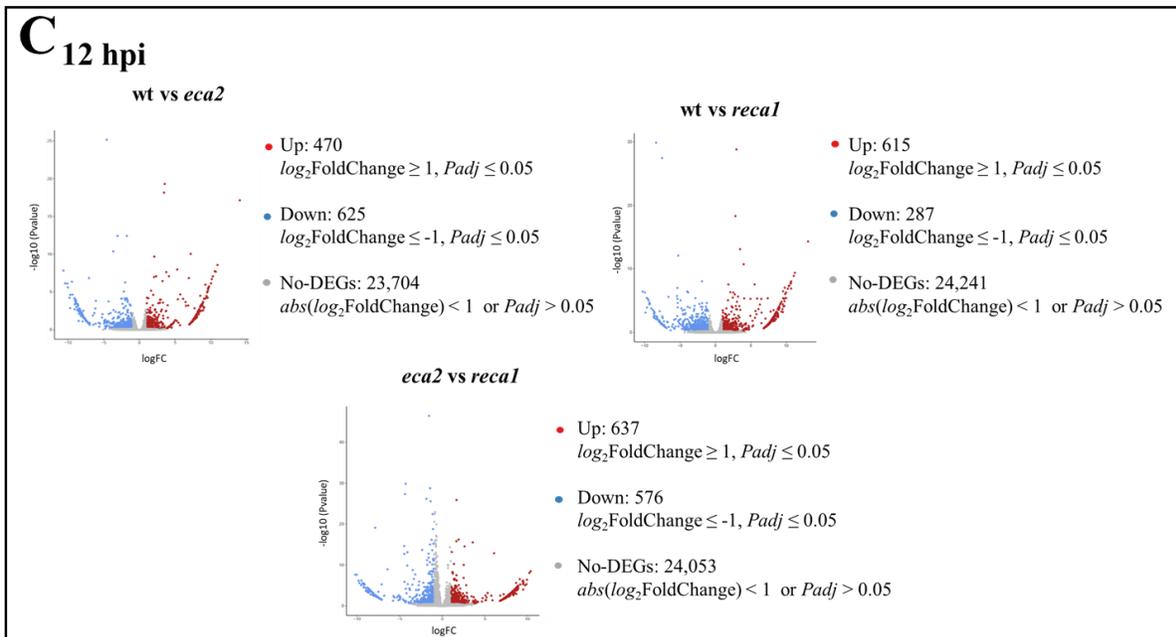
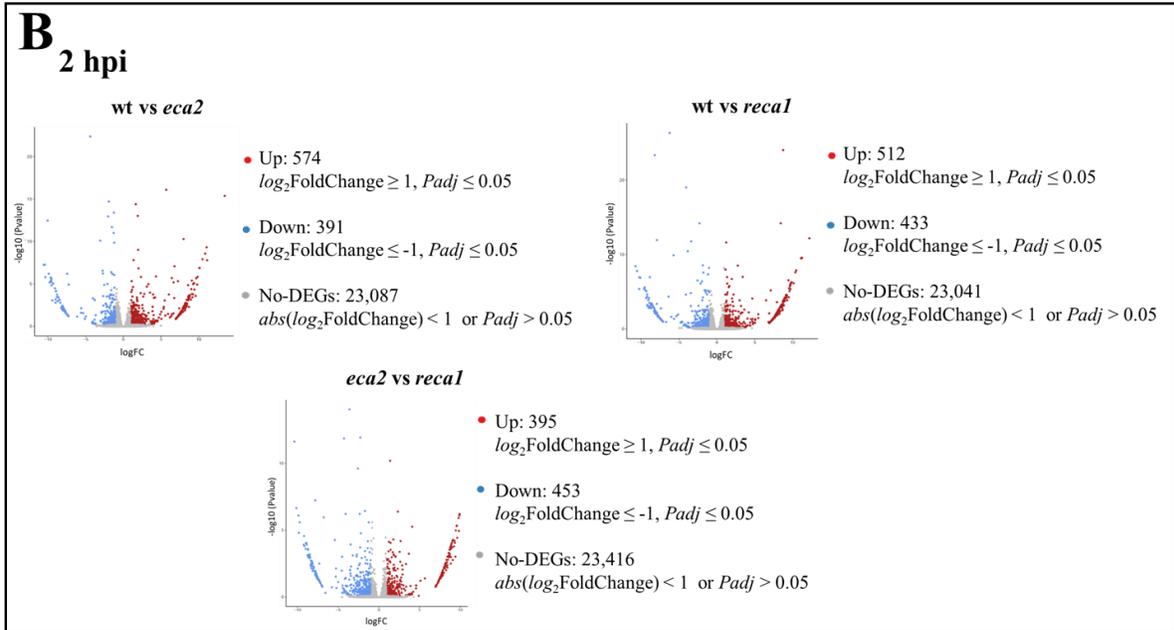


Figura 28. Gráfico de volcán (volcano plot) de DEGs. Los puntos rojos representan los genes sobreexpresados, los puntos azules representan genes reprimidos en los tiempos; 0 hpi (A), 2 hpi (B) y 12 hpi (C) con *Pst* DC3000 en las comparaciones de las muestras wt, *eca2* y *recal1*.

Las listas de DEGs resultantes de los 3 tiempos (0, 2 y 12hpi) con *Pst* DC3000 de la comparación de las muestras wt vs *eca2*, wt vs *recal* y *eca2* vs *recal*, incluyen varios genes que se han caracterizado como marcadores de respuestas de defensa tempranas y tardías contra *P. syringae*, ya que se inducen en respuesta a efectores al igual que han sido descritos como componentes reguladores clave del sistema inmune de *A. thaliana*. Por ejemplo, genes tales como AT1G33960 (*AIG1*), AT2G19190 (*FRK1*) y AT4G23550 (*WRKY29*) cuya sobreexpresión la observamos a las 2 hpi en nuestras muestras, se ha demostrado anteriormente que se expresan y participan en la respuesta temprana durante la infección por *P. syringae* ya que se inducen a los 30-60 minutos posteriores a la infección.

Por otro lado, las listas de DEGs de la comparación de las muestras wt vs *eca2*, wt vs *recal* y *eca2* vs *recal* a las 12 hpi con *Pst* DC3000 incluyen genes que han sido identificados por participar en respuestas de defensa, a estrés, y a estímulos de hormonas, tales como los genes AT3G04720 (*PR-4*), AT5G44420 (*PDF1.2*), AT4G31800 (*WRKY18*), AT2G18660 (*PNP-A*), AT2G14610 (*PRI*), AT3G52430 (*PAD4*) y AT3G48090 (*EDS1*) (De torres, *et al.*, 2003; Howard, *et al.*, 2013; Blanc *et al.*, 2018).

7.2.3 Análisis de enriquecimiento de términos de ontologías génicas (GO-term enrichment analysis).

Posteriormente, procedimos a realizar un análisis de enriquecimiento de ontologías génicas (GO term enrichment análisis), el cual clasifica a los DEGs en tres ontologías: proceso biológico, función molecular y componente celular.

El análisis GO reveló que la mayoría de los DEGs, sobreexpresados y reprimidos en la comparación de las muestras wt vs *eca2*, wt vs *recal* y *eca2* vs *recal* en los tres tiempos (0, 2 y 12 hpi), pertenecen a la categoría de ontología de procesos biológicos, tales como; respuestas a estímulos químicos, bióticos, abióticos, a defensa, a estrés, a hormonas, a bacterias, a hongos, y a herbívoros”, “procesos biosintéticos y metabólicos de lípidos, ácidos grasos y ceras”, entre otros, como puede observarse en las **Tablas 3-11** en la parte de **Anexos**.

7.2.4 Análisis de vías metabólicas y regulatorias en KEGG

Las proteínas interactúan entre sí para funcionar en ciertas actividades biológicas. El análisis de las vías metabólicas y regulatorias podría usarse para comprender mejor la función biológica de los genes (Zhao, *et al.*, 2017). Los DEGs resultantes del análisis de GO, se mapearon en las rutas

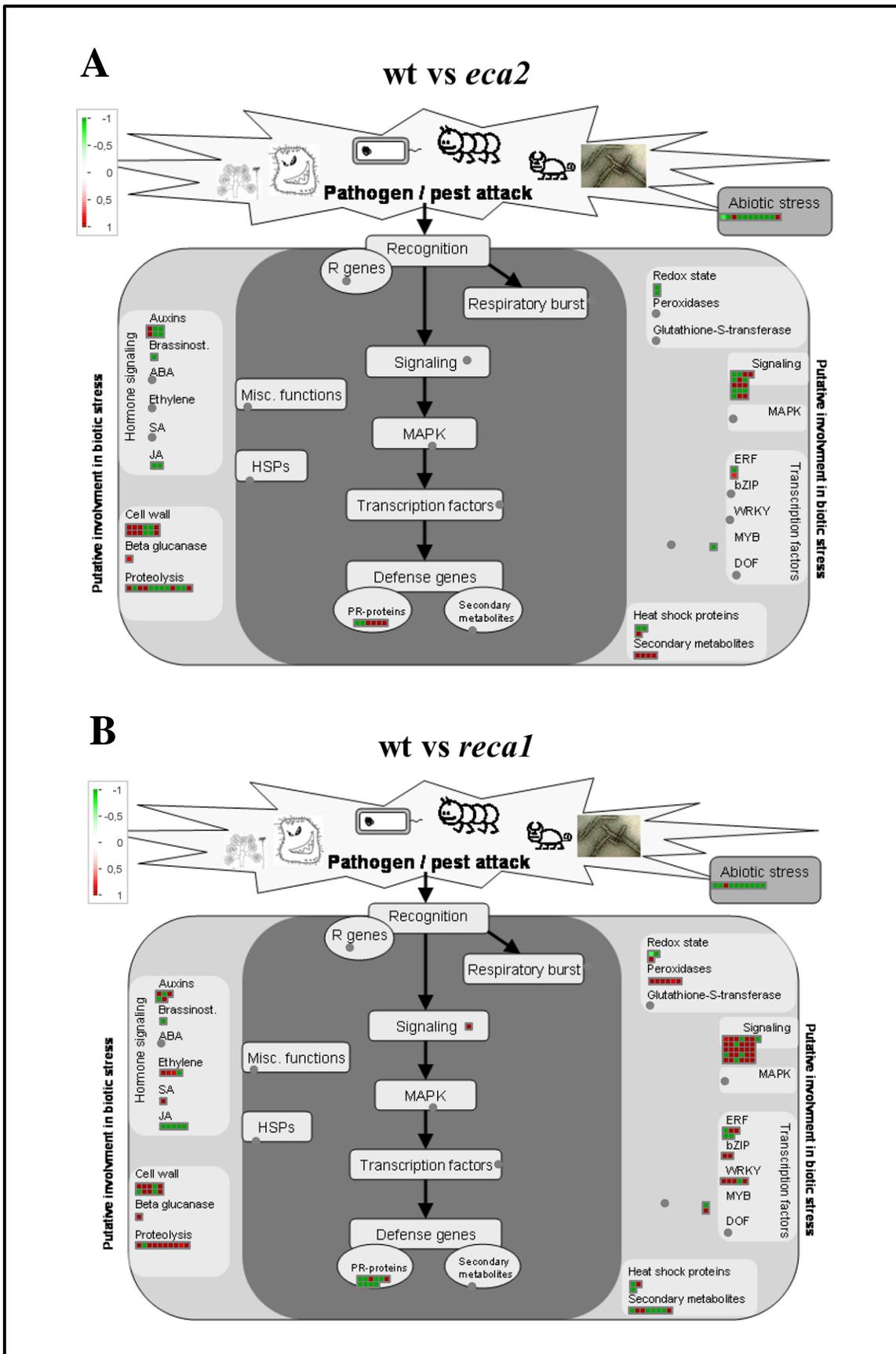
canónicas de referencia en KEGG. De manera general se asignaron entre 2 y 30 vías de KEGG para las muestras de 0, 2 y 12 hpi. Siendo las muestras del tiempo de 0 hpi a las que se le asignaron más vías debido al mayor número de DEGs que se ingresaron a la plataforma de KEGG. A las 0 hpi, el término más común fue “transducción de señales de hormonas vegetales” así como “biosíntesis de cutina, suberina, ceras, ácidos grasos, lípidos y flavonoides”. A las 2 hpi, los términos más sobresalientes fueron “biosíntesis de metabolitos secundarios”, “metabolismo de triptófano y fenilalanina” así como “rutas metabólicas” y finalmente a las 12 hpi los términos “fotosíntesis”, “metabolismos del carbono”, “biosíntesis de metabolitos secundarios, flavonoides y amino ácidos” e “interacción planta-patógeno” (**Anexo I, Tabla 3-11**).

7.2.5 Análisis general de la vía del estrés biótico

La respuesta de la planta al estrés biótico incluye una serie de DEG inducidos por patógenos, insectos y otros organismos e implica de manera general los siguientes pasos: después de la señal inicial inducida por el patógeno, la cual es reconocida por los receptores (genes *R*), se activa la transcripción de la cascada de señalización de defensa de la planta, incluidos los cambios de estrés oxidativo. Dentro de la célula, se transmiten señales que conducen a la producción de moléculas de defensa (proteínas PR, proteínas de choque térmico y metabolitos secundarios) (Rotter, *et al.*, 2007)

Los DEG implicados en la respuesta de *A. thaliana* a la infección por *P. syringae* se reflejan en gran medida en la vía de estrés biótico. A través del análisis MAPMAN, de las muestras de 2 y 12 hpi en comparación con la wt a 2 hpi encontramos el siguiente número de DEGs; 103 en *eca2* y 100 en *recal*. En comparación con la muestra *eca2* 2 hpi, 81 DEGs en *recal* (**Figura 29**). Con respecto a las muestras de 12 hpi, en comparación con la wt; 79 DEGs en *eca2* y 123 en *recal*. Y por último en comparación con la muestra *eca1* 12 horas, 314 DEGs en *recal* (**Figura 30**).

Como puede observarse en ambas figuras (**29** y **30**) a las 2 y 12 hpi se obtuvo la inducción de componentes muy similares de la vía del estrés biótico ya que tal como observamos también en los KEGG, los DEGs se expresan mayormente en la parte de señalización y defensa en dicha vía, ya que es en ellas en donde se concentran la mayor cantidad de DEGs de ambos tiempos (2 y 12 hpi).



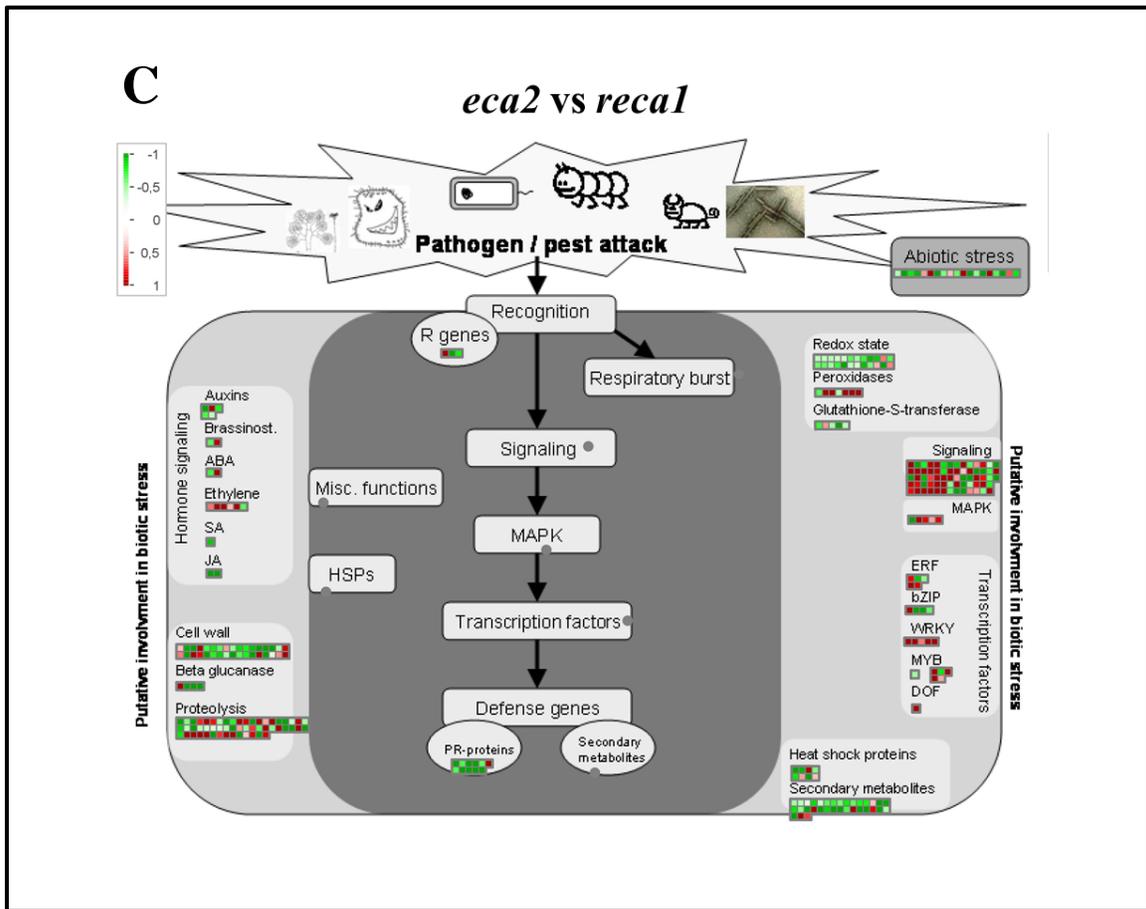


Figura 30. Análisis de la vía del estrés biótico de DEGs en *A. thaliana* a las 12 hpi por *Pst* DC3000. En análisis de DEGs en la vía de estrés biótico se realizó mediante el programa MAPMAN. La escala se muestra en las figuras, por lo que los cuadros rojos representan los genes sobreexpresados y los los verdes genes reprimidos en las comparaciones; A) wt vs *eca2*, B) wt vs *recal*

7.3 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE *RECA1*

7.3.1 Generación de la población de mapeo F₂

Una vez identificada la mutante *reca1*, la cual posee el fenotipo de interés (expresión de *ATL2* confinada a la parte meristemática en ausencia de elicitores/hojas blancas), se realizó una cruce con su fondo mutante *eca2*, para determinar en la población híbrida F₁ si el fenotipo observado en *reca1* se debía a una mutación dominante o recesiva.

Para realizar este análisis genético, se realizó una cruce control wt X *eca2* (*ECA2/ECA2* x *eca2/eca2*), ya que anteriormente Serrano y colaboradores (2004), determinaron que la F₁ resultante de dicha cruce presentaba un fenotipo wt (dominante). Nosotros obtuvimos resultados similares, al verificar que la mutación en *eca2* es recesiva debido a que en la F₁ sólo se observó el fenotipo tipo silvestre. Posteriormente, realizamos la cruce entre *eca2* y *reca1* (**Tabla 1** y **Figura 31**). De acuerdo con los datos obtenidos de las cruces genéticas (*eca2/eca2* X *reca1/reca1*) mostrados en la **Figura 31** y **Tabla 1**, la mutación presente en *reca1* es recesiva e independiente a la mutación *eca2*, ya que el fenotipo observado en la población F₁ fue el de *eca2* (expresión constitutiva de *ATL2*/hojas azules).

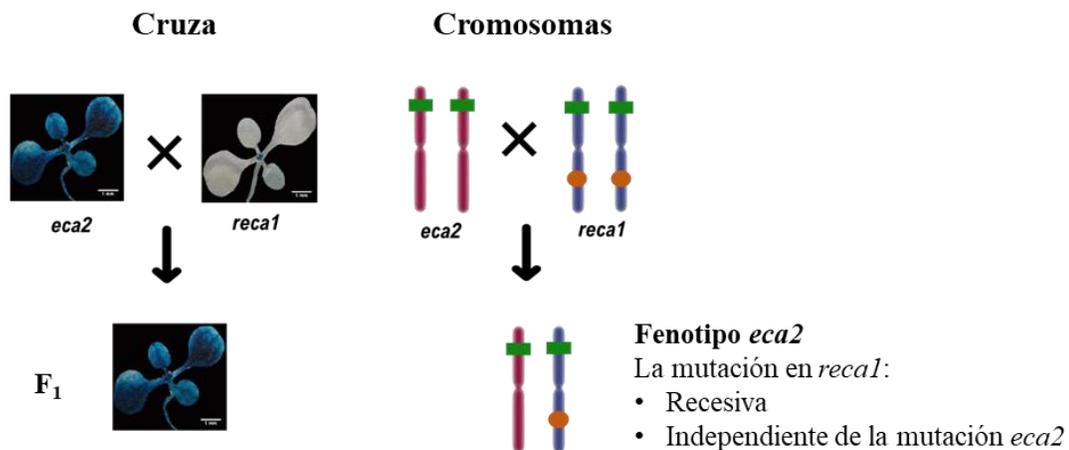


Figura 31. Cruza genética entre los mutantes: *eca2* X *reca1*.

Tabla 1. Patrón de expresión de *ATL2* en plantas F₁

| Cross (Female X Male) | Generación | Number of plants | Expression pattern | | |
|--|----------------|------------------|--------------------|-------------|--------------|
| | | | wt | <i>eca2</i> | <i>reca1</i> |
| ECA2/ECA2 X <i>eca2/eca2</i> (wt X <i>eca2</i>) | F ₁ | 9 | 9 | 0 | - |
| <i>eca2/eca2</i> X ECA2/ECA2 (<i>eca2</i> X wt) | F ₁ | 7 | 7 | 0 | - |
| REA1/RECA1 X <i>reca1/reca1</i> (wt X <i>reca1</i>) | F ₁ | 12 | - | 0 | 12 |
| <i>reca1/reca1</i> X RECA1/RECA1 (<i>reca1</i> X wt) | F ₁ | 8 | - | 0 | 8 |
| <i>eca2/eca2</i> X <i>reca1/reca1</i> (<i>eca2</i> X <i>reca1</i>) | F ₁ | 6 | - | 6 | 0 |
| <i>reca1/reca1</i> X <i>eca2/eca2</i> (<i>reca1</i> X <i>eca2</i>) | F ₁ | 9 | - | 9 | 0 |

Una vez que se obtuvo la F₂ (a partir de la autofertilización de las plantas F₁ de la crucea *eca2* X *reca1*), se procedió a seleccionar la población de mapeo, lo cual consistió en hacer dos *bulk* de DNA con plantas segregantes F₂ con el fenotipo de *eca2* y con el fenotipo *reca1*, para posteriormente mandar el DNA de esas dos muestras a secuenciar como prerrequisito para realizar el mapeo genético de la mutación *reca1* por medio de la plataforma SHOREmap (Schneeberger *et al.*, 2009).

7.3.1 Selección de la población de mapeo F₂

Para seleccionar las plantas segregantes con los fenotipos de interés antes mencionados, se tomaron semillas F₂ y germinaron en macetas con sustrato, y al obtener plántulas de 7 días de edad, se trasplantaron a charolas y se dejaron crecer bajo condiciones de invernadero.

Las plantas F₂ fueron seleccionadas a partir de las siguientes técnicas (**Figura 32**):

1. Tinción histoquímica de *GUS* – Patrón de expresión de *ATL2*: Se tomaron hojas de las plantas control (wt, *eca2* y *reca1*) y de las segregantes F₂ y se hicieron tinciones de *GUS*. Se marcaron aquellas plantas F₂ que se teñían de color azul (fenotipo *eca2*) y las que no se teñían (fenotipo *reca1*).
2. Azul de toluidina – Permeabilidad: Se colocaron gotas de 6 µl de azul de toluidina (TB; *toluidine blue*) en una hoja de cada una de las plantas control y segregantes F₂ y se marcaron aquellas plantas que mostraron una permeabilidad similar a *eca2* (círculos azules en el lugar donde se colocó el TB) y a *reca1* (puntos azules en el lugar donde se colocó el TB).
3. Infección con *Botrytis cinerea*: Se colocaron 5 µL de esporas de *Botrytis cinerea* cepa B050 suspendidas en ¼ de PDB (2x10⁵ esporas/ml) en 1 hoja de las plantas control y de las segregantes F₂ y se marcaron las plantas F₂ que fueron resistentes (como *eca2*) y susceptibles (como *reca1*) a dicho hongo.

Realizadas las tres pruebas en las plantas de 3 semanas de edad de los controles y de las segregantes, se tomó tejido de aquellas plantas que cumplían con los tres fenotipos evaluados (**Figura 32**), es decir; para las plantas F₂ del bulk de *eca2*, debían; 1) Prueba de *GUS*; teñirse de azul, 2) Azul de toluidina; observarse marcas azules sobre el haz de la hoja, y 3) Infección con *B. cinerea*; ser resistentes. Para las plantas F₂ del bulk de *reca1*; 1) Prueba de *GUS*; no teñirse, 2) Azul de toluidina; observarse puntos azules sobre el haz de la hoja, y 3) Infección con *B. cinerea*; ser susceptibles.

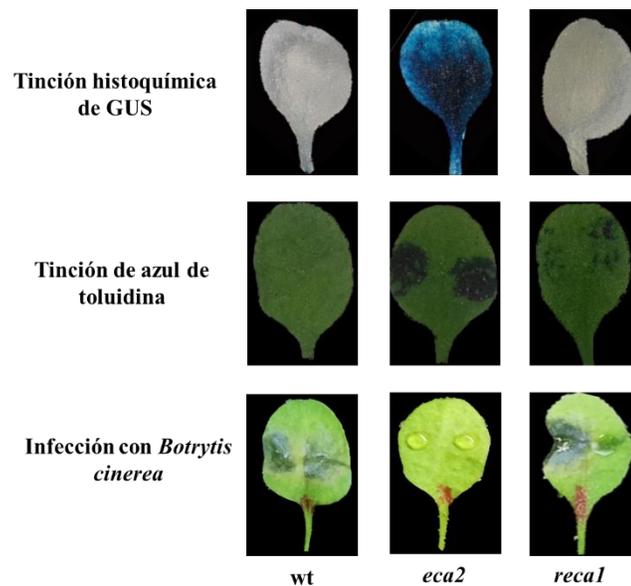


Figura 32. Fenotipos evaluados en el escrutinio de la población de mapeo. Hojas de 3 semanas de edad.

En un principio, esta fue la manera para seleccionar los candidatos para obtener el DNA, sin embargo, comenzamos a notar que al tomar tejido solo de aquellas plantas que cumplían con las tres pruebas para cada *bulk* (*eca2* o *reca1*) además de perder tejido (debido a que al final seleccionábamos a muy pocos candidatos en comparación con los muchos que evaluábamos) no observamos la proporción de segregación 3:1 correspondiente al fenotipo *eca2* que observamos en la población F₁, lo cual probablemente se debe a que esos tres fenotipos no están ligados a un solo gen, si no a varios, no necesariamente están involucrados en la mutación presente en *reca1*. Por

ello cambiamos de estrategia y realizamos un segundo escrutinio de la población de mapeo bajo condiciones *in vitro* en donde el criterio de selección fue el patrón de expresión de *ATL2* (**Figura 33**), ya que fue este fenotipo el que permitió seleccionar tanto a la mutante *eca2* como a *reca1*. Para ello germinamos *in vitro* semillas de la población F₂ junto con los controles (*wt*, *eca2* y *reca1*), y una vez que obtuvimos plántulas de 10 días de edad, procedimos a cortar una hoja de cada una de las plántulas y les aplicamos la tinción de GUS y posteriormente marcamos las plántulas cuyas hojas no se tiñeron y procedimos a guardar el tejido de estas para posteriormente hacer un *bulk* con plántulas F₂ que presentaban el fenotipo *eca2* y *reca1*.

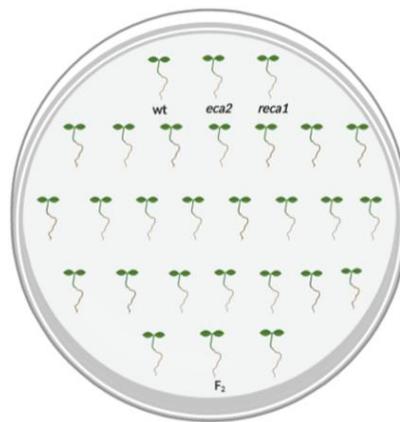


Figura 33. Cultivo *in vitro*. Plantas control en la parte superior y plantas segregantes F₂ de 10 días de edad en la parte inferior.

Del escrutinio *in vitro* de las plantas F₂, recolectamos tejido de 520 plántulas, de las cuales 386 presentaron el fenotipo *eca2* y 134 el fenotipo *reca1* (**Tabla 2**), lo cual nos indicó una segregación de **3:1** ($\chi^2 = .164$; $p > 0.05$). De dicho tejido se extrajo el DNA y se mandó a secuenciar la F₂ de *reca1* y la mutante *eca2*, siendo el genoma de esta última el que se tomará como referencia y por lo tanto contra el que se hará el ensamblaje y mapeo.

Tabla 2. Patrón de expresión de *ATL2* en plantas F₂

| Cruza (Hembra x Macho) | Generación | Número de plantas | Patrón de expresión | | |
|--|----------------|-------------------|---------------------|-------------|--------------|
| | | | wt | <i>eca2</i> | <i>reca1</i> |
| <i>eca2/eca2</i> X <i>reca1/reca1</i> (<i>eca2</i> X <i>reca1</i>) | F ₁ | 6 | - | 6 | 0 |
| | F ₂ | 520 | - | 386 | 134 |

χ^2 fue calculada de acuerdo con una proporción esperada 3:1 (*eca2* X *reca1*) ($\chi^2 = .164$; $p > 0.05$).

8. DISCUSIÓN

Un grupo específico de genes que son transcritos en minutos (entre 5 a 30 minutos) en respuesta a señales o estímulos determinados, se conocen como genes de respuesta temprana (ERGs) y están encargados de activar y amplificar las respuestas inmunes en las plantas (Abel & Theologis, 1996; Bahrami & Drablos, 2016). Mediante el análisis de los ERG se han identificado y caracterizado genes que participan en la regulación de las rutas de señalización a diferentes estímulos. Por ejemplo, ERG que responden a auxinas (Dinesh *et al*, 2016). Se ha determinado que la percepción de los PAMPs, los DAMPs y MAMPs liberados durante la interacción con el hongo *Botrytis cinerea* o con el tratamiento con cutina, así como los HAMPs liberados durante la interacción planta-herbívoros, convergen en la inducción de ERGs, razón por la cual estos genes pueden ser utilizados como un punto inicial para caracterizar las respuestas tempranas y tardías de la inmunidad innata vegetal (Blanc, *et al.*, 2018).

Dentro de los ERGs se encuentra el gen *ATL2*, el cual pertenece a una familia multigénica de genes de respuesta temprana conocida como *ATL* (*Arabidopsis* *Tóxicos en Levadura*), los cuales son inducidos por MAMP's o DAMP's tales como la quitina, *flg22* o celulasa (Martínez-García *et al.*, 1996). Dicho gen se expresa constitutivamente en la mutante *eca2* de la cual se ha determinado que presenta resistencia al hongo *Botrytis cinerea* y a la bacteria *Pseudomonas syringae*, y que además acumula y produce especies reactivas de oxígeno. Así mismo, se caracterizaron los cambios transcripcionales generados por la mutación *eca2*, a través de un análisis global de expresión y se observó que los genes involucrados en la inmunidad innata son rápidamente inducidos durante la interacción planta-*B. cinerea*. Cabe resaltar, que, a partir de un análisis bioquímico, resultó que *eca2* presenta cambios en la permeabilidad de la cutícula debido a una reducción en el contenido de ceras y cutina. Por lo tanto, se ha determinado que ECA2 podría ser un regulador negativo que dirige la activación transcripcional de defensas inducidas por genes tempranos y su mutación causa el *priming* de las respuestas de defensa de la planta contra patógenos necrótrofos y biótropos, por lo que su estudio para identificar elementos de regulación en las respuestas tempranas de defensa a dichos patógenos se hace relevante.

Con el fin de identificar elementos moleculares que regulan la expresión del gen de respuesta temprana *ATL2* mediada por *ECA2*, realizamos anteriormente como trabajo de Tesis de Licenciatura la generación, aislamiento y caracterización de mutantes *reca* (*revertoras de eca2*). A partir de un escrutinio realizado en 2,200 plantas M₂ se identificó una mutante, a la que llamamos

recal, que es capaz de revertir la expresión constitutiva de *ATL2*, así como de ciertos fenotipos observados en la mutante *eca2*. Por lo que con el objetivo de continuar con la caracterización de *recal*, en este trabajo nos propusimos realizar su caracterización fenotípica y transcriptómica, así como también nos planteamos comenzar con la identificación genética de *RECA1* mediante el escrutinio de la población de mapeo.

8. 1 La mutante *recal* revierte completamente la resistencia a *Botrytis cinerea*, pero parcialmente a *Pseudomonas syringae*.

Dependiendo de la interacción patógeno/hospedero se activan una o varias rutas de defensa mediadas por fitohormonas. En la inmunidad innata vegetal existe una elevada interconexión entre las diversas cascadas de señalización, interactuando de manera sinérgica o antagónica, proporcionando así a la célula la capacidad de regular las respuestas defensivas. De manera general, se ha descrito que las vías de señalización JA/ET son efectivas para mediar la resistencia contra los patógenos necrótrofos (quienes se alimentan de tejido muerto) y los herbívoros, mientras que la vía de señalización dependiente de SA funciona principalmente para mediar la resistencia a los patógenos biótropos (actúan como parásitos obligados ya que obtiene nutrientes de los tejidos vivos del huésped) (Pieterse *et al.*, 2009; Ravichandran *et al.*, 2013).

Para identificar cambios en la mutante *recal* en cuanto a la resistencia a patógenos y como parte de un trabajo de Tesis de Licenciatura realizamos ensayos de infección con el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* y la bacteria biótropa *Pst* DC3000. La mutante *recal* resultó ser susceptible a *B.cinerea* al igual que la planta wt, ya que ambas plantas mostraron un tamaño de lesión mayor en comparación con *eca2* (**Figura 16**), lo cual, se correlacionó con el nivel de expresión de genes marcadores de JA y ET analizados en *recal*, ya que en el caso del gen *PR-4* (ET) y el gen *PDF1.2* (JA/ET) presentaron niveles de expresión menores en comparación con la wt y *eca2* (**Figura 15**) (Aviles, 2018). Dichos resultados los confirmamos una vez más, pero ahora con el análisis transcriptómico de *recal* a las 0 hpi ya que los genes reprimidos o con menor nivel de expresión en *recal* en comparación con la wt y *eca2*, según el GO son aquellos en respuesta a defensa, hongos y relacionados con JA y ET (**Anexo I, Tabla 4**).

Por otro lado, *recal* resultó ser menos susceptible a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 que la planta wt pero no tan resistente en comparación con *eca2* (**Figura 17**), por lo que posiblemente se presentó un estado intermedio entre la susceptibilidad de la wt y la resistencia de

eca2, dicho resultado en su momento se comparó con niveles de expresión obtenido por qRT-PCR del gen *PR-1* (SA) en *eca2*, y cómo puede observarse en la **Figura 15** dicho gen no presentó un nivel de expresión mayor en *recal* en comparación con la wt (Aviles, 2018). De acuerdo con los resultados del análisis GO y KEGG (**Anexo I, Tabla 5**) en *recal* en comparación con *eca2*, los DEGs de genes involucrados en la vía de señalización de la fitohormona del ácido salicílico (*PR-1* y *NPR-1*) se encuentran reprimidos en los tres tiempos, mientras que en *eca2* el gen *PR-1* se encuentra sobreexpresado sólo en el tiempo 2 hpi, lo que coincide con los datos de expresión obtenidos anteriormente por qRT-PCR, lo que nos lleva a concluir que la resistencia que observamos en *recal* a *P. syringae* se debe a otra vía de defensa independiente de SA, ya que como se mencionó en los resultados, los genes *AIG1*, *FRK1* y *WRK18* están sobreexpresados tanto en la mutante *eca2* como en *recal*, y dichos genes están involucrados en la defensa contra bacterias y se expresan 30 minutos después de la interacción con *P. syringae*, por ello observamos la expresión de dichos genes sólo en las muestras de 2 y 12 hpi.

8.2 *recal* no presenta acumulación de ROS

Las ROS están involucradas en múltiples procesos tales como el reforzamiento de la pared celular, la regulación de las vías de señalización de fitohormonas, así como el desencadenamiento de la muerte celular programada, todo eso durante la interacción planta-microorganismo (Lehmann *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente en la mutante *eca2* las ROS están acumuladas constitutivamente en plantas no infectadas y dicha acumulación aumenta después de la interacción con *B. cinerea* en comparación con la wt (**Figura 5**) (Blanc *et al.*, 2018). En este trabajo, evaluamos la acumulación de ROS en plantas de 4 semanas de edad en ausencia del patógeno mediante tres metodologías; DCF-DA, NBT y DAB. Como puede observarse en la **Figura 23** se obtuvieron diferencias significativas entre *recal* y *eca2*, ya que en *recal* no se detectó la acumulación basal de ROS al igual que en la wt, lo cual se relaciona entre otros factores más con que *recal* y la wt sean susceptibles a *Botrytis cinerea*, ya que como Chassot y colaboradores en el 2007 demostraron que las mutantes alteradas en la permeabilidad de la cutícula están directamente relacionadas con una mayor resistencia a patógenos necrótrofos, ya que además se demostró que estos mutantes cuticulares producen ROS de forma constitutiva y dicha producción provee resistencia contra el hongo *B. cinera* (L'Hardion *et al.*, 2011).

8.3 Cambios morfológicos en la mutante *recal*

Uno de los rasgos que distinguen a las plantas de los animales es la plasticidad fenotípica en respuesta a las condiciones ambientales y fisiológicas. El estrés hídrico, el metabolismo y la disponibilidad de nutrientes pueden modificar la morfología de la hoja y otros órganos. De acuerdo con Tsukaya (1995), mutaciones en genes de mantenimiento celular como los de una proteína ribosómica 18S o una quinasa, perturban el desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*, la cual adquiere una forma ligeramente apuntada o aserrada, respectivamente. Se conoce también, que las fitohormonas ejercen influencia sobre la morfogénesis foliar, ya que, entre otras, las mutaciones en el gen AUXIN RESISTANT1 (*AXRI*) provoca la aparición de hojas pequeñas y tallos cortos, debido a una reducción del número de células. Además, se conocen otras mutaciones, denominadas *acaulis1* (*acl1*) y *acaulis2* (*acl2*) y *sbg11* que perturban el desarrollo de las hojas y tallos. Las plantas *acl1* presentan hojas vegetativas pequeñas, retorcidas y con tendencia a curvarse hacia el suelo, lo que aparentemente se debe a una interrupción en la expansión celular en todas las direcciones, que sucede en estadios tempranos del desarrollo foliar. La mutante *acl2* muestra hojas cuyo limbo es aparentemente normal, aunque su peciolo, al igual que el tallo de la planta, son significativamente más cortos que los observados en la planta silvestre (Tsukaya *et al.*, 1995; Serrano, 1998; Escudero, 2014). Por último, plantas de la mutante *sbg11* presentan reducción en el tamaño de la roseta y altura de la planta, y hojas con un mayor contenido de clorofila, lo cual de acuerdo con Escudero (2014) está relacionado con una sobreexpresión de genes de defensa regulados por ABA (ácido abscísico) Estas observaciones indican la importancia de las condiciones fisiológicas y ambientales, así como de las fitohormonas en el control del desarrollo vegetal. La luz es uno de los factores ambientales que influye de forma más específica en la morfogénesis de la hoja, lo que probablemente se debe a su carácter de órgano fotosintético (Serrano, 1998).

La mutante *recal* mostró diferencias significativas en cuanto al número de hojas, área foliar, peso fresco y peso seco en comparación con la *wt* y *eca2*, ya que *recal* presentó una roseta de menor tamaño (**Figura 19, 20, 21 y 22**). Dicho fenotipo podría deberse a cambios de plasticidad en respuesta a factores ambientales o bien a vías dependientes de fitohormonas, tales como las auxinas de la cual se observó la sobreexpresión de los genes *AUX1* y *SAUR68* los cuales están involucrados en la respuesta a dicha fitohormona (**Anexo I, Tabla 4**), y se tienen antecedentes sobre su papel en procesos como división celular y diferenciación de tejidos vegetales (Pieterse *et al.*, 2009). De hecho, no sería tan azaroso que este fenotipo podría estar regulado por

modificaciones en la vía de señalización de auxinas, debido a que se tiene antecedentes en donde se especula un papel de *ATL2* en el crecimiento o desarrollo de la planta, debido a que se produce una acumulación rápida y transitoria de RNAm de este gen en presencia de auxinas, lo que sugiere que esta es una respuesta primaria a este regulador de crecimiento (Martínez-García *et al.*, 1996).

8.4 La mutante *recal1* revierte parcialmente la permeabilidad foliar

La cutícula está formada principalmente de ceras y cutina y forma parte de la superficie de las células epidérmicas, así como de partes aéreas de la planta (hojas, pétalos, frutos, etc.). Dentro de algunas de sus funciones como barrera física es la prevención de la pérdida de agua, así como de la entrada de solutos a la planta, también la protege de la radiación, microorganismos y herbívoros. La integridad y permeabilidad de la cutícula es muy importante para su función durante las interacciones planta-patógeno; por ejemplo, una cutícula vegetal más permeable podría dar lugar a resistencia o susceptibilidad a infecciones por patógenos (Serrano *et al.*, 2014; Aragón *et al.*, 2017), ya que, estudios previos realizados en mutantes de *Arabidopsis* y tomate que presentaban una cutícula permeable; *CYP86A2* (dependiente del citocromo P450 oxidasa), *LACS2* (Acil-CoA de cadena larga sintetasas), *PER57* (peroxidasa 57 sobreexpresada), *BODYGUARD* (alfa-beta hidrolasa), y el factor de transcripción *DEWAX*, demostraron que mejoraron la resistencia de las plantas contra el patógeno fúngico *B. cinerea* pero aumentaron la susceptibilidad al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae*. Sin embargo, no todos los mutantes relacionados con la cutícula mostraron resistencia a *B. cinerea*: por ejemplo, un estudio realizado por Xia y colaboradores en el 2009 encontraron que las mutantes de *Arabidopsis ACP4* (proteína transportadora de acilo 4) y *GL1* (*GLABROUS 1*) que tenían niveles reducidos el contenido de cutina y cera, aumentaron la susceptibilidad a ambos patógenos (Ziv *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2020).

Varios mecanismos pueden explicar el aumento de la resistencia de las hojas a *B. cinerea* y otros patógenos cuando aumenta la permeabilidad de la cutícula de la planta:

1.- Liberación de ciertos monómeros de cutina o componentes de cera que funcionan como señales para activar la resistencia a las enfermedades de las plantas (Aragón *et al.*, 2017);

2.- Liberación de difusados antifúngicos y ROS que inhiben el crecimiento de patógenos y la infección en la superficie de la hoja (L'Haridon *et al.*, 2011; Sela *et al.*, 2013);

2.- Captación acelerada de elicitores (por ejemplo, MAMP / PAMP / DAMP) activados por patógenos para PTI; y liberación de efectores avirulentos para ETI, que podrían estimular una

respuesta de defensa de la planta más fuerte y eficiente (Chassot et al., 2008; Aragón et al., 2017; (Ziv et al., 2018).

Cómo ejemplo a los puntos antes citados y gracias al trabajo realizado por Blanc y colaboradores en el 2018, sabemos que la permeabilidad de la cutícula de *eca2*, le permitió ser más resistente a *B. cinerea* y *P. syringae*, debido en gran parte al estudio bioquímico sobre la cutícula, el cual arrojó que está presenta una reducción tanto en los componentes de cera como de cutina, así como por la expresión de genes involucrados en las vías de señalización de SA, JA, y ET. Cómo se mostró en los resultados, en el caso de *recal* pese a que resultó ser una mutante más permeable que la wt, no presentó resistencia hacia *B. cinerea* y solo en cierto nivel hacia *P. syringae* y al no tener nosotros un análisis bioquímico sobre la composición de su cutícula comenzamos a indagar en su transcriptoma y cómo puede observarse en la **Tabla 4 (Anexo I)** los genes sobreexpresados en *recal* en comparación con *eca2* están involucrados en el desarrollo de la cutícula, tales como la biosíntesis de ceras, de cutina y de ácidos grasos, tales como; *KCS1*, *KCS4*, *CER1*, y *CER3* a los cuales se une el factor de transcripción MYB96 del cual se sabe que su activación en líneas de *Arabidopsis* presentó mayor acumulación de ceras y una mayor resistencia a *P. syringae* al potenciar la biosíntesis de SA, sin embargo, la acumulación de componentes de cera cuticular no contribuye necesariamente a la resistencia contra patógenos bacterianos. Por ejemplo, líneas sobreexpresantes de *CER1* presentaron mayor acumulación de alcanos VLC, incremento la susceptibilidad a *P. syringae*.

Por lo tanto, la caracterización de la función de componentes de cera específicos en la regulación del crecimiento bacteriano y las infecciones, así como las respuestas de defensa de la planta, podría contribuir a comprender las funciones de las ceras cuticulares en la regulación de las interacciones fitopatógenas bacterianas en la investigación futura (Wang et al., 2020).

8.5 La mutante *recal* no revierte completamente la función de *ECA2*

Como parte de los resultados que obtuvimos anteriormente en el trabajo de Tesis de Licenciatura, observamos mediante tinciones de GUS la expresión de *ATL2* en la mutante *recal* en ausencia y presencia de elicitors (celulosa), y obtuvimos un patrón de expresión similar al observado en la planta

silvestre, ya que en ausencia del patógeno la expresión de *ATL2* se ve confinada en la región del meristemo, expresión que tras 120 minutos de incubación con la celulasa se dispersa por toda la plántula.

Por otro lado, se cuantificó el nivel de expresión endógena de *ATL2* en *reca1* y se obtuvo un nivel intermedio entre la baja expresión de *ATL2* en la wt y la alta expresión en *eca2*, lo cual además de demostrar, junto al patrón de expresión de *reca1* en presencia de la celulasa, que se trataba de un buen candidato para identificar elementos que regulan la expresión de *ATL2* mediada por *ECA2*, ya que no está afectado el gen reportero GUS ni el promotor de *ATL2* que lo regula (Aviles, 2018).

Lo anterior nos dio indicios de que posiblemente la mutación *reca1* este regulando directamente al gen *ATL2* sin pasar necesariamente por reversión total de la función de *ECA2*, ya que, si la mutación *reca1* estuviera regulando a *ATL2* sólo a través de *ECA2*, el nivel de expresión de *ATL2* sería similar al observado en la wt, debido a que se recuperaría la regulación negativa de *ECA2* observada en las plantas wt (**Figura 10**) (Aviles, 2018). Dichas observaciones pudimos corroborarlas mediante el análisis transcriptómico de las muestras a las 0, 2 y 12 hpi, ya que observamos la sobreexpresión de *ATL2* en las muestras de *eca2* a las 0 hpi en comparación con la wt y *reca1* y una vez que se pusieron las plantas en contacto con el patógeno en este caso con la bacteria *P. syringae*, observamos la sobreexpresión de dicho gen en las muestras de 2 y 12 hpi de *eca2* y *reca1* en comparación con la wt.

8.5 Caracterización genética de *reca1*

Como parte de la caracterización genética de *reca1*, realizamos escrutinios genéticos de la población de mapeo F2 resultante de la cruce genética *eca2* X *reca1*, posteriormente al haber obtenido una proporción 3:1 (Tabla 2) realizamos la extracción de DNA y mandamos a secuenciar, sin embargo, aún no tenemos resultados de dicha secuenciación.

9. CONCLUSIONES

- La mutante *recal* presenta represión de genes involucrados en vías de defensa dependientes de JA y ET lo cual se relaciona con su susceptibilidad a *Botrytis cinerea*.
- La reversión parcial de la resistencia de *eca2* a la bacteria *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 que obtuvimos en *recal* requiere ser analizada con más detalle para poder relacionarla o no con una dependencia de la vía de señalización de SA.
- La mutante *recal* no presenta acumulación basal de ROS en comparación con la wt y *eca2*.
- La mutante *recal* presenta una roseta pequeña en comparación con la wt y *eca2*, lo cual podría deberse a modificaciones de rutas dependientes de fitohormonas tales como las auxinas, ya que los genes sobreexpresados en *recal* en comparación con la wt y *eca2*, están involucrados en respuestas a dicha fitohormona.
- *RECA1* regula directamente al gen *ATL2* sin pasar por reversión total de la función de *ECA2*.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones presentados en esta Tesis de Maestría, las perspectivas de trabajos futuros se orientan principalmente en las siguientes direcciones:

1. Confirmar por qRT-PCR los resultados del análisis de transcriptómica.
- 2.- Complementar el estudio de la cutícula de *recA1* con un análisis bioquímico del contenido de ceras y cutina.
- 3.- Realizar la identificación genética de *RECA1* por medio de la técnica Next Generation Mapping (NGM).
- 4.- Una vez identificados los genes *ECA2* y *RECA1*, realizar su caracterización molecular y funcional con respecto a la inducción y regulación de los genes de respuesta temprana.

11. ANEXOS

Tabla 3. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 0 hpi en plantas de *eca2* en comparación con plantas wt. Genes sobreexpresados (**A**) y reprimidos (**B**).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p-Value |
|------------|--------------------|--|-----------|----------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 148 | 3.60E-11 |
| GO:0009416 | Biological Process | response to light stimulus | 42 | 5.10E-11 |
| GO:0006631 | Biological Process | fatty acid metabolic process | 23 | 2.30E-09 |
| GO:0006629 | Biological Process | lipid metabolic process | 45 | 3.40E-08 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 64 | 8.40E-08 |
| GO:0006633 | Biological Process | fatty acid biosynthetic process | 16 | 1.60E-07 |
| GO:0000038 | Biological Process | very-long-chain fatty acid metabolic process | 7 | 1.60E-06 |
| GO:0042335 | Biological Process | cuticle development | 6 | 1.20E-05 |
| GO:0060560 | Biological Process | developmental growth involved in morphogenesis | 15 | 2.00E-05 |
| GO:0009719 | Biological Process | response to endogenous stimulus | 44 | 3.20E-05 |
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 40 | 9.20E-05 |
| GO:0010025 | Biological Process | wax biosynthetic process | 5 | 0.00024 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 67 | 0.0005 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 73 | 0.0005 |
| GO:0006952 | Biological Process | defense response | 30 | 0.0012 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|---|
| pathway | description |
| ath00062 | Fatty acid elongation |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |
| ath00196 | Photosynthesis - antenna proteins |
| ath03030 | DNA replication |
| ath00073 | Cutin, suberine and wax biosynthesis |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms |
| ath00061 | Fatty acid biosynthesis |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath01212 | Fatty acid metabolism |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| ath00195 | Photosynthesis |
| ath01200 | Carbon metabolism |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|----------------------------------|-----------|-----------------|
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 73 | 2.30E-21 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 96 | 1.00E-16 |
| GO:0010033 | Biological Process | response to organic substance | 51 | 2.20E-16 |
| GO:0010200 | Biological Process | response to chitin | 20 | 3.70E-16 |
| GO:0032774 | Biological Process | RNA biosynthetic process | 36 | 9.70E-11 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 53 | 7.90E-09 |
| GO:0010468 | Biological Process | regulation of gene expression | 46 | 7.30E-08 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 12 | 9.30E-07 |
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 27 | 1.90E-06 |
| GO:0009718 | Biological Process | anthocyanin biosynthetic process | 5 | 4.30E-06 |
| GO:0050789 | Biological Process | regulation of biological process | 63 | 7.60E-06 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath00941 | Flavonoid biosynthesis |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |

Tabla 4. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 0 hpi en plantas de *recal* en comparación con plantas wt. Genes sobreexpresados (**A**) y reprimidos (**B**).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|---------------------------------|-----------|-----------------|
| GO:0009987 | Biological Process | cellular process | 1054 | 2.30E-13 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 188 | 1.10E-11 |
| GO:0008152 | Biological Process | metabolic process | 953 | 2.50E-11 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 417 | 5.30E-11 |
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 136 | 8.70E-11 |
| GO:0009719 | Biological Process | response to endogenous stimulus | 141 | 7.00E-10 |
| GO:0009733 | Biological Process | response to auxin stimulus | 65 | 1.40E-09 |
| GO:0006631 | Biological Process | fatty acid metabolic process | 47 | 5.50E-09 |
| GO:0006633 | Biological Process | fatty acid biosynthetic process | 35 | 1.10E-08 |
| GO:0006629 | Biological Process | lipid metabolic process | 109 | 1.40E-07 |
| GO:0010025 | Biological Process | wax biosynthetic process | 11 | 1.10E-05 |
| GO:0010166 | Biological Process | wax metabolic process | 11 | 1.50E-05 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|---|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath03010 | Ribosome |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath00195 | Photosynthesis |
| ath01200 | Carbon metabolism |
| ath00196 | Photosynthesis - antenna proteins |
| ath01230 | Biosynthesis of amino acids |
| ath00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms |
| ath00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| ath00061 | Fatty acid biosynthesis |
| ath00130 | Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis |
| ath00860 | Porphyrin and chlorophyll metabolism |
| ath00062 | Fatty acid elongation |
| ath00030 | Pentose phosphate pathway |
| ath00260 | Glycine, serine and threonine metabolism |
| ath00051 | Fructose and mannose metabolism |
| ath00073 | Cutin, suberine and wax biosynthesis |
| ath01212 | Fatty acid metabolism |
| ath00020 | Citrate cycle (TCA cycle) |
| ath04145 | Phagosome |
| ath00970 | Aminoacyl-tRNA biosynthesis |
| ath03030 | DNA replication |
| ath00620 | Pyruvate metabolism |
| ath00400 | Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis |
| ath00910 | Nitrogen metabolism |
| ath00240 | Pyrimidine metabolism |
| ath00100 | Steroid biosynthesis |
| ath00480 | Glutathione metabolism |
| ath00640 | Propanoate metabolism |
| ath00270 | Cysteine and methionine metabolism |
| ath00780 | Biotin metabolism |
| ath00600 | Sphingolipid metabolism |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p -Value |
|------------|--------------------|---------------------------------------|-----------|----------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 457 | 4.00E-45 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 274 | 5.70E-36 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 272 | 2.10E-28 |
| GO:0010033 | Biological Process | response to organic substance | 179 | 3.90E-24 |
| GO:0010200 | Biological Process | response to chitin | 47 | 1.90E-18 |
| GO:0009743 | Biological Process | response to carbohydrate stimulus | 57 | 1.90E-17 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 165 | 8.50E-16 |
| GO:0009607 | Biological Process | response to biotic stimulus | 87 | 9.00E-13 |
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 114 | 4.10E-12 |
| GO:0009737 | Biological Process | response to abscisic acid stimulus | 61 | 5.70E-12 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 34 | 6.40E-08 |
| GO:0006952 | Biological Process | defense response | 80 | 3.80E-07 |
| GO:0032870 | Biological Process | cellular response to hormone stimulus | 43 | 7.60E-07 |
| GO:0009813 | Biological Process | flavonoid biosynthetic process | 16 | 8.30E-06 |

| KEGG Pathways | |
|----------------|---------------------------------------|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |
| ath04016 | MAPK signaling pathway - plant |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath00592 | alpha-Linolenic acid metabolism |
| ath04626 | Plant-pathogen interaction |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath00330 | Arginine and proline metabolism |
| ath00941 | Flavonoid biosynthesis |
| ath00904 | Diterpenoid biosynthesis |
| ath04712 | Circadian rhythm - plant |
| ath00460 | Cyanoamino acid metabolism |

Tabla 5. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 0 hpi en plantas de *recal* en comparación con plantas *eca2*. Genes sobreexpresados (**A**) y reprimidos (**B**).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|--|-----------|-----------------|
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 84 | 7.30E-16 |
| GO:0009719 | Biological Process | response to endogenous stimulus | 86 | 8.20E-15 |
| GO:0009733 | Biological Process | response to auxin stimulus | 43 | 6.30E-13 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 205 | 2.10E-12 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 122 | 3.30E-11 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 87 | 1.70E-08 |
| GO:0008152 | Biological Process | metabolic process | 404 | 3.90E-07 |
| GO:0016053 | Biological Process | organic acid biosynthetic process | 32 | 6.00E-06 |
| GO:0046394 | Biological Process | carboxylic acid biosynthetic process | 32 | 6.00E-06 |
| GO:0009987 | Biological Process | cellular process | 429 | 6.80E-06 |
| GO:0042547 | Biological Process | cell wall modification during multidimensional cell growth | 8 | 1.10E-05 |

| KEGG Pathways | | | |
|----------------|---|--------------------------|-----------------------------|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> | <i>count in gene set</i> | <i>false discovery rate</i> |
| ath01100 | Metabolic pathways | 109 of 1899 | 8.42e-22 |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction | 39 of 273 | 5.41e-19 |
| ath03010 | Ribosome | 33 of 318 | 1.57e-12 |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites | 60 of 1063 | 1.41e-11 |
| ath01200 | Carbon metabolism | 25 of 261 | 5.22e-09 |
| ath00196 | Photosynthesis - antenna proteins | 7 of 21 | 1.01e-05 |
| ath00860 | Porphyrin and chlorophyll metabolism | 9 of 52 | 2.62e-05 |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism | 10 of 75 | 5.20e-05 |
| ath00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms | 9 of 69 | 0.00016 |
| ath00260 | Glycine, serine and threonine metabolism | 8 of 70 | 0.00099 |
| ath00195 | Photosynthesis | 8 of 76 | 0.0015 |
| ath01230 | Biosynthesis of amino acids | 14 of 244 | 0.0032 |
| ath00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis | 9 of 115 | 0.0040 |
| ath00970 | Aminoacyl-tRNA biosynthesis | 6 of 57 | 0.0074 |
| ath00561 | Glycerolipid metabolism | 6 of 58 | 0.0075 |
| ath00061 | Fatty acid biosynthesis | 5 of 41 | 0.0092 |
| ath00051 | Fructose and mannose metabolism | 6 of 64 | 0.0106 |
| ath00270 | Cysteine and methionine metabolism | 8 of 114 | 0.0109 |
| ath00780 | Biotin metabolism | 3 of 16 | 0.0231 |
| ath00940 | Phenylpropanoid biosynthesis | 9 of 167 | 0.0282 |
| ath00785 | Lipoic acid metabolism | 2 of 5 | 0.0282 |
| ath00670 | One carbon pool by folate | 3 of 20 | 0.0345 |
| ath01212 | Fatty acid metabolism | 5 of 67 | 0.0430 |
| ath00945 | Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis | 2 of 7 | 0.0430 |
| ath00910 | Nitrogen metabolism | 4 of 43 | 0.0430 |
| ath00480 | Glutathione metabolism | 6 of 98 | 0.0468 |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p -Value |
|------------|--------------------|-------------------------------------|-----------|----------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 336 | 1.70E-48 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 210 | 4.60E-34 |
| GO:0009607 | Biological Process | response to biotic stimulus | 76 | 1.70E-18 |
| GO:0006952 | Biological Process | defense response | 84 | 2.50E-18 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 114 | 4.00E-14 |
| GO:0009617 | Biological Process | response to bacterium | 34 | 1.70E-10 |
| GO:0045087 | Biological Process | innate immune response | 40 | 5.30E-10 |
| GO:0006955 | Biological Process | immune response | 40 | 2.30E-09 |
| GO:0002376 | Biological Process | immune system process | 40 | 2.50E-09 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 27 | 1.40E-08 |
| GO:0009737 | Biological Process | response to abscisic acid stimulus | 39 | 1.40E-08 |
| GO:0009753 | Biological Process | response to jasmonic acid stimulus | 28 | 2.00E-08 |
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 71 | 4.00E-08 |
| GO:0009751 | Biological Process | response to salicylic acid stimulus | 26 | 6.50E-08 |
| GO:0042742 | Biological Process | defense response to bacterium | 24 | 1.00E-07 |
| GO:0009620 | Biological Process | response to fungus | 22 | 2.30E-07 |
| GO:0009694 | Biological Process | jasmonic acid metabolic process | 9 | 1.10E-05 |

| KEGG Pathways | |
|----------------|---------------------------------------|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath04016 | MAPK signaling pathway - plant |
| ath00592 | alpha-Linolenic acid metabolism |
| ath04626 | Plant-pathogen interaction |
| ath00380 | Tryptophan metabolism |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |
| ath00966 | Glucosinolate biosynthesis |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath00480 | Glutathione metabolism |
| ath01210 | 2-Oxocarboxylic acid metabolism |
| ath00330 | Arginine and proline metabolism |
| ath00591 | Linoleic acid metabolism |

Tabla 6. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 2 hpi en plantas de *eca2* en comparación con plantas wt. Genes sobreexpresados (**A**) y reprimidos (**B**).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|-------------------------------------|-----------|-----------------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 100 | 4.00E-18 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 68 | 1.10E-15 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 62 | 1.30E-14 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 18 | 4.90E-12 |
| GO:0009605 | Biological Process | response to external stimulus | 25 | 4.20E-12 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 44 | 1.20E-10 |
| GO:0006979 | Biological Process | response to oxidative stress | 19 | 2.20E-09 |
| GO:0010200 | Biological Process | response to chitin | 12 | 7.60E-08 |
| GO:0009617 | Biological Process | response to bacterium | 13 | 1.90E-06 |
| GO:0009607 | Biological Process | response to biotic stimulus | 21 | 2.40E-06 |
| GO:0006952 | Biological Process | defense response | 22 | 1.10E-05 |
| GO:0009753 | Biological Process | response to jasmonic acid stimulus | 10 | 7.80E-05 |
| GO:0000302 | Biological Process | response to reactive oxygen species | 6 | 0.00027 |
| GO:0050832 | Biological Process | defense response to fungus | 6 | 0.00089 |

| KEGG Pathways | |
|----------------|---|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath00380 | Tryptophan metabolism |
| ath04141 | Protein processing in endoplasmic reticulum |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath00940 | Phenylpropanoid biosynthesis |
| ath00592 | alpha-Linolenic acid metabolism |
| ath00330 | Arginine and proline metabolism |
| ath00966 | Glucosinolate biosynthesis |
| ath00410 | beta-Alanine metabolism |
| ath00360 | Phenylalanine metabolism |
| ath00280 | Valine, leucine and isoleucine degradation |
| ath00071 | Fatty acid degradation |
| ath00053 | Ascorbate and aldarate metabolism |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|---------------------------------|-----------|-----------------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 56 | 2.20E-07 |
| GO:0009733 | Biological Process | response to auxin stimulus | 14 | 3.00E-07 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 36 | 3.40E-07 |
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 22 | 1.50E-06 |
| GO:0010033 | Biological Process | response to organic substance | 26 | 2.30E-06 |
| GO:0009719 | Biological Process | response to endogenous stimulus | 22 | 5.50E-06 |
| GO:0009791 | Biological Process | post-embryonic development | 16 | 3.60E-05 |
| GO:0034357 | Cellular Component | photosynthetic membrane | 10 | 2.50E-05 |
| GO:0055035 | Cellular Component | plastid thylakoid membrane | 9 | 4.00E-05 |
| GO:0042651 | Cellular Component | thylakoid membrane | 9 | 6.00E-05 |
| GO:0009536 | Cellular Component | plastid | 39 | 6.00E-05 |

| KEGG Pathways | |
|----------------|---|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |
| ath00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath00905 | Brassinosteroid biosynthesis |
| ath00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis |
| ath00561 | Glycerolipid metabolism |
| ath00030 | Pentose phosphate pathway |
| ath00051 | Fructose and mannose metabolism |
| ath01200 | Carbon metabolism |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| ath00196 | Photosynthesis - antenna proteins |

Tabla 7. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 2 hpi en plantas de *recal* en comparación con plantas wt. Genes sobreexpresados (**A**) y reprimidos (**B**).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p -Value |
|------------|--------------------|----------------------------------|-----------|----------|
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 29 | 3.70E-06 |
| GO:0009408 | Biological Process | response to heat | 9 | 6.20E-06 |
| GO:0009266 | Biological Process | response to temperature stimulus | 14 | 3.00E-05 |
| GO:0009620 | Biological Process | response to fungus | 8 | 4.00E-05 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 8 | 0.00017 |
| GO:0003824 | Molecular Function | catalytic activity | 102 | 9.80E-05 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|---|
| pathway | description |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath04146 | Peroxisome |
| ath01200 | Carbon metabolism |
| ath00071 | Fatty acid degradation |
| ath00250 | Alanine, aspartate and glutamate metabolism |
| ath00561 | Glycerolipid metabolism |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p -Value |
|------------|--------------------|---------------------------------|-----------|----------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 71 | 3.40E-12 |
| GO:0010876 | Biological Process | lipid localization | 6 | 7.20E-08 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 38 | 3.10E-07 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 38 | 3.80E-06 |
| GO:0010033 | Biological Process | response to organic substance | 26 | 9.30E-06 |
| GO:0009605 | Biological Process | response to external stimulus | 13 | 2.50E-05 |
| GO:0009719 | Biological Process | response to endogenous stimulus | 21 | 5.60E-05 |
| GO:0009725 | Biological Process | response to hormone stimulus | 19 | 0.00016 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 24 | 0.00028 |
| GO:0044464 | Cellular Component | cell part | 144 | 5.80E-05 |
| GO:0005623 | Cellular Component | cell | 144 | 5.80E-05 |

| KEGG Pathways | | | |
|--------------------------|---|-------------------|----------------------|
| pathway | description | count in gene set | false discovery rate |
| ath00380 | Tryptophan metabolism | 5 of 53 | 0.0021 |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction | 8 of 273 | 0.0139 |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites | 17 of 1063 | 0.0139 |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism | 4 of 75 | 0.0252 |
| ath01100 | Metabolic pathways | 23 of 1899 | 0.0308 |

Tabla 8. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 2 hpi en plantas de *eca2* en comparación con plantas *recal*. Genes sobreexpresados (A) y reprimidos (B).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p -Value |
|------------|--------------------|----------------------|-----------|----------|
| GO:0003824 | Molecular Function | catalytic activity | 86 | 5.00E-05 |
| GO:0016740 | Molecular Function | transferase activity | 37 | 0.00027 |

| KEGG Pathways | |
|---------------|---|
| pathway | description |
| ath01200 | Carbon metabolism |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| ath00564 | Glycerophospholipid metabolism |
| ath03410 | Base excision repair |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p -Value |
|------------|--------------------|--|-----------|----------|
| GO:0009607 | Biological Process | response to biotic stimulus | 38 | 6.30E-21 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 93 | 1.10E-20 |
| GO:0051707 | Biological Process | response to other organism | 36 | 5.50E-20 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 67 | 1.50E-19 |
| GO:0051704 | Biological Process | multi-organism process | 36 | 1.40E-16 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 16 | 2.40E-11 |
| GO:0042435 | Biological Process | indole derivative biosynthetic process | 10 | 3.00E-11 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 49 | 3.50E-11 |
| GO:0042434 | Biological Process | indole derivative metabolic process | 10 | 8.50E-11 |
| GO:0042430 | Biological Process | indole and derivative metabolic process | 10 | 8.50E-11 |
| GO:0006952 | Biological Process | defense response | 27 | 4.00E-10 |
| GO:0009605 | Biological Process | response to external stimulus | 20 | 9.10E-10 |
| GO:0009617 | Biological Process | response to bacterium | 14 | 3.20E-08 |
| GO:0009620 | Biological Process | response to fungus | 11 | 1.40E-07 |
| GO:0050832 | Biological Process | defense response to fungus | 9 | 4.80E-07 |
| GO:0009861 | Biological Process | jasmonic acid and ethylene-dependent systemic resistance | 5 | 1.20E-06 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 31 | 1.80E-06 |
| GO:0009814 | Biological Process | defense response, incompatible interaction | 9 | 4.30E-06 |
| GO:0003824 | Molecular Function | catalytic activity | 137 | 3.20E-13 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|---|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath00380 | Tryptophan metabolism |
| ath01230 | Biosynthesis of amino acids |
| ath00966 | Glucosinolate biosynthesis |
| ath00280 | Valine, leucine and isoleucine degradation |
| ath00330 | Arginine and proline metabolism |
| ath00561 | Glycerolipid metabolism |
| ath01210 | 2-Oxocarboxylic acid metabolism |
| ath00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis |
| ath00071 | Fatty acid degradation |
| ath00053 | Ascorbate and aldarate metabolism |
| ath01200 | Carbon metabolism |
| ath04016 | MAPK signaling pathway - plant |
| ath00910 | Nitrogen metabolism |
| ath00940 | Phenylpropanoid biosynthesis |
| ath00400 | Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis |
| ath00340 | Histidine metabolism |
| ath00030 | Pentose phosphate pathway |
| ath00511 | Other glycan degradation |
| ath00290 | Valine, leucine and isoleucine biosynthesis |
| ath00051 | Fructose and mannose metabolism |
| ath00460 | Cyanoamino acid metabolism |
| ath00260 | Glycine, serine and threonine metabolism |
| ath00770 | Pantothenate and CoA biosynthesis |

Tabla 9. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 12 hpi en plantas de *eca2* en comparación con plantas wt. Genes sobreexpresados (**A**) y reprimidos (**B**).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|--|-----------|-----------------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 62 | 7.70E-07 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 42 | 1.10E-06 |
| GO:0006979 | Biological Process | response to oxidative stress | 13 | 5.10E-06 |
| GO:0042547 | Biological Process | cell wall modification during multidimensional cell growth | 5 | 7.30E-06 |
| GO:0009605 | Biological Process | response to external stimulus | 14 | 1.60E-05 |
| GO:0051707 | Biological Process | response to other organism | 16 | 4.40E-05 |
| GO:0009607 | Biological Process | response to biotic stimulus | 16 | 8.90E-05 |
| GO:0042545 | Biological Process | cell wall modification | 7 | 9.00E-05 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 8 | 0.00027 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 32 | 0.00046 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|---------------------------------------|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath00196 | Photosynthesis - antenna proteins |
| ath00592 | alpha-Linolenic acid metabolism |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|----------------------------------|-----------|-----------------|
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 72 | 1.80E-22 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 119 | 7.70E-19 |
| GO:0009416 | Biological Process | response to light stimulus | 38 | 1.30E-15 |
| GO:0009639 | Biological Process | response to red or far red light | 22 | 1.80E-13 |
| GO:0009266 | Biological Process | response to temperature stimulus | 31 | 5.40E-13 |
| GO:0042221 | Biological Process | response to chemical stimulus | 67 | 2.70E-12 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 69 | 3.50E-11 |
| GO:0015979 | Biological Process | photosynthesis | 17 | 1.00E-10 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 15 | 6.90E-08 |
| GO:0009414 | Biological Process | response to water deprivation | 16 | 7.60E-08 |
| GO:0016168 | Molecular Function | chlorophyll binding | 13 | 3.80E-14 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|---|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath00196 | Photosynthesis - antenna proteins |
| ath00592 | alpha-Linolenic acid metabolism |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath04075 | Plant hormone signal transduction |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath04141 | Protein processing in endoplasmic reticulum |
| ath00591 | Linoleic acid metabolism |

Tabla 10. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 12 hpi en plantas de *recal* en comparación con plantas wt. Genes sobreexpresados (A) y reprimidos (B).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p-Value |
|------------|--------------------|-----------------------------|-----------|----------|
| GO:0051707 | Biological Process | response to other organism | 21 | 9.00E-07 |
| GO:0009620 | Biological Process | response to fungus | 11 | 8.90E-07 |
| GO:0050832 | Biological Process | defense response to fungus | 9 | 2.20E-06 |
| GO:0009607 | Biological Process | response to biotic stimulus | 21 | 2.30E-06 |
| GO:0051704 | Biological Process | multi-organism process | 22 | 1.30E-05 |
| GO:0006952 | Biological Process | defense response | 21 | 3.40E-05 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 43 | 5.50E-05 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 61 | 0.00051 |
| GO:0016209 | Molecular Function | antioxidant activity | 11 | 5.50E-07 |

| KEGG Pathways | |
|---------------|---------------------------------------|
| pathway | description |
| ath00940 | Phenylpropanoid biosynthesis |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath01100 | Metabolic pathways |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p-Value |
|------------|--------------------|--|-----------|----------|
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 42 | 2.80E-15 |
| GO:0009767 | Biological Process | photosynthetic electron transport chain | 10 | 3.40E-12 |
| GO:0015979 | Biological Process | photosynthesis | 14 | 1.40E-11 |
| GO:0006091 | Biological Process | generation of precursor metabolites and energy | 17 | 2.30E-11 |
| GO:0009416 | Biological Process | response to light stimulus | 23 | 3.10E-11 |
| GO:0022900 | Biological Process | electron transport chain | 11 | 6.00E-11 |
| GO:0009314 | Biological Process | response to radiation | 23 | 5.20E-11 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 63 | 1.10E-10 |
| GO:0019684 | Biological Process | photosynthesis, light reaction | 11 | 2.80E-10 |
| GO:0055114 | Biological Process | oxidation reduction | 11 | 2.10E-07 |
| GO:0051186 | Biological Process | cofactor metabolic process | 13 | 2.50E-07 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 37 | 8.30E-07 |
| GO:0044237 | Biological Process | cellular metabolic process | 92 | 8.20E-07 |
| GO:0005737 | Cellular Component | cytoplasm | 133 | 1.50E-35 |
| GO:0044424 | Cellular Component | intracellular part | 144 | 2.40E-28 |
| GO:0043226 | Cellular Component | organelle | 128 | 1.40E-24 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|---|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms |
| ath00195 | Photosynthesis |
| ath03010 | Ribosome |
| ath01200 | Carbon metabolism |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath00480 | Glutathione metabolism |
| ath01230 | Biosynthesis of amino acids |

Tabla 11. Análisis GO y KEGG de genes diferencialmente expresados a 12 hpi en plantas de *recal* en comparación con plantas *eca2*. Genes sobreexpresados (A) y reprimidos (B).

A

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | <i>p</i> -Value |
|------------|--------------------|---|-----------|-----------------|
| GO:0010876 | Biological Process | lipid localization | 7 | 2.60E-08 |
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 74 | 1.90E-06 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 47 | 1.50E-05 |
| GO:0009791 | Biological Process | post-embryonic development | 20 | 8.20E-05 |
| GO:0015698 | Biological Process | inorganic anion transport | 5 | 7.20E-05 |
| GO:0005488 | Biological Process | binding | 173 | 3.50E-09 |
| GO:0016209 | Molecular Function | antioxidant activity | 8 | 0.00026 |
| GO:0016684 | Molecular Function | oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor | 7 | 0.00051 |
| GO:0004601 | Molecular Function | peroxidase activity | 7 | 0.00051 |

| KEGG Pathways | |
|--------------------------|----------------------------|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath03040 | Spliceosome |
| ath04626 | Plant-pathogen interaction |

B

| GO ID | Ontology | Description | No. Genes | p -Value |
|------------|--------------------|--------------------------------------|-----------|----------|
| GO:0050896 | Biological Process | response to stimulus | 111 | 2.60E-20 |
| GO:0006950 | Biological Process | response to stress | 68 | 1.10E-13 |
| GO:0009628 | Biological Process | response to abiotic stimulus | 45 | 7.10E-10 |
| GO:0006952 | Biological Process | defense response | 30 | 3.10E-09 |
| GO:0051707 | Biological Process | response to other organism | 26 | 4.90E-09 |
| GO:0009607 | Biological Process | response to biotic stimulus | 26 | 1.70E-08 |
| GO:0009416 | Biological Process | response to light stimulus | 23 | 2.80E-07 |
| GO:0046394 | Biological Process | carboxylic acid biosynthetic process | 17 | 5.10E-06 |
| GO:0009611 | Biological Process | response to wounding | 11 | 1.60E-05 |
| GO:0008152 | Biological Process | metabolic process | 150 | 7.60E-05 |

| KEGG Pathways | |
|----------------|--|
| <i>pathway</i> | <i>description</i> |
| ath01110 | Biosynthesis of secondary metabolites |
| ath01100 | Metabolic pathways |
| ath00196 | Photosynthesis - antenna proteins |
| ath00960 | Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis |
| ath00592 | alpha-Linolenic acid metabolism |
| ath01230 | Biosynthesis of amino acids |
| ath00941 | Flavonoid biosynthesis |
| ath00860 | Porphyrin and chlorophyll metabolism |
| ath00260 | Glycine, serine and threonine metabolism |
| ath00591 | Linoleic acid metabolism |
| ath00630 | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| ath00062 | Fatty acid elongation |
| ath01200 | Carbon metabolism |
| ath00910 | Nitrogen metabolism |
| ath00360 | Phenylalanine metabolism |

12. LITERATURA CITADA

- AbuQamar, S., Moustafa, K., & Phan, L.S. 2017. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2): 262-274.
- Aviles, N. Y. 2018. Generación, identificación y caracterización de mutantes *reca* de *Arabidopsis thaliana* que revierten la expresión constitutiva de *ATL2*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas. México.
- Blanc, C., Coluccia, F., L'Haridon, F., Torres, M., Ortiz-Berrocal, M., Schreiber, L., Nawrath, C., Métraux, J-P & Serrano M. 2018. The novel wax mutant *eca2* modifies the plant innate immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. *In press*.
- Boller, T. & Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 379-406.
- Boller, T & Yang, S. 2009. Innate Immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptor in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*. Author Manuscript, 324(5928): 742-744.
- Castro, E. & García, E. 2009. La inmunidad innata en las plantas: una batalla molecular entre receptores y estimuladores. *Biológicas*, 11: 43-47.
- Coluccia, F. 2015. The search for mutants insensitive to the action of cutinase. Master thesis in Biology. (pp:1-39). Plant biology, department of biology, University of Fribourg, Switzerland.
- Chassot C., Nawrath, C., and Métraux J.P. 2007. Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant Journal*. 49:972-980.
- Chassot C., Buchala A., Schoonbeek H.J., Métraux J.P., Lamotte O. 2008. Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *Plant Journal* 55(4):555-67.

- Dangl, J.L., & Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.
- De Torres M, Sanchez P, Fernandez-Delmond I, Grant M. 2003. Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defense responses in RPM1-mediated resistance. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 33: 665–676
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. 2010. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research* 38: W64-W70.
- Edwards, K., Jonhnstone, C., y Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 6(19): 1349.
- Escudero, V. 2014. Caracterización funcional de los genes *sgb* (supresor of agb 1-1 susceptibility to pathogens): nuevos reguladores de la respuesta de inmunidad innata de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. España.
- Fumiaky, K., Thilmony, R., & Yang, S. 2002. The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Arabidopsis Book*. 1: e0039.
- Göhre, V., & Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46: 189-215.
- Guzmán, P. 2012. The prolific *ATL* family of RING-H2 ubiquitin ligases. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 1014-1021.
- Howard, BE., Hu, Q., Babaoglu, A.C., Chandra, M., Borghi, M., Xiaoping, T. Luyan, E. 2013. High-Throughput RNA Sequencing of *Pseudomonas*-Infected *Arabidopsis* Reveals Hidden Transcriptome Complexity and Novel Splice Variants. *PLOS ONE* 8(10): e74183
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5: 387–405.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.

- Kim, Y., Schumaker, K. & Zhu, J.K. 2006. EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Protocols* (2^o ed.). Sanchez-Serrano, J., & Salinas, J. (eds). Methods in Molecular Biology, 323: 101-104. Humana Press Inc. United States of America.
- L'Haridon, F., Besson-Bard, A., Binda, M., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Balet, F., Schoonbeek, H.-J., Hess, S., Mir, R., Léon, J., Lamotte, O. & Métraux, J.-P. 2011. A Permeable Cuticle Is Associated with the Release of Reactive Oxygen Species and Induction of Innate Immunity. *PLoS Pathog*, 7:1-17.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S.E., and Mettraux, J.P. 2015. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112:54-62.
- Madriz, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*, 63: 22-32.
- Martínez-García, M., Garcidueñas-Piña, C., & Guzmán, P. 1996. Gene isolation in *Arabidopsis thaliana* by conditional overexpression of cDNAs toxic to *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel early response zinc-finger gene. *Mol Gen Genet*, 252: 587-596.
- Newman, M.A., Sundelin, T. Nielsen, J. & Erbs, G. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in plant science*, 4(139): 1-14.
- Ojito-Ramos, K. & Portal, O. 2010. Introducción al sistema inmune en plantas. *Bioteología Vegetal*, 10(1): 3-19.
- Page, D.R., & Grossniklaus, U. 2002. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Review Genetics*, 3(2): 124-136.
- Pieterse, C.M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees S.C. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5(5):308-16.
- Qu, L.J., & Qin, G. 2014. Generation and identification of *Arabidopsis* EMS mutants.: growth, preservation of seed, transformation, and genetic crosses. *Arabidopsis Protocols* (3^o ed.). Sanchez-Serrano, J., & Salinas, J. (eds). Methods in Molecular Biology, 1062: 225-240: 3-26. Humana Press Inc. United States of America.

- Riveros, A.B. 2010. Mecanismos asociados con la defensa de las plantas Inducción de resistencia en plantas Interacción: Planta-Patógeno. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). pp:39-55. Colombia.
- Salinas-Mondragón, R., Garcidueñas-Piña, C. & Guzmán, P. 1999. Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 40: 579-590.
- Serrano, J. 1998. Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del Arabidopsis Information Service. Tesis doctoral. Universidad de Alicante. España.
- Serrano, M. & Guzmán, P. 2004. Isolation and Gene Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* Mutants with Constitutive Expression of *ATL2*, an Early Elicitor-Response RING-H2 Zinc-Finger Gene. *Genetics*, 167: 919-929.
- Serrano, M., Parra, S., Alcaraz, L. & Guzmán, P. 2006. The *ATL* Gene Family from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* Comprises a Large Number of Putative Ubiquitin Ligases of the RING-H2 Type. *Journal of Molecular Evolution* 62: 434-445.
- Serrano, M., Torres, M., Coluccia, F., L'Haridon, F., & Metraux, J.P. 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*. 5:274.
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A.H., Nielsen, L., Jorgensen, J.E., Weigel, D., & Andersen S-U. 2009. SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature Methods* 6: 550.
- Tsukaya, H. 1995. Developmental genetics of leaf morphogenesis in dicotyledoneous plants. *Journal of Plant Research* 108, 407-416.
- Vidhyasekaran, P. 2013. PAMP Signaling in Plant Innate Immunity. PAMP Signals in Plant Innate Immunity, Signal Perception and Transduction. Springer Science & Business Media. pp:17-31. London.
- Wang, X., Kong, L., Zhi P., & Chang C. 2020. *International Journal of Molecular Science*. 21: 5514.
- Zipfel, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in*

Immunology. 20: 10-16.

Ziv, C.; Zhao, Z.; Gao, Y.G.; Xia, Y. 2018. Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plants. Sci.* 9:1088

Zhao Y, Bi K, Gao Z, Chen T, Liu H, Xie J, Cheng J, Fu Y and Jiang D. 2017. Transcriptome Analysis of *Arabidopsis thaliana* in Response to *Plasmodiophora brassicae* during Early Infection. *Frontiers Microbiology.* 8:673