



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas

**“Participación de las cinasas MPK6 y TOR en la respuesta inmune de
Arabidopsis thaliana contra *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con
modificación en la producción de CDPs”**

Presenta:

M.C. Cristhian Said Solis Ortiz

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias Biológicas
Opción Investigaciones Químico-Biológicas**

Director de tesis:

D.C. Homero Reyes de la Cruz

Codirector de tesis:

D.C. Jesús Campos García

Morelia Michoacán, México, a julio del 2023.

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS, DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ Y LA COASESORIA DEL D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA.

EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, No. DE BECARIO 701929, CVU 628781. AEMÁS DE LOS PROYECTO DE CIENCIA BÁSICA CONACYT No. 222405 Y DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN 2018-2022 DE LA CIC-UMSNH.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Gracias por haberme facilitado la oportunidad de realizar el programa de “Doctorado Institucional en Ciencias Biológicas opción en Investigaciones Químico-Biológicas”.

A CONACYT. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para la realización de este trabajo de investigación.

Al D.C. Homero Reyes de la Cruz, mi asesor, por aceptar dirigir mi tesis, apoyándome con sus conocimientos, recursos y las instalaciones de su laboratorio para desarrollar mi proyecto de Doctorado que hoy culmina con éxito. Por tener paciencia y creer en mi trabajo sin dejar de lado la calidez humana.

Al D.C. Jesús Campos García, mí coasesor, por su apoyo para desarrollar mi proyecto de Doctorado mediante su conocimiento, paciencia y aportaciones para la mejora de este proyecto. Por creer en mí capacidad y mi trabajo, alentándome a realizar el doctorado.

A mis sinodales, D.C. Jesús Salvador López Bucio, D.C. Ernesto García Pineda y D.C. Ángel Arturo Guevara García, por las aportaciones para mejorar éste trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio Cesar, Saúl, Omar, Lolita, Héctor, Iván, Daniela, Rosario, Sharel, Laura, Xóchitl, Lorena y Alma, gracias por su apoyo y amistad.

A mí familia, a mis padres Ma. de la Luz y Aristeo, por darme su amor, consejos y apoyo para realizar mis sueños, gracias papás por creer en mí. A mis hermanos, Alida, J. Manuel, Rodrigo, Alberto, Beneda y Alfredo, por su amor, apoyo y consejos, los quiero mucho. A mi amigo Fernando, por ser mi familia elegida. A mi primin Carlos por su ayuda incondicional, cariño y consejos.

A Dios (como yo lo concibo), por otorgarme talentos, fuerza, valentía y resiliencia para superar los obstáculos y alcanzar mis objetivos, personales y espirituales.

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 El estrés vegetal y las respuestas de defensa en plantas.....	8
1.1.1 Estrés abiótico.....	10
1.1.2 Estrés de tipo biótico.....	11
1.1.3 Inmunidad asociada a patrones moleculares asociados a patógenos (PTI).	13
1.1.4 Inmunidad asociada a efectores.....	16
1.1.5 Regulación de PTI por ETI.	17
1.1.6 Respuesta hipersensible.....	20
1.1.7 Respuesta sistémica adquirida.....	22
1.1.8 Respuesta sistémica inducida.....	30
1.1.9 Las fitohormonas de la defensa.....	36
1.1.9.1 Ácido salicílico	37
1.1.9.2 Ácido jasmónico.....	38
1.1.9.3 Etileno (ET).....	39
1.1.9.4 Ácido abscísico.....	39
1.1.9.5 Entrecruzamiento de las fitohormonas en SAR e ISR.....	42
1.2 Vías de señalización implicadas en las respuestas de defensa.....	44
1.2.1 Vía de las MAPK.....	44
1.2.1.1 Módulo MPK3/MPK6 y MPK4.....	44
1.2.2 Vía de AtTOR-S6K.....	46
1.2.2.1 Participación de TOR en el balance y crecimiento de plantas.....	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> como patógeno oportunista de plantas.....	50
1.3.1 Sistema de Quórum sensing (QS).....	51
1.3.2 Factores de virulencia y su relación con el QS.....	56
1.3.2.1 Pigmentos producidos por <i>P. aeruginosa</i>	57
1.3.2.2 Ramnolípidos	58
1.4 Elicitores de la respuesta de defensa en plantas.....	60
1.4.1 Vesículas bacterianas de membrana externa (OMVs).....	60
1.4.2 Péptidos bacterianos	62
2. ANTECEDENTES.....	64

2.1	CDPs de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 como elicitores de la respuesta de defensa en plantas.	64
3.	JUSTIFICACIÓN.	67
4.	HIPOTESIS.	67
5.	OBJETIVO GENERAL.	67
5.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	67
6.	RESULTADOS.....	68
6.1.	Resultados publicados.....	68
6.2.	Resultados no Publicados.	79
6.2.1.	Marco de referencia.	79
6.2.2	Resultados de la experimentación.....	79
6.2.3.	Discusión de resultados no publicados.	89
6.3.	CONCLUSIONES.....	91
8.-	ANEXOS.....	96
8.1.	Artículo de colaboración.....	96
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	111

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 1. Clases funcionales de genes predichos de <i>P. aeruginosa</i> (modificado de Stover et al., 2000).	51
Tabla 2. Funciones controladas por el circuito de QS en <i>P. aeruginosa</i> (tomada de Juhas, et al., 2005).	57
Figura 1. Señalización de la respuesta de defensa en plantas.	10
Figura 2. Entrecruzamiento entre PTI y ETI.	15
Figura 3. Modelo del sistema inmunológico de plantas.	19
Figura 4. Respuesta sistémica adquirida (SAR) en plantas.	26
Figura 5. Diferencias entre SAR y SIR.	33
Figura 6. Relación entre el sistema inmune de las plantas y su microbioma.	35
Figura 7. Vía de señalización de las MAPK.	45
Figura 8. Vía de señalización de TORC1.	46
Figura 9. Componentes de AtTORC1.	47
Figura 10. Procesos regulados por AtTORC1.	48
Figura 11. SnRK1 y TOR, balance entre defensa y crecimiento.	49
Figura 12. Sistema de Quorum Sensing (QS) en <i>P. aeruginosa</i>.	53
Figura 13. Señales químicas de QS de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	55
Figura 14. Pigmentos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	58
Figura 15. Efecto OMVs de patógenos, balance entre protección y crecimiento.	62
Figura 16. Participación de TOR en la modulación del sistema inmune en plantas (tomado de De Vleeschauwer, et al., 2017).	66
Figura 17. Efecto negativo de los RLs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, sobre el desarrollo de <i>A. thaliana</i>.	80
Figura 18. Efecto negativo de la PC de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sobre el desarrollo de <i>A. thaliana</i>.	81
Figura 19. Efecto de los RLs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>.	82
Figura 20. Efecto de la PC de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>.	84
Figura 21. Expresión de PR-1::GUS en hojas de <i>A. thaliana</i> por efecto de los RLs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	85
Figura 22. Actividad de LOX2::GUS en hojas de <i>A. thaliana</i> por efecto de los RLs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	85
Figura 23. Actividad de PR-1::GUS en hojas de <i>A. thaliana</i> por efecto de la PC de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	86
Figura 24. Actividad de LOX2::GUS en hojas de <i>A. thaliana</i> por efecto de la PC de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	86
Figura 25. Efecto de la preexposición de <i>A. thaliana</i> Col-0 a PAO1-CDPs, PC y RLs contra <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y PA4078/pvdL.	88

RESUMEN

Las plantas como organismos sésiles están expuestas a factores abióticos y bióticos que les causan estrés. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 es un patógeno oportunista para humanos y plantas. La exposición directa de *Arabidopsis thaliana* a la cepa *P. aeruginosa* PAO1 causa la muerte de las plantas al producir una amplia gama de factores de virulencia, que están regulados principalmente por sistemas de detección de quórum. *P. aeruginosa* PAO1 produce los ciclodipeptidos (PAO1-CDPs), ciclo(L-Pro-L-Phe), ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Leu). Los PAO1-CDPs tienen actividad similar a las auxinas en las plantas, actuando como moléculas promotoras de crecimiento vegetal a través de la activación de la vía Diana de la Rapamicina (AtTOR). Por otro lado, los mecanismos de defensa de las plantas se regulan a través de la producción de fitohormonas como el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA), que son inducidos por patógenos de plantas mediante el censado de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), activando genes de defensa como *PR-1*, asociado a SA, y *LOX2*, asociado a JA. La sinergia entre JA y SA se presenta en la respuesta sistémica adquirida (SAR), mientras que su antagonismo ocurre en la respuesta sistémica inducida (ISR). Los mecanismos de defensa implican la participación de cascadas de señalización, como las de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) o la vía TOR, que controlan un interruptor que dirige la energía hacia la defensa o el crecimiento. Con base en lo anterior, este trabajo se encaminó a describir la participación de las proteínas AtTOR y MPK3/MPK6 en la respuesta de defensa de *A. thaliana* ante la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1, permitiendo identificar que estas cinasas están implicadas en la respuesta inmune de *A. thaliana*, a través de la desactivación AtTOR y la activación de MPK3/MPK6, para activar la respuesta sistémica adquirida (SAR). Por su parte, los PAO1-CDPs activan la respuesta sistémica inducida (ISR), activando a *LOX2*, asociado a JA, y desactivando a *PR-1*, asociado a SA. Estas observaciones sugieren que los PAO1-CDPs pueden ser considerados como elicitores de la respuesta inmune de las plantas.

Palabras clave: Proteínas cinasas, interacción planta-patógeno, Fitohormonas, Ciclodipeptidos, Elicitores.

ABSTRACT

Plants, as sessile organisms are exposed to abiotic and biotic factors that cause stress. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is an opportunistic pathogen for humans and plants. Direct exposure of *Arabidopsis thaliana* to the *P. aeruginosa* PAO1 strain causes plant death by producing a wide range of virulence factors, mainly regulated by quorum detection systems. *P. aeruginosa* PAO1 produces the cyclodipeptides (PAO1-CDPs), cyclo(L-Pro-L-Phe), cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Leu). PAO1-CDPs have auxin-like activity in plants as plant growth-promoting molecules through activating the Target of Rapamycin Pathway (AtTOR). On the other hand, the defense mechanisms of plants are regulated through the production of phytohormones such as salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) that are induced by plant pathogens through the perception of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), activating defense genes such as *PR-1* associated with SA and *LOX2* associated with JA. The synergy between JA and SA occurs in the systemic acquired response (SAR), while its antagonism occurs in the induced systemic response (ISR). Defense mechanisms involve signaling cascades such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) or the TOR pathway as a switch that re-directs energy toward defense or growth. For all the above, this work was aimed at describing the participation of AtTOR and MPK3/MPK6 in the defense response of *A. thaliana* to the pathogenicity *P. aeruginosa* PAO1, identifying that the proteins kinases AtTOR and MPK3/MPK6 are involved in the immune response of *A. thaliana*, where AtTOR is deactivated. At the same time, MPK3/MPK6 are activated, activating SAR, while the PAO1-CDPs activate SIR, triggering *LOX2* expression associated with JA and deactivating *PR-1* expression associated with SA. All this suggests that PAO1-CDPs can be considered elicitors of plant immune responses.

Keywords: Protein kinase, plant-pathogen, Phytohormones, Cyclodipeptides, Elicitors.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El estrés vegetal y las respuestas de defensa en plantas.

Las plantas son organismos sésiles que están expuestos a diferentes estímulos externos que pueden ser de tipo abiótico y biótico, los cuales les producen estrés y, por consiguiente, comprometen su desarrollo, disminuyendo la producción de cultivos de interés como el maíz, el arroz o el trigo, causando pérdidas importantes a la economía global (Etesami & Jeong, 2018). El estrés puede definirse como una condición adversa para el crecimiento y desarrollo de las plantas, causada por factores ambientales o biológicos, o ambos (Ahmad et al., 2019). Cuando las plantas activan adecuadamente su sistema de defensa para responder eficientemente a estímulos patogénicos se considera una respuesta clave para la supervivencia (McMillan et al., 2021). El sistema de defensa en plantas comprende mecanismos altamente intrincados que activan redes de vías de señalización para responder específicamente a las amenazas letales causadas por organismos patógenos, desencadenando, entre otros, la respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) y la muerte celular programada (Macho & Zipfel, 2014; Ramirez-Prado et al., 2018).

Los microorganismos patógenos pueden ser bacterias, virus, u oomicetos. Los microorganismos pueden clasificarse en biótrosos, necrótrosos y hemibiótrosos; los hemibiótrosos son organismos que establecen una relación de alimentación a largo plazo con su huésped, derivando nutrientes de las células vivas; mientras que los necrótrosos matan a las células huésped secretando toxinas o enzimas y luego se alimentan de los restos. Muchos patógenos, sin embargo, pueden comportarse como biótrosos y necrótrosos dependiendo de la etapa de su ciclo de vida, y por lo tanto se denominan hemibiótrosos (De Vleeschauwer et al., 2016; Pieterse et al., 2009).

Dentro de las plantas, numerosas vías y redes de transducción de señales interactúan en respuesta a un estímulo biótico o abiótico dado. Estas respuestas están entrelazadas con interacciones de numerosas hormonas vegetales, calcio y diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), así como con una gran cantidad de receptores,

cinastas, fosfatasa y otras proteínas reguladoras, compuestos y moléculas pequeñas (Figura 1) (Peck & Mittler, 2020; A. K. Singh & Chamovitz, 2019; Williams et al., 2019). Cada mecanismo o red de señalización podría estar influenciado por diferentes condiciones bióticas o abióticas, que alterarán su resultado general y afectarán la aclimatación a diferentes condiciones. En las plantas se activan redes de señalización, que se producen bajo diversas condiciones, o estímulos, que desencadenan y coordinan redes reguladoras y mecanismos epigénéticos, transcripcionales y posttranscripcionales, necesarios para su supervivencia. Las diferentes señales son producidas en diferentes compartimentos celulares, pero su integración requiere complejos unidos a membranas que comprenden muchas proteínas diferentes (Figura 1) (Nimma et al., 2017; Peck & Mittler, 2020; A. K. Singh & Chamovitz, 2019).

Existen múltiples factores que pueden afectar a las plantas y activar sus diversas vías de transducción de señales. El resultado de la activación de casi cualquier vía de señalización necesita integrar muchos factores para generar una respuesta relevante para la supervivencia de la planta. La interacción entre diferentes complejos de señalización, que integran la entrada de múltiples factores en diferentes compartimentos subcelulares (citósol, citoesqueleto, pared celular, membrana plasmática, núcleo, retículo endoplásmico (ER), mitocondria y cloroplasto) de la célula, se propone para orquestar la integración de múltiples señales e impactar la expresión génica durante la activación de cualquier vía de transducción de señales dada. Algunos de estos complejos pueden interactuar físicamente para formar súper complejos que integran múltiples señales (Figura 1), lo cual da como resultado la activación de factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) para la activación de genes, donde se encuentran procesos como la transcripción, la epigenética y eventos post transcripcionales, producción de especies reactivas de oxígeno, activación de la respuesta hipersensible o desencadenar la muerte celular programada (Peck & Mittler, 2020).

Las plantas detectan patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs, por sus siglas en inglés), los cuales son moléculas presentes en la superficie del organismo invasor, que pueden ser reconocidos por receptores anclados a la membrana plasmática, designados como receptores de reconocimiento PAMP (PRR, por sus siglas en

inglés), para activar la primera capa de defensa de las plantas (inmunidad desencadenada por PAMP) (Figura 1) (Baltrus et al., 2012; Ichinose et al., 2013).

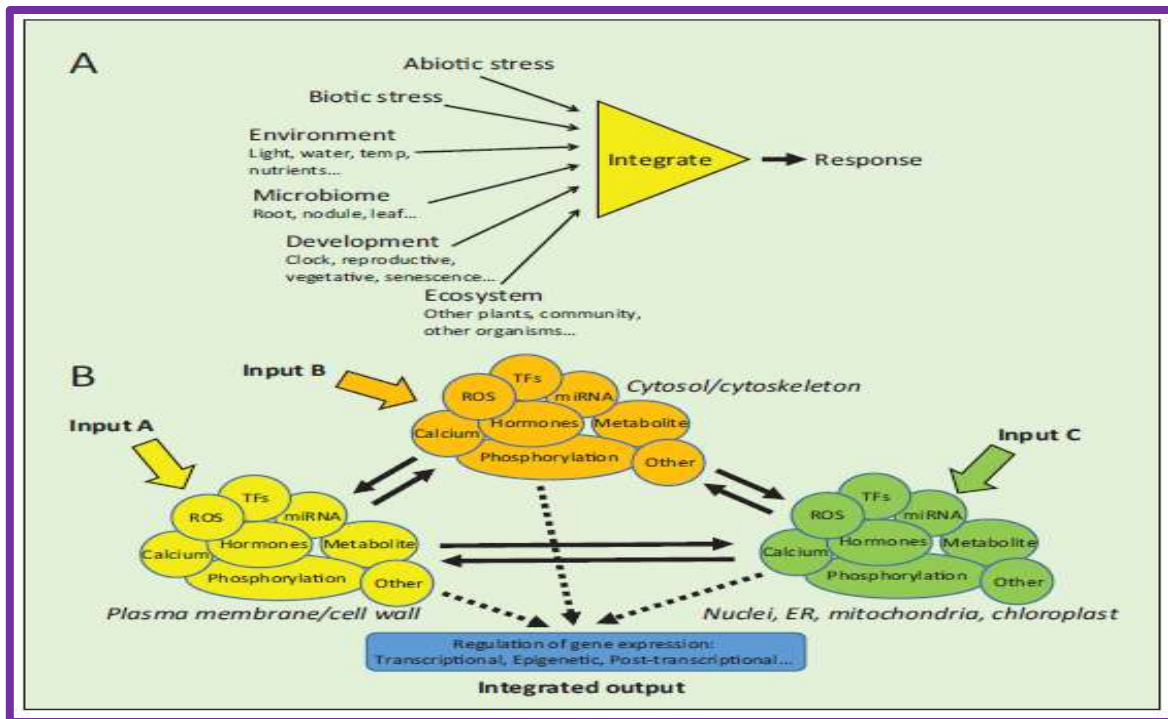


Figura 1. Señalización de la respuesta de defensa en plantas

Integración de las vías de transducción de señales en plantas (Tomada de (Peck & Mittler, 2020)). (A) Los múltiples factores propuestos para afectar casi todas las vías de transducción de señales en las plantas. El resultado de casi cualquier vía de señalización necesita integrar muchos de estos factores para generar una respuesta relevante para el contexto que contribuirá a la supervivencia, el crecimiento y la reproducción exitosos de la planta. (B) Se propone la interacción entre diferentes complejos de señalización que integran entradas de múltiples factores (p. ej., entradas A, B y C) en diferentes compartimentos subcelulares para orquestar la integración de múltiples señales e impactar la expresión génica durante la activación de cualquier señal dada la vía de transducción. Algunos de estos complejos pueden interactuar físicamente para formar supercomplejos que integran múltiples señales. Abreviaturas utilizadas: ER, retículo endoplásmico; ROS, especies reactivas de oxígeno; TF, factor de transcripción.

1.1.1 Estrés abiótico.

Existen múltiples factores que modulan las vías de transducción de señales en las plantas, como el estrés abiótico, donde se incluyen a factores ambientales como la luz, el estrés hídrico, la disponibilidad de nutrientes y cambios de temperatura; factores del desarrollo, como el tiempo, la senescencia y la reproducción (Peck & Mittler, 2020). Bajo condiciones naturales, las plantas pueden ser afectadas al mismo tiempo por dos tipos de

estrés abiótico, como la salinidad y sequía, o el calor y disponibilidad de nutrientes, lo cual afecta la producción mundial de cultivos de interés. Estos estreses abióticos concurrentes son más destructivos para las plantas, pues alteran su metabolismo y reducen su rendimiento aún más que si ocurrieran por separado en diferentes etapas de crecimiento (Peters et al., 2014). Las plantas actúan en respuesta a estreses concurrentes al inducir la expresión de un conjunto diverso de genes cuyos productos, como los metabolitos secundarios fenólicos, desempeñan un papel crítico en el alivio de una amplia gama de estreses (Naikoo et al., 2019). Las plantas alteran sus respuestas a factores de estrés concurrentes y, junto con otras respuestas generales, revelan numerosas respuestas distintivas (Ahmad et al., 2019).

1.1.2 Estrés de tipo biótico.

El estrés biótico, es importante debido a que existen diferentes organismos que pueden causar daño a las plantas, un factor del estrés biótico es el microbioma de la raíz, nódulos y hojas; el ecosistema en sí, en el que se catalogan a mamíferos, insectos, otras plantas y microorganismos como bacterias, hongos, oomicetos y virus, es otro factor estresante (Peck & Mittler, 2020).

El estrés biótico ejerce una gran presión sobre la productividad de las plantas (Mordecai, 2011). Un caso común de estrés biótico combinado, son los ataques simultáneos de patógenos bacterianos y fúngicos. Las plantas pueden estar gravemente dañadas por infecciones fúngicas, bacterianas y virales concurrentes, que conducen a síntomas de enfermedad más graves que las infecciones separadas con cada uno de estos patógenos (Ahmad et al., 2019). Por ejemplo, los ataques combinados de la bacteria *Xanthomonas arboricola* y patógenos fúngicos como *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Colletotrichum spp.* o *Phomopsis spp.*, causan necrosis apical marrón en *Juglans regia* (Belisario et al., 2002). Los daños causados tanto por el estrés biótico y abiótico a los cultivos, se prevé que podrían aumentar en el futuro cercano, incluso debido al cambio climático global, así como que los costos asociados a los daños causados por estrés, son potencialmente enormes, pues tienen un gran impacto en la agricultura, la biodiversidad y el ambiente (Acquaah, 2009; Ahmad et al., 2019).

Las plantas han desarrollado un sistema inmune innato de dos capas para detectar y hacer frente a diversos ataques bióticos (Jones & Dangl, 2006; Zhou & Zhang, 2020). La primera capa del sistema inmune se activa al reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o los patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés), a través de PRR localizados en la superficie celular, lo que lleva a la inmunidad asociada a patrones (PTI por sus siglas en inglés); (Jones & Dangl, 2006). Así, PTI juega un papel prominente en la reducción de la invasión de patógenos (Melotto et al., 2006; Zipfel et al., 2004) y el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota foliar endófito en la hoja de la planta (Chen et al., 2020).

Para facilitar la invasión y la proliferación, muchos patógenos, incluidas bacterias, hongos, oomicetos y nematodos, entregan moléculas asociadas a la virulencia, como efectores secretados a través del sistema de secreción bacteriana tipo III (T3SS por sus siglas en inglés), en las células vegetales o el apoplasto para suprimir la inmunidad del huésped (Rocafort et al., 2020; Xin et al., 2018). Para combatir la virulencia de los patógenos, las plantas activan una segunda señalización inmune generalmente más fuerte, conocida como inmunidad asociada a efectores (ETI por sus siglas en inglés), tras el reconocimiento directo o indirecto de efectores por parte de los receptores tipo NOD (NLR) (Jones & Dangl, 2006). Jones y Dangl en el 2006, propusieron un influyente modelo en "zigzag" para describir los resultados fisiológicos del sistema inmune de las plantas de dos capas en respuesta a diferentes patógenos (Jones & Dangl, 2006).

Cabe destacar que PTI y ETI implican la activación de dos clases distintas de receptores (PRR y NLR, respectivamente) y diferentes pasos en la señalización temprana (Couto & Zipfel, 2016; Jones et al., 2016). Sin embargo, conducen a una serie de salidas descendentes superpuestas, como las cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés), el flujo de calcio, el estallido ROS, la reprogramación transcripcional y la señalización de fitohormonas (Peng et al., 2018; Tsuda & Katagiri, 2010), lo que sugiere puntos convergentes e interseccionales de estas dos cascadas de señalización. Los últimos años fueron testigos de un progreso significativo en la comprensión de cómo PTI y ETI se entrecruzan para garantizar una inmunidad robusta (Yuan et al., 2021).

1.1.3 Inmunidad asociada a patrones moleculares asociados a patógenos (PTI).

El sistema inmune de las plantas comprende múltiples capas, una de ellas es la inmunidad desencadenada por patrones activada por PAMPs. La PTI es suficiente para suprimir el desarrollo de la enfermedad al impedir la colonización de patógenos. Sin embargo, algunos patógenos pueden alterar la PTI (Jones & Dangl, 2006; Nguyen et al., 2021; Seyfferth & Tsuda, 2014). Tras el reconocimiento de PAMP, se generan ROS, la afluencia intracelular de calcio y se produce una activación transitoria de MAPKs y la producción de ácido salicílico (SA por sus siglas en inglés) (Figura 2) (Seyfferth & Tsuda, 2014; Tsuda & Katagiri, 2010).

El primer nivel del sistema inmune de la planta corresponde a la percepción del patógeno a través del reconocimiento de PAMP conservados, por PRR. Como los PAMPs a menudo también se derivan de no patógenos, se denominan preferentemente patrones moleculares asociados a microbios (Ausubel, 2005). El reconocimiento de MAMPs por parte de la planta, induce la inmunidad desencadenada por PAMP o la inmunidad desencadenada por patógenos o la inmunidad desencadenada por patrones o la inmunidad desencadenada por MAMP, un conjunto complejo de respuestas destinadas a resistir un ataque de patógenos. La planta también es capaz de detectar DAMP, que son productos de degradación de las plantas resultantes de la acción de patógenos invasores, o péptidos endógenos, constitutivamente presentes o recién sintetizados, que son liberados por las plantas después de los ataques de patógenos (Figura 2) (Boller Felix, 2009) El reconocimiento de DAMPs también desencadena respuestas inmunes similares a la respuesta PTI (Yamaguchi & Huffaker, 2011)

La percepción de patógenos también puede ocurrir a través del reconocimiento de efectores de patógenos, que son moléculas sintetizadas por los patógenos y entregadas en la matriz extracelular o en la célula vegetal para mejorar la aptitud del patógeno, por ejemplo, contrarrestando la inducción de PTI. Las plantas que no son capaces de detectar estos efectores son susceptibles a un patógeno, lo que resulta en una susceptibilidad desencadenada por el efector, mientras que las plantas que pueden reconocer los efectores a través de

proteínas de resistencia a enfermedades (proteínas R) pueden implementar una respuesta inmune llamada inmunidad desencadenada por el efector (Figura 2). La coevolución de patógenos y plantas, en particular su repertorio de efectores y proteínas R condujo al llamado modelo en zigzag (Bigeard et al., 2015; Jones & Dangl, 2006).

Después de la detección de patógenos, las plantas son capaces de inducir una serie de mecanismos de defensa, incluido el cierre estomático, para limitar la entrada de bacterias (Melotto et al., 2008; Sawinski et al., 2013), la restricción de la transferencia de nutrientes del citosol al apoplasto, para limitar la multiplicación bacteriana (Chen et al., 2010; Wang et al., 2012), la producción y secreción de compuestos antimicrobianos, incluidas las fitoalexinas, como la camalexina, y proteínas/péptidos relacionados con la defensa, como *PR-1* (Ahuja et al., 2012; Bednarek, 2012; Cowan, 1999), la generación de especies reactivas de oxígeno, que tienen efectos tóxicos sobre los patógenos (O'Brien et al., 2012), y una muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés), conocida como respuesta hipersensible, en el sitio de la infección, para limitar la progresión del patógeno (Figura 2) (Mur et al., 2008).

La señalización PTI se activa tras el reconocimiento directo de PAMPs o DAMPs por PRRs, que hasta ahora incluyen dos tipos de proteínas de superficie celular, cinasas similares a receptores (RRLK por sus siglas en inglés) y proteínas similares a receptores (Figura 2) (RLPs por sus siglas en inglés) (Boutrot & Zipfel, 2017). La porción extracelular de estas proteínas a menudo contiene repeticiones ricas en leucina (LRR por sus siglas en inglés) (por ejemplo, FLS2, EFR, PEPR y RLP23), LysM (por ejemplo, LYK4/5) o dominio S-lectina (por ejemplo, LORE) (Couto & Zipfel, 2016), que perciben ligandos derivados de microbios o plantas. Los RLK contienen un dominio de cinasa intracelular, mientras que los LRP carecen de un dominio de cinasa, tienen una cola intracelular corta o nula y, por lo general, son complejos con la proteína adaptadora SOBIR1, para el reconocimiento de ligandos (Albert et al., 2015; Liebrand et al., 2013; Zhang et al., 2013). Tras la unión de ligandos, los receptores RLK o RLP-SOBIR1 reclutan correceptores como BAK1 o CERK1, para formar un complejo de receptores, en el que se produce la transfosforilación (Figura 2) (Albert et al., 2015; Chinchilla et al., 2007; Sun et al., 2013). El complejo de receptores heteroméricos

activado fosforila a cinasas citoplasmáticas similares a los receptores (RLCK) (Liang & Zhou, 2018; D. Lu et al., 2010), que posteriormente activan una variedad de proteínas de sustrato, lo que lleva a diversos resultados fisiológicos que incluyen la producción de ROS, el cierre estomático, la activación de MAPK y la producción de hormonas de defensa (Figura 2) (Yuan et al., 2021).

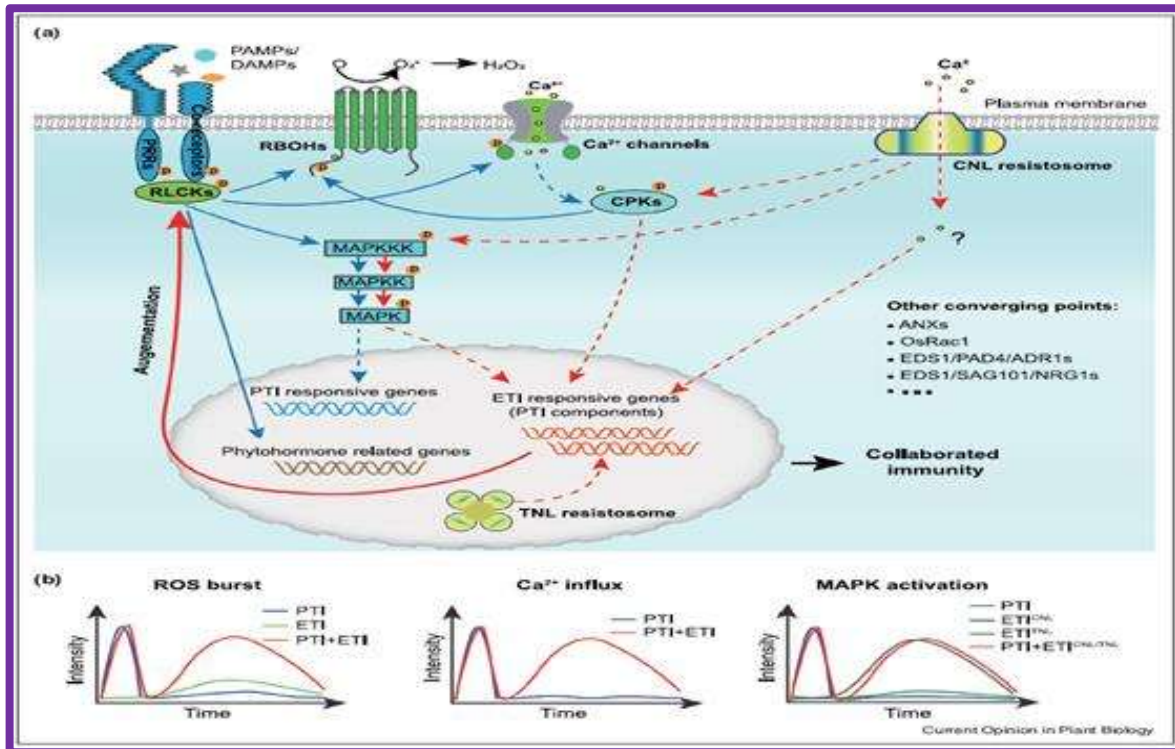


Figura 2. Entrecruzamiento entre PTI y ETI.

Distintos mecanismos de activación y eventos de señalización temprana en PTI versus ETI. Tomado de Yuan et al., 2021) a) La señalización PRR y NLR co-regula las respuestas inmunes y converge en múltiples puntos. Tras el reconocimiento de PAMPs/DAMPs, los PRR localizados en la superficie celular reclutan co-receptores para formar complejos de receptores y activar RLCKs aguas abajo, que posteriormente fosforilan componentes aguas abajo (por ejemplo, RBOHD, CNGCs/OSCA1.3, MAPKKKs, WRKYs), para desencadenar la explosión de ROS, la afluencia de Ca²⁺, la activación de MAPK, la producción de fitohormonas y la reprogramación transcripcional. Los NLR forman resistosomas tras la activación, que eventualmente conducen a respuestas inmunes superpuestas, pero con diferentes dinámicas (b) y generalmente amplitudes más fuertes en comparación con PTI. Varios estudios mostraron que componentes como RBOHD, RLCKs, CPKs y cascadas de MAPK contribuyen y están regulados tanto por PTI como por ETI. También se indican puntos de convergencia PTI-ETI adicionales. Es importante destacar que la resistencia y las respuestas de ETI dependen de los componentes de la vía PTI y ETI. Por lo tanto, las dos cascadas de señalización trabajan juntas de manera colaborativa para garantizar una inmunidad efectiva. Las flechas sólidas indican efectos directos y las flechas discontinuas indican efectos indirectos. Los signos de interrogación indican mecanismos desconocidos. (b) Dinámica y amplitudes de las respuestas inmunes en diferentes condiciones (es decir, PTI solo, ETI solo o PTI

+ ETI). El eje x indica el tiempo después del tratamiento de elicitors o la inoculación de patógenos para activar diferentes señales. «PTI» se refiere a las respuestas tras la aplicación de PAMP solo (PTI) y «ETI» se refiere a las respuestas a la expresión condicional de efectores que provocan ETI en plantas transgénicas. «PTI + ETI» se refiere a las respuestas a la aplicación/expresión de efectores que provocan PAMP y ETI o a la inoculación de patógenos avirulentos en las plantas. La producción de ROS en la activación de ETI y MAPK en ETI iniciada por TNL requiere señalización PRR, mientras que la activación de MAPK en ETI iniciada por CNL parece ser independiente de PTI. Se desconoce si el flujo de calcio en la ETI se basa en la señalización PRR.

1.1.4 Inmunidad asociada a efectores.

Otra capa de la respuesta inmune de las plantas es la inmunidad desencadenada por efectores, que está asociada a una variedad de proteínas efectoras desplegadas por patógenos (Jones & Dangl, 2006; Nguyen et al., 2021; Seyfferth & Tsuda, 2014). Cuando algunos patógenos alteran la capa de la PTI, las plantas también se han adaptado para reconocer sus proteínas efectoras y desencadenar ETI (de Vleeschauwer et al., 2018). La ETI es más específica y es activada por un efector del patógeno y una proteína específica de resistencia vegetal (R) en genotipos resistentes (Figura 2).

Los patógenos adaptados liberan efectores al interior de la célula vegetal que interfieren con la señalización de PTI, comprometiéndola lo suficiente para permitir la proliferación del patógeno (Jones & Dangl, 2006). Este estado comprometido por PTI se denomina susceptibilidad desencadenada por un efector (ETS por sus siglas en inglés). Sin embargo, las plantas han desarrollado otra forma de detectar el ataque de patógenos al reconocer directa o indirectamente, algunos efectores de patógenos por proteínas de resistencia a cognados (Figura 2) (Dodds & Rathjen, 2010; Jones et al., 2016). Por ejemplo, los efectores del patógeno bacteriano Gram-negativo *Pseudomonas syringae*, AvrRpt2 y AvrRpm1, son reconocidos por las proteínas R de *Arabidopsis* RPS2 y RPM1, respectivamente (Bent et al., 1994; Grant et al., 1995). Este reconocimiento por las proteínas R desencadena eventos de señalización para ETI. En general, la ETI se asocia con fuertes respuestas inmunes, que generalmente incluyen la muerte celular programada de las células vegetales en el sitio de la infección, lo que se denomina respuesta hipersensible (Coll et al., 2011; Mur et al., 2008). Es probable que lo malo de que se active ETI, es que conlleva un alto costo físico y energético para la planta (Hatsugai et al., 2017).

La señalización de ETI se inicia tras el reconocimiento directo o indirecto de los efectores de patógenos por NLRs (Figura 3) y la activación de ETI da como resultado una mayor resistencia y respuesta hipersensible (HR) (Cui et al., 2015). La mayoría de los NLRs en plantas contienen tres dominios, un dominio variable N-terminal, un dominio de unión de nucleótidos medios y un dominio LRR C-terminal (Jones et al., 2016). Los NLRs se pueden clasificar en tres grupos principales en función del dominio N-terminal: los NLRs de tipo bobina (CC) (CNL), los receptores NLRs tipo Toll/interleucina-1 (TIR) de tipo receptor/proteína de resistencia (TNLs) y los NLRs con dominio 8 de resistencia tipo oído (RPW8) (Jones et al., 2016; Jubic et al., 2019), los cuales pueden funcionar como "sensores" o "ayudantes" durante el reconocimiento (Jubic et al., 2019).

En comparación con un gran cuerpo de conocimiento en la señalización temprana de PTI, la forma en que la activación de NLR conduce a varios eventos posteriores de ETI sigue siendo en gran medida difícil de alcanzar. Curiosamente, múltiples proteínas RLCK como PBS1, PBL2 y ED1 / ZRK, actúan como "señuelos" o "adaptadores" en los complejos NLR para iniciar ETI (Bastedo et al., 2019; Shao et al., 2003; Zhang et al., 2010), donde BIK1 media la producción de ROS asociadas a ETI en *Arabidopsis* (Figura 2) (Yuan et al., 2021).

1.1.5 Regulación de PTI por ETI.

A pesar de los distintos ligandos percibidos y los modos de activación en PTI y ETI, la creciente evidencia sugiere que las dos ramas de señalización están funcionalmente vinculadas. Por ejemplo, los co-receptores PTI BAK1 y BKK1 en *Arabidopsis* son necesarios para la restricción de patógenos asociada a ETI, mediada por TNLs RPP2 y RPP4 contra las razas *Hyaloperonospora arabidopsis* (Hpa) *Emoy2* y *Cala2* (Roux et al., 2011). Se podría argumentar que la restricción asociada a ETI del crecimiento de patógenos medida en estos estudios, en realidad representaba 'PTI + ETI', ya que los patógenos avirulentos transportan tanto PAMP como efectores. Para diseccionar claramente la relación entre PTI y ETI, un examen cuidadoso utilizando el tratamiento de PAMP solo, la expresión transgénica de

efectores sola o ambos, demostraron que la señalización PRR es realmente importante para las respuestas asociadas a ETI (Figura 3) (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021).

La influencia entre PTI y ETI parece ser mutua. Estudios recientes mostraron que una regulación al alza de los componentes de PTI es una característica importante de ETI. La activación de múltiples NLR (es decir, RPM1, RPS2, RPS5, RPS4 y RPP4) desencadena la transcripción y la acumulación de proteínas de múltiples componentes de señalización PRR, incluidos BAK1, SOBIR1, BIK1 / PBL, RBOHD y MPK3 de manera independiente de PTI (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021). Del mismo modo, la activación de la proteína N (un TNL que confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco en *Nicotiana tabacum*) conduce a la síntesis de novo de WIPK (un ortólogo de *Arabidopsis* MPK3) (Zhang & Klessig, 1998). Además, la activación de ETI por RRS1/RPS4, que media la resistencia contra el patógeno fúngico *Colletotrichum higginsianum* en *Arabidopsis* (Narusaka et al., 2009), potencia la producción de ROS y la muerte celular desencadenada por quitina del hongo PAMP (Ngou et al., 2021). Estos sugieren que la ETI desencadenada por diferentes efectores puede potenciar la respuesta PTI desencadenada por múltiples PAMPs (Figura 3) (Yuan et al., 2021).

Los mecanismos detallados por los cuales ETI potencia los componentes de señalización PRR aún no están claros. Si bien la aplicación exógena de SA puede conducir a la acumulación de PRR, MPK3 y RBOHD, tanto en *Arabidopsis* como en papa (Pogány et al., 2009; Tateda et al., 2014), la regulación del incremento de los componentes de señalización de PRR durante ETI es independiente de ICS1 (SID2), una enzima clave involucrada en la biosíntesis de SA (Yuan et al., 2021). Por lo tanto, SA por sí solo no parece ser responsable de la regulación del alza de ETI a los componentes de PTI. Curiosamente, la transcripción y la traducción están mal correlacionadas durante PTI (Xu et al., 2017), pero bien correlacionadas durante ETI (Xu et al., 2017; Yoo et al., 2020). Poco después de la activación, la PTI se regula negativamente, a través de la renovación o desactivación de proteínas, para prevenir respuestas inmunes prolongadas (Couto & Zipfel, 2016). Por lo tanto, es posible que la potenciación ETI de los componentes de PTI, involucre mecanismos transcripcionales y traslacionales (Figura 3) (Yuan et al., 2021).

Durante mucho tiempo se ha postulado que la ETI es una "respuesta PTI acelerada y amplificada" (Jones & Dangl, 2006). De hecho, estudios recientes han proporcionado evidencia experimental de la intrincada diafonía entre la señalización inmune mediada por PRR y la mediada por NLR y comenzaron a desentrañar los crecientes puntos de conexión entre PTI y ETI. Estos resultados sugieren la necesidad de un refinamiento del modelo 'zigzag' (Figura 3). Parece que PTI actúa como el principal mecanismo de defensa contra los patógenos (Yuan et al., 2021). Los patógenos virulentos utilizan efectores para suprimir la PTI como un mecanismo importante de patogénesis. La señalización NLR regula al alza los componentes clave de la señalización PRR, compensando la atenuación de los componentes PTI por patógenos o la retroalimentación negativa endógena por parte de las plantas (Couto & Zipfel, 2016; Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021). En un modelo refinado, ETI no es una vía inmune separada, sino más bien un módulo de amplificación que depende de la maquinaria PTI para funcionar de manera efectiva (Figura 3).

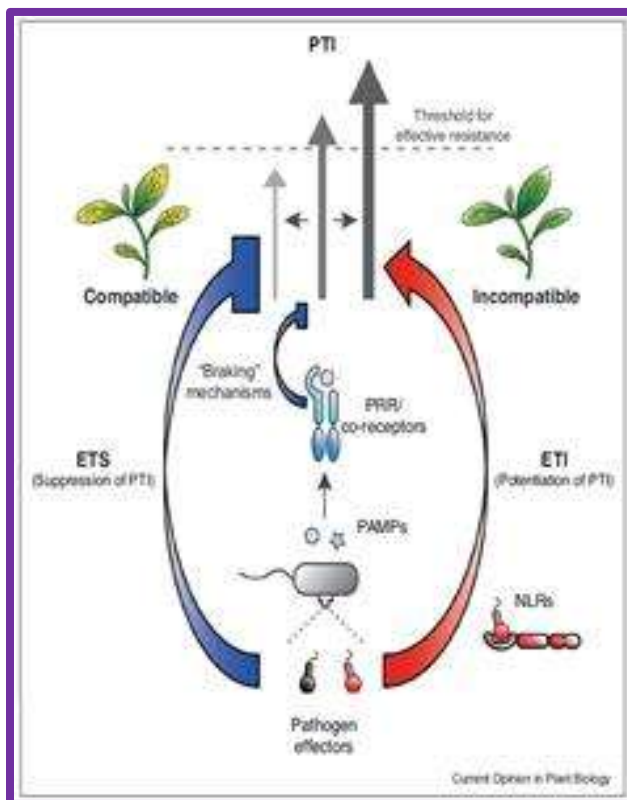


Figura 3. Modelo del sistema inmunológico de plantas.

Un modelo actualizado del sistema inmunológico de las plantas (Tomado de (Yuan et al., 2021). El PTI actúa como el principal mecanismo de defensa contra patógenos y microbios comensales, y los componentes del PTI están bajo control negativo por los mecanismos endógenos de "frenado" de las plantas para evitar la sobreactivación y, profundamente, por los efectores secretados por los patógenos (flechas romas azules). Los NLR activados activan ETI, que potencia y restaura PTI a través de la regulación ascendente de los componentes de PTI (flecha roja). Las dos ramas inmunes funcionan coordinadas para proporcionar una resistencia robusta contra los patógenos. La salida de resistencia final es la combinación de i) inhibición de PTI por ETS o mecanismos endógenos de "frenado" y ii) potenciación de PTI por ETI. ETS, susceptibilidad desencadenada por efector. 'PTI + ETS' generalmente se asocia con interacciones compatibles (a la izquierda) e interacciones incompatibles 'PTI + ETI' (a la derecha).

1.1.6 Respuesta hipersensible.

Los patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMP o MAMP por sus siglas en inglés), por moléculas presentes en la superficie del organismo invasor, pueden ser reconocidos por receptores anclados en la membrana plasmática denominados receptores de reconocimiento PAMP (PRR), para activar la primera capa de defensa de la planta, la cual es la inmunidad desencadenada por PAMP (Baltrus et al., 2012; Ichinose et al., 2013). La segunda capa de defensa de la planta, denominada inmunidad desencadenada por efectores, es más específica y es activada por un patógeno efector y una proteína de resistencia específica en las plantas con genotipos resistentes. En este último caso, la planta a menudo desarrolla la HR, que desencadena la síntesis de compuestos específicos que conducen a la muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés), de las células vecinas al sitio de la invasión, como un mecanismo para contener al patógeno en el sitio de la infección y, por lo tanto, evitar su propagación (Coll et al., 2011; Finkel, 2000; J. M. Rodrigues et al., 2021; Zou et al., 2005).

Una respuesta inmune innata exitosa a menudo incluye la llamada respuesta hipersensible, una PCD rápida que ocurre en un área limitada en el sitio de la infección. Esta muerte de las células infectadas es para limitar la propagación de patógenos biotróficos. Estudios recientes ha demostrado en las plantas, que los esfingolípidos como la dihidroesfingosina (DHS) desencadenan eventos de PCD mediante la formación de ROS. De hecho, la aplicación de DHS al tabaco resultó en el aumento del Ca^{2+} citosólico, relacionado con la producción de ROS y la activación de las defensas de la planta, así como del Ca^{2+} nuclear, que desencadena la vía PCD. Por lo tanto, ROS y Ca^{2+} jugarían un papel importante en el control de la PCD inducida por esfingolípidos (Lachaud et al., 2010; Pata et al., 2010).

Otra estrategia de defensa en las plantas ante la infección bacteriana, implica alteraciones del metabolismo especializado, como la biosíntesis de fitoalexinas, que funcionan como compuestos antimicrobianos y se producen de forma constitutiva o en respuesta al daño (Alam et al., 2014; Falcone Ferreyra et al., 2012). Los flavonoides son compuestos fenólicos que se acumulan en las plantas como compuestos centrales, llamados

agliconas, o combinados con grupos químicos (metilación, acilación, melonilación, prenilación, glicosilación o polimerización), llamados flavogeninas (Ahuja et al., 2012; Aron & Kennedy, 2008; Falcone Ferreyra et al., 2012). En las plantas, la mayoría de los flavonoides se presentan en forma de glicoconjugados que albergan funciones de sacáridos que aumentan o reducen la actividad de las fitoalexinas contra los organismos invasores (Alam et al., 2014; Aron & Kennedy, 2008; Zabala et al., 2006). Los flavonoides tienen una amplia gama de funciones, incluida la actividad antioxidante, la protección contra la radiación UV y la defensa contra fitopatógenos (Chin et al., 2018; Graham, 1998; Hassan & Mathesius, 2012). Estudios recientes demuestran que la acumulación de fitoalexinas aumenta ante el desencadenamiento de PCD y la HR (Rodrigues et al., 2021).

Los compuestos fenólicos que se derivan de la fenilalanina, se encuentran entre los grupos más extendidos de metabolitos especializados en plantas y muestran una amplia gama de propiedades biológicas. La síntesis y acumulación de muchos fenoles vegetales son inducidas por estreses biótico y abiótico. Muchos compuestos fenólicos inducidos por patógenos, incluidas varias cumarinas y flavonoides, se consideran fitoalexinas dada su acumulación en los tejidos de las plantas tras la infección y su actividad antimicrobiana *in vitro* (Mierziak et al., 2014). Un estudio demostró una diferencia notable en los perfiles de flavonoides en plantas transgénicas que sobreexpresan BiP relacionado con WT (Rodrigues et al., 2021).

Se detectaron diferencias de abundancia para la aglicona, así como para los glicoconjugados y estos respondieron a infecciones bacterianas no compatibles que desencadenaron una HR. Los niveles de las agliconas naringenina, apigenina, daidzenina y genisteina, fueron más altos en las plantas transgénicas (Rodrigues et al., 2021). De hecho, los flavonoides son muy importantes en la resistencia de las plantas contra bacterias y hongos patógenos, pero pueden ser inespecíficos y resultar, en parte, de sus propiedades antioxidantes. Los compuestos flavonoides son transportados al sitio de la infección donde inducen la reacción de hipersensibilidad, que es el mecanismo de defensa más temprano empleado por las plantas infectas, la muerte celular programada (Mierziak et al., 2014).

1.1.7 Respuesta sistémica adquirida.

La respuesta sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés), juega un papel crítico en la reducción de la infección por patógenos en las plantas y puede ser inducida por microbios patógenos e insectos. Es comúnmente aceptado que SAR es una defensa vegetal dependiente de SA, caracterizada por la acumulación de SA y la activación de la expresión de genes PR. (Bigeard et al., 2015; Thomma et al., 2011). Las plantas responden a su entorno de una manera específica del estímulo. Estas respuestas a menudo convergen en diferentes vías de fitohormonas que interactúan entre sí y, presumiblemente, afinan la respuesta neta de la planta para optimizar su aptitud (Erb, 2019; Pieterse et al., 2012). Cuando se exponen al estrés biótico en forma de patógenos, las plantas elevan sus defensas a través de una o más de las fitohormonas canónicas como SA, JA o ET (Glazebrook, 2005; Pieterse et al., 2012; Vlot et al., 2009).

Contra los patógenos biotróficos y hemibiotróficos, que dependen de los tejidos y células del huésped vivo para su nutrición, las plantas se defienden principalmente a través de mecanismos inmunes, dependientes de SA. Los patógenos necrotróficos que viven de tejidos muertos o moribundos, así como los insectos, mejoran las defensas que dependen de JA, actuando en concierto con ET. Una vez inducidas localmente, las señales sistémicas se propagan desde el sitio afectado a través de la planta, induciendo un estado de preparación en los tejidos sistémicos no afectados para responder con una mayor resistencia a un estrés secundario posterior. Esto se conoce como resistencia inducida o sistémica, que a menudo es mecánicamente similar al 'cebado', una forma de potenciación que permite reacciones exacerbadas después de un estímulo de estrés secundario (Conrath et al., 2015; Vlot et al., 2021).

Los patógenos hemibiotróficos inducen respuestas de defensa dependientes de SA (Vlot et al., 2009). En el primer encuentro, las plantas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos/microbios en la superficie de los patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones localizados en la superficie celular de la planta. Esto conduce a la inmunidad desencadenada por PAMP, una forma de resistencia basal que restringe el

crecimiento de patógenos (Jones & Dangl, 2006). Después de ingresar al citoplasma de las células huésped, los efectores de patógenos inhiben la PTI, mejorando así el crecimiento del patógeno. Sin embargo, si los efectores del patógeno activan las respuestas dependientes de proteínas de resistencia (PR) del huésped, esto induce una respuesta de defensa relativamente fuerte, la inmunidad desencadenada por efectores, que culmina en la muerte programada del tejido infectado y circundante que restringe completamente la propagación del patógeno (Jones & Dangl, 2006). PTI y ETI dependen de SA y cada uno induce una respuesta de defensa sistémica dependiente de SA, que se conoce como resistencia sistémica adquirida (Conrath et al., 2015; Spoel & Dong, 2012; Vlot et al., 2009).

La SAR es una forma duradera de resistencia contra un amplio espectro de patógenos hemibiotróficos. En condiciones de laboratorio, el estado de SAR puede durar desde ~ 3-10 días, dependiendo de la planta y el patógeno utilizado, hasta períodos de tiempo considerablemente más largos, como lo demuestra el llamado SAR transgeneracional, donde el estado SAR se propaga a la progenie de padres inducidos (Luna et al., 2012; Vlot et al., 2021). El establecimiento de la SAR está bajo el control de dos pequeños metabolitos inmunoactivos clave, el ácido N-hidroxipipecólico (NHP por sus siglas en inglés) y el SA.

Desde que el NHP se informó por primera vez en 2018 como un metabolito de defensa que se acumula naturalmente en *Arabidopsis thaliana* por Hartmann et al., y casi simultáneamente por Chen et al., (Chen et al., 2018; Hartmann et al., 2018), una serie de estudios han proporcionado evidencia de su papel crítico en la SAR en diferentes especies de plantas (Holmes et al., 2019; Schnake et al., 2020). El SA, por el contrario, fue reconocido como una hormona de defensa relevante para la SAR aproximadamente un cuarto de siglo antes (Gaffney et al., 1993; Wildermuth et al., 2001).

Se describen tres centros reguladores intrínsecamente diferentes que han surgido recientemente, mediante los cuales se realiza una acción concertada de NHP y SA en la inducción de la SAR: (1) conjuntos superpuestos de elementos reguladores controlan la biosíntesis de ambos metabolitos activos en la SAR; (2) un patógeno común que inducible glicosiltransferasa, UTG76B1, inactiva tanto al NHP como al SA, formando NHP-N-O-

glucósido (NHPG) y SA-O- β -glucósido (SAG) inactivos, respectivamente; y (3) un componente aguas abajo compartido, en el que un co-regulador transcripcional y receptor SA NONEXPRESSOR OF PR GENES1 (NPR1), median la transducción de señales activada por NHP y fortificada por el SA en la SAR (Bauer et al., 2021; Klessig et al., 2018; Zeier, 2021).

Tanto el NHP como el SA también se pueden convertir en ésteres de glucosa en plantas (Bauer et al., 2021; Hartmann et al., 2018; Zeier, 2021), el metabolismo del SA incluye además la esterificación de metilo y diferentes reacciones de hidroxilación cuyos productos podrían glicosilarse nuevamente (Klessig et al., 2018). Por lo tanto, una inducción efectiva de la SAR por el NHP elevado en *Arabidopsis*, también requiere mayores niveles de SA. Para garantizar niveles elevados temporalmente de NHP y de SA de manera coordinada, ambos activadores de la SAR se biosintetizan mediante principios reguladores superpuestos y se inactivan mediante glicosilación simultánea (Zeier, 2021).

Una interacción cooperativa del NHP y el SA es clave requisito para el establecimiento de la SAR (Hartmann & Zeier, 2019) (Figura 4). En el curso de la activación de la SAR en *Arabidopsis*, la inducción de la inoculación de hojas desencadena una reprogramación transcripcional en las hojas distantes que se asocia con la regulación al alza de más de 3000 genes y una regulación a la baja concomitante de un número similar de genes. Cualitativamente, estos extensos cambios sistémicos en la transcripción de genes sugieren que la SAR aumenta la preparación de defensa de las plantas y disminuye la capacidad fotosintética, así como los procesos relacionados con el crecimiento (Bernsdorff et al., 2016).

El SA es necesario para amplificar la reprogramación transcripcional sistémica desencadenada por el NHP (Bernsdorff et al., 2016; Yildiz et al., 2021). La interacción sinérgica entre el NHP y el SA cambia el equilibrio de crecimiento/defensa de las plantas hacia la inmunidad (Vlot et al., 2021; Zeier, 2021). Las respuestas de resistencia mediadas por el NHP y el SA son parcialmente aditivas: las plantas con doble mutación *ald1 sid2* o *fmo1 sid2*, deficientes tanto en NHP como en SA, están más gravemente comprometidas en la resistencia a patógenos relacionados con la PTI y la ETI que mutantes individuales

respectivos que carecen de biosíntesis de NHP o SA (Bartsch et al., 2006; Bernsdorff et al., 2016; Liu et al., 2020).

La respuesta transcripcional desencadenada por el NHP asociada con la SAR, no solo aumenta la expresión de todos los genes necesarios para la biosíntesis del SA y el NHP en las hojas distales, sino también de los genes *UGT76B1*, *S3H* y *S5H*, implicados en el catabolismo del SA y el NHP (Yildiz et al., 2021). Por lo tanto, la acumulación local de NHP regula la biosíntesis sistémica *de novo* de ambos inmunorreguladores y, al mismo tiempo, organiza su homeostasis (Figura 4). Las plantas inducidas por la SAR reprogramadas transcripcionalmente, muestran una característica importante: están preparadas sistémicamente para inducir reacciones inmunitarias potenciadas durante un ataque posterior (Figura 4) (Zeier, 2021).

Un estado cebado asociado con la SAR, que depende de ALD1 y FMO1, se induce en hojas secundarias distantes cuando las plantas de *Arabidopsis* son inoculadas con patógenos en las hojas primarias (Bernsdorff et al., 2016; Návárová et al., 2012). El cebado de defensa se induce en las plantas Col-0 y *fmo1* tratadas con el NHP exógeno (Yildiz et al., 2021). Estos hallazgos demuestran que el NHP es un desencadenante decisivo para la inducción del cebado asociado con la SAR. Nuevamente, el SA entra en juego como un amplificador de este proceso desencadenado por el NHP, porque se observa una respuesta de cebado marcadamente reducida en las plantas *sid2* para los escenarios de cebado inducido biológica y químicamente. La medida en que el SA fortalece el cebado varía según las diferentes reacciones de defensa (Figura 4) (Bernsdorff et al., 2016; Yildiz et al., 2021).

Las respuestas provocadas por patógenos que generalmente se potencian en las plantas inducidas por la SAR y el NHP, implican la acumulación de camalexina, la biosíntesis de SA, la acumulación de Pip, la generación de aminoácidos de cadena ramificada y la expresión de varios genes relacionados con la defensa (Bernsdorff et al., 2016; Yildiz et al., 2021) (Figura 4). La respuesta transcripcional asociada con la SAR se prepara para la inducción de defensas amplificadas durante un desafío patógeno. Por ejemplo, una acumulación de metabolitos cebados podría basarse en la preactivación de algunos, pero no

todos, de los respectivos genes de la vía biosintética (p. ej. camalexina). Alternativamente, todos los genes biosintéticos de una ruta metabólica podrían preactivarse durante la SAR hasta cierto punto (p. ej. SA) (Yildiz et al., 2021).

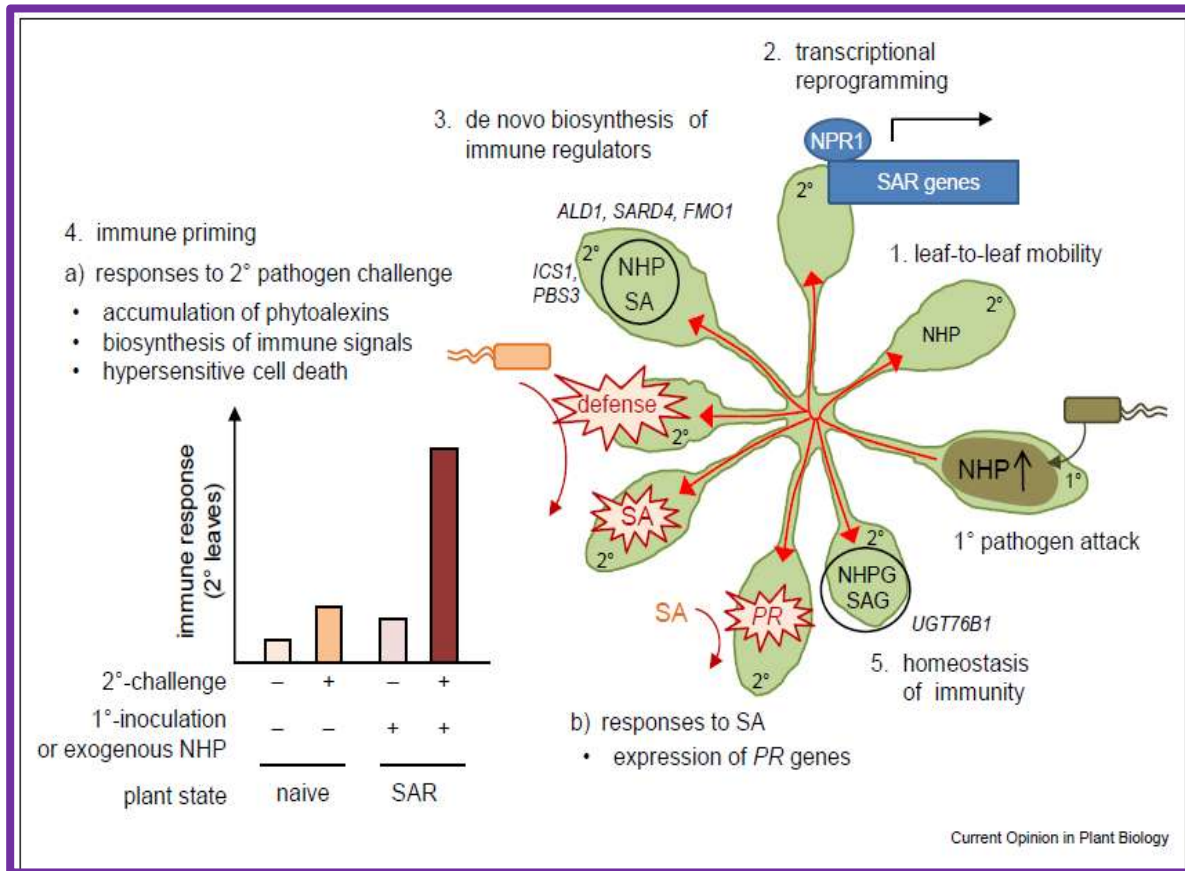


Figura 4. Respuesta sistémica adquirida (SAR) en plantas.

El NHP es un activador móvil de la SAR que induce la reprogramación transcripcional y un estado preparado de mayor capacidad de respuesta a patógenos y el SA (tomado de (Zeier, 2021). Derecha: En el ataque microbiano en una hoja, la activación de una ruta catabólica L-Lys de tres pasos inducible por patógenos, da como resultado la acumulación local de NHP. Otros cambios metabólicos en las hojas 1° implican la acumulación de conjugados de glucosa del NHP (NHPG y NHPGE) y conjugados del SA (principalmente SAG y SGE). El NHP es móvil y viaja a hojas distantes (2), presumiblemente a través del floema (1). Como resultado, los niveles del NHP comienzan a aumentar en el tejido sistémico de la hoja, lo que inicia una respuesta de la SAR transcripcional dependiente de NPR1 en el tejido de la hoja 2° (2). Esto incluye la activación de genes biosintéticos de NHP, lo que promueve aún más la acumulación de NHP a través de la síntesis *de novo* y la transcripción mejorada de genes biosintéticos del SA, lo que conduce a la biosíntesis del SA (3). Por lo tanto, los niveles crecientes del SA en tejidos alimentan decisivamente la respuesta transcripcional de la SAR. En la inducción completa de la SAR, la planta está preparada para una activación reforzada de las defensas si se produce una futura infección de desafío (4a). El gráfico de la izquierda ilustra una posible manifestación de una respuesta inmune particular. De izquierda a derecha: las plantas no desafiadas muestran una respuesta inmune basal baja (-/-). Un desafío de patógenos induce esta respuesta localmente en el marco de una modesta reacción inmune basal (-/+). Una inoculación inductora eleva el NHP y activa la SAR, lo que puede llevar a una activación cuantitativamente baja o parcial de la respuesta a nivel sistémico (+/-). Las plantas inducidas por la

SAR están preparadas para una respuesta fuertemente potenciada después de un subsiguiente desafío por patógenos (+/+). En el estado cebado, las plantas también se sensibilizan para activar respuestas inducibles por el SA más fuertes (4b). Además, la respuesta transcripcional inducida por el NHP equilibra la inmunidad a nivel sistémico al aumentar la actividad de UTG76B1 y otras enzimas catabolizantes que reducen los niveles de los metabolitos de NHP y el SA activos en la SAR (5).

Las respuestas provocadas por patógenos que generalmente se potencian en las plantas inducidas por la SAR y el NHP, implican la acumulación de camalexina, la biosíntesis de SA, la acumulación de Pip, la generación de aminoácidos de cadena ramificada y la expresión de varios genes relacionados con la defensa (Bernsdorff et al., 2016; Yildiz et al., 2021) (Figura 4). La respuesta transcripcional asociada con la SAR se prepara para la inducción de defensas amplificadas durante un desafío patógeno. Por ejemplo, una acumulación de metabolitos cebados podría basarse en la preactivación de algunos, pero no todos, de los respectivos genes de la vía biosintética (p. ej. camalexina). Alternativamente, todos los genes biosintéticos de una ruta metabólica podrían preactivarse durante la SAR hasta cierto punto (p. ej. SA) (Yildiz et al., 2021).

Varios estudios indican que el NHP también aumenta la muerte celular por la ejecución de la HR, como se observa en las interacciones de *Arabidopsis* con bacterias avirulentas inductoras de la HR (Y.-C. Chen et al., 2018). La inmunidad desencadenada por NHP de *Arabidopsis* contra oomicetos compatibles, que no provocan la HR en plantas no desafiadas, se asoció con el desarrollo de lesiones microscópicas de la HR en sitios presumibles de intento de penetración (Hartmann et al., 2018). Como otro modo de interacción positiva entre el NHP y el SA en la inmunidad, el NHP también sensibiliza a las plantas para que respondan con más fuerza al SA (Figura 4) (Bernsdorff et al., 2016). Por ejemplo, un tratamiento previo con el NHP localizado de hojas de *Arabidopsis* potenció la expresión inducida de *PR-1* por el SA exógeno en el tejido de las hojas distales. Además, el tratamiento previo con el NHP permitió que el tejido distal mejorara la expresión de *ALDI* en respuesta al SA, lo que no se observó en las plantas de control no tratadas previamente (Yildiz et al., 2021). Como otro modo de interacción positiva entre el NHP y el SA en la inmunidad, el NHP también sensibiliza a las plantas para que respondan con más fuerza al SA (Figura 4) (Bernsdorff et al., 2016).

Las respuestas de defensa desencadenadas por el SA están mediadas por el coactivador transcripcional NPR1. En la inoculación del patógeno, los niveles acumulados del SA reubican a NPR1 del citosol al núcleo (Y. Wu et al., 2012). El SA luego se une a NPR1 y, por lo tanto, provoca una mayor expresión de genes relacionados con la patogénesis y la activación inmune (Ding et al., 2018; Y. Wu et al., 2012). La respuesta similar a SAR de *Arabidopsis* provocada por la aplicación de Pip disminuyó considerablemente en las plantas Knockout para *npr1*, lo que indica que la vía del NHP también emite señales a través de NPR1 (Návarová et al., 2012). Consistentemente, el NHP exógeno fue incapaz de inducir la SAR a la infección por patógenos bacterianos y oomicetos en mutantes de *Arabidopsis npr1* (Y. Liu et al., 2020; Yildiz et al., 2021). Cuando se aplicó el NHP a hojas locales de plantas *sid2*, las hojas distantes desarrollaron una SAR modesta, pero los mutantes dobles *sid2 npr1* y simple *npr1* no (Yildiz et al., 2021). Esto indica que el NHP induce la SAR a través de una vía dominante dependiente del SA y NPR1 y una vía menor independiente del SA pero aún dependiente de NPR1 (Zeier, 2021). Curiosamente, los análisis con mutantes sugirieron que NPR1 funciona en el control de la biosíntesis del NHP y la homeostasis del SA en combinación con su parólogo NRP4 (Y. Liu et al., 2020).

Diferentes observaciones sugieren fuertemente que el NHP funciona como una hormona de defensa móvil que viaja, después de acumularse en las hojas inoculadas localmente, a hojas distantes en el curso de la inducción de la SAR (Figura 4). En primer lugar, un análisis detallado del curso temporal de *Arabidopsis* inoculada con *P. syringae*, reveló que los niveles del NHP en las hojas distantes comienzan a aumentar el comienzo mismo de la SAR en una etapa en la que los niveles sistémicos del precursor Pip y el SA aún no han cambiado (Hartmann et al., 2018). Es poco probable que estos aumentos sistémicos tempranos del NHP se produzcan a partir de una biosíntesis *de novo* del NHP en hojas distantes y, por lo tanto, con toda seguridad se deban al transporte a larga distancia. En segundo lugar, el NHP se acumuló fuertemente en la sabia del floema de las plantas de pepino recolectada tanto de hojas distantes, como inoculadas con patógenos, mientras que apenas se observaron aumentos sistémicos del SA en la savia del floema. Esto apoya un escenario de movimiento de hoja a hoja del NHP a través del floema (Schnake et al., 2020). En tercer lugar, la expresión localizada de los genes de *Arabidopsis ALDI* y *FMO* mediada por A.

tumefaciens en folíolos de tomate, desencadenó elevaciones del NHP en folíolos distantes (Holmes et al., 2019).

Diferentes estudios indican además que proporciones significativas del NHP o versiones deuteradas del NHP, que se administraron localmente a las hojas de *Arabidopsis* mediante infiltración a presión, se traslocaron a hojas distantes (Cai et al., 2021; Y.-C. Chen et al., 2018; Mohnike et al., 2021). El movimiento del NHP también ocurrió en *sid2* y *npr1* lo que indica que la señalización del SA no es necesaria para la traslocación del NHP (Yildiz et al., 2021). El NHP aplicado localmente etiquetado también se convirtió en versiones etiquetadas de NHPG y NHPGE en las hojas tratadas y NHPG y NHPGE luego aumentaron en las hojas distantes (Yildiz et al., 2021). Esta observación, abre la posibilidad de que uno de los conjugados de glucosa del NHP también pueda viajar entre las hojas y contribuir a los aumentos sistémicos del NHP, después de reconvertirse en NHP libre. Sin embargo, es improbable una contribución del NHPG al movimiento sistémico del NHP, porque la traslocación del NHP se observó fácilmente en el mutante *ugt76b1*, deficiente en NHPG, después de la aplicación local (Cai et al., 2021; Mohnike et al., 2021). Esto está en la línea con el hallazgo de que los aumentos sistémicos del NHP y el NHPGE, fueron proporcionalmente más altos que los del NHPG en una aplicación local de NHP (Yildiz et al., 2021).

Una mirada más cercana a los cambios metabólicos y transcripcionales en las hojas locales y distales de plantas mutantes de *Arabidopsis* para ¿inoculadas con patógenos, proporciona más información valiosa sobre los procesos de transporte metabólico que subyacen a la SAR, por la sencilla razón de que los cambios metabólicos activados endógenamente ocurren dentro de la situación fisiológica de la SAR, mientras que los experimentos de transporte que se basan en la administración de compuestos exógenos pueden tener un componente artificial. Por ejemplo, el NHP y el éster de glucosa NHPGE se acumulan sustancialmente en las hojas distales de *npr1* después de la inoculación de patógenos en las hojas locales, aunque el aumento relacionado con SAR en la transcripción de genes biosintéticos de NHP se ve comprometido en esta mutante (Yildiz et al., 2021; Zeier, 2021).

1.1.8 Respuesta sistémica inducida.

Otra forma destacada de resistencia inducida a patógenos es desencadenada por bacterias comensales en la rizósfera de la planta y se denomina resistencia sistémica inducida (ISR por sus siglas en inglés) (Pieterse et al., 2014). En comparación con la SAR, la ISR parece actuar contra un espectro considerablemente más amplio de patógenos, incluidos los patógenos hemibiotróficos y necrotróficos. Aunque una preexposición local o temprana de las plantas al estrés abiótico también desencadena la propagación sistémica o transgeneracional de la tolerancia (Vlot et al., 2021). La ISR es mediada por microbios beneficiosos que viven en la rizosfera ((Pieterse et al., 2014; Zamioudis et al., 2015).

La ISR depende de las vías JA y ET. Sin embargo, múltiples informes han demostrado la activación de las vías de señalización el SA y el JA/ET en la ISR desencadenadas por microbios beneficiosos, revelando la complejidad y diversidad de las vías de señalización involucradas en la ISR (Yu et al., 2022). La ISR es diferente de la SAR en que es causada por microorganismos benéficos del suelo que interactúan con las raíces de las plantas (Pieterse et al., 2014). Los inductores de la ISR incluyen rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), como *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, y *Streptomyces spp.*, y hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF por sus siglas en inglés), incluidos *Trichoderma spp.* y *Serendipita indica* (anteriormente *Piriformospora indica*) (Aloo et al., 2019; Balmer et al., 2013; Gill et al., 2016; Newitt et al., 2019). Los PGPR o PGPF tienen múltiples efectos, tanto en las plantas monocotiledóneas como en las dicotiledóneas, pero todas estimulan el crecimiento de las plantas (Vacheron et al., 2013) y pueden inducir respuestas de resistencia contra una amplia gama de patógenos (Pieterse et al., 2014).

Similar a la SAR, la ISR protege los tejidos aéreos de las plantas contra patógenos hemibiotróficos. Al mismo tiempo, ISR también es eficaz contra patógenos necrotróficos (Pieterse et al., 1996, 2014; Ton et al., 2002; Van der Ent et al., 2008). *Serendipita indica* desencadena la tolerancia a una variedad de estreses bióticos y abióticos en muchas especies de plantas (Gill et al., 2016). En la cebada, aumenta la tolerancia al estrés salino, así como la

resistencia a *Blumeria graminis f. sp. hordei* y *F. culmorum* (Waller et al., 2005). Después de una infección de desafío con *Blumeria graminis f. sp. hordei*, el cebado de plantas inoculadas con *Serendipita indica* se vuelve obvio con una inducción temprana y rápida de la expresión de genes de defensa (Molitor et al., 2011; Waller et al., 2008). Por lo tanto, parece que, al igual que en otros de la ISR, también en dicotiledóneas, la resistencia inducida por *Serendipita indica* en monocotiledóneas se basa en el cebado (Pieterse et al., 2014).

Los primeros estudios para identificar los componentes de señalización involucrados en este tipo de resistencia, han demostrado que la ISR depende del JA y el ET, con un papel dominante para el factor de transcripción central asociado al JA MYC2 en el tejido foliar (Figuras 4 y 5) (Pozo et al., 2008). En las raíces, MYC2 podría contribuir aún más a la inhibición de la PTI para facilitar la colonización de raíces por PGPR/F (Jacobs et al., 2011; Millet et al., 2010). Además, los niveles del ABA aumentan en las raíces, pero aún más en las hojas, lo que restringe la entrada de patógenos foliares a través del cierre de los estomas (Kumar et al., 2012).

Aunque la ISR protege a las plantas de patógenos hemibiotróficos, esto no parece estar asociado con niveles elevados del SA o señalización (Pieterse et al., 2014). De acuerdo con esta hipótesis, la ISR se ha asociado con una función no dependiente del SA de NPR1, que por lo tanto, parece ser bifuncional para respaldar la SAR y la ISR (Nie et al., 2017; Weller et al., 2012). Curiosamente, la respuesta de fitohormonas a *Serendipia indica* que es altamente específica del huésped, por ejemplo, los niveles del JA aumentan en el arroz, pero no en el maíz, mientras que el ácido giberélico lo hace al revés (Liu et al., 2019). Este comportamiento específico del huésped también se observa en respuesta a otro inductor de resistencia, *Tricoderma spp.*, que puede inducir la señalización del SA y el JA/ET según las condiciones experimentales y la especie exacta de *Tricoderma* involucrada (Vos et al., 2015).

En trigo, la colonización de raíces con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* o el hongo *T. harzianum* puede inducir resistencia contra *Bipolaris sorokiniana* (Singh, et al., 2019a; Singh, et al., 2019b). Curiosamente, esta reacción se fortalece con la aplicación conjunta del SA en el caso de *Pseudomonas fluorescens* y de MeJA en el caso de *T.*

harzianum que también induce la producción del SA en la planta. Estos ejemplos respaldan la idea de que la ISR, al ser efectiva contra patógenos hemibiotróficos, de alguna manera rompe la regla general del “antagonismo SA-JA”. De manera similar, el cebado en cebada a través de N-acil homoserina lactonas, agentes de detección de quórum de bacterias del suelo, también exhibe sinergia en lugar de antagonismo entre el JA y el SA (Schenk & Schikora, 2015). Por lo tanto, parece que la interacción entre las diferentes vías de señalización de las fitohormonas determina el resultado de la ISR y esto depende de la naturaleza de la planta, el inductor de resistencia y el fitopatógeno (Figura 5) (Vlot et al., 2021).

Los componentes esenciales de las plantas que respaldan la ISR, incluyen el factor de transcripción MYB72, que se induce en las raíces pero no en las hojas de las plantas al entrar en contacto con las rizobacterias (Van der Ent et al., 2008) o con los COV que emiten (Martínez-Medina et al., 2017; Sharifi & Ryu, 2016; Zamioudis et al., 2015). En *Arabidopsis*, MYB72 es esencial para la ISR contra patógenos hemibiotróficos y necrotróficos (Van der Ent et al., 2008), y se coexpresa con otros factores que influyen en la respuesta a la deficiencia de hierro de la planta (Zamioudis et al., 2015). MYB72 regula aún más la expresión de la β -glucosidasa BGLU42, que es esencial para la ISR y presumiblemente media la hidrólisis de la escopoletina cumarina dependiente de MYB72 a escopoletina, que es secretada por las raíces de las plantas e influye en la colonización de las raíces por microbios (Figura 5) (Stringlis et al., 2018; Zamioudis et al., 2014).

La evidencia reciente sugiere que los mecanismos moleculares de la SAR y la ISR no son procesos completamente separados. La ISR en *Arabidopsis* está asociada con la expresión inducida y/o cebada tanto en las raíces como en las hojas de AZI1, EARLI1 y/o el homólogo de LLP1, LEC, que recientemente asociamos con la SAR bajo el acrónimo LLP2 (Wenig et al., 2019; Zamioudis et al., 2015). Además, AZI1 y EARLI1 son necesarios para la ISR desencadenada por *Pseudomonas simiae* en *Arabidopsis* y, junto con las MAP cinasas 3 y 6, para la defensa aérea inducida por el riego con AzA (Figura 5) (Cecchini et al., 2015, 2019).

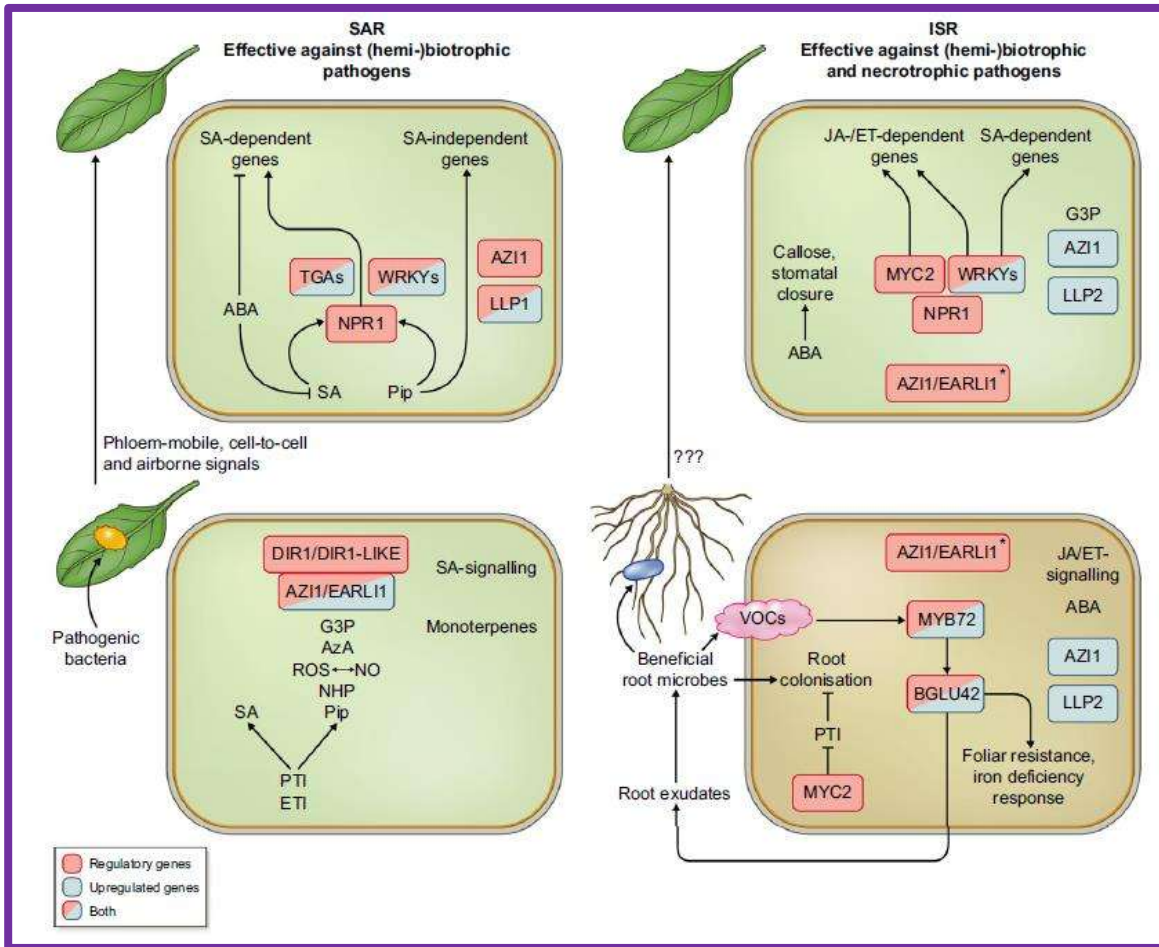


Figura 5. Diferencias entre SAR y SIR.

Comparación de los componentes moleculares de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (tomado de Vlot et al., 2021). La SAR se representa en los paneles de la izquierda, la ISR en la derecha, con tejidos locales en la parte inferior y tejidos sistémicos en la parte superior. Los genes reguladores importantes se representan en cuadros rojos, los genes regulados positivamente durante los procesos se representan en cuadros azules. Los genes con ambas propiedades se representan en cuadros con ambos colores. AZI1 (AZELAIC ACID INDUCED 1) Y EARLI1 (EARLY *ARABIDOPSIS* ALUMINUM INDUCED 1) son necesarios para ISR, pero aún no se sabe si se necesitan a niveles local y/o sistémico. ABA, ácido abscísico; AzA, ácido azelaico; BGLU42, BETA GLUCOSIDASA 42; DIR1, DEDECTUOSO EN RESISTENCIA INDUCIDA 1; ET, etileno; ETI, inmunidad asociada a efectores; G3P, glicero-3-fosfato; JA ácido jasmónico; LLP, PROTEÍNA TIPO LECTINA DE LEGRUMBRES; MYB72, PROTEÍNA 72 DEL DOMINIO MYB; NHP, ácido N-hidroxipípecólico; NO, óxido nítrico; NPR1, GEN NO EXPRESOR RELACIONADO CON LA PATOGENIA 1; Pip, ácido pípecólico; PTI, inmunidad asociada a patrones moleculares asociados a patógenos; ROS, especies reactivas de oxígeno; SA, ácido salicílico; TGA, PROTEINA DE UNIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA TGACG.

Finalmente, la acumulación de G3P en las hojas cumple una función esencial en la resistencia a patógenos tipo ISR inducida en soja por rizobios (Shine et al., 2019). Aunque solo se está comenzando a comprender las similitudes potenciales, es posible que los mecanismos moleculares que respaldan la ISR no sean tan diferentes de los que operan en la

SAR, como se esperaba anteriormente (Figura 5). Si la ruta SAR no-SA, que incluye G3P, AZI1, EARLI1 y LLP1, se dirigiera aguas abajo de la interacción de PGPR/F con las raíces, esto podría explicar por qué la ISR a menudo se activa contra patógenos hemibiotróficos en una vía aparentemente independiente del SA (Vlot et al., 2021).

El microbioma juega un papel importante para la salud y el estado físico de muchos eucariotas, al proporcionarles nutrientes y apoyo contra los patógenos. Esto último se logra atacando directamente a los patógenos con sustancias antimicrobianas o mediante el crecimiento competitivo y el agotamiento de las fuentes de nutrientes. En las plantas, la interacción con los microbios beneficiosos del microbioma también puede conducir a la activación del sistema inmunitario, sobre todo en forma de la ISR. Recíprocamente, la composición del microbioma de la planta está influenciada por la inmunidad (Teixeira et al., 2019; Yu et al., 2019). Centrándose en las interacciones sistémicas, las bacterias beneficiosas que están asociadas con las hojas pueden desencadenar una respuesta inmune y aumentar la resistencia de la planta contra los patógenos (Figura 6). En las hojas de *Arabidopsis*, *Sphingomonas melonis* Fr1 desencadena cambios en la expresión génica asociados al SA y la SAR (Vogel et al., 2016). En plantas axénicas, esto conduce a una mayor resistencia contra *Pseudomonas syringae* patógena (Vogel et al., 2016).

PGPR/F en el microbioma de las raíces forman ejemplos bien estudiados para la inducción de la ISR. Recíprocamente, las plantas parecen moldear activamente el microbioma de su rizosfera. Al exudar una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos al suelo circundante, lo que se conoce como rizodeposición, las plantas atraen selectivamente microbios que son beneficiosos para su propio crecimiento y salud (Dakora & Phillips, 2002; Jones et al., 2009). Durante la ISR, *Arabidopsis* exuda escopoletina cumarina, que tiene propiedades antimicrobianas selectivas; varias bacterias inductoras de ISR, como *Pseudomonas simiae* WCS 417 y *Pseudomonas capeferrum* WCS358, son insensibles a ella, mientras que el crecimiento de ciertos microbios patógenos, incluidos los hongos *F. oxysporum* y *Verticillium dahliae*, se inhiben (Stringlis et al., 2018). De esta manera, la ISR influye en la defensa de *Arabidopsis* contra patógenos del suelo/raíz, mientras moldea activamente el microbioma de la rizosfera (Figuras 5 y 6).

Una infección foliar de las plantas también puede influir en el reclutamiento de consorcios bacterianos en las raíces/rizosfera. *Arabidopsis*, por ejemplo, recluta tres cepas PGPR diferentes *Xantomonas spp.* WCS2014-23, *Stenotrophomonas sp.* WCS2014-113 y *Microbacterium sp* WCS2014-259, tras la infección de las hojas con el patógeno *Hyaloperonospora arabidopsis* (Berendsen et al., 2018). Los PGPR reclutados, a su vez, provocan la respuesta de la ISR en la planta para defenderse de los patógenos. De manera similar, una infección inductora de la SAR en las hojas de *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae* patógena induce la secreción de ácido L-málico de las raíces.

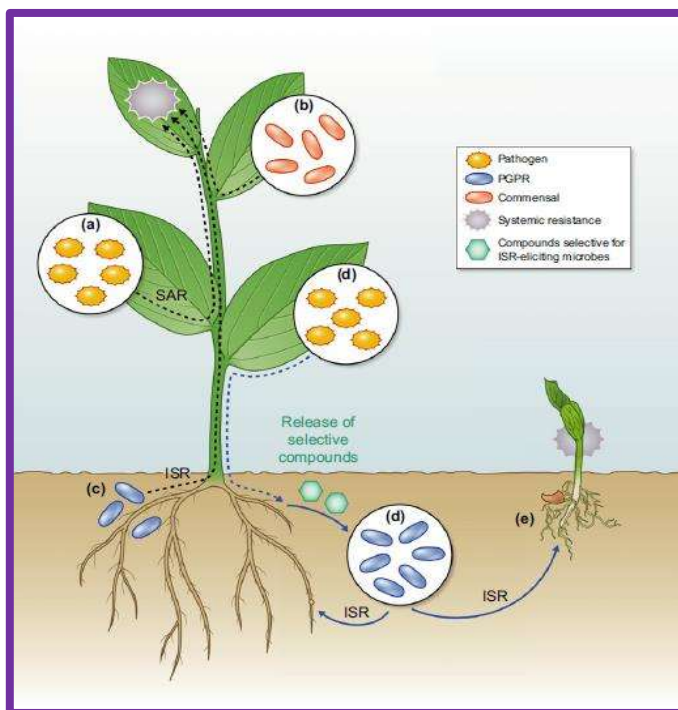


Figura 6. Relación entre el sistema inmune de las plantas y su microbioma.

Interacciones recíprocas entre la inmunidad sistémica y el microbioma vegetal (tomado de Vlot et al., 2021). Los patógenos en las hojas pueden inducir resistencia sistémica adquirida (SAR) (a), mientras que también se ha demostrado que los microbios comensales en las hojas desencadenan inmunidad sistémica (b). Mientras que las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) pueden provocar resistencia sistémica inducida (ISR) (c), ciertas bacterias patógenas en las hojas pueden inducir la liberación de compuestos de las raíces de las plantas a la rizosfera (d). Algunos de estos compuestos atraen selectivamente microbios inductores de la ISR, que pueden proteger de enfermedades a sucesivas generaciones de plantas que crecen en el mismo suelo (e).

En la rizósfera, el ácido L- málico actúa como agente quimiotáxico atrayendo al inductor de la ISR *Bacillus subtilis* FB17 y promoviendo la formación de su biopelícula (Rudrappa et al., 2008). De esta manera, SAR induce no solo resistencia sistémica a enfermedades, sino que fortalece esta inmunidad sistémica al promover respuestas de la ISR adicionales (Figura 6). En particular, estos pueden transmitirse a futuras generaciones de plantas que crecen en el mismo suelo (Berendsen et al., 2018). Por lo tanto, las plantas enfermas fortalecen su rizosfera al reclutar microbios inductores de la ISR, que protegen a su descendencia de la

infección, un principio que muy probablemente sea responsable de los efectos beneficiosos de los llamados “suelos supresores de enfermedades” (Berendsen et al., 2018).

1.1.9 Las fitohormonas de la defensa.

Las plantas han desarrollado sistemas de defensa para contrarrestar los ataques de microorganismos patógenos y un sistema inmunológico de dos niveles, que comprende varias capas estratégicas de defensas constitutivas, como el SAR, e inducibles, como el ISR (Bigeard et al., 2015; Jones & Dangl, 2006; Rodrigues et al., 2021). Las barreras físicas y químicas preformadas constituyen la primera línea de defensa y evitan la mayoría de los patógenos. Además, esos pocos patógenos capaces de romper las defensas constitutivas de la planta se enfrentan a una serie de respuestas inmunes inducibles, incluida una explosión del metabolismo oxidativo, la producción de metabolitos antimicrobianos y proteínas relacionadas con la defensa y el fortalecimiento local de la pared celular por depósitos de callosa y lignina (Macho & Zipfel, 2014). La activación y regulación de estas defensas inducibles está controlada por una matriz de vías de transducción de señales entrelazadas, dentro de las cuales las fitohormonas juegan un papel central (De Vleeschauwer et al., 2016; Pieterse et al., 2012).

La señalización por MAPK ha sido relacionada con la producción y señalización del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), y el etileno (ET), las cuales son consideradas como las tres hormonas mayormente involucradas en la respuesta de defensa de las plantas (Lin & Agehara, 2021; Shigenaga & Argueso, 2016). La importancia del SA, el JA y del ET en la red de señalización de defensa de la planta está bien establecida (Pieterse et al., 2009). Tras la infección, las plantas producen mezclas específicas de estas hormonas, con la combinación exacta aparentemente dependiendo del estilo de vida del patógeno (Lin & Agehara, 2021; Shigenaga & Argueso, 2016).

La activación de los mecanismos de defensa en las plantas es un proceso que requiere cantidades sustanciales de energía y generalmente se produce a expensas del crecimiento y del desarrollo, la diafonía hormonal también permite a las plantas utilizar sus recursos

limitados de una manera rentable (Bolton, 2009; Pieterse et al., 2012). En cumplimiento de este concepto, trabajos recientes han subrayado la importancia de los mecanismos de diafonía del JA y el ácido giberélico (GA por sus siglas en inglés) en el establecimiento del conflicto de crecimiento vs defensa de la planta, donde ocurre un entrecruzamiento de la señalización hormonal, donde se encuentran sinergias o antagonismos entre las señales hormonales, lo cual varía de especie a especie (Huot et al., 2014; Wild et al., 2012; Yang et al., 2012).

A medida que las plantas responden al ataque de patógenos activando las vías del SA y del AJ/ET y las respuestas de defensa, otras vías de identificación hormonal también se activan. Se cree que estas vías, reguladas por hormonas más a menudo asociadas con el crecimiento y las respuestas al estrés abiótico, afinan las respuestas a los patógenos, activando las respuestas fisiológicas apropiadas requeridas para combatir al organismo invasor específico. A medida que los patógenos manipulan la fisiología del huésped para crear condiciones que mejoren sus posibilidades de éxito y reproducción, también es probable que se dirijan a las vías de desarrollo de las plantas controladas por las hormonas de crecimiento, generando una respuesta paralela en estas vías de desarrollo por parte de la planta (Shigenaga & Argueso, 2016).

1.1.9.1 Ácido salicílico

El SA es un compuesto fenólico con actividad hormonal vegetal, que es más reconocido como una importante molécula de señalización endógena en la inmunidad de las plantas. Sin embargo, también se ha documentado que el SA está indirectamente involucrado en la germinación, la floración, el transporte de electrones mitocondriales y la resistencia al estrés abiótico, incluida la termotolerancia (Shigenaga & Argueso, 2016). El ácido salicílico es conocido porque su señalización generalmente confiere resistencia en *A. thaliana* ante organismos patógenos de tipo hemibiotróficos (De Vleeschauwer et al., 2016; Pieterse et al., 2009).

En arroz, las interacciones sinérgicas entre SA-JA parecen prevalecer y se plantea la hipótesis de que las dos hormonas participan en una vía de defensa común que puede ser efectiva contra los patógenos hemibiotróficos y necrotróficos (De Vleeschauwer et al., 2013, 2014; Tamaoki et al., 2013). La mutante *mpk4* de *Arabidopsis thaliana* tiene elevados niveles de SA y confiere mayor resistencia a patógenos (Petersen et al., 2000). Es comúnmente aceptado que la SAR es dependiente del SA en la defensa de las plantas, caracterizándose por acumulación de SA y activación de genes *PR* (Yu et al., 2022). Bajo estrés de tipo biótico, la expresión de genes como *PATHOGENESIS-RELATED-1 (PR-1)* es asociado con activación de la señalización del SA (Criollo-Arteaga et al., 2021; Seyfferth & Tsuda, 2014; Yuan et al., 2019).

1.1.9.2 Ácido jasmónico.

El JA es una molécula de señalización derivada de lípidos involucrada en varios procesos de desarrollo y defensa en las plantas. El JA confiere resistencia ante organismos de tipo necrotrófico, al antagonizar al SA, sin embargo, la activación de la señalización de JA puede ocasionar susceptibilidad ante organismos hemibiotróficos como *Pseudomonas syringae pv tomat*, el cual causa manchas foliares, lo cual sugiere que el JA es un regulador positivo de la defensa ante organismos necrotróficos y un regulador negativo en la defensa ante organismos hemibiotróficos (Navarro et al., 2008; Shigenaga & Argueso, 2016). La ISR es dependiente de las vías del JA y del ET, sin embargo, múltiples informes han demostrado la activación de las vías de señalización del SA y del JA /ET en la ISR desencadenadas por microbios beneficiosos, revelando la complejidad y diversidad de las vías de señalización involucradas en la ISR (Yu et al., 2022).

Bajo estrés de tipo biótico, la expresión de genes como *LIPOXYGENASE2 (LOX2)* se asocia con activación de la señalización del JA (Rubil et al., 2021; Santino et al., 2013). El primer paso en la biosíntesis del JA es la liberación de ácido linoleico de las membranas del cloroplasto, seguida de la oxigenación por las enzimas LIPOXIGENASA (LOX). Las heridas o los ataques de patógenos son seguidos de una regulación significativa al alza de los genes sensibles al JA, incluidos los genes *LOX*. Una vez oxigenado, el ácido-linoleico se convierte

en JA, que luego se modifica rápidamente en varios derivados del JA. Uno de estos derivados, (+)-7-iso-jasmonoyl-l-isoleucina (JA-Ile), sintetizado a través de la conjugación de isoleucina al JA por la enzima JA AMIDO SINTETASA (JAR1). El JA también se puede convertir en la planta en el volátil metil-jasmonato (MeJA), a través de la metilación por la enzima JA CARBOXYL METHYLTRANSFERASE (JMT) (Shigenaga & Argueso, 2016).

1.1.9.3 Etileno (ET).

La hormona vegetal gaseosa etileno se considera un componente importante de la respuesta inmune de los patógenos de las plantas. El ET se sintetiza a partir del aminoácido metionina, que se convierte en S-adenosilmetionina (SAM), por la enzima SAM SINTETASA. La SAM se convierte en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), por la enzima ACCSINTASA (ACS), en lo que se considera la biosíntesis de paso más limitante de la velocidad de síntesis del ET. El ACC se convierte entonces a ET en una reacción catalizada por ACC OXIDASE (ACO) (Argueso et al., 2007; Shigenaga & Argueso, 2016). Al igual que el JA, el ET también confiere resistencia ante organismos necrotrofos.

Usualmente la señalización del ET se activa en sinergia con la señalización del JA, pero estas vías de señalización pueden actuar independientemente (De Vleeschauwer et al., 2016; Robert-Seilaniantz et al., 2011). El ET se relaciona junto con el JA en la activación de MPK3/MPK6 vía MKK9 (Bethke et al., 2009). La señalización del ET en las plantas se inicia mediante la unión del ET a uno o más de sus receptores, ETILENO RESPONSE 1 (ETR1), ETHYLENERESPONSE 2 (ETR2), ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 (ERS1), ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2 (ERS2) y ETHYLENE INSENSITIVE 4 (EIN4), que son cinasas híbridas de histidina localizadas en la membrana del retículo endoplásmico (Shigenaga & Argueso, 2016).

1.1.9.4 Ácido abscisico.

La hormona vegetal ABA se ha asociado durante mucho tiempo con respuestas a estreses abióticos, especialmente la sequía y la salinidad. Sin embargo, en la última década se ha

comenzado a dilucidar su función en el estrés biótico. La biosíntesis del ABA ocurre principalmente en plastidios y se inicia por la conversión del carotenoide zeaxantina a trans-violaxantina, por la enzima ZEAXANTINA EPOXIDASA (ZEP) (Marin et al., 1996; Schwartz et al., 1997). Este paso es seguido por la escisión en xantosina por 9-cis-EPOXICAROTENOIDES DIOXIGENASAS (NCED), en lo que se considera la etapa limitante de la velocidad de la biosíntesis del ABA (Iuchi et al., 2001). En el citosol, la xantosina se convierte en aldehído abscísico por una CADENA CORTA DESHIDROGENASA/REDUCTASA (SDR), que luego se oxida a ABA por la enzima ALDEHÍDO OXIDASA (AAO) (Seo et al., 2000). El último paso en la vía biosintética del ABA consiste en la adición de un cofactor molibdeno, por la enzima MOLIBDENO COFACTOR SULFURASULFURASA (MOCO/ABA3) (Bittner et al., 2001).

La señalización del ABA en plantas implica la percepción por parte de un componente receptor formado por las proteínas PYRABACTIN RESISTANCE 1 (PYR) y PYR1-LIKE (PYL), también conocidas como COMPONENTES REGULADORES DE LOS ABARECEPTORES (RCAR). En ausencia del ABA, las proteínas PYR/PYL/RCAR forman dímeros, que se disocian al unirse al ABA. La dimerización conduce a cambios conformacionales en las proteínas PYR/PYL/RCAR y a la formación de un sitio de unión para las proteínas FOSFATASA TIPO 2C (PP2C). La unión de PP2C a PYR/PYL/RCAR es seguida por la liberación de los blancos de la PP2C, SNF1-RELATED KINASES (SnRK2s). Los SnRK2 liberados pueden entonces pasar al núcleo y fosforilar factores de transcripción del tipo bZIP que activan la expresión de genes regulados por el ABA, para producir respuestas fisiológicas (Hauser et al., 2011).

La primera indicación del papel del ABA en las respuestas de defensa provino de observaciones de patógenos que alteraron la susceptibilidad del huésped en plantas tratadas con ABA. La aplicación de ABA a plantas de papa condujo a una reducción de la producción de fitoalexinas y, en consecuencia, a una disminución de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Henfling, 1980). Del mismo modo, la aplicación de ABA condujo a una mayor susceptibilidad de las plantas de tabaco a *Peronospora tabacina* (Salt et al., 1986). Otros experimentos mostraron que la aplicación de ABA podría regular la expresión génica de

defensa, como en el tratamiento de cultivos de células de tabaco con ABA, lo que conduce a la regulación a la baja del gen *PR-2* (P. Wang et al., 2018). Estos estudios iniciales condujeron a la conclusión de que el ABA actuaba aumentando la susceptibilidad de las plantas a los patógenos, especialmente a los hongos.

Recientemente el ABA, junto con otras fitohormonas como los brasinoesteroides (BR por sus siglas en inglés), las citocinas, el ácido giberélico y las auxinas, también surgieron como reguladores críticos de las interacciones planta-microbio. Además, se sugiere que estas hormonas influyen en los resultados de la enfermedad al interferir con la columna vertebral SA-JA/ET del sistema inmunológico de la planta, lo cual es un fenómeno que a menudo se le denomina diafonía hormonal (De Vleeschauwer et al., 2016; Robert-Seilaniantz et al., 2011). El ABA también está relacionado con la vía de TOR, pues la producción del ABA y la activación de la autofagia inducen la expresión de SnRK2, que a su vez inactiva TOR y, en consecuencia, los mecanismos regulados por TOR (Margalha et al., 2019; Zanetti & Blanco, 2017). La señalización del ABA es otra vía importante a través de la cual SnRK1 y TOR pueden afectar las respuestas al estrés. Se han establecido vínculos entre la señalización de SnRK1 y el ABA (Margalha et al., 2019). Líneas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de SnRK1 α 1 son hipersensibles a ABA (Jossier et al., 2009) y se han propuesto que SnRK1 media los efectos del ABA durante la maduración de la semilla y el llenado de guisantes, posiblemente a través de ABI3 (Radchuk et al., 2006, 2010).

El ABA puede activar la señalización de SnRK1 a través de la acción de las proteínas fosfatasa de tipo 2C (PP2C), que actúan como reguladores negativos de SnRK1. En consecuencia, SnRK1 y el ABA inducen respuestas transcripcionales que se superponen en gran medida (Rodrigues et al., 2013). Por el contrario, los sobreexpresadores de TOR en arroz muestran insensibilidad al ABA durante la germinación (Bakshi et al., 2017), mientras que los mutantes de *Arabidopsis raptor1b* son hipersensibles (Salem et al., 2017). Muy recientemente, se informó que se estableció un equilibrio entre las respuestas de crecimiento y estrés a través de la regulación recíproca entre la señalización de estrés por TOR y el ABA. En condiciones favorables, TOR fosforila los receptores PYL de ABA, lo que impide su asociación con las fosfatasas ABA y PP2C y conduce a la inactivación de las cinasas SnRK2

y de las respuestas al estrés; por su parte, TOR se inactiva de manera dependiente de la cinasa SnRK2 para reprimir el crecimiento (Rosenberger & Chen, 2018; Wang et al., 2018).

1.1.9.5 Entrecruzamiento de las fitohormonas en SAR e ISR.

Al considerar las respuestas de defensa en un entorno natural, es raro que las plantas solo estén expuestas a un único factor estresante. Por lo tanto, es de gran importancia comprender el entrecruzamiento entre las SAR/ISR y otras cascadas de señalización, por ejemplo, aquellas activadas por estrés abiótico. Una de las fitohormonas más críticas involucradas en las respuesta al estrés abiótico es ABA y, por lo tanto, la interacción entre esto y SAR/ISR tiene potencialmente un impacto profundo en la efectividad de la defensa sistémica después de experimentar presiones ambientales simultáneas (Vlot et al., 2021). De hecho, las respuestas asociadas con el SA se inhiben mediante la aplicación conjunta de ABA exógeno (Yasuda et al., 2008). Aunque se desconoce el punto directo de interacción, el ABA mejora la degradación mediada por proteosoma del receptor NRP1 de SA, lo que a su vez compromete las defensas asociadas al SA (Ding et al., 2016).

La aplicación de análogos funcionales de SA también reduce la expresión de genes de biosíntesis y de respuesta al ABA después del tratamiento con sal, lo que indica que SA/SAR también podrían suprimir las respuestas de estrés mediadas por el ABA (Yasuda et al., 2008). Esta diafonía no se limita a *Arabidopsis*, ya que los inductores de SA/SAR también muestran antagonismo con la señalización de ABA en tomate (Kusajima et al., 2017; Pye et al., 2013, 2018). Los componentes de la vía de inducción de la SAR independiente del SA, también se han asociado con respuestas de estrés abiótico mediadas por el ABA. La sobreexpresión de *AZII* confiere susceptibilidad a la sequía (Atkinson et al., 2013). Por el contrario, la tolerancia a la congelación y la tolerancia a la sal parecen ser promovidas por *AZII* a través de un mecanismo dependiente del ABA (Pitzschke et al., 2014; Xu et al., 2011). Esto sugiere un papel dual de *AZII* en la resistencia al estrés abiótico, según el tipo de estrés encontrado. Además, los datos de expresión génica de (Gruner et al., 2013) sugieren un papel positivo para el ABA en las primeras etapas de la señalización de Pip (Figura 5).

La SAR también interactúa con las vías del JA bajo una variedad de tensiones. En general, se ha reconocido que las señales basales de SA que se necesitan para el inicio de SAR son mutuamente antagónicas con el JA (Glazebrook, 2005), pero esto no está tan claro con respecto a la defensa sistémica (Figura 4). En *Arabidopsis* hay informes contradictorios sobre la necesidad de JA para la SAR (Attaran et al., 2009; Truman et al., 2007). Además, una infección que induce la SAR confiere susceptibilidad a los patógenos necrotróficos, a través de la supresión de la señal de JA en el tejido local infectado, lo que probablemente este asociado con una función citosólica de NPR1 (Spoel et al., 2003, 2007; Wittek et al., 2015). La última función de NPR1 podría respaldar las respuestas de la ISR asociadas a JA/ET (Nie et al., 2017; Weller et al., 2012). Sin embargo, durante la SAR, que está respaldada por una función nuclear de NPR1 aguas debajo de SA, no parece haber cambios en la susceptibilidad sistémica a los patógenos necrotróficos (Spoel et al., 2007; Wittek et al., 2015). Esto podría deberse a que la acumulación sistémica de SA asociada a la SAR no alcanza niveles lo suficientemente altos como para alcanzar el umbral necesario para que ocurra el antagonismo de SA-JA (Spoel et al., 2007).

Si bien la interacción SA-JA durante la SAR no se comprende bien, la situación se vuelve aún más compleja durante la ISR. Anteriormente se creía que se basaba en las vías de JA, ahora parece que un componente sinérgico de la vía SA-JA está involucrado en este tipo de defensa, según el huésped y la especie de PGPR (Wu et al., 2018; Yuan et al., 2019). La aparente falta de antagonismo entre SA y JA durante la ISR puede deberse a una regulación positiva del factor de transcripción ORA59, que se induce después de la inoculación de *Arabidopsis* con el inductor de la ISR *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN (Timmermann et al., 2019). Se ha demostrado que la sobreexpresión de ORA59 reduce los efectos reguladores negativos del SA en los genes inducidos por el JA aguas abajo (Van der Does et al., 2013). Durante mucho tiempo se ha considerado en el fitomejoramiento que las líneas con mayores capacidades de defensa muestran un déficit correspondiente en la promoción del crecimiento y viceversa (Huot et al., 2014). La diafonía entre la SAR y otras vías de defensa agrega mayor complejidad a estas consideraciones y, por lo tanto, debe tenerse en cuenta al investigar las posibles aplicaciones de los inductores de la SAR y la ISR en la agricultura (Vlot et al., 2021).

1.2 Vías de señalización implicadas en las respuestas de defensa.

Existen diferentes vías implicadas en la respuesta de defensa de las plantas, las cuales pueden ser similares entre diferentes especies. Estas vías, se activan para regular procesos en los que activan o desactivan genes de defensa o genes implicados en la regulación de la producción de fitohormonas, como el JA, el SA, el ET o el ABA, o generan procesos como la producción de ROS, silenciamiento de genes implicados en el desarrollo y crecimiento de las plantas, así como la regulación de la autofagia, manteniendo el equilibrio en los procesos necesarios para la supervivencia de las plantas. Algunas de las vías relacionadas a la respuesta de defensa son la vía de la proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) de TOR y de SnRK1 (Margalha et al., 2019; Shi et al., 2018; Zhang et al., 2018).

1.2.1 Vía de las MAPK.

El comportamiento celular en respuesta a estímulos extracelulares es mediado a través de vías de señalización intracelular, como las vías MAPK que conforman cascadas de señales discretas que sirven como puntos focales en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares. La vía de señalización de las MAPK se relaciona con el desarrollo y el crecimiento de las plantas (López-Bucio et al., 2019; Xu & Zhang, 2015), pero esta vía de señalización está altamente implicada en la respuesta de defensa de las plantas. El genoma de *A. thaliana* codifica para 80 MAPK cinasa-cinasa (MAPKKK), 10 MAPK cinasa (MAPKK) y 20 MAPK, que forman módulos funcionales que contienen unas u otras y son activados mediante fosforilaciones (Meng & Zhang, 2013; Pecher et al., 2014; Pitzschke et al., 2009). La señalización de la vía de las MAPK ha sido relacionada también con la producción y señalización del SA, JA y el ET (Lin & Agehara, 2021; Shigenaga & Argueso, 2016).

1.2.1.1 Módulo MPK3/MPK6 y MPK4.

Hay conservación notable en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos de inmunorrespuestas naturales de plantas, insectos y mamíferos (C. Lu et al., 2002; Pitzschke et al., 2009). Las respuestas mediadas por las MAPK, están reguladas en

parte por su repertorio de sustratos, lo cual está muy poco estudiado en las plantas (Bethke et al., 2009). Las cascadas de las MAPK transducen señales externas en respuestas celulares en todos los eucariotas (Valdespino-Gómez et al., 2015).

Factores de virulencia como la proteasa y la flagelina han sido descritos como PAMPs (Ramírez-Prado et al., 2018), reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones localizados en la superficie (Ranf, 2017) y median la activación de diferentes módulos de MAPKs, donde MPK3/MPK6 y MPK4 participan (Figura7) (Withers & Dong, 2017; Zhang et al., 2018), promoviendo la expresión de genes de respuesta a patógenos, tales como *PRI* o *LOX2* (Criollo-Arteaga et al., 2021; Santino et al., 2013). El módulo que contiene las proteínas MPK3/MPK6 es considerado un regulador positivo de la respuesta de defensa en plantas, mientras que el módulo que contiene MPK4 es reconocido como un regulador negativo (Figura 7) (Pitzschke et al., 2009).

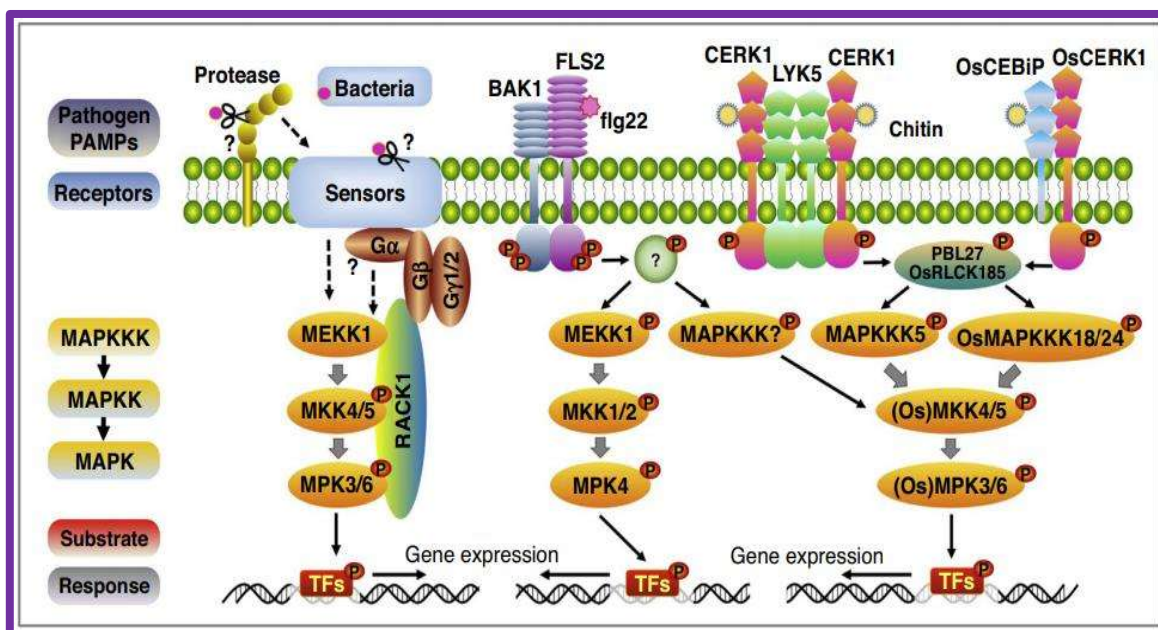


Figura 7. Vía de señalización de las MAPK.

Proteasa y flg22 activan módulos MPK3/MPK6 y MPK4 (tomado de Zhang et al., 2018). La percepción de patrones moleculares asociados a patógenos/ microbios exógenos (PAMP) por parte de los complejos de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) RLK/RLP de plantas, activa la cascada MPK3/MPK6 y MPK4 en la inmunidad de las plantas. La fosforilación de diversos sustratos de MAPK conduce a la activación de las respuestas de defensa. La proteína G, las RLCK y otros componentes no identificados juegan un papel importante en la conexión de los complejos de receptores y las cascadas de MAPK. Los signos de interrogación indican componentes de señalización no identificados. Una flecha puede representar varios pasos debido a componentes desconocidos en las vías de señalización.

1.2.2 Vía de AtTOR-S6K.

La cinasa blanco de la rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés) es un componente central de una vía de transducción de señales que regula el crecimiento celular en respuesta a mitógenos, nutrientes y factores de crecimiento en eucariotas (Figura 8). Estudios previos indican que la actividad de TOR en *Arabidopsis thaliana* (AtTOR) es resistente a la rapamicina, mientras que en maíz (*ZmTOR*) no lo es, lo que sugiere que las plantas podrían tener mecanismos de regulación diferentes de esta vía de transducción de señales (Agredano-Moreno et al., 2007).

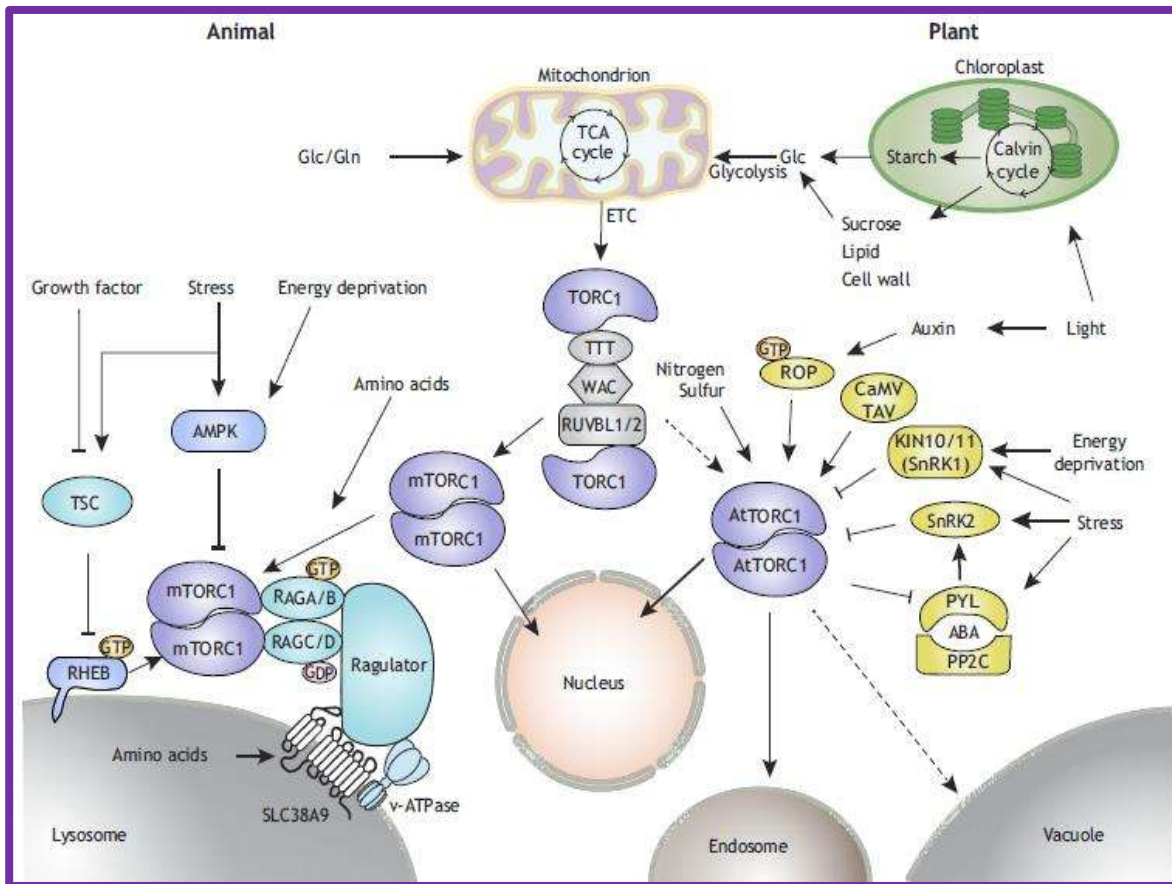


Figura 8. Vía de señalización de TORC1.

Reguladores aguas arriba de TORC1 (tomado de Shi et al., 2018). En las células de mamíferos, el ensamblaje de un dímero TORC1 es impulsado por actividades TCA-ETC dependientes de nutrientes/energía en las mitocondrias de una manera dependiente del complejo TTT-WAC-RUVBL, que puede conservarse en las plantas. mTORC1 es activado por la pequeña GTPasa RHEB en la membrana lisosomal, mientras que las pequeñas ROP de GTPasa de las plantas actúan como activadores de AtTORC1 corriente abajo de la auxina. Tanto en mamíferos, como en plantas el estrés comúnmente suprime las funciones de TORC1 a través de

AMPK/SnRK1. La hormona del estrés vegetal ABA se acopla con SNRK2 para regular AtTORC1 corriente debajo de la auxina de manera recíproca, lo que equilibra el crecimiento y las respuestas al estrés. También son evidentes las diferencias en la localización de complejos que contienen TOR en células vegetales y animales. AtTORC1-ROP2 de plantas, se localiza en el endosoma durante la activación de la auxina, mientras que las funciones TOR nucleares se han informado tanto en células de plantas como de mamíferos. CaMV, virus del mosaico de la coliflor; Glc, glucosa; Gln, glutamina; PP2C, proteína fosfatasa 2C; PYL, resistencia a la pirabactina 1; RAG, GTPasa de trapo; RUVBL, RuvB como AAA ATPasa; ciclo TCA, ciclo del ácido tricarboxílico; WAC, adaptador que contiene el dominio WW con bobina en espiral.

La proteína TOR se conserva en todos los eucariotas. En mamíferos, TOR está presente en dos complejos: mTORC1 y mTORC2. mTORC1 se define por sus tres componentes principales: mTOR, Raptor (proteína reguladora asociada con mTOR) y mLST8 (proteína de mamífero 8 Sec13, también conocida como GβL). mTORC2 también contiene mTOR y mLST8; sin embargo, en lugar de Raptor, mTORC2 contiene Rictor (compañero insensible a la rapamicina de mTOR) (Figura 9) (John et al., 2011; Sabatini, 2017; Shi et al., 2018). Hasta la fecha, solo se ha reportado el complejo analógico mTORC1 en plantas. El complejo AtTORC1 está formado por AtTOR, LST8, FKBP12 y RAPTOR (Figura 9) (Sabatini, 2017; Shi et al., 2018).

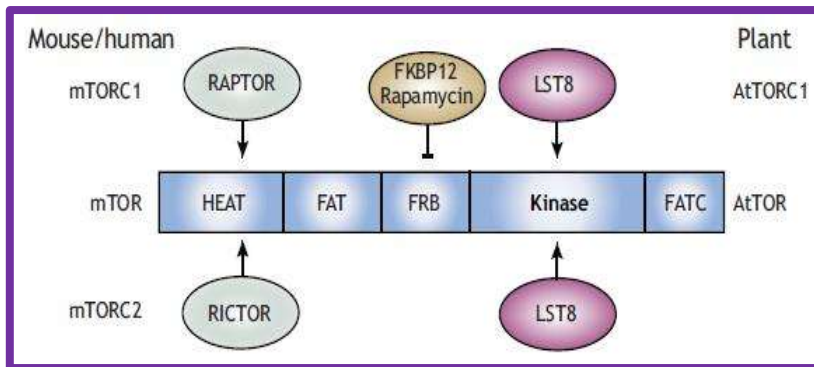


Figura 9. Componentes de AtTORC1.

La estructura de dominio de TOR y complejos que contienen TOR (tomado de Shi et al., 2018). La estructura de dominio de TOR, destacando los componentes mTORC1/2 y AtTORC1 que se unen a cada dominio.

Varios factores, como nutrientes, estrés, nivel de energía celular y factores de crecimiento, estimulan o reprimen esta red de señalización, donde la proteína cinasa de serina-treonina TOR desempeña un papel central (Figura 10). La insulina y factores de crecimiento tipo insulina (IGFs) son generadores de esta vía de regulación de crecimiento, que activa selectivamente la maquinaria traduccional, regula la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas y en última instancia el crecimiento celular. En las plantas, hay un creciente número de informes que describen varios componentes de la vía TOR, como TOR, RAPTOR, las cinasas S6K1 y S6K2 y otras proteínas implicadas que regulan la actividad de

TOR, como FKBP12 o la proteína de control traduccional de tumor (Figura 10) (TCTP) (Garrocho-Villegas & Sánchez de Jiménez, 2012).

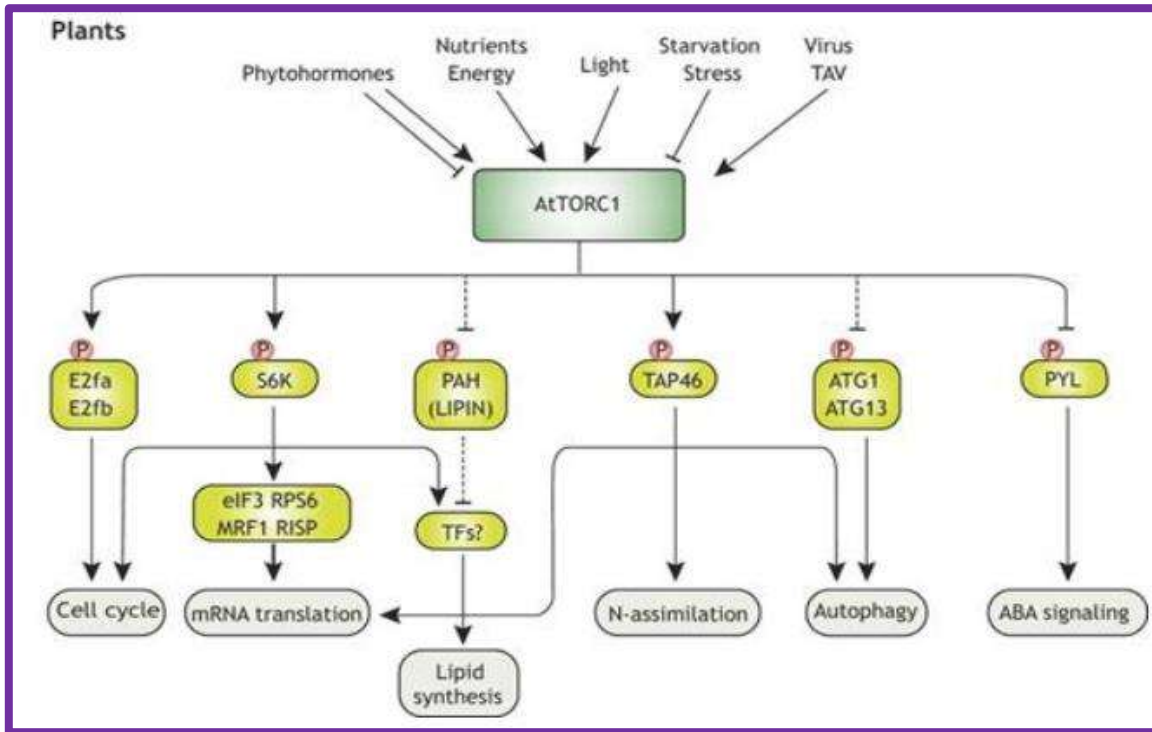


Figura 10. Procesos regulados por AtTORC1.

La cinasa TOR fosforila y modula directamente los componentes de señalización aguas abajo (Shi et al., 2018). Sustratos de AtTORC1 directos, sus funciones y componentes de señalización clave en plantas.

1.2.2.1 Participación de TOR en el balance y crecimiento de plantas.

Otra vía de señalización involucrada en las respuestas de defensa de las plantas contra microorganismos patógenos es la vía del blanco de la rapamicina (TOR) (Margalha et al., 2019; Petersen & Nurse, 2007), que se ha relacionado comúnmente con el desarrollo y crecimiento de las plantas (Hall, 2016; Sabatini, 2017). Se ha documentado ampliamente que la vía TOR es el transductor de señales de estímulos externos como la disponibilidad de nutrientes, de fitohormonas, la exposición a la luz y el estrés, entre otros (Albert & Hall, 2015; Daniel-Rexin et al., 2015; Dobrenel et al., 2016).

Evidencias recientes en plantas muestran que TOR funciona como un interruptor en conjunto con SnRK1, redirigiendo la energía a la defensa o las respuestas de desarrollo y crecimiento. Si TOR está activo, SnRK1 se inactiva y viceversa. Si SnRK1 inactiva TOR, se desencadenarán las respuestas de defensa contra el estrés biótico, como el silenciamiento de ARN, la producción de SA y JA, la muerte celular programada, la activación de genes de defensa y la autofagia (Figura 11) (Dobrenel et al., 2016; Margalha et al., 2019; Zanetti & Blanco, 2017). Bajo estrés biótico, la expresión de los genes *PR-1* o *LOX2* se asocia con la activación de la señalización de SA y JA, respectivamente (Figura 11) (Rubil et al., 2022; Seyfferth & Tsuda, 2014; Yuan et al., 2019). La activación de la autofagia y la producción de ABA activan SnRK2, que a su vez inactiva TOR y, en consecuencia, los mecanismos regulados por TOR (Figura 11) (Dobrenel et al., 2016; Margalha et al., 2019; Zanetti & Blanco, 2017).

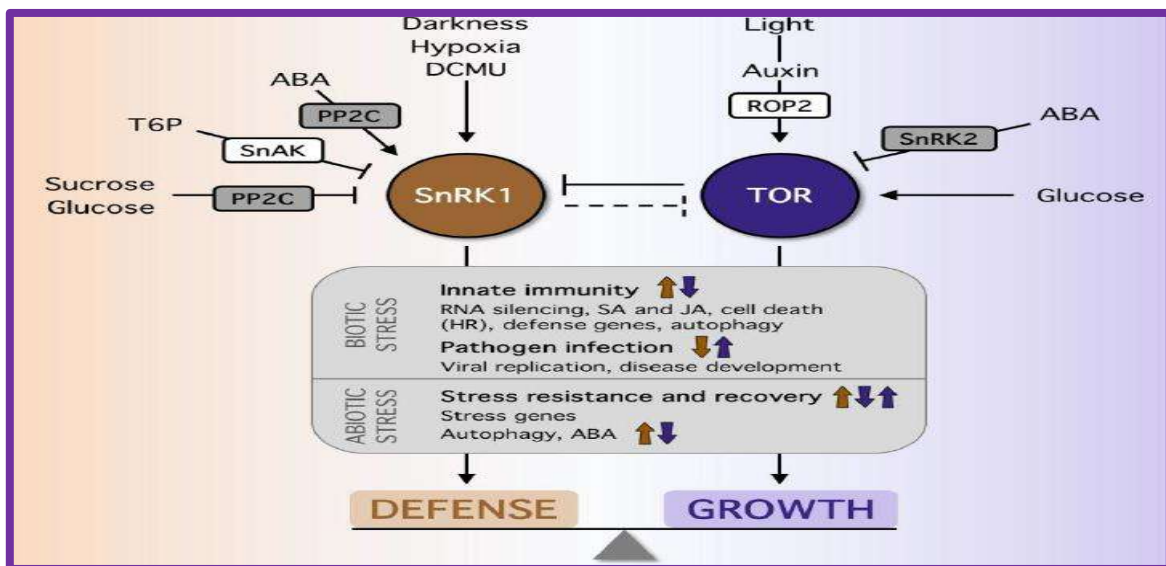


Figura 11. SnRK1 y TOR, balance entre defensa y crecimiento.

SnRK1 y TOR son reguladores metabólicos centrales que desempeñan funciones antagónicas en gran medida en el crecimiento y la defensa de las plantas (Margalha et al., 2019). En condiciones desfavorables, cuando la producción de energía se ve comprometida por factores de estrés biótico o abiótico, SnRK1 se reprime mientras que TOR se activa, para impulsar los procesos asociados con la proliferación y el crecimiento celular. Las compensaciones de crecimiento-defensa pueden resultar de una regulación cruzada negativa entre SnRK1 y TOR, así como a través de su regulación independiente de los procesos posteriores. Los componentes resaltados en gris y blanco designan reguladores negativos y positivos, respectivamente, de la cinasa indicada. Las flechas hacia arriba y hacia abajo codificadas por colores designan los efectos positivos y negativos, respectivamente, de la cinasa correspondiente en los procesos posteriores. SnRK1, TOR, PP2Cs, SnA, ROP, SnRK2.

***Pseudomonas aeruginosa* como patógeno oportunista de plantas.**

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa en forma de bastoncillo que se encuentra de forma ubicua en el ambiente, pertenece al reino bacteria; filo *proteobacteria*; clase *Gamaproteobacteria*; genero *Pseudomonas*; especie *aeruginosa*, posee movilidad unipolar debido a la presencia de un flagelo y no forma esporas (Chandler et al., 2019). *P. aeruginosa* tiene una notable versatilidad metabólica y puede sobrevivir en ambientes aeróbicos, hipóxicos y anaeróbicos, lo que la convierte en un patógeno oportunista para plantas, animales y humanos (Dubern et al., 2015; Gellatly & Hancock, 2013; Rudrappa et al., 2008; Savoia, 2014). Se cataloga como organismo de tipo hemibiotrófico, al tener un mecanismo donde inicialmente coloniza a la planta y posteriormente la mata (Chahtane et al., 2018; Rudrappa & Bais, 2008). Se encuentra de manera ubicua en el ambiente y es comúnmente asociada a la infección de vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística (Chandler et al., 2019).

Aunque se han informado y descrito muchos aislamientos de *P. aeruginosa*, la cepa PAO1 sigue siendo la cepa de referencia utilizada para la investigación en laboratorios de todo el mundo (Chandler et al., 2019). Esta cepa proviene del aislamiento de PAO (anteriormente llamado “cepa 1 de *P. aeruginosa*”) en el laboratorio de Bruce Holloway (Holloway & Morgan, 1986; Holloway, 1955). La cepa PAO1 se aisló de una herida en un paciente en Melbourne, Australia, en 1954. La cepa actual surgió después de una mutación espontánea en la cepa original que produjo resistencia al cloranfenicol y es actualmente la principal cepa de referencia para los análisis genéticos y fenotípicos de *Pseudomonas* (Holloway & Morgan, 1986; Holloway, 1955).

PAO1 fue la primera cepa de *P. aeruginosa* completamente secuenciada, cuyo genoma completo se publicó en el 2000 (Stover et al., 2000). Además, una subcepa alternativa de PAO1 sirvió como base para la biblioteca de mutantes de transposones de *P. aeruginosa* desarrollada por el laboratorio Manoil de la Universidad de Washington-Seattle (Jacobs et al., 2003; Lewenza et al., 2005). Las sublíneas PAO1 se han distribuido, mantenido y propagado en todo el mundo. Una versión de PAO1 de Holloway se depositó en la American

Type Culture Collection (ATCC) (Chandler et al., 2019). Hasta el momento se considera que su genoma es uno de los más grandes en bacterias; tiene 6.2 MPb y se predice que tiene 5,570 ORFs (Tabla 1). El genoma de *P. aeruginosa* es comparable con el tamaño de los eucariotas simples como *Saccharomyces cerevisiae*. Otra de las características del genoma de *P. aeruginosa* es que es rico en G+C, con alrededor de 66.6% (Stover et al., 2000).

Tabla 1. Clases funcionales de genes predichos de *P. aeruginosa* (modificado de Stover et al., 2000).

Tipo de función	ORFS	%ORFS
A adaptación, protección (por ejemplo proteínas de choque de baja temperatura)	60	1.1
Biosíntesis y metabolismo de aminoácidos	150	2.7
Resistencia y susceptibilidad a antibióticos	19	0.3
Biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y de transporte	119	2.1
Metabolismo de compuestos de carbono	130	2.3
División celular	26	0.5
Pared celular, LPS	83	1.5
Metabolismo intermediario central	64	1.1
Chaperonas y proteínas de choque térmico	52	0.9
Quimiotaxis	43	0.8
Replicación, recombinación, modificación y reparación de DNA	81	1.5
Metabolismo energético	166	3.0
Metabolismo de fosfolípidos y ácidos grasos	56	1.0
Proteínas de membrana	7	0.1
Accesorios y motilidad	65	1.2
Biosíntesis y metabolismo de nucleótidos	60	1.1
Aparatos de secreción y exportación de proteínas.	83	1.5
Enzimas putativas	409	7.3
Relación con fagos, transposones o plásmidos	38	0.7
Factores de secreción (toxinas, enzimas y alginato)	58	1.0
Proceso de transcripción y degradación de RNA	45	0.8
Reguladores transcripcionales	403	7.2
Traducción, modificación y degradación post traduccional	149	2.7
Trasporte de moléculas pequeñas	555	10.0
Sistemas de regulación de dos componentes	118	2.1
Hipotéticos	1774	31.8
Desconocidos (Hipotéticos conservados)	757	13.6
Total	5570	100.0

1.3.1 Sistema de Quórum sensing (QS).

El quorum sensing (QS por sus siglas en inglés) es un mecanismo en el que las bacterias se comunican utilizando moléculas como señal química. En bacterias, la comunicación química implica la producción, liberación, detección y re suspensión de pequeñas moléculas hormonales llamadas autoinductores. Este proceso, permite que las

bacterias monitoricen otras bacterias del entorno para alterar el comportamiento a escala de toda la población, en respuesta a cambios en el número y las especies presentes en una comunidad (Waters & Bassler, 2005).

El primer sistema de QS descrito es el de la bacteria *Vibrio fischeri*; que es un simbionte facultativo de peces marinos y calamares y se considera el paradigma de QS de la mayoría de las bacterias Gram negativas (Nealson & Hastings, 1979). La regulación de la bioluminiscencia de esta bacteria está mediada por el sistema LuxI-LuxR, que pertenece a la red de señalización de quórum sensing. LuxI sintetiza la señal, una acil-homoserina lactona (AHL) de seis carbonos (3-oxo-hexanoil-HSL), que a medida que se acumulan llevan a la unión y activación de un regulador específico LuxR. El LuxR activado se une a secuencias palindrómicas específicas del ADN, llamadas “caja lux”, donde recluta a la ARN polimerasa para así aumentar la expresión de genes (González & Keshavan, 2006).

La bien caracterizada red QS de *P. aeruginosa* comprende dos homólogos de LuxIR de sistemas de señalización dependientes de AHL (*las* y *rhl*), y otro mecanismo de señalización que depende de la señal 2 heptil-3-hidroxi-4-(1H)-quinolona (PQS) (Diggle et al., 2006; Gallagher et al., 2002) (Figura 12). El sistema *las* está compuesto de la sintasa LasI, que dirige la biosíntesis del autoinductor, N-(3-oxododecanoil)-l-homoserina lactona (3OC12HSL), y el activador transcripcional afín LasR (Pesci et al., 1997) (Figura 12), Análogicamente, el sistema *rhl* incluye el regulador RhlR y la sintasa RhlI que produce N-butiril-l-homoserina lactona (C4HSL) (Brint & Ohman, 1995; Ochsner & Reiser, 1995; Winzer & Williams, 2001) (Figura 12).

A alta densidad celular, la acumulación de las señales de QS 3OC12HSL y C4HSL a una concentración umbral, incrementa la unión y la activación a sus reguladores transcripcionales afines. El sistema *las* más allá se comunican con el sistema *rhl* a través de la interacción y activación de RhlR, por el complejo 3OC12HSL-LasR, lo que resulta en una superposición en su regulón (Glessner et al., 1999). Como tal, el sistema *las* y *rhl* ejerce control transcripcional sobre la producción de factores de virulencia extracelulares similares, como la elastasa, proteasa alcalina, proteasa *lasA*, exotoxina A, ramnolípidos, piocianina,

cianuro de hidrógeno, lectinas citotóxicas PA-IL y PA-IIL y sobre la motilidad bacteriana (Diggle et al., 2002; Latifi et al., 1995; Stintzi et al., 1998; Winson et al., 1995; Winzer & Williams, 2001).

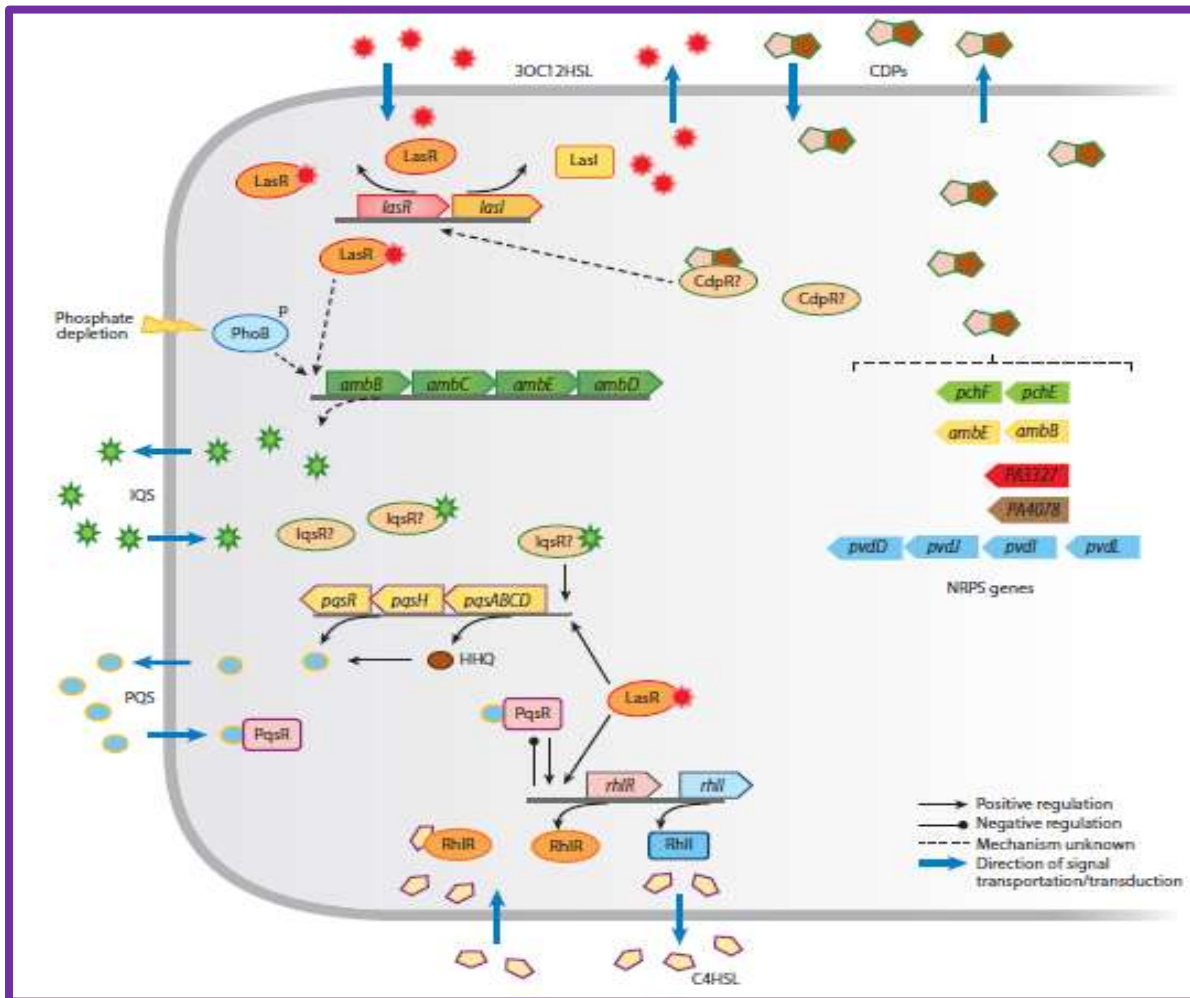


Figura 12. Sistema de Quorum Sensing (QS) en *P. aeruginosa*.

Los sistemas de comunicación química interconectados en *P. aeruginosa* (tomado de Ahator & Zhang, 2019). El sistema de respuesta al estrés por agotamiento de fosfato y las QS aguas arriba representado por PhoB, regula los sistemas PQS y Rhl QS aguas abajo, a través del sistema de señalización IQS. La biosíntesis de CDPs está influenciada por alguna enzima NRPS, y la mezcla de CDPs podría estimular el sistema *las* con algún mecanismo desconocido. Estos sistemas de comunicación química interconectados son capaces de modular la fisiología bacteriana y la virulencia en respuesta a diversos cambios ambientales, incluida la dinámica de la densidad de población y el estrés por agotamiento de fosfato. Abreviaturas: C4HSL, N-butiril-L-homoserina lactona; CDPs, dipéptido cíclico; IQS, Integrador de quorum sensing; NRPS, péptido sintetasa no ribosomal; PQS, 2-heptil-3-dihidroxi-4-(1H)-quinolona; QS, detección de quórum.

La tercera señal QS, PQS, se sintetiza a través de la condensación de antranilato y β -ceto dodecanoato (Bredenbruch et al., 2005). El grupo de genes *pqsABCD* está involucrado en la producción del precursor de PQS, 2-heptil-4(1H)-quinolona (Bredenbruch et al., 2005), que se convierte en PQS por PqsH, una monooxigenasa putativa (Déziel et al., 2004; Gallagher et al., 2002). La producción de PQS está regulada por el regulador de tipo LysR PqsR (también conocido como MvfR) (Figura 12), y este sistema QS controla la biosíntesis de ciertos factores de virulencia asociados a AHL, como piocianina, ramnolípidos, elastasa y lectina galactofílica, y también afecta el desarrollo de biopelículas (Diggle et al., 2003, 2006; Pesci et al., 1999). Además, PQS regula la formación de microvesículas, un sistema de entrega de la señal de PQS, proteínas, toxinas y ADN (Bomberger et al., 2009; Mashburn & Whiteley, 2005), además posee propiedades antioxidantes, actividad quelante de hierro y tiene un efecto inhibitor del crecimiento contra otras especies de bacterias (Bomberger et al., 2009; Bredenbruch et al., 2006; Toyofuku et al., 2010).

Los tres sistemas de QS en *P. aeruginosa* están organizados jerárquicamente, donde el sistema *las* está en la posición anterior del circuito QS y controla los genes *pqs* y *rhl* aguas abajo en condiciones in vitro normales (de Kievit et al., 2002; Gallagher et al., 2002; Pesci et al., 1999) (Figura 12). El sistema PQS desempeña una función reguladora intermediaria en la retrasmisión de las señales Las-Rhl de QS, ya que el PQS exógeno aumenta la expresión de RhlR e influye en la expresión de factores de virulencia dependientes de *rhl*. Curiosamente, el sistema Rhl regula negativamente el sistema PQS según la abundancia relativa de sus moléculas de señalización afines en el medio extracelular y la capacidad de las bacterias para percibirlos (Wade et al., 2005; Xiao et al., 2006).

El sistema de quorum sensing es importante por coordinar diferentes procesos biológicos en *P. aeruginosa* PAO1, tales como la simbiosis, resistencia al estrés oxidativo y resistencia a antibióticos (Ahator & Zhang, 2019; Papenfort & Bassler, 2016; Waters & Bassler, 2005). Además de los autoinductores, como las AHL y PQS, el sistema de quorum sensing en *P. aeruginosa* regula la producción de ciclodipéptidos (CDPs) que pueden actuar como antagonistas compitiendo con las AHL por el sitio de unión a su regulador LasR (Figura 13) (Ahator & Zhang, 2019; Waters & Bassler, 2005). *P. aeruginosa* PAO1 produce cuatro

ciclodipéptidos: ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Leu), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Phe); (Figura 13), que han sido reportados por su actividad tipo auxina incrementando la biomasa foliar y radicular en *A. thaliana*, donde se involucra la vía de señalización de AtTOR- S6K (González et al., 2017; González-López et al., 2021; Ortiz-Castro et al., 2011).

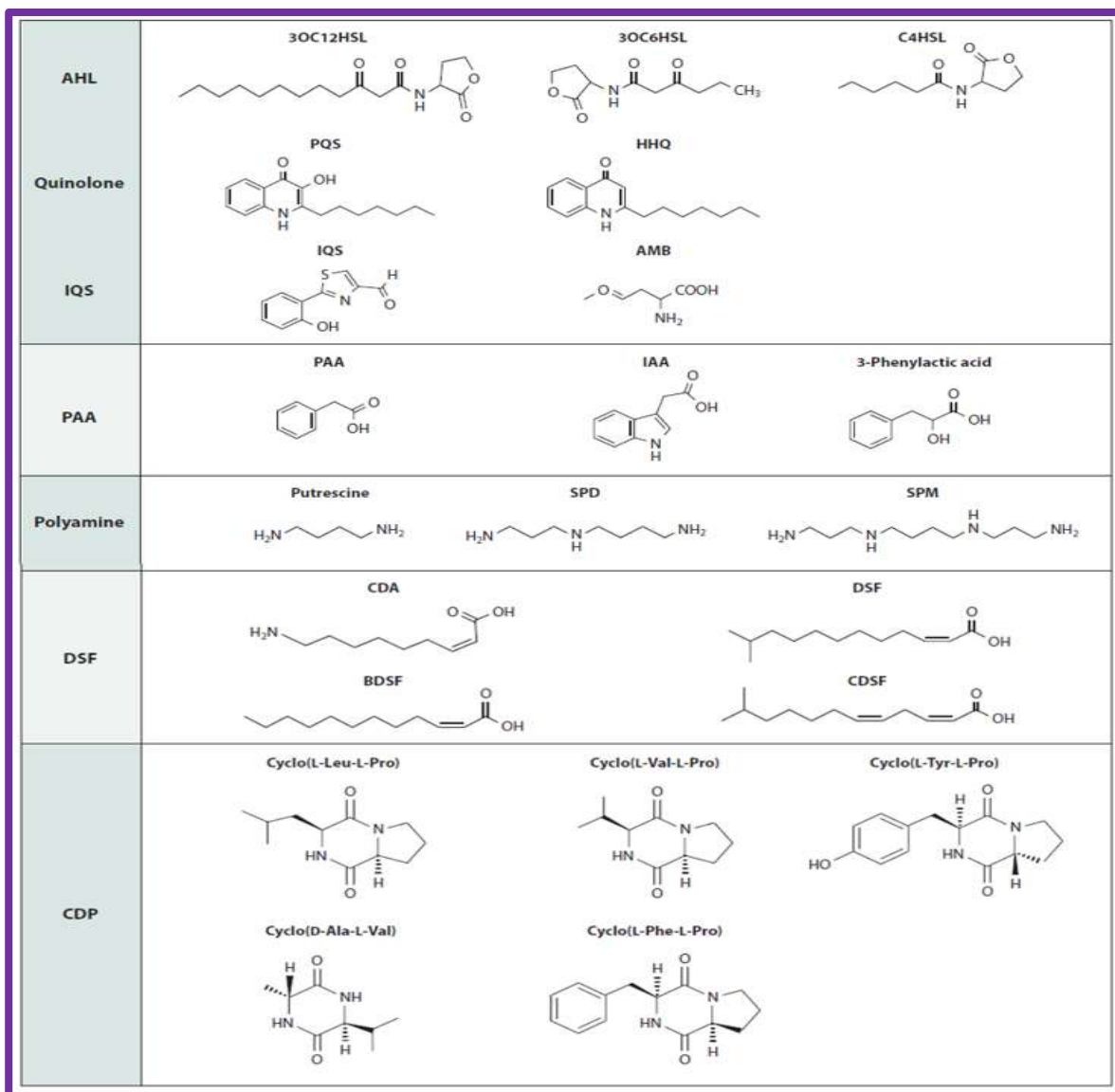


Figura 13. Señales químicas de QS de *P. aeruginosa* PAO1.

Estructuras de las señales químicas y derivados enunciados en Ahator & Zhang, 2019. Abreviaturas: 3OC6HSL, 3-oxohexanoil-homoserina lactona; 3OC12HSL, N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona; AHL, acil homoserina lactona; AMB, 1-2-amino-4-metoxi-trans-3-ácido butenoico; BDSF, ácido cis-2-dodecanoico; C4HSL, N-butiril-1-homoserina lactona; CDA, ácido cis-2-decanoico; CDP, dipéptido cíclico; CDSF, ácido cis-11-metildodeca-2,5-dienoico; DSF, factor de señal difusible; HHQ, 2-heptil-4(1H)-quinolona; ALA, ácido indol-3-acético; IQS, integrador de quorum sensing; PAA, ácido fenilacético; PQS, 2-heptil-3-hidroxi-4-(1H)-quinolona; SPD, espermidina; SPM, espermina.

Se ha descrito que la producción de los CDPs es regulada por un grupo de genes descritos como péptido sintetasa no ribosomales (NRPS), algunos de ellos están implicados en la producción de IQS, pioverdina y piocianina (Figura 13) (Ahator & Zhang, 2019; Wang et al., 2014). La mutación de genes NRPS modifica la producción de CDPs y otros factores de virulencia importantes para *P. aeruginosa* PAO1 (Díaz-Pérez et al., 2022; González et al., 2017). Se sugiere además que los PAO1-CDPs actúan de manera antagónica con las AHL de PAO1, compitiendo por la región transcripcional de LasR del sistema de QS de PAO1, pues en estudios moleculares hechos por González et al., 2017, mostraron que el sitio de interacción 3-oxo-C12-HSL en el regulador LasR ocurrió en un sitio bien definido, interactuando con los residuos Ser129, Asp73 y Trp60; mencionando también que la energía de enlace de los CDPs con LasR es alta, dentro del rango de la energía de enlace de 3-oxo-C12-HSL-LasR la cual es de -7.3 Kcal/mol, además se menciona que la dimensión de la rejilla de la estructura de la proteína LasR de *P. aeruginosa* con el 3-oxo-C12-HSL y los CDPs fue similar (≈ 1 Å).

1.3.2 Factores de virulencia y su relación con el QS.

Como patógeno oportunista, *P. aeruginosa* PAO1 es una bacteria muy competitiva que produce factores de virulencia como ramnolípidos, piocianina, flagelina, biopelícula, catalasa, proteasa alcalina, elastasa y lecitina, entre otros (Papenfort & Bassler, 2016; Smith & Iglewski, 2003). Los factores de virulencia que produce *P. aeruginosa* le proporcionan una capacidad eficiente de colonización (Rudrappa & Bais, 2008). Factores de virulencia tales como proteasa y flagelina han sido descritos como PAMPs (Ramirez-Prado et al., 2018), reconocidos por receptores PRRs.

El circuito de QS es esencial para la expresión de factores de virulencia, así como para la formación de biopelícula, se ha especulado que la actividad patógena y la regulación por QS están estrechamente ligadas para el establecimiento efectivo de la infección (Ahator & Zhang, 2019; Juhas et al., 2005). Muchos de los factores de virulencia secretados y fenotipos, como la formación de biopelícula, están bajo el control del QS regulado mediante moléculas autoinducidas (Tabla 2).

Muchos de los factores relacionados con la virulencia de *P. aeruginosa* participan directa o indirectamente en la interacción física con la célula huésped y las proteínas del anfitrión, incluyendo a los sistemas de secreción (tipo II, tipo III y tipo VI) y efectores asociados (incluyendo ExoT, ExoU, ExoS y ExoA, fosfolipasa C y proteasa alcalina), flagelos y estructuras asociadas en la adhesión a las células del huésped, tal como el pili tipo IV. Otros factores de virulencia reconocidos incluyen los implicados en el quorum sensing (sistemas AHL y PQS), en la adquisición de hierro (Pioquelina y Pioverdina), producción de moléculas pequeñas/síntesis de toxinas (fenazinas, cianuro de hidrogeno), alginato, LPS y la formación de biopelícula (Feinbaum et al., 2012).

Tabla 2. Funciones controladas por el circuito de QS en *P. aeruginosa* (tomada de Juhas, et al., 2005).

Controlado por las	Controlado por <i>rhl</i>	Controlado por PQS
síntesis PQS	síntesis PQS	sistema <i>rhl</i>
sistema <i>rhl</i>	ramnolipidos	ramnolipidos
formación de biofilm	proteasa alcalina	formación de biofilm
proteasa alcalina	elastasa	elastasa
elastasa	piocianina	piocianina
lipasa	lipasa	lecitina A y B
ác. cianhídrico	lecitina A y B	
secreción Xcp	ác. cianhídrico	
exotoxina A	secreción Xcp	
neuraminidasa	quitinasa	
endoproteasa PvdS	RpoS	
catalasa	exoenzima S	
peróxido dismutasa	swarming	
aminopeptidasa	twiching	
swimming		
swarming		
twiching		

1.3.2.1 Pigmentos producidos por *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa posee la capacidad de formar diferentes pigmentos hidrosolubles (Figura 14), entre los cuales se incluye el compuesto fluorescente pioverdina (también producido por *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*). Cuando la pioverdina se

combina con el pigmento fenazínico azul piocianina, se crea el color verde brillante, característico de *P. aeruginosa*, que también puede producir otros pigmentos hidrosolubles, como la piorrubina (rojo) y la piomelanina (marrón). Estas sustancias, cuya producción se ve favorecida por temperaturas menores a 37 °C y por la presencia de hierro en el medio, fueron aplicadas como marcadores fenotípicos con utilidad variable, se ha demostrado que poseen actividad antibacteriana y efecto sobre la integridad del epitelio respiratorio (Merino, 2007).



Figura 14. Pigmentos de *P. aeruginosa* PAO1.

Colonias de aislamientos hospitalarios de *P. aeruginosa*. Se aprecian los diferentes pigmentos producidos sobre agar Mueller Hinton, luego de 48 h de incubación a 28 °C (tomada de Merino 2007).

1.3.2.2 Ramnolípidos

Los ramnolípidos (RLs por sus siglas en inglés) producidos por *P. aeruginosa* son los biosurfactantes más estudiados debido a sus aplicaciones potenciales en una amplia variedad de industrias y los altos niveles de su producción. Sin embargo, se reporta que otras especies bacterianas como *Burkholderia mallei* y *B. pseudomallei*, también son productoras de ramnolípidos (Toribio et al., 2010).

La estructura de los RLs varía debido al número de fracción de ramnosa y la longitud y el número de cadena de carbono. En vista de las estructuras, los RL se pueden describir de la siguiente manera: son glucósidos compuestos principalmente de dos partes, primero una fracción de ramnosa (parte glicona) y la segunda fracción de lípidos (parte aglicona). La fracción de ramnosa de RLs está compuesta por una o dos fracciones de ramnosa unidas entre sí, que se llaman mono-RLs y di-RLs, respectivamente. La fracción lipídica, sin embargo, está compuesta por cadenas de ácidos grasos hidroxilados (saturados, mono o poliinsaturados y de longitud de cadena que varían de C8 a C16) unidas entre sí (Eslami et al., 2020).

Los RLs son glicolípidos producidos por bacterias que están involucrados en la motilidad de la superficie y el desarrollo de biopelículas, son esenciales para la motilidad bacteriana y el desarrollo de biopelículas (Chrzanowski et al., 2012; Eslami et al., 2020; Vatsa et al., 2010). Estudios diversos reportan que los RLs desencadenan una respuesta inmune en *A. thaliana* caracterizada por la acumulación de moléculas de señalización y la activación de genes de defensa. Esta respuesta inmune participa en la resistencia contra la bacteria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae pv tomat*, el oomiceto biótrofo *Hyaloperonospora arabidopsidis* y el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea*.

La resistencia mediada por RLs implica diferentes vías de señalización que dependen del tipo de patógeno. El ET está involucrado en la resistencia inducida por RLs a *H. arabidopsidis* y a *P. syringae pv tomat*, mientras que el JA es esencial para la resistencia a *B. cinerea*. El SA participa en la restricción de todos los patógenos. Actualmente se sugiere que las plantas dependientes de SA son potenciadas por los RLs después del desafío por organismos como *B. cinerea* o *P. syringae pv tomat* (Sanchez et al., 2012).

Los RLs son potentes estimuladores de la inmunidad animal (Vatsa et al., 2010). Recientemente también se ha demostrado que provocan respuestas de defensa de las plantas e inducen resistencia contra *B. cinerea* en la vid (Varnier et al., 2009). Igualmente participan en la actividad de biocontrol de la bacteria beneficiosa de la planta *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, contra los oomicetos (Perneel et al., 2008).

Los RLs desencadenan una respuesta inmune en *A. thaliana* caracterizada por la acumulación de moléculas de señalización y la activación de genes de defensa. Se ha reportado que los RLs pueden desencadenar las vías de señalización de ET, JA y SA, contra microorganismos biotróficos, hemibiotróficos y necrotróficos y que la señalización de las fitohormonas y vías de señalización como las MAPK depende del microorganismo con el que se confronte *A. thaliana*, sin embargo, se sugiere que los RLs juegan un rol central en la respuesta de defensa modulada por SA (Sanchez et al., 2012).

1.4 Elicitores de la respuesta de defensa en plantas.

Las plantas también pueden percibir estímulos externos, incluidas moléculas producidas por algunos patógenos, como RLs, CDPs o vesículas bacterianas de membrana externa (OMVs por sus siglas en inglés), que funcionan como elicitores que activan los sistemas de defensa. A través de la preexposición a pequeñas dosis de estos compuestos, las plantas pueden ser inmunizadas, reduciendo así los efectos durante los ataques de patógenos (McMillan et al., 2021; Noh et al., 2017; Sanchez et al., 2012).

1.4.1 Vesículas bacterianas de membrana externa (OMVs).

Las vesículas bacterianas de la membrana externa (OMVs por sus siglas en inglés), realizan una variedad de funciones en la supervivencia bacteriana y la virulencia. En los sistemas de mamíferos, las OMVs activan las respuestas inmunes y se explotan como vacunas. Sin embargo, poco trabajo se ha centrado en las interacciones de las OMVs con los huéspedes de las plantas (McMillan et al., 2021).

Las células de todos los reinos de la vida producen vesículas extracelulares. Las bacterias pueden usar estos "paquetes" biológicos secretados, de 40 a 200 nm de diámetro, para eliminar compuestos tóxicos como las proteínas mal plegadas, facilitar la adaptación bacteriana al cambio ambiental y el estrés, y comunicarse con su entorno utilizando mediadores insolubles (Horspool & Schertzer, 2018; Volgers et al., 2018).

En las bacterias Gram-negativas, las vesículas brotan de la membrana externa en un proceso que no daña ni debilita la membrana bacteriana (Kulp & Kuehn, 2010; Schwechheimer et al., 2013). La producción de OMVs está influenciada por muchos factores, incluida la etapa de crecimiento y el estrés, investigaciones anteriores sugieren que la producción alcanza su punto máximo durante el registro tardío y la fase estacionaria temprana y aumenta en respuesta al estrés (Orench-Rivera & Kuehn, 2016; Pathirana & Kaparakis-Liaskos, 2016).

Para los patógenos bacterianos, los estudios han demostrado que las OMVs están enriquecidas en toxinas y factores de virulencia e interactúan específicamente con, y a menudo se internalizan en, las células huésped (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Volgers et al., 2018). Las interacciones OMV-huésped pueden beneficiar a los patógenos y contribuir a su estrategia general de virulencia; sin embargo, los sistemas inmunes del huésped también detectan las OMVs y los usan como señales para activar respuestas inmunes que mejoran la capacidad del huésped para superar la infección (Caruana & Walper, 2020; Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015).

Estudios proteómicos han revelado que las OMVs de las bacterias patógenas de las plantas contienen enzimas que degradan la pared celular, componentes de la maquinaria de secreción de proteínas y efectores, ácidos nucleicos conocidos por inducir respuestas inmunes y una variedad de factores de virulencia (Kulkarni et al., 2015; Solé et al., 2015). Se ha demostrado que las OMVs de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, *X. campestris pv. campestris* y *X. oryzae pv. oryzae* y los factores de virulencia purificados de estas OMVs, desencadenan respuestas inmunes que incluyen la deposición de callosa, el aumento de la transcripción de los receptores PAMPs y la liberación de especies reactivas de oxígeno (Bahar et al., 2016; Tayi et al., 2016).

Ante la exposición a las OMVs bacterianas, las plantas pueden montar una respuesta inmune de amplio espectro, contra patógenos bacterianos y oomycetes. Esta respuesta se conserva para las OMVs de una variedad de especies bacterianas, aunque no para todas las especies, e incluye una compleja gama de respuesta inmune directa de la planta e inhibición directa del crecimiento, lo cual resulta como una herramienta útil para desacoplar el crecimiento de las plantas y la activación de la respuesta de defensa (Figura 15). El estudio de estas diferentes respuestas proporciona una visión única de cómo las plantas diferencian entre interacciones bacterianas beneficiosas, comensales y patógenas. Además, los datos revelan un nuevo y emocionante uso de las OMVs como una herramienta para desacoplar el crecimiento de las plantas y la activación de la defensa, así como la señalización y el resultado inmune (McMillan et al., 2021).

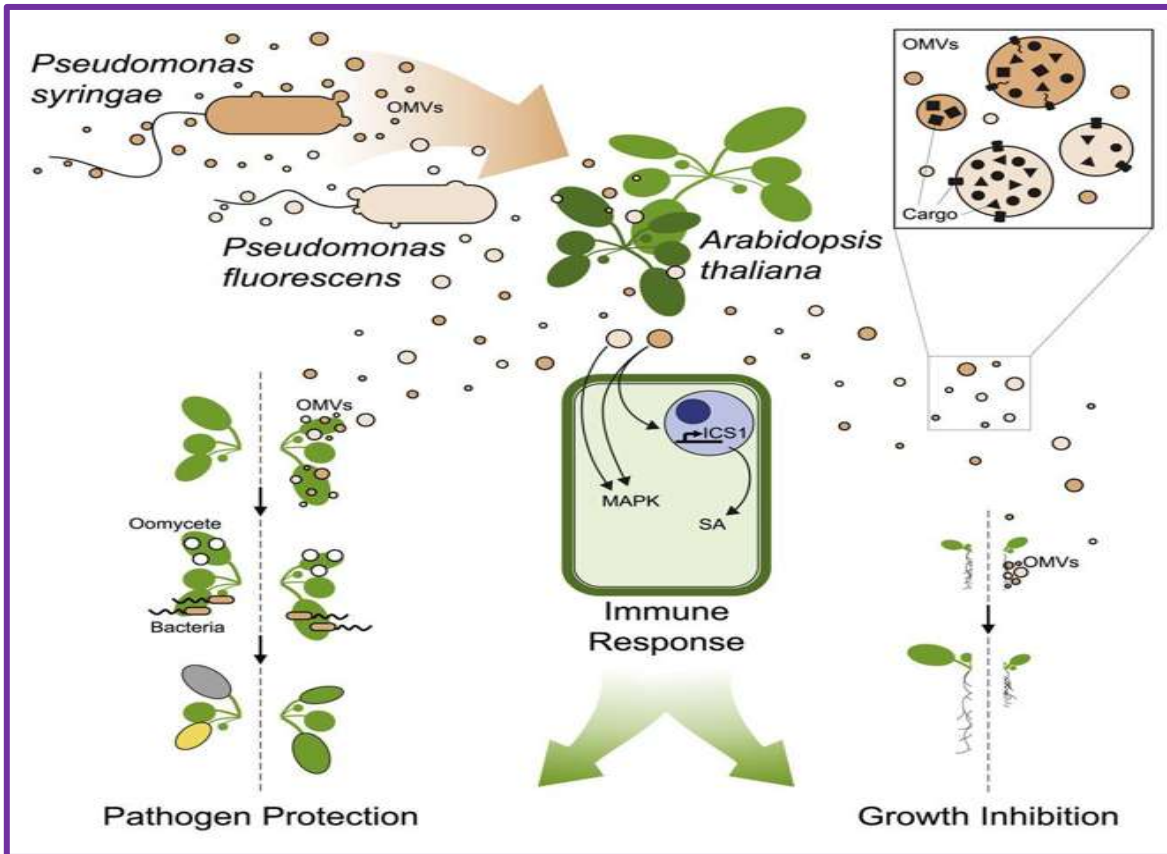


Figura 15. Efecto OMVs de patógenos, balance entre protección y crecimiento.

Efecto de OMVs sobre la respuesta de defensa de *A. thaliana* (tomada de McMillan, et al., 2021). Las vesículas de la membrana externa bacteriana (OMV) realizan una variedad de funciones en la supervivencia y virulencia bacteriana. En mamíferos, las OMV activan respuestas inmunitarias y se explotan como vacunas. Las OMV de *Pseudomonas syringae* y *P. fluorescens* activan las respuestas inmunitarias de las plantas que las protegen contra patógenos bacterianos y oomicetos. La actividad inmunomoduladora mediada por OMV de estas especies muestra una sensibilidad diferente a los factores de estrés bioquímicos, lo que refleja diferencias en el contenido de OMV. Es importante destacar que las respuestas de las plantas mediadas por OMV son distintas de las desencadenadas por epitopos bacterianos conservados y moléculas efectoras solas. Las respuestas inmunitarias protectoras inducidas por OMV son independientes del sistema de secreción tipo III (T3SS) y sus proteínas, pero la inhibición del crecimiento de plántulas mediada por OMV, depende en gran medida de los componentes proteicos.

1.4.2 Péptidos bacterianos

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR por sus siglas en inglés), que colonizan la superficie de la raíz y la rizosfera, regulan positivamente el crecimiento de las plantas y también mejoran su resistencia a las enfermedades (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Los efectos beneficiosos de las PGPR se deben principalmente a la

producción de diversos metabolitos que pueden modular directa e indirectamente la fisiología vegetal, relacionada con el crecimiento y la inmunidad (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Zamioudis & Pieterse, 2012).

La resistencia inducida a menudo se clasifica en dos grupos según los tipos de agentes biológicos causales y las vías de señalización de las plantas desencadenadas por los inductores. En primer lugar, la resistencia inducida acelerada por las PGPR generalmente aprovecha la maquinaria de señalización mediada por JA y la resistencia inducida se denomina resistencia sistémica inducida (Choudhary et al., 2007). Por otro lado, la inmunización foliar con patógenos virulentos y/o avirulentos, que inducen necrosis severa y respuesta hipersensible, respectivamente, también activa la resistencia sistémica adquirida (Ryals et al., 1996). En el caso de la SAR, las plantas necesitan acumulación de SA, tanto en tejidos sistémicos locales como distales, y generan señales móviles de larga distancia, para establecer una respuesta inmune exitosa contra la infección secundaria por patógenos (Dempsey & Klessig, 2012). Varios análisis genéticos revelan que las plantas mutantes de *Arabidopsis* defectuosas en la señalización dependiente de JA y SA, son insensibles a las aplicaciones exógenas de PGPRs y microbios inductores de SAR (Jung et al., 2009; Zamioudis & Pieterse, 2012).

La estimulación exógena de la respuesta inmune de las plantas por microorganismos, puede activar directamente las respuestas de defensa dependientes de SA y/o JA, independientemente de la infección patógena posterior (Wiesel et al., 2014). Incluso si el tratamiento confiere efectivamente resistencia a la enfermedad, se altera una asignación de energía adecuada, lo que resulta en un defecto de crecimiento en las plantas (Walters et al., 2013). Un modo diferente de acción de los microorganismos beneficiosos, es preparar a las plantas para que activen rápida y fuertemente los eventos relacionados con la defensa durante la infección por patógenos (Conrath, 2011). En este caso, las plantas no muestran ningún cambio fisiológico significativo sin infección por patógenos (Conrath et al., 2015). Por lo tanto, el cebado de la respuesta de defensa es un fenómeno notable para el manejo efectivo de las enfermedades de las plantas (van Hulten et al., 2006).

Los dipéptidos cíclicos son uno de los compuestos más simples que se derivan de bacterias a humanos (Bellezza et al., 2014). El género *Bacillus* también genera muchos CDPs conjugados con moléculas lipídicas, como iturinas, fengicina y surfactinas, que desencadenan la activación de la respuesta inmune de las plantas (Park et al., 2016). Además, los CDPs producidos por *Streptomyces sp.* y *Bacillus spp.*, tienen actividades antibacterianas y antifúngicas (Kumar et al., 2014; Wattana-Amorn et al., 2016). Estos informes sugieren fuertemente que los CDPs son buenos candidatos para el manejo de enfermedades de las plantas. Tanto un CDPs sintético, ciclo(Gly-L-Pro), como tres CDPs diferentes, ciclo(L-Ala-L-Ile), ciclo(L-Ala-L-Leu) y ciclo(L-Leu-L-Pro) aislados de *B. vallismortis* BS07, que no tienen actividad antimicrobiana directa *in vitro*, requieren ciertas proteínas importantes para las respuestas de defensa dependientes de SA y/o JA para inhibir con éxito el crecimiento de bacterias en *Arabidopsis*. Además, el tratamiento exógeno de estos CDPs puede preparar a las plantas para que expresen fuertemente el gen PR4, involucrado en la defensa relacionada con JA en *Arabidopsis* (Noh et al., 2017).

2. ANTECEDENTES.

2.1 CDPs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 como elicitores de la respuesta de defensa en plantas.

En nuestro grupo de trabajo se ha reportado que *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 produce cuatro ciclodipéptidos (PAO1-CDPs), ciclo(L-Pro-L-Phe), ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Leu), que son sintetizados a través de las péptido sintetetasas no ribosomales (O. González et al., 2017), los cuales han sido reportados por su actividad similar a la auxina de aumentar la biomasa radicular y foliar en *A. thaliana* con la participación de la vía AtTOR-S6K (González et al., 2017; González-López et al., 2021; Ortiz-Castro et al., 2011). Además, se determinó que los PAO1-CDPs influyen en la detección del quórum sensing (González et al., 2017). También se ha reportado que los PAO1-CDPs promueven el crecimiento y desarrollo del maíz, a través de la vía de señalización TOR/S6K, como un mecanismo de crecimiento de la planta y desarrollo de raíces en la interacción planta-microorganismo (Corona-Sánchez et al., 2019).

Otros reportes del grupo sugieren que los CDPs-PAO1 tienen potencial anticancerígeno, por su efecto citotóxico sobre líneas celulares HeLa (cáncer cervicouterino) y CaCo (cáncer colorrectal) (Vázquez-Rivera et al., 2015). Además, se dilucidó que el efecto antiproliferativo de los PAO1-CDPs es a través de la vía de señalización de mTOR-PI3K-AKT-S6K, evitando la fosforilación de las cinasas AKT y S6K, donde también hay participación del complejo mTORC1/C2, bloqueando las proteínas cinasas de múltiples vías de señalización involucradas en la supervivencia, proliferación, invasividad, apoptosis, autofagia y metabolismo energético, como PI3K/Akt /mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK1/2, PI3K /JNK/PKA, p27Kip1/CDK1/ survivin, MAPK, HIF-1, Wnt/ β -catenina, HSP27, EMT, CSC y receptores, como EGF/ErbB2/HGF Met (Hernández Padilla, 2016; Hernández-Padilla et al., 2017, 2020).

Además, se ha reportado que los PAO1-CDPs disminuyeron el tamaño del melanoma y la formación de tumores en un modelo de melanoma de ratón xenoinjertado subcutáneo, donde los PAO1-CDPs aceleraron la muerte de las células de melanoma murino B16-F0. En ratones, el efecto antitumoral mejoró mediante el tratamiento con PAO1-CDPs que utilizaron ciclodextrinas como vehículo farmacológico. En los tumores, los PAO1-CDPs causaron fragmentación nuclear y cambiaron la expresión de los marcadores apoptóticos Bcl-2 y Ki67 y promovieron la restauración de la hiperactivación de la vía PI3K/Akt/mTOR (Durán-Maldonado et al., 2020). Lo anterior, demuestra que los PAO1-CDPs producidos por *P. eruginosa* PAO1 tienen diferentes potenciales. *P. euroginosa*, clasificada como un organismo hemibiotrófico, produce múltiples factores de virulencia y afecta a *A. thaliana* mediante la producción de biopelícula y ramnolípidos. En este trabajo se sugiere que los PAO1-CDPs pueden tener un efecto elicitor igual al de CDPs producidos por otros microorganismos, como *Streptomyces sp.*, *Bacillus spp* y *B. vallismortis* BS07.

Realmente poco se sabe acerca del potencial de los PAO1-CDPs como elicitores de la respuesta inmune de las plantas, sin embargo, en este trabajo se pretende elucidar el tipo de respuesta de defensa que activan, así como el de sus factores de virulencia, como piocianina y ramnolípidos, sobre *A. thaliana*, donde pueden estar involucradas las capas de defensa SAR y SIR, así como la señalización de diversas fitohormonas, como JA, SA y ET, lo cual puede

incluir la participación de vías de señalización de proteínas cinasas como MAPK3/MPK6 y AtTOR-S6K, desencadenando la activación de genes de respuesta a patógenos como *PR-1* y *LOX2*. Al respecto, se sabe que la sobreexpresión de TOR en plantas produce un efecto negativo durante los ataques de patógenos, lo que resulta en plantas más dañadas. Por el contrario, la inhibición de TOR reduce el daño patógeno (Figura 16) (De Vleeschauwer et al., 2016; Vleeschauwer et al., 2018; Zanetti & Blanco, 2017).

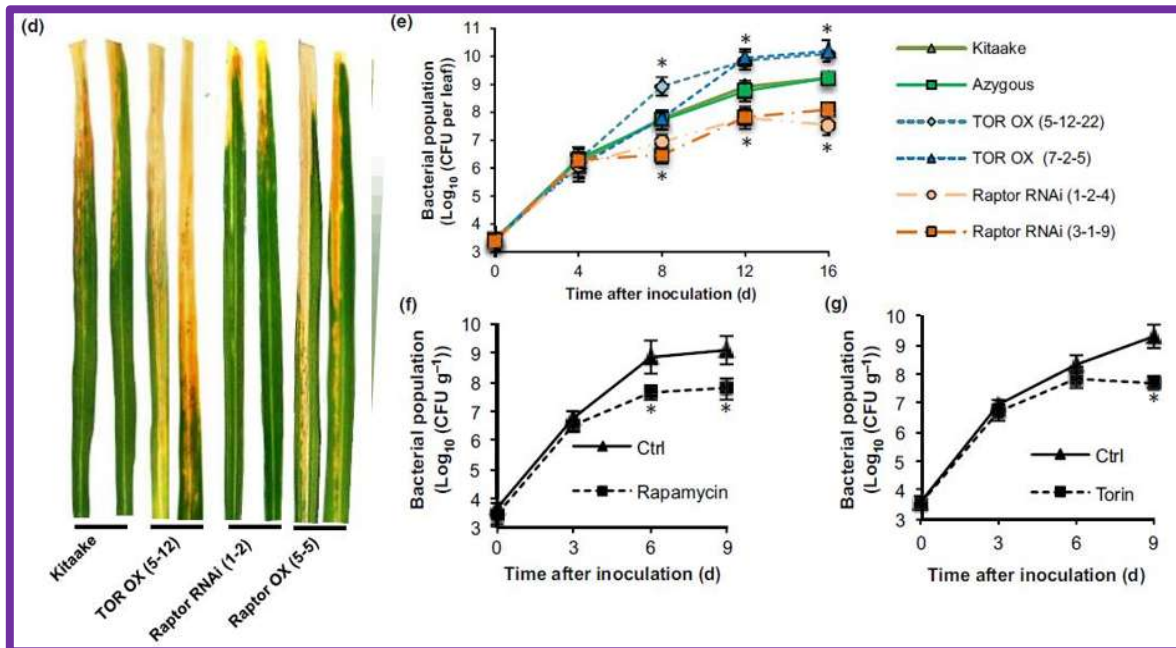


Figura 16. Participación de TOR en la modulación del sistema inmune en plantas (tomado de De Vleeschauwer, et al., 2017).

OsTOR induce la susceptibilidad al patógeno bacteriano del tizón de la hoja *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Todas las plantas de la progenie T1 se inocularon con la cepa PXO99 virulenta de Xoo utilizando el método de recorte de hojas y 12 días después de la inoculación se midió la longitud de las lesiones. Los resultados muestran que la salida de señalización del objetivo de la rapamicina (TOR) está inversamente correlacionada con la resistencia a Xoo. Se tomaron fotografías que ilustran los síntomas representativos de la enfermedad 12 días después de la inoculación y se muestran en (d). Poblaciones de Xoo PXO99 en Kitaake, un control de transgén nulo y dos líneas independientes de ARNi T2 TOR OX y Raptor (proteína asociada a la regulación de mTOR) a los 0-16 días después de la inoculación (e). Los datos que se muestran son medias \pm SD de tres réplicas de al menos dos hojas agrupadas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en relación con las muestras de Kitaake para cada punto de tiempo por separado (Duncan, $\alpha \leq 0.05$). Para analizar el bloqueo de la señalización de Xoo en plantas de tipo salvaje (f, g). Se separaron las dos hojas más jóvenes completamente desarrolladas de plantas de Kitaake de 6 semanas de edad, se inocularon con PO99 y se flotaron en soluciones acuosas que contenían dimetilsulfóxido (DMSO) o inhibidores de TOR. Las densidades bacterianas se determinaron a intervalos de 3 días. Los datos son medias \pm SD de tres réplicas de cuatro hojas agrupadas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en relación con las muestras control de Kitaake (Duncan, $\alpha \leq 0.05$). Una repetición del experimento arrojó resultados similares. UFC, unidades formadoras de colonias.

3. JUSTIFICACIÓN.

Los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 regulan su sistema de QS y este a su vez la producción de factores de virulencia como piocianina (PC) y ramnolípidos (RLs). Se ha reportado que los PAO1-CDPs modifican la arquitectura de *A. thaliana* a través la vía de AtTOR, sin embargo, se desconoce si la vía de MAPKs puede estar involucrada en estos procesos, específicamente un módulo donde participan MPK3/MPK6. También se desconoce si en *A. thaliana* los PAO1-CDPs activan genes de defensa, como *PR-1* y *LOX2*, asociados a SA y JA respectivamente. Para abordar estas preguntas, es importante el estudio del efecto de mutantes NRPS afectadas las en producción de CDPs, sobre las respuestas de defensa de las plantas.

4. HIPOTESIS.

La producción de CDPs modifica la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1, actuando como elicitores de la respuesta inmune de *A. thaliana* a través de las vías AtTOR y MPK3/MPK6.

5. OBJETIVO GENERAL.

Analizar la participación de las vías de señalización MAP cinasas y AtTOR en la respuesta inmune de *A. thaliana* ante la patogenicidad de una cepa *P. aeruginosa* PAO1 modificada en la producción de CDPs.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1: Evaluar la respuesta inmune de *A. thaliana* ante la patogenicidad de una cepa de *P. aeruginosa* PAO1 modificada en la producción de CDPs.

2: Determinar la participación de las vías de MAP cinasas y/o AtTOR en las respuestas de *A. thaliana* ante la patogenicidad de una cepa de *P. aeruginosa* PAO1 modificada en producción de CDPs.

6. RESULTADOS.

6.1. Resultados publicados

Los resultados más relevantes de este trabajo y la discusión de los mismos están incluidos en la siguiente publicación internacional (archivo adjunto):

Solis-Ortiz, C. S., González-Bernal, J., Kido-Díaz, H. A., Peña-Uribe, C. A., López-Bucio, J. S., López-Bucio, J., ... & de La Cruz, H. R. (2022). Bacterial cyclodipeptides elicit *Arabidopsis thaliana* immune responses reducing the pathogenic effects of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ambB/pvdl and PA4078/pvdl strains on plant development. *Journal of Plant Physiology*, 153738.

El archivo electrónico de esta publicación, incluyendo los materiales suplementarios, pueden consultarse directamente en el siguiente enlace:

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153738>

Journal of Plant Physiology 275 (2022) 153738

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jplph

Bacterial cyclodipeptides elicit *Arabidopsis thaliana* immune responses reducing the pathogenic effects of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains on plant development

Cristhian Said Solis-Ortiz^a, Javier Gonzalez-Bernal^b, Héctor Antonio Kido-Díaz^a, Cesar Arturo Peña-Uribe^b, Jesús Salvador López-Bucio^b, José López-Bucio^b, Angel Arturo Guevara-García^c, Ernesto García-Pineda^d, Javier Villegas^e, Jesús Campos-García^{f,*}, Homero Reyes de La Cruz^{g,*,**}

^a Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, México

^b Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, México

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 52250, Cuernavaca, Morelia, México

^d Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de Plantas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, México

^e Laboratorio de Reservación Sucho Plantea Microorganismos, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, México

^f Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, México

^g Corresponding author. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif-03, Ciudad Universitaria, 58030, Morelia, Michoacán, México.

** Corresponding author.
E-mail addresses: jesus.campos@umich.mx (J. Campos-García), homero.reyes@umich.mx (H. Reyes de La Cruz).

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153738>
Received 7 December 2021; Received in revised form 27 May 2022; Accepted 27 May 2022
Available online 31 May 2022
0176-1617/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.

ARTICLE INFO

Keywords:
Cyclodipeptides
Immune response
MAP kinases
TOR protein
Plant pathogen interactions

ABSTRACT

Plants being sessile organisms are exposed to various biotic and abiotic factors, thus causing stress. The *Pseudomonas aeruginosa* bacterium is an opportunistic pathogen for animals, insects, and plants. Direct exposure of *Arabidopsis thaliana* to the *P. aeruginosa* PAO1 strain induces plant death by producing a wide variety of virulence factors, which are regulated mainly by quorum sensing systems. Besides virulence factors, *P. aeruginosa* PAO1 also produces cyclodipeptides (CDPs), which possess auxin-like activity and promote plant growth through activation of the target of the rapamycin (TOR) pathway. On the other hand, plant defense mechanisms are regulated through the production of phytohormones, such as salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), which are induced in response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), activating defense genes associated with SA and JA such as PATHOGENESIS-RELATED-1 (PR-1) and Lipoxygenase (LOX2), respectively. PR proteins are suggested to play critical roles in coordinating the Systemic Acquired Response (SAR). In contrast, LOX proteins (LOX2, LOX3, and LOX4) have been associated with the production of JA by producing its precursors, oxylipins. The activation of defense mechanisms involves signaling cascades such as Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) or the TOR pathway as a switch for re-directing energy towards defense or growth. In this work, we challenged *A. thaliana* (wild type, *map3* or *map3* mutants, and overexpressing TOR) seedlings with *P. aeruginosa* PAO1 strains to identify the role of bacterial CDPs in the plant immune response. Results showed that the pre-exposure of these *Arabidopsis* seedlings to CDPs significantly reduced plant infection of the pathogenic *P. aeruginosa* PAO1 strains, indicating that plants that over-express TOR or lack MAPK/MPK6 protein-kinases are more susceptible to the pathogenic effects. In addition, CDPs induced the GLS activity only in the LOX2-GLS plants, indicative of JA-signaling activation. Our findings indicate that the CDPs are molecules that trigger SA-independent and JA-dependent defense responses in *A. thaliana*; hence, bacterial CDPs may be considered elicitors of the *Arabidopsis* immune response to pathogens.

1. Introduction

Plants being sessile organisms are exposed to different external factors that produce stress. Plant stress can be classified as biotic and abiotic depending on its nature. Abiotic stresses include water stress, mechanical stress, high and low temperatures, and nutrient deficiencies, among others, while biotic stress is produced by a wide variety of microorganisms, including necrotrophic ones, such as *Borytis cinerea* (AbuQamar et al., 2017; Fujita et al., 2006; Nie et al., 2017), biotrophic ones, such as *Cladosporium fulvum* (Doehlemann and Hemetsberger, 2013), and hemibiotrophic ones, such as *P. aeruginosa* (Rudrappa and Bais, 2008). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is listed as an opportunistic pathogen in humans (Dubern et al., 2015) and also has a high mortality rate in plants (Chahtane et al., 2018; Rudrappa and Bais, 2008). *P. aeruginosa* produces various virulence factors that provide an efficient colonizing capability (Rudrappa and Bais, 2008). Some of the virulence factors produced by the *P. aeruginosa* PAO1 strain are rhamnolipids, pyocyanin, flagellin, biofilm, catalase, alkaline protease, elastase, and lecithin, among others (Smith and Iglewski, 2003). The quorum sensing (QS) systems regulate the production of all these compounds, which also coordinates biological processes such as symbiosis, resistance to oxidative stress, and resistance to antibiotics (Ahator and Zhang, 2019; Papenfort and Bassler, 2016; Waters and Bassler, 2005). Virulence factors, such as protease and flagellin, have been described as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Ramirez-Prado et al., 2018), recognized by surface-localized pattern recognition receptors (PRRs) (Ranf, 2017), and triggering the activation of different Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) modules, where MPK3/MPK6 and MPK4 are part of these MAPK pathways (Withers and Dong, 2017; Zhang et al., 2018), which in turn promotes the expression of response genes to pathogens such as *PATHOGENESIS-RELATED-1 (PR-1)* or *LIPOXYGENASE2 (LOX2)* (Criollo-Arteaga et al., 2021; Santino et al., 2013). The MAPK module containing MPK3/MPK6 proteins is considered a positive regulator of the plant defense response, whereas the module that contains MPK4 is regarded as a negative regulator (Pitzschke et al., 2009). The MAPK pathway is related to plant development and growth (López-Bucio et al., 2019; Xu and Zhang, 2015), but it is also one of the main signaling pathways involved in the defense response of plants. The *A. thaliana* genome encodes for 80 MAPK kinase-kinase (MAPKKK), 10 MAPK kinases (MAPKK), and 20 MAPK, which form functional MAPK modules containing at least one of each, and are activated by phosphorylation (Meng and Zhang, 2013; Pecher et al., 2014; Pitzschke et al., 2009).

MAPK signaling has been related to the production and signaling of salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and Ethylene (ET), the three major plant hormones involved in the plant defense responses (Lin et al., 2021; Shigenaga and Argueso, 2016). The plant immunity system comprises multiple layers, such as pattern-triggered immunity (PTI) activated by PAMPs and effector-triggered immunity (ETI) triggered by a variety of effector proteins deployed by pathogens (Jones and Dangl, 2006; Nguyen et al., 2021; Seyfferth and Tsuda, 2014). PTI is sufficient to suppress disease development by impeding pathogen colonization. However, some pathogens can disrupt PTI; plants, in turn, have adapted to recognize their effector proteins and trigger ETI (De Vleeschauwer et al., 2018). Upon PAMP recognition, reactive oxygen species and intracellular calcium influx are generated, and a transient activation of MAPKs and the production of SA occurs (Seyfferth and Tsuda, 2014; Tsuda and Katagiri, 2010). These processes trigger the hypersensitive response (HR) and, subsequently, the systemic acquired response (SAR) (Bigeard et al., 2015; Thomma et al., 2011). Plant systemic resistance can be divided into SAR, induced by pathogenic microbes and insects, and induced systemic resistance (ISR), mediated by beneficial microbes living in the rhizosphere (Romera et al., 2019). It is commonly accepted that SAR is a SA-dependent plant defense, featured by the accumulation of SA and activation expression of PR genes and that ISR is dependent on JA and ET pathways. Nevertheless, multiple reports have demonstrated

activation of both SA and JA/ET signaling pathways in ISR triggered by beneficial microbes, revealing the complexity and diversity of signal pathways involved in ISR (Yu et al., 2022). Another signaling pathway involved in plant defense responses against pathogenic microorganisms is the target of the rapamycin (TOR) pathway (Margalha et al., 2019; Petersen and Nurse, 2007), which has been commonly linked to plant development and growth (Hall, 2016; Sabatini, 2017). It has been extensively documented that the TOR pathway is the transducer of signals from external stimuli such as nutrient availability, phytohormones, light exposure, and stress, among others (Albert and Hall, 2015; Dobrenel et al., 2016; Rexin et al., 2015). TOR protein is conserved in all eukaryotes. In mammals, TOR is present in two complexes: mTORC1 and mTORC2. mTORC1 is defined by its three main components: mTOR, Raptor (regulatory protein associated with mTOR), and mLST8 (mammalian protein 8 Sec13, also known as GβL). mTORC2 also contains mTOR and mLST8; however, instead of Raptor, mTORC2 contains Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) (John et al., 2011; Sabatini, 2017; Shi et al., 2018). To date, only the mTORC1 analog complex has been reported in plants. The AtTORC1 complex consists of AtTOR, LST8, FKBP12, and RAPTOR (Sabatini, 2017; Shi et al., 2018). Recent reports in plants show that TOR works as a switch in conjunction with SnRK1, redirecting energy to defense or development and growth responses. If TOR is active, SnRK1 becomes inactivated, and vice versa. If SnRK1 inactivates TOR, defense responses against biotic stress, such as RNA silencing, SA and JA production, HR programmed cell death, defense gene activation, and autophagy, will be triggered in plants (Margalha et al., 2019; Zanetti and Blanco, 2017). Under biotic stress, expression of the genes *PR-1* or *LOX2* is associated with SA and JA signaling activation, respectively (Seyfferth and Tsuda, 2014; Rubil et al., 2022; Yuan et al., 2019). Autophagy activation and abscisic acid (ABA) production activate SnRK2, which in turn inactivates TOR, and consequently the mechanisms regulated by TOR (Margalha et al., 2019; Zanetti and Blanco, 2017). Overexpression of TOR in plants produces a negative effect during pathogen attacks, resulting in more damaged plants. Conversely, TOR inhibition reduces pathogen damage (De Vleeschauwer et al., 2016; Zanetti and Blanco, 2017).

Plants that adequately activate their immune system respond efficiently to pathogenic stimuli, which is considered the key response for survival (McMillan et al., 2021). Plant defense systems are intricate mechanisms that activate networks of signaling pathways to respond specifically to lethal threats caused by pathogenic organisms, triggering HR and cell death (Macho and Zipfel, 2014; Ramirez-Prado et al., 2018). In addition, it has been reported that plants can also perceive external stimuli, including molecules produced by some pathogens, such as rhamnolipids, microbial peptides, or bacterial outer membrane vesicles (OMVs) that function as elicitors that activate the defense systems. Through pre-exposure to small doses of these compounds, plants can be immunized, thus, reducing the effects during pathogen attacks (McMillan et al., 2021; Noh et al., 2017; Sanchez et al., 2012). *P. aeruginosa* PAO1 produces four CDPs, cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Leu), cyclo(L-Pro-L-Tyr), and cyclo(L-Pro-L-Phe), which have been reported for their auxin-like activity of increasing root and foliar biomass in *A. thaliana* with the involvement of the AtTOR-S6K pathway (González et al., 2017; González-López et al., 2021; Ortiz-Castro et al., 2011). Therefore, in the present work, we investigated whether the CDPs produced by *P. aeruginosa* PAO1 can also function as elicitors, the involvement of the JA and SA phytohormones, and the MAPKs and AtTOR signaling pathways in the plant immune response.

2. Results

2.1. Pre-exposure of *A. thaliana* to CDPs reduces the pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1

Plant-pathogen interaction experiments without (Fig. 1) and with pre-exposition of plants to bacterial CDPs (Fig. 2) were conducted to

elucidate whether pre-exposure of *A. thaliana* seedlings to CDPs decreased the negative effects (plant growth inhibition and plant damage) of pathogenic *P. aeruginosa* PAO1 strains. In addition, in our interaction approach to elucidate the participation of MAPK and TOR signaling pathways in pathogen recognition and plant immunity activation, we used the *Arabidopsis mpk6* mutant and a line overexpressing TOR (oxTOR). Regarding *P. aeruginosa* strains, in addition to the PAO1 wild type (WT), PAO1-derived double mutants *ambB/pvdI* (*ambB*/*pvdI*) and *PA4078/pvdI* (*PA4078*/*pvdI*) were utilized to compare with the effects of the non-pathogenic double mutant *rhlI/lasI* (*rhlI*/*lasI*) strain. The *ambB/pvdI* and *PA4078/pvdI* are pathogenic double mutants with altered production of CDPs and increased production of virulence factors, obtained in our workgroup by interrupting both of the indicated genes, which encode for putative non-ribosomal peptide synthase (NRPS) (unpublished data). The *rhlI/LasI* double mutant was reported to have increased CDPs production and reduced virulence factors

production (Ortiz-Castro et al., 2011). The results showed that, as expected, the pathogenic strains affected *Arabidopsis* growth and induced plant damage compared with non-inoculated control and *rhlI/lasI* inoculated seedlings (Fig. 1). When seedlings were pre-exposed to CDPs isolated from the PAO1 WT and then inoculated with the *P. aeruginosa* strains, a decrease in the negative effects was observed in all *Arabidopsis* lines (Fig. 2), indicating that the CDPs elicit plant defense against the bacterial pathogenic attack. The results also show that *Arabidopsis* seedlings that overexpress TOR or the *mpk6* mutant are more susceptible to the negative effects of *P. aeruginosa* strains *ambB/pvdI*, highlighting the relevance of the MAPK and AtTOR pathways in plant defense responses against this mutant. Both plant lines (oxTOR and *mpk6*) treated with this strain show an increased number of plants with lesions. The oxTOR plants have an increased CFU/mL with all the strains used except for *ambB/pvdI* compared with Col-0 plants.

A CDPs sample extracted from the *P. aeruginosa* PAO1 strain was

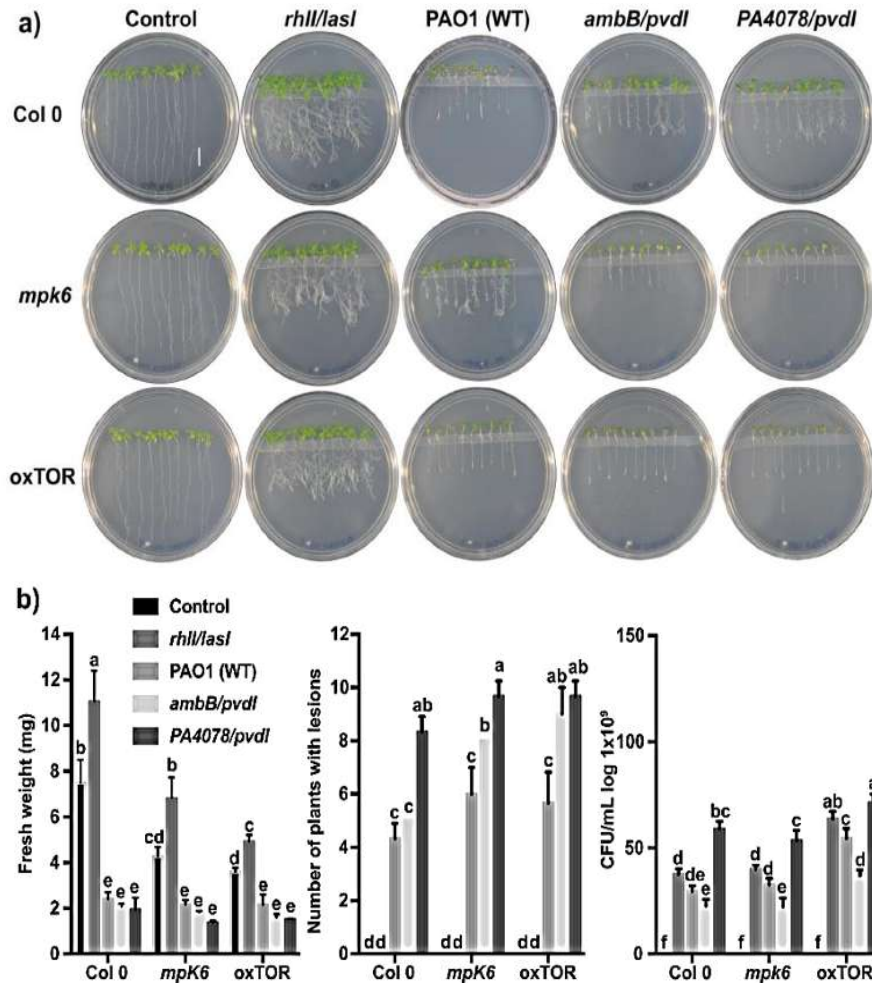


Fig. 1. Effect of *P. aeruginosa* strains on *A. thaliana* lines, Col-0, *mpk6*, and oxTOR. *Arabidopsis* lines were confronted with the indicated *P. aeruginosa* PAO1 strains. The seeds of all *Arabidopsis* lines were germinated in MS medium and transferred (7 days) to Petri dishes, where streaks of PAO1 (WT), *rhlI/lasI*, *ambB/pvdI*, and *PA4078/pvdI* strains (2.5×10^8 CFU) were placed. a) representative photographs of plants grown for 12 days with the bacterium, scale bar = 1 cm. b) Graphics of plants' fresh weight, number of plants with lesions, and bacterial CFU data. The values represent the mean \pm standard deviation (n = 10). A 2-way ANOVA with a post hoc Tukey test was performed on the data; letters represent a significant statistical difference (P ≤ 0.05). The experiment was repeated thrice.

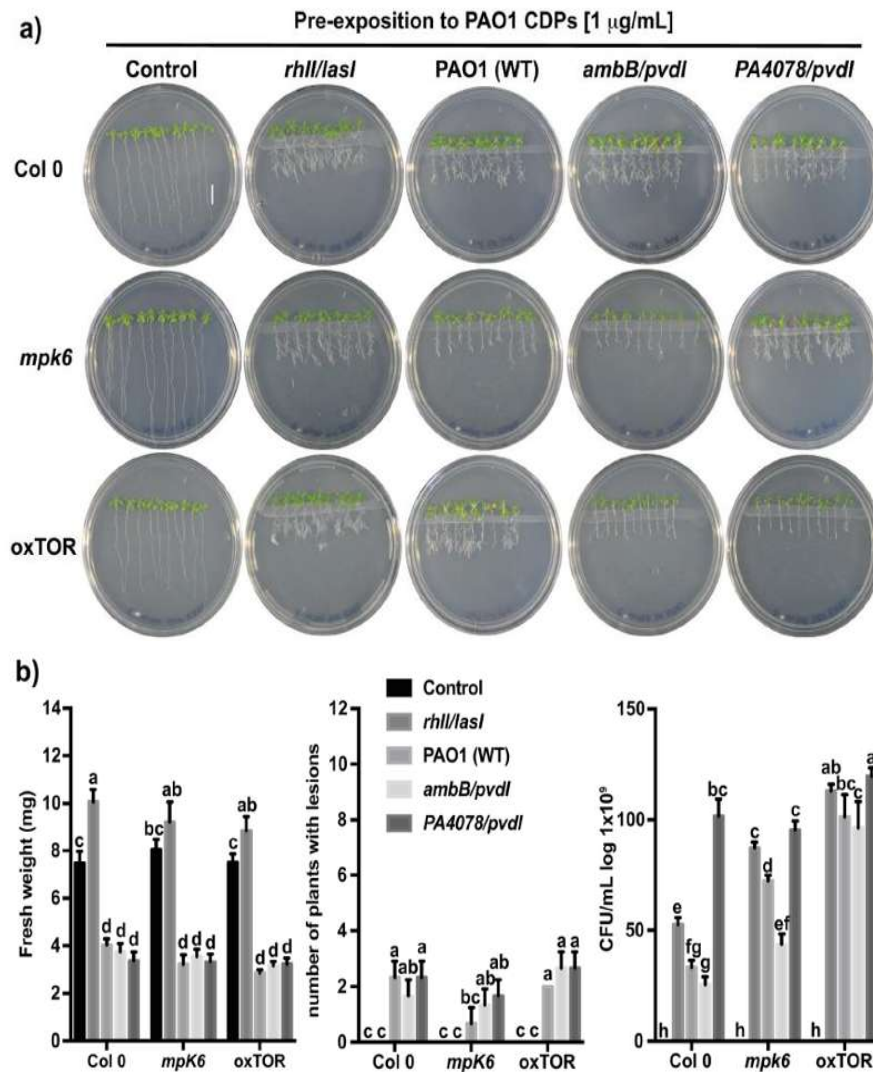


Fig. 2. The negative effect of pathogenic *P. aeruginosa* on *A. thaliana* decreases with pre-exposure to CDPs. The Col-0, *mpk6*, and *oxTOR* *Arabidopsis* lines were germinated and grown for five days, and then the plants were placed in an MS medium supplemented with 1 $\mu\text{g/mL}$ CDPs and grown for 2 days. After this, the plants were transferred to Petri dishes, where streaks of PAO1 (WT), *rhII/lasI*, *ambB/pvdI*, and PA4078/*pvdI* strains (2.5×10^6 CFU) were placed. a) Representative photographs of plants grown for 12 days with the bacterium, scale bars = 1 cm. b) Graphics of plants' fresh weight, number of plants with lesions, and bacterial CFU/mL data. The values represent the mean \pm standard deviation ($n = 10$). A 2-way ANOVA with a post hoc Tukey test was performed on the data; letters represent the significant statistical difference ($P \leq 0.05$). The experiment was repeated thrice.

fractionated by column chromatography, and the fractions were tested for their capacity to elicit plant defense (Fig. S1). We found that the CDPs mixture diminished the plant damage caused by the *P. aeruginosa* strains, and all the fractions tested reduced the damage caused by the PAO1 WT strain. However, with the *ambB/pvdI* and PA4078/*pvdI* strains, only the CDPs mixture reduced the damage on *Arabidopsis* 2.2. The AtTOR pathway is involved in plant responses triggered by *P. aeruginosa*

The AtTOR pathway has been described to play important roles in

regulating plant defense responses, suggesting that AtTOR redirects development and growth energy to trigger the plant defense responses (Margalha et al., 2019). In this way, TOR activation indicates plant growth, whereas plant defense responses imply TOR inactivation. The S6K protein is one of the AtTOR targets, and its phosphorylation level is indicative of TOR pathway activation. For this reason, the S6K phosphorylation was detected compared with control seedlings (without bacterial inoculum). On the other hand, Col-0 plants treated with the double mutant in the QS systems *rhII/lasI*, a strain with decreased production of virulence factors and overproduction of CDPs, showed S6K

phosphorylation levels similar to control plants but higher than the pathogenic PAO1 and *ambB/pvdI* strains (Fig. 3). These results further confirm the involvement of the AtTOR pathway in plant responses to pathogenic bacteria.

2.3. MPK3 and MPK6 activity are regulated during plant-pathogen interaction

In the presence of PAMPs, some modules of MAPK signaling cascades are related to defense responses in plants. The module that consists of MEK1 (a MAPK3K), MKK4/5 (a MAPKK), and finally MPK3/MPK6 (a MAPK) has been described as a positive regulator of the defense responses activated by protease, which is recognized by a sensor attached to the plant cell's membrane. MPK3 and MPK6 are reported as homologous proteins with redundant MAPK functions (Zhang et al., 2018). To elucidate the participation of MAPKs signaling cascades in the *A. thaliana* defense response observed against the *P. aeruginosa* bacterium, confrontation assays using the *Arabidopsis mpk3* and *mpk6* mutant lines were carried out, determining the phosphorylation activity of MPK3 and MPK6 kinases. Results did not show significant differences between the growth of *mpk3* and *mpk6*, even after pre-exposure of plants to CDPs (Fig. S3). However, in the kinase assay in protein extracts of *Arabidopsis* seedlings, the co-inoculation of the *P. aeruginosa* PAO1 WT and its mutant *ambB/pvdI* caused an increased activity of MPK3 and MPK6 compared with untreated (control) plants, contrary to the *rhlI/lasI* strain that provoked a decrease in MPK6 activity and inhibition of MPK3 activity (Fig. 4). In addition, a minor level of phosphorylation was observed in both MPK3 and MPK6 in seedlings co-inoculated with the mutant strain PA4078/pvdI. These results suggest that both MAPKs are involved in sensing the virulence factors produced by the pathogenic *P. aeruginosa* PAO1 strain.

2.4. Effect of *P. aeruginosa* strains on SA and JA pathways

Phytohormones, such as SA, JA, and ET, are closely related to plant defense responses during plant-pathogen interaction. The PR-1 and LOX2 proteins are related to SA and JA signaling activation, respectively

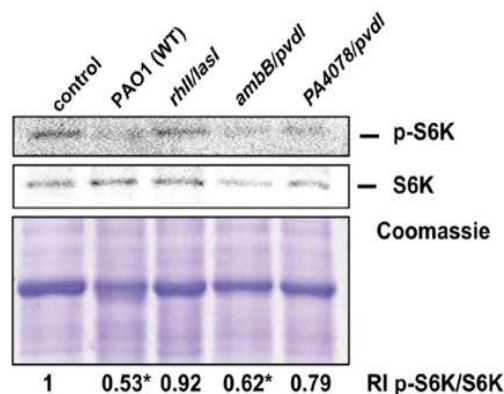


Fig. 3. Effects of *P. aeruginosa* strains on AtTOR pathway activity. The seeds of *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants were grown in MS medium and transferred (7 days) to Petri dishes, where streaks of PAO1 WT, *rhlI/lasI*, *ambB/pvdI*, and PA4078/pvdI strains (2.5×10^8 CFU) were placed. After 12 days of growth in the bacteria, plants were collected and protein extracts prepared, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by protein gel blot hybridization using anti-AtS6K-phosphorylated (Thr449)(upper panel) or anti-AtS6K (middle panel) antibodies. The images correspond to representative membranes of three independent treatments. The lower panel corresponds to the Coomassie-stained gel. The numbers represent gel dot bands' relative intensity (RI) (p-S6K/S6K). The asterisk denotes statistical differences with the control.

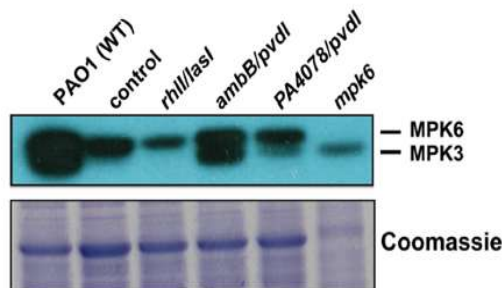


Fig. 4. In-gel kinase assay of MPK3 and MPK6 from plants confronted with *P. aeruginosa* strains. Plants of *A. thaliana* Col-0 were confronted for 10 days against PAO1 (WT), *rhlI/lasI*, *ambB/pvdI*, and PA4078/pvdI strains, followed by protein extraction, and finally, an in-gel kinase assay using Myelin Basic Protein (MBP) as a substrate to analyze the activity of MPK3 and MPK6 (upper panel). The *mpk6* line corresponds to proteins extracted from the *mpk6* mutant plant grown under control conditions. The test was conducted on 60 plants per treatment. The experiment was repeated twice. The lower panel corresponds to the Coomassie-stained gel.

(Rubil et al., 2022). These proteins regulate the plant immune responses associated with PTI and ETI (Naveed et al., 2020). The activation of SA and JA is related to SAR, and on the other hand, the activation of JA and ET is associated with ISR. The production of these phytohormones is dependent on MAPK activation, although it has also been reported that JA production is related to the TOR pathway (Song et al., 2017). To establish the mechanisms involved in the plant responses to *P. aeruginosa* strains, GUS activity assays were performed using *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* *Arabidopsis* transgenic lines, which were treated with cultures of bacterial strains, or with cell-free supernatants (Fig. 5). As expected, the cultures of the PAO1, *ambB/pvdI*, and PA4078/pvdI strains and their supernatants showed increased β -glucuronidase activity in both the transgenic *Arabidopsis* lines *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS*, which is indicative of SA and JA signaling activation (Fig. 5C-E, H-J, M-O, R-T), contrary to the control seedlings and the ones co-inoculated with the non-pathogenic *rhlI/lasI* strain (Fig. 5A-B, K-L). Although a slight increase in GUS activity was observed in the cell-free supernatant of the *rhlI/lasI* strain in both the transgenic lines (Fig. 5G, Q), this could be due to the fact that although this strain has a reduced capacity, it still can produce virulence factors.

2.5. Effect of purified CDPs from *P. aeruginosa* PAO1 on PR-1 and LOX-2 expression

To gain insights into whether the CDPs induce SA and JA signaling activation, the transgenic *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* *Arabidopsis* plants were treated with a purified CDPs mixture extracted from the *P. aeruginosa* PAO1 WT strain cultures (Fig. 6). Results showed that the CDPs mixture did not induce the *PR-1::GUS* marker, suggesting the lack of SA signaling activation (Fig. 6A-L). However, the CDPs mixture induced *LOX2::GUS* expression in a dose- and time-dependent manner (Fig. 6M-X), indicating the activation of the JA pathway. The purified CDPs mixture was fractionated (see Materials and Methods), and three of the fractions obtained (F2, F3, and F5) and a mix of these fractions (FM) were tested for their capability of inducing *PR-1* or *LOX2* expression. We also found that all the CDPs fractions tested activated the expression of *LOX2* (Fig. 7B) but not that of *PR-1* (Fig. 7A).

3. Discussion

Cyclodeptides have been described to participate in the quorum-sensing systems of *P. aeruginosa* PAO1 (Ahator and Zhang, 2019) and are also involved in promoting plant growth through the TOR pathway

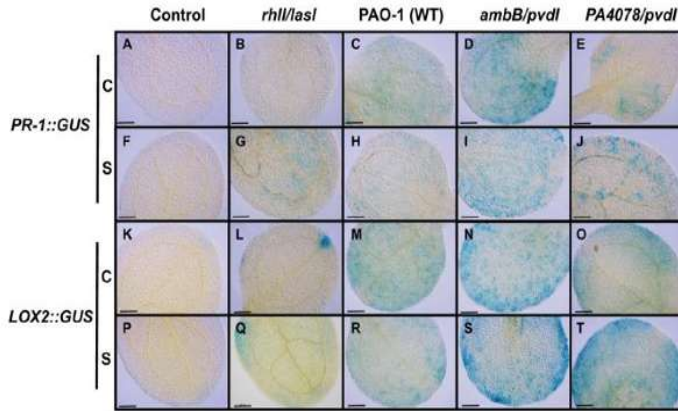


Fig. 5. Activation of salicylic acid (SA) or jasmonic acid (JA) pathways by *P. aeruginosa* strains. The effect of PAO1 and its mutants strains on SA and JA pathways was reviewed using the *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* transgenic lines, respectively. *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* plants were treated without (Control) or with cultures (C) and cell-free supernatants (S) of PAO1, *rhII/lasI*, *ambB/pvdI*, and *PA4078/pvdI* for a time of 12 h, and GUS activity analysis were performed. (A–E) *PR-1::GUS* vs. bacterial cultures; (F–J) *PR-1::GUS* vs. cell-free supernatants; (K–O) *LOX2::GUS* vs. bacterial cultures; (P–T) *LOX2::GUS* vs. cell-free supernatants. The photographs are representative of a total of three photographs per treatment, scale bars = 200 µm.

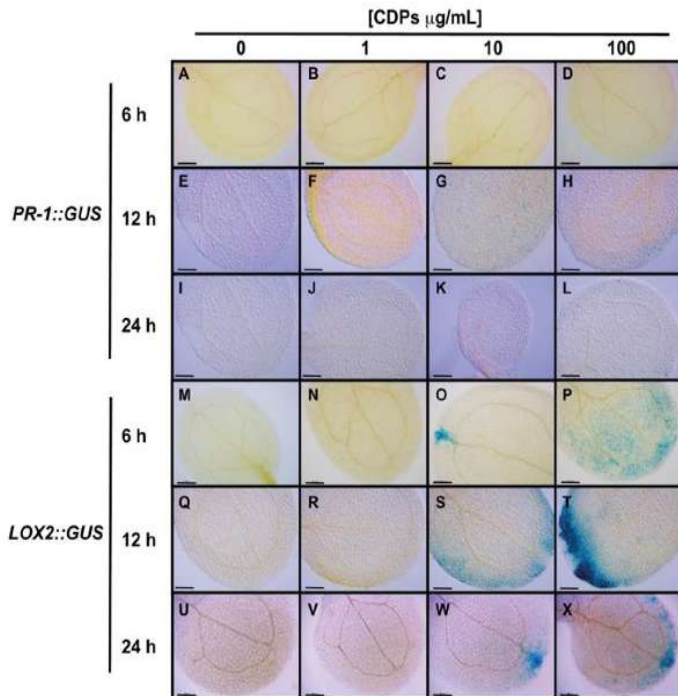


Fig. 6. Activation of SA and JA pathways by the CDPs mixture. The effect of purified CDPs mixture of *P. aeruginosa* PAO1 on SA and JA pathways was analyzed using the *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* transgenic *Arabidopsis* lines, respectively. The lines *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* were treated with different doses (0, 1, 10, and 100 µg/mL) of the CDPs mixture [cyclo(L-Pro-L-Phe), cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Phe), and cyclo(L-Pro-L-Leu)] obtained from PAO1 strain. (A–D), *PR-1::GUS* vs CDPs 6 h; (E–H) *PR-1::GUS* vs CDPs 12 h; (I–L) *PR-1::GUS* vs CDPs 24 h; (M–P) *LOX2::GUS* vs CDPs 6 h; (Q–T) *LOX2::GUS* vs CDPs 12 h; (U–X) *LOX2::GUS* vs CDPs 24 h. The photographs are representative of a total of three photographs per treatment, scale bars = 200 µm.

(González-López et al., 2021). In this work, we present evidence of the effect of CDPs as elicitors of defense responses in *A. thaliana* against the pathogenic bacteria *P. aeruginosa* PAO1. When *A. thaliana* Col-0 plants were co-cultured in a streak of *P. aeruginosa* PAO1 WT, and its mutants *ambB/pvdI* and *PA4078/pvdI*, pathogenic for the plants, it showed negative effects on plant growth (Fig. 1). On the other hand, the *P. aeruginosa* mutant in both QS systems *rhII/lasI* (*rhII/lasI*) shows a plant growth promotion effect, as reported previously (Ortiz-Castro et al., 2011). The participation of MAPKs in plant defense responses is widely documented (Meng and Zhang, 2013; Yamada et al., 2017; Zhang et al., 2018). Recently, the role of the TOR pathway during a plant pathogen's attack, functioning as a switch between growth and plant

defense responses with the SnRK1 protein, which is activated when TOR is inactivated due to factors such as biotic and abiotic stress or nutrient deficiency was described (Margalha et al., 2019; McMillan et al., 2021). To analyze the participation of these signaling pathways during *P. aeruginosa* pathogenicity, *mpk6* (a null mutant for MPK6 protein) and *oxTOR* (overexpressing TOR) plants were exposed to bacterial strains. Compared with Col-0, *mpk6* and *oxTOR* plants showed a more significant number of plants with lesions with the *ambB/pvdI* strain despite a similar reduction in fresh weight. Moreover, *oxTOR* plants showed a more significant CFU/mL number with all the strains, except for the *PA4078/pvdI*, indicating an increased bacterial proliferation. De Vleeschauwer et al. demonstrated that the damage caused by *X. oryzae* pv.

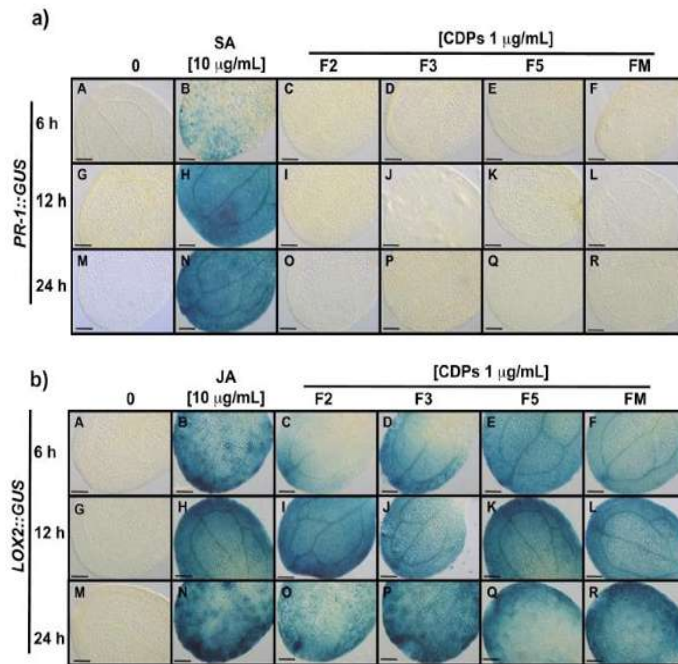


Fig. 7. Activation of SA and JA pathways by purified CDPs of *P. aeruginosa*. The *Arabidopsis* lines *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* were treated with 1 µg/mL of fraction 2, cyclo(L-Pro-L-Leu); fraction 3 cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Leu); fraction 5, cyclo(L-Pro-L-Phe); and 1 µg/mL of the mixture of these three purified fractions (FM). a) *PR-1::GUS* vs. CDPs with 6 h of treatments (A–F); 12 h of treatment (G–L), and 24 h of treatment (M–R); SA (10 µg/mL) was used as the positive control. b) *LOX2::GUS* vs. CDPs with 6 h of treatment (A–F); 12 h of treatment (G–L), and 24 h of treatment (M–R); JA (10 µg/mL) was used as a positive control. The photographs are representative of a total of three photographs per treatment, scale bars = 200 µm.

oryzae in rice was greater in oTOR lines or rice lines that overexpress Raptor (Raptor OX) (De Vleeschauwer et al., 2018). They also showed that the effects decreased in Raptor RNAi lines, which inhibits the activity of the AtTOR complex (Shi et al., 2018).

Recent studies show that MPK6 is involved in the regulation of root meristem development in plants, in addition to the fact that this protein participates in the activation of transcription factors for the expression of defense genes when PAMPs are perceived by the plants (López-Bucio et al., 2019; Zhang et al., 2018). The pre-exposure of plants to biomolecules such as rhamnolipids or microbial peptides is effective in counteracting the negative effects of pathogenic organisms in plants (Nie et al., 2017; Noh et al., 2017; Sanchez et al., 2012). With this in mind, we wondered whether CDPs have a similar function. It was found that the CDPs mixture from PAO1 at 1 µg/mL acts as an elicitor in *A. thaliana*, demonstrating that the pathogenic effects of PAO1, *ambB/pvdI*, and *PA4078/pvdI* strains on plants were counteracted with CDPs pre-exposition decreasing the number of plants with lesions even in the *mpk6* mutant and oTOR plants (Fig. 2).

The *ambB/pvdI* and *PA4078/pvdI* strains are mutants in genes that encode for non-ribosomal peptide syntheses (NRPS). The mutations in these genes modify the CDPs production in *P. aeruginosa* PAO1 (González et al., 2017) and other relevant virulence factors for the pathogenicity of PAO1 bacterium (unpublished data). It was previously shown that the CDPs, individually or in the mix, have similar effects on HeLa Cells (Hernández-Padilla et al., 2017). To test whether individual CDPs carry out the elicitor effect, the extract containing the CDPs mixture was fractionated by column chromatography, and the elicitor effects of the fractions were analyzed. Although all the purified fractions tested counteracted the negative effects of the PAO1 strain in pre-exposition assays, the purified fractions separately did not revert the negative effect of the mutants *ambB/pvdI* and *PA4078/pvdI*. The fresh weight increased with the mixture of CDP fractions as well as with the purified extract of CDPs mix in a more significant proportion than with the treatment of the fractions separately. Moreover, the number of

plants with lesions decreased with both the purified CDPs mixtures, compared with the result shown in Fig. 1. In addition to the increase in fresh weight, an increase in CFU/mL is also observed in plants that were pre-exposed to the mixture of purified CDPs. These results indicate that the mixture of purified CDPs has an elicitor effect.

The AtTOR pathway is important for plant development (Sabatini, 2017) and its overexpression negatively affects the rice interaction with the pathogen *X. oryzae* pv. *oryzae* (De Vleeschauwer et al., 2018). Downstream the AtTOR pathway, different targets such as S6K are found (Shi et al., 2018). So, the phosphorylation of S6K in plants treated with different strains of *P. aeruginosa* PAO1 was assayed, which allows us to directly evidence the activity of the AtTOR pathway and its participation in the defense response of *A. thaliana*. The results show that pathogenic strains such as PAO1, *ambB/pvdI*, and *PA4078/pvdI* decrease the phosphorylation of S6K compared with *rhlI/lasI* strain, a non-pathogenic strain that promotes plant growth and over-produces CDPs (Ortiz-Castro et al., 2011). This result suggests that to activate the defense responses in plants, it is necessary to deactivate AtTOR and redirect the energy of the plant, perhaps through the activation of SnRK1, where signaling pathways such as JA and SA are dependent on transcription factors and defense genes, and autophagy, cell death, and hypersensitive response could be involved (Margalha et al., 2019). In addition to the AtTOR pathway, the MAPKs pathway is essential for plant development. 80 MAPKs are present in *Arabidopsis* that participate in different processes. In defense response, MPK3 and MPK6 have been identified and are considered homologous proteins located in the same pathway. The MAPK module that contains MPK3/MPK6 is considered a positive regulation of defense (Zhang et al., 2018), so we specifically reviewed this module. To this end, the MPK3/MPK6 activities from plants confronted with the different strains were analyzed. The results showed that the pathogenic PAO1, *ambB/pvdI*, and *PA4078/pvdI* strains increased the MPK3/MPK6 activities, while the non-pathogenic *rhlI/lasI* reduced MPK3/MPK6 activities, compared with the non-confronted (control) plants. Although the treatment with *ambB/pvdI* and *PA4078/pvdI*

showed lower MPK3/MPK6 activity compared to the PAO1 treatment, there were also differences between the activity of MPK3 and MPK6 in the treatment group *PA4078/pvdl*, which had lower MPK3 activity. These results indicate that MPK6 is essential for the activity of the MAPK module during the interaction of *A. thaliana* with pathogenic *P. aeruginosa* strains. Moreover, the results suggest that for the activation of MPK3 and MPK6 at the same level, the virulence factors produced by PAO1 are necessary, taking into account that *ambB/pvdl* and *PA4078/pvdl* mutants have modified the production of CDPs and other virulence factors. The treatment with the *rhlI/lasI* strain presented a decreased MPK6 activity, and no MPK3 activity was evidenced compared to plants that were not confronted with any strain (control). To validate these results, MPK3/MPK6 activity in gel was analyzed in protein extracts from the *Arabidopsis mpk6* mutant, observing the absence of the band corresponding to MPK6 but showing the presence of the band corresponding to MPK3. All the above indicate that the MAPK pathway is activated in the presence of pathogens and suggests that the activation of MPK3/MPK6 could be due to other virulence factors and not by CDPs.

In addition to reviewing the activity of MPK3/MPK6 in gel, the effects of the strains PAO1, *rhlI/lasI*, *ambB/pvdl*, and *PA4078/pvdl* on the mutant lines *mpk3* and *mpk6* of *A. thaliana* were analyzed to establish similarities or differences between the phenotypes of these lines. However, the results showed that there were no differences between these two lines, but there were differences concerning Col-0; therefore, it was confirmed that MPK3 and MPK6 have a redundant function, in addition to the fact that the elicitor effect of the CDPs was presented in both *mpk3* and *mpk6*. After activating the MAPK cascade, transcriptional factors are activated, which, in turn, activate genes that participate in different plant processes (Yuan et al., 2019; Zhang et al., 2018). In this case, MPK3/MPK6 activates transcription factors that induce processes such as cell death, hypersensitive response, and activation of defense genes such as PR genes (Zhang et al., 2018). In this context, the key result concerning AtTOR and MAPK signaling pathways' activity is the *rhlI/lasI*-*Arabidopsis* interaction. This strain promotes plant growth through overproduction of CDPs and reduced production of virulence factors (Ortiz-Castro et al., 2011). It was observed that *rhlI/lasI* does not reduce the S6K protein phosphorylation, indicating that the AtTOR pathway is active; however, plants confronted with this strain showed reduced MPK3/MPK6 activity. On the other hand, plants confronted with pathogenic strains (which produce CDPs and other virulence factors) showed reduced AtTOR pathway activity and augmented MPK3/MPK6 activity. Taken together, all these results reveal an antagonistic role of TOR and MAPK pathways during plant growth or pathogenic attack.

Phytohormones such as SA, together with JA, are closely related to the defense response in plants (De Vleeschauwer et al., 2016), and the synergy or antagonism of these compounds regulate and activate ISR (regulated by JA) or SAR (regulated by SA) (Shigenaga et al., 2017). There are different PR genes, but the *PR-1* gene, whose expression is activated by SA, is the one that is more studied and related to the defense response in plants (Criollo-Arteaga et al., 2021; Santino et al., 2013; Rubil et al., 2022). Expression activation of the lipoxygenase, encoded by *LOX2* in *A. thaliana*, is indicative of JA production because it produces its precursors, oxylipins (Gfeller et al., 2010; Vellosillo et al., 2007).

To gain insights into which defense responses are activated by *P. aeruginosa* in *Arabidopsis*, *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* transgenic plants were exposed to cultures and supernatants of the cultures of all strains used in this work. We found that GUS activity was induced in both the transgenic lines by the pathogenic strains PAO1, *ambB/pvdl* and *PA4078/pvdl* only (with bacterial cultures or their supernatants), demonstrating the participation of both SA and JA signaling in the defense response during the pathogenic attack. Although the PAO1 WT strain induces the strongest effect on TOR and MAPKs activities, it showed lower GUS activity in *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* plants than *ambB/pvdl* and *PA4078/pvdl*. This could be explained by the altered

CDPs production and increased production of virulence factors of these double mutants on two putative NRPS genes. We observed a slight induction of GUS activity in the leaf tips of *LOX2::GUS* plants exposed to the culture *rhlI/lasI*, and that the supernatant of this strain induces GUS activity in both transgenic lines but with less intensity than the supernatants of pathogenic strains. In addition to CDPs, *P. aeruginosa* PAO1 releases different virulence factors into the environment, such as pyocyanin, rhamnolipids, protease, elastase, catalase, and biofilm, among others (Ahator and Zhang, 2019; Smith and Iglewski, 2003). We decided to analyze whether CDPs could induce GUS activity in *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* plants. We found that GUS activity was not induced by the CDPs mixture in *PR-1::GUS* plants at any time or dose; however, GUS activity was induced in the *LOX2::GUS* seedlings at 10 µg/mL dose, with a peak of induction at 12 h, indicating the participation of JA signaling in the effect of CDPs. When we exposed the *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* seedlings to 1 µg/mL CDPs fractions, we further found that neither the CDP fractions nor the mixture of CDP fractions induced GUS activity in *PR-1::GUS* plants at any time; however, all the fractions and the mixed fractions of CDPs induced GUS activity in *LOX2::GUS* plants after 6 h of treatment, revealing that the SA pathway is not activated, but the JA pathway is.

In conclusion, we present evidence that indicates that CDPs have an elicitor effect in *A. thaliana*'s response to the pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1. We also demonstrate that the S6K phosphorylation is lower when plants are confronted with the pathogenic PAO1 and *ambB/pvdl* strains, indicating that the AtTOR pathway is downregulated and the MAPKs pathway is upregulated during the bacterial pathogenic attack, and conversely, AtTOR activity is not affected and the MPK3/MPK6 module is downregulated during plant promotion. Finally, our evidence indicates that the elicitor effect of the bacterial CDPs in *A. thaliana* occurs through the *LOX-2* expression suggesting the activation of ISR, while that during pathogenic attack occurs through the *PR-1* and *LOX2* expression, suggesting activation of both SAR and ISR. However, to reinforce this conclusion, other markers of ISR or SAR should be investigated in response to CDPs in the future.

4. Materials and methods

4.1. Growing media

Medium 0.2x Murashigie and Skoog (MS) 1 L: 0.886 g MS salts were used, in addition to 20 g sucrose, dissolved with 1 L distilled H₂O, and added 10 g Phyto agar. The mixture was sterilized for 20 min.

Liquid medium Luria-Bertani (LB) 100 mL: 0.5 g NaCl, 1 g Casein peptone, 0.5 g yeast extract, and distilled H₂O. The pH was adjusted to 7.0. For 100 mL solid LB medium, 1.5 bacteriological agar was added. The media were sterilized for 20 min.

4.2. Biological materials

Arabidopsis thaliana lines: The wild-type line of *Arabidopsis thaliana* (Col-0) was used. In addition to the mutant lines *mpk3* and *mpk6* (obtained from the Salk T-DNA collection <http://arabidopsis.org>; SALK_073907/*mpk6-2*, and SALK_151594/*mpk3-1*), an overexpressing line of TOR (oxTOR), and reporting lines of SA and JA (*PR-1::GUS* and *LOX2::GUS*, respectively) were used. All seeds of *A. thaliana* were germinated in solid medium Murashigie and Skoog (MS) at 21 °C with 80% relative humidity and a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness. The number of days required for seedling growth varied between 5 and 7.

Bacterial strains: The *P. aeruginosa* PAO1 wild-type strain was used (González et al., 2017). It was grown at 37 °C in liquid LB medium at 80 rpm or in solid LB medium with 200 µg/mL streptomycin. We used the *P. aeruginosa* PAO1 double mutant *rhlI/lasI* (*rhlI/lasI*) (Ortiz-Castro et al., 2011), which shows decreased production of virulence factors and overproduction of CDPs. It was grown at 37 °C in LB liquid medium with

60 µg/mL tetracycline at 80 rpm shaking. The *P. aeruginosa* derivative PAO1 double mutants *ambB/pvdI* and *PA4078/pvdI* were obtained from simple mutants of PAO1 in these genes (González et al., 2017) by performing a second mutation in the other putative non-ribosomal peptide synthase genes (NRPS) and then interrupting the gene sequence by inserting a gentamicin resistance cassette. The *ambB/pvdI* and *PA4078/pvdI* mutants were grown at 37 °C in selective LB liquid medium at 80 rpm shaking or in selective LB solid medium with 30 µg/mL gentamycin and 60 µg/mL tetracycline. This mutant strain shows increased production of virulence factors, such as rhamnolipids and pyocyanin, and decreased CDP production (unpublished data).

4.3. Extraction and chemical characterization of CDPs from *P. aeruginosa* PAO1 strains

The CDPs' preparation was performed according to González-López et al. (2021) (González-López et al., 2021). Briefly, 500 mL LB liquid medium was inoculated with 2.5×10^8 CFU of *rhlI/lasI* strain from *P. aeruginosa* and incubated at 37 °C for 24 h. Free-cell supernatants were obtained by centrifugation at 10,000×g, 25 °C for 10 min in an Eppendorf 5810 R centrifuge. The resulting supernatants were extracted twice with two volumes of acetic acid acidified ethyl acetate (0.1 mL/L). The solvent-extracted samples were concentrated by evaporation using a rotavapor at 60 °C and then solubilized with 1 mL methanol-acetonitrile (1:1). The solvent solutions were centrifugated, and the supernatants were concentrated with rotavapor and dissolved in DMSO-water (1:3) to obtain the sample bacterial CDPs. The CDPs samples were analyzed by High-Resolution Liquid Chromatography (HPLC; Varian-240) using a photodiode detector (Varian-410) and a reverse-phase peptide column C18, 12 µm, 4.6 mm × 250 mm (Amersham).

4.4. Purification and chemical characterization of CDPs from *P. aeruginosa* PAO1 strains

A column with a 219 cm³ resin stopper compacted with deionized water was used as a stationary phase to adjust the flow to 3 mL per min with the help of a mixture of methanol:water [2:98]. The sample of CDPs extracted from PAO1 was added and mobile phases eluted through the column as follows: 500 mL methanol: water [10:90], 2000 mL methanol: water [25:75], 1000 mL methanol: water [40:60], and finally 1000 mL methanol: water [90:10]. Finally, the column is balanced by adding 500 mL methanol: water [2:98]. Each phase was placed before the previous one was finished. The eluted volume was collected in different fractions of 50 mL, and the optical density was measured. CDPs were detected at 274 nm in HPLC, and optical density was measured at 230 nm using methanol as reference. HPLC individually identified the CDPs using retention times of synthetic cyclodipeptides as internal standards (acquired from Bachem Co., Torrance, CA, USA). The process was performed according to Hernández-Padilla et al. (2017). Considering the area under the curve obtained at minute 4.476 for the cyclodipeptide (L-Pro-L-Tyr), at minute 4.465 for the cyclodipeptide (L-Pro-L-Tyr), at minute 5.715 for cyclodipeptide (L-Pro-L-Val), and at minute 7.858 for cyclodipeptide (L-Pro-L-Phe). Later the fractions were unified according to the criterion of optical density and finally were analyzed in HPLC. We obtained six fractions: fraction 1 contained a cyclo(L-Pro-L-), fraction 2 contained a cyclo(L-Pro-L-Leu), fraction 3 contained a cyclo(L-Pro-L-Val) and cyclo(L-Pro-L-Leu), fraction 4 contained a cyclo(L-Pro-L-), fraction 5 contained a cyclo(L-Pro-L-Phe), and fraction 6 contained a cyclo(L-Pro-L-). Fractions 2, 3, and 5 were chosen because fractions 1, 4, and 6 contained similar compositions. It was also intended to have most of the cyclodipeptides produced by *P. aeruginosa* PAO1, either alone or in combination in the selected fractions.

4.5. *Arabidopsis* seedlings cultivation

Arabidopsis thaliana seeds were surface sterilized by washing with

sterile distilled H₂O, and then successive washes with 70% (v/v) ethanol for 5 min, 20% (v/v) commercial bleach solution for 5 min, and finally five washes with sterile distilled H₂O. The seeds were stored in sterile distilled H₂O at 4 °C for 48 h for vernalization. After this, the seeds were germinated and grown on agar plates containing semisolid 0.2x MS medium (0.866 g/L of MS salts lacking amino acids and vitamins, 10 g/L Phyto agar micropropagation grade, and 6 g/L sucrose) in a plant growth chamber at 21 °C, 80% relative humidity, and a photoperiod of 16 h light/8 h darkness for 7 days. The seedlings were transferred to fresh semisolid 0.2x MS media. A bacterial streak at a density of 2.5×10^8 CFU of the different *P. aeruginosa* strains was placed in front of the plant rot tip as described by González et al. (2017) and incubated for 12 days. Then the plants were photographed, the fresh weight (FW) and the number of plants with lesions (NPLs) were determined, and bacterial CFU/mL was recorded.

To place 2.5×10^8 CFU in the streak, a 10 µL calibrated microbiological loop was used, and a loop was taken from a bacterial culture with an optical density of 0.7 at 600 nm, to which a CFU count was previously performed using the serial dilution and plating method, to determine the bacterial density.

The CFU/mL number was calculated using the serial dilution and plating method from plants confronted with bacterial streaks. After the exposure, all plants were removed from the Petri dishes and washed with 1 mL of distilled sterile water. This was performed for triplicated.

4.6. Plant pre-exposition to bacterial CDPs

Before bacterial interactions, *Arabidopsis* seedlings were pre-exposed to the *P. aeruginosa* PAO1 CDPs samples as follows: after surface-disinfection, vernalization, and growth for five days, seedlings were transferred to fresh semisolid 0.2x MS medium supplemented with 1 mg/mL of PAO1-CDPs and incubated for 2 days. After this period, seedlings were transferred again to a fresh MS semisolid medium, and a bacterial streak of the different strains was inoculated. As mentioned above, the interaction system was allowed to grow for ten days, and then the plant's fresh weight, the number of plants with lesions, and bacterial CFU/mL were quantified.

4.7. Immunodetection assays

Cytoplasmic protein extracts were prepared using 150 *Arabidopsis* seedlings from each treatment. Seedlings were ground in liquid nitrogen using a mortar, and the powder was placed in an extraction buffer (1 mM sodium ortho-vanadate, 1 mM sodium molybdate, 1 mM benzamidine, 20 mM sodium fluoride, 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 mM dithiothreitol, and 50 mM 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid; pH 7.6). The homogenate was centrifugated (9000×g, 30 min at 4 °C), the supernatants were collected, and the protein content was quantified using the Bradford method (BioRad). 10 g of total protein was mixed with denaturation buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% glycerol, 4% SDS, 4% β-mercaptoethanol, and 0.0025% bromophenol blue), boiled for 5 min, and separated through SDS-PAGE using a 12% polyacrylamide gel. One gel was dyed with Coomassie blue, and the other was transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore). The membranes were blocked with 5% milk powder in TBS-T (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% tween-20; pH 7.8) for 1 h with shaking (80 rpm) at room temperature and subsequently washed twice with 0.15 M TBS-T. Afterward, the anti-S6K and anti-p-S6K antibodies (Rabbit polyclonal antibodies against *Arabidopsis thaliana* proteins, Agrisera; dilution 1:5000) were added to the respective membranes and incubated overnight at 4 °C with slight shaking. Then the membranes were washed with 0.15 M TBS-T for 5 min, followed by washing with 1 M TBS-T for 5 min, and finally with 0.15 M TBS-T for 5 min. The membranes were incubated with the secondary antibody anti-rabbit IgG conjugated to HRP (Bio-Rad) in a dilution of 1:10,000 for 2 h at room temperature. The membranes were washed thrice with 0.15 M

TBS-T for 5 min each, revealed using luminol (Pierce, Thermo Fisher Scientific), and recorded using a ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad). Band intensities were quantified using Image J software (NIH Image).

4.8. MAPKs activity assay

The in-gel kinase assay for MAPKs activity was performed as described by López-Bucio et al. (2019) (López-Bucio et al., 2019). Plants of the *A. thaliana* Col-0 were confronted against PAO1, *rhl1/las1*, *ambB/pvdl1*, and PA4078/*pvdl1* strains for 10 days, and then total proteins were extracted from roots or shoots of plants grown in the different treatments. The seedlings were frozen and ground in liquid nitrogen and resuspended in an extraction buffer containing 100 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 10 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 50 mM β-glycerophosphate, 10% glycerol, and 7.5% polyvinylpyrrolidone, supplied with a protease inhibitor mixture, and centrifuged at 16,300×g, for 15 min at 4 °C. The protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit, using bovine serum albumin (BSA) as standard. The in-gel kinase assay was performed as described by (Lu et al., 2002). For this, 50 μg of total protein extracted from plant tissue was fractionated on a 12% SDS polyacrylamide gel containing 0.25 mg/mL myelin basic protein as a substrate for the MPKs. After electrophoresis, the gel was washed thrice with 25 mM Tris (pH 7.5), 0.5 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 0.5 mg/mL of BSA, and 0.1% (v/v) Triton X-100 solution, at room temperature for 30 min each. Proteins in the gel were re-natured by incubating the gel in a solution containing 25 mM Tris (pH 7.5), 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, and 5 mM NaF at 4 °C overnight with three changes. The kinase reactions were carried out by incubating the gel in 30 mL reaction buffer (25 mM Tris (pH 7.5), 2 mM EGTA, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, and 200 nM ATP) and 1.85 E⁺⁶ Bq of γ-³²P ATP (>1.48 E⁺¹⁴ Bq/mmol; PerkinElmer Inc) for 60 min at room temperature. To remove the free ³²P, the gel was washed repeatedly, at room temperature with several changes, with a solution of 5% (w/v) trichloroacetic acid and 1% (w/v) NaPPi until ³²P radioactivity in the wash solution became undetectable. The gels were dried on Whatman 3 MM paper and exposed to X-ray films.

4.9. GUS staining

Transgenic seedlings of *A. thaliana* *PR-1::GUS* (Criollo-Arteaga et al., 2021; Shu-Qing et al., 2004) and *LOX2::GUS* (Criollo-Arteaga et al., 2021; Vellosillo et al., 2007) were surface-sterilized, vernalized, and grown for 6 days in semisolid MS medium in the conditions described above. Subsequently, groups of 10 seedlings were placed in 1 mL liquid MS medium, and each group was treated with 200 μL bacterial cultures previously grown for 24 h at 37 °C with shaking (150 rpm), cell-free supernatants of bacterial cultures, and with different doses of CDPs. The treatments were placed in the plant growth chamber for 24 h, seedlings were removed at the determined time, and transgenic plants processed with 0.1% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) dissolved in phosphate buffer (0.2 M Na₂HPO₄, 0.2 M NaH₂PO₄, H₂O (pH 7.0); Triton 0.1%; and 0.25 M EDTA), supplemented with 0.5 M potassium ferrocyanide (K₄[Fe (CN)₆]) and 2 mM potassium ferricyanide (K₃[Fe (CN)₆]) for 24 h at 37 °C in the darkness. Seedlings were cleared as previously described (Malamy and Benfey, 1997). At least three photographs of transgenic leaves (*PR-1*- and *LOX2*-GUS expressed) were taken per treatment.

CRedit authorship contribution statement

Christian Said Solís-Ortiz: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Writing – original draft. Javier Gonzalez-Bernal: Conceptualization, Methodology, Investigation. Héctor Antonio Kido-Díaz: Conceptualization, Methodology, Investigation. Cesar

Arturo Peña-Urbe: Conceptualization, Methodology, Investigation. Jesús Salvador López-Bucio: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – review & editing. José López-Bucio: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – review & editing. Ángel Arturo Guevara-García: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – review & editing. Ernesto García-Pineda: Writing – review & editing. Javier Villegas: Writing – review & editing. Jesús Campos-García: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – review & editing. Homero Reyes de La Cruz: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This project was funded by CONACYT [grant number 222405] and the Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH) program 2018–21. C.S. Solís Ortiz (CVU-628781) was the recipient of CONACYT fellowship [fellowship number 701929].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153738>.

References

- AbuQamar, S., Moustafa, K., Tran, L.S., 2017. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37 (2), 262–274. <https://doi.org/10.1080/07380551.2016.1271767>.
- Ahator, S.D., Zhang, L., 2019. Small is mighty—chemical communication systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annu. Rev. Microbiol.* 73 (1), 559–576. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>.
- Albert, V., Hall, M.N., 2015. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.cob.2014.12.001>.
- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H., 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant* 8 (4), 521–539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>.
- Chahtane, H., Nogueira Fuller, T., Allard, P.-M., Marcourt, L., Ferreira Queiroz, E., Shanmugabaiji, V., Falquet, J., Wolfender, J.-L., Lopez-Molina, L., 2016. The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in *Arabidopsis*. *Elife* 7, e37082. <https://doi.org/10.7554/eLife.37082.001>.
- Criollo-Arteaga, S., Moya-Jimenez, S., Jimenez-Meza, M., Gonzalez-Vera, V., Gordon-Nunez, J., Llerena-Llerena, S., Ramirez-Villacis, D.X., vant Hof, P., Leon-Reyes, A., 2021. Sulfur deprivation modulates salicylic acid responses via nonexpressor of pathogenesis-related gene 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* 10 (6), 1065. <https://doi.org/10.3390/plants10061065>.
- De Vleeschauwer, D., Filipe, O., Hoffman, G., Seif, H.S., Haeck, A., Canlas, P., Van Bockhaven, J., De Waele, E., Demeestere, K., Ronald, P., Hofte, M., 2018. Target of rapamycin signaling orchestrates growth-defense trade-offs in plants. *New Phytol.* 217 (1), 305–319. <https://doi.org/10.1111/nph.14785>.
- De Vleeschauwer, D., Seif, H.S., Filipe, O., Haeck, A., Huu, S.N., Demeestere, K., Hofte, M., 2016. The DELLA protein SLR1 integrates and amplifies salicylic acid- and jasmonic acid-dependent innate immunity in rice. *Plant Physiol.* 170 (3), 1631–1647. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01515>.
- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., Meyer, C., 2016. TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67 (1), 261–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114640>.
- Doehlemann, G., Hemetsberger, C., 2013. Apoptotic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* 196 (4), 1001–1016. <https://doi.org/10.1111/nph.12277>.
- Dubern, J.-F., Cigana, C., De Simone, M., Lazenby, J., Juhas, M., Schwager, S., Bianconi, I., Döring, G., Eberl, L., Williams, P., Bragonzi, A., Cámara, M., 2015. Integrated whole-genome screening for *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes using multiple disease models reveals that pathogenicity is host specific. *Environ. Microbiol.* 17 (11), 4379–4393. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12863>.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Naruraka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (4), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>.

- Gfeller, A., Liechti, R., Farmer Edward, E., 2010. Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal.* 3 (109), cm4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3109cm4>.
- González, O., Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A.L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., Campos-García, J., 2017. Non-ribosomal peptide synthetases from *Pseudomonas aeruginosa* play a role in cyclopeptide biosynthesis, quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. *Microb. Ecol.* 73 (3), 616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0596-4>.
- González-López, O., Palacios-Nava, B.B., Peña-Urbe, C.A., Campos-García, J., López-Bucio, J., García-Pineda, E., Reyes de la Cruz, H., 2021. Growth promotion in Arabidopsis thaliana by bacterial cyclopeptides involves the TOR/S6K pathway activation. *J. Plant Physiol.* 257, 153343 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153343>.
- Hall, M.N., 2016. TOR and paradigm change: cell growth is controlled. *Mol. Biol. Cell* 27 (18), 2804–2806. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0311>.
- Hernández-Padilla, L., Vázquez-Rivera, D., Sánchez-Briones, L.A., Díaz-Pérez, A.L., Moreno-Rodríguez, J., Moreno-Eutimio, M.A., Meza-Carmen, V., Cruz, H.R.-D.L., Campos-García, J., 2017. The antiproliferative effect of cyclopeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa cells involves inhibition of phosphorylation of akt and S6K kinases. *Molecules* 22 (6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>.
- John, P., Roffler, S., Wicker, T., Ringli, C., 2011. Plant TOR signaling components. *Plant Signal. Behav.* 6 (11), 1700–1705. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17662>.
- Jones, J.D., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444 (7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05206>.
- Lin, L., Wu, J., Jiang, M., Wang, Y., 2021. Plant mitogen-activated protein kinase cascades in environmental stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (4), 1543. <https://doi.org/10.3390/ijms22041543>.
- López-Bucio, J.S., Salmerón-Barrera, G.J., Ravelo-Ortega, G., Raya-González, J., León, P., de la Cruz, H.R., Campos-García, J., López-Bucio, J., Guevara-García, Á.A., 2019. Mitogen-activated protein kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in Arabidopsis thaliana. *Planta* 250 (4), 1177–1189. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03212-4>.
- Lu, C., Han, M.-H., Guevara-García, A., Fedoroff, N.V., 2002. Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *PNAS USA* 99 (24), 15812–15817. <https://doi.org/10.1073/pnas.242607499>.
- Macho, Alberto P., Zipfel, C., 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell.* 54 (2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.026>.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* 124 (1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>.
- Margalita, L., Confraria, A., Baena-González, E., 2019. SnRK1 and TOR: modulating growth-defense trade-offs in plant stress responses. *J. Exp. Bot.* 70 (8), 2261–2274. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz066>.
- McMillan, H.M., Zebell, S.G., Ristaino, J.B., Dong, X., Kuehn, M.J., 2021. Protective plant immune responses are elicited by bacterial outer membrane vesicles. *Cell Rep.* 34 (3), 103645 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.103645>.
- Meng, X., Zhang, S., 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51 (1), 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-002712-102314>.
- Naveed, Z.A., Wei, X., Chen, J., Mubeen, H., Ali, G.S., 2020. The PTI to ETI continuum in phytophthora-plant interactions. *Front. Plant Sci.* 11 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.593905>, 2030.
- Nguyen, Q.-M., Iswanto, A.B.B., Son, G.H., Kim, S.H., 2021. Recent advances in effector-triggered immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (9), 4709. <https://doi.org/10.3390/ijms22094709>.
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., Niu, D., 2017. Induced systemic resistance against Botrytis cinerea by Bacillus cereus AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8 (236) <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00236>.
- Noh, S.W., Seo, R., Park, J.-K., Manir, M.M., Park, K., Sang, M.K., Moon, S.-S., Jung, H. W., 2017. Cyclic dipeptides from *Bacillus vallismortis* B507 require key components of plant immunity to induce disease resistance in Arabidopsis against *Pseudomonas* infection. *Plant Pathol.* J. 33 (4), 402–409. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2016.0255>.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Marriner-Trujillo, M., del Río, R.E., Campos-García, J., López-Bucio, J., 2011. Transkingdom signaling based on bacterial cyclopeptides with auxin activity in plants. *PNAS USA* 108 (17), 7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>.
- Papenfors, K., Bassler, B.L., 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.09>.
- Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke, G., Uhrig, J., Weyhe, M., Scheel, D., Lee, J., 2014. The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytol.* 203 (2), 592–606. <https://doi.org/10.1111/nph.12917>.
- Petersen, J., Nurse, P., 2007. TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat. Cell Biol.* 9 (11), 1263–1272. <https://doi.org/10.1038/ncb1646>.
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H., 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (4), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.008>.
- Ramírez-Prado, J.S., Abulfaraj, A.A., Rayapuram, N., Benhamed, M., Hirt, H., 2016. Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. *Trends Plant Sci.* 23 (9), 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.004>.
- Ranf, S., 2017. Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.011>.
- Rexin, D., Meyer, C., Robaglia, C., Veit, B., 2015. TOR signalling in plants. *Biochem. J.* 470 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20150505>.
- Romera, F.J., García, M.J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M.A., Ramos, J., Alcántara, E., Angulo, M., Pérez-Vicente, R., 2019. Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Front. Plant Sci.* 10, 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>.
- Rubil, N., Kalachova, T., Hauser, T.P., Burketová, L., 2022. Specialist aphids feeding causes local activation of salicylic and jasmonic acid signaling in Arabidopsis veins. *Mol. Plant Microbe Interact.* <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-21-0203-SC> (in press).
- Rudrappa, T., Bais, H.P., 2000. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J. Agric. Food Chem.* 56 (6), 1955–1962. <https://doi.org/10.1021/jf072591j>.
- Sabatini, D.M., 2017. Twenty-five years of mTOR: uncovering the link from nutrients to growth. *PNAS USA* 114 (45), 11819–11825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716173114>.
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.-H., Clément, C., Baillieux, F., Dorey, S., 2012. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in Arabidopsis and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol.* 160 (3), 1630–1641. <https://doi.org/10.1104/pp.112.201913>.
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, F., Pastor, V., Flors, V., 2013. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (ab)iotic stresses. *Plant Cell Rep.* 32 (7), 1055–1096. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1441-2>.
- Seyfferth, C., Truda, K., 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front. Plant Sci.* 5 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00697>, 697–697.
- Shi, L., Wu, Y., Sheen, J., 2018. TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development* 145 (13). <https://doi.org/10.1242/dev.160087>.
- Shigenaga, A.M., Berens, M.L., Tsuda, K., Argueso, C.T., 2017. Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 36, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.021>.
- Shigenaga, A.M., Argueso, C.T., 2016. No hormone to rule them all: interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* 56, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.005>.
- Shu-Qing, Z., Xin-Feng, L., Jian-Bo, G., 2004. Expression of the pathogenesis-related gene promoter—GUS reporter fusion in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.* 46 (8), 982–987.
- Smith, R.S., Iglewski, B.H., 2003. P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (1), 56–60. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-0).
- Song, Y., Zhao, G., Zhang, X., Li, L., Xiong, F., Zhuo, F., Zhang, C., Yang, Z., Datla, R., Ren, M., Li, F., 2017. The crosstalk between target of rapamycin (TOR) and jasmonic acid (JA) signaling existing in Arabidopsis and cotton. *Sci. Rep.* 7 (1), 45830 <https://doi.org/10.1038/srep45830>.
- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T., Joosten, M.H.A.J., 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23 (1), 4–15. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.002602>.
- Tsuda, K., Katagiri, F., 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 (4), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>.
- Velloillo, T., Marriner, M., López, M.A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M., Castresana, C., 2007. Oxylinins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* 19 (3), 831–846. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046052>.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>.
- Withers, J., Dong, X., 2017. Post-translational regulation of plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.004>.
- Xu, J., Zhang, S., 2015. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci.* 20 (1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.001>.
- Yamada, K., Yamaguchi, K., Yoshimura, S., Terauchi, A., Kawasaki, T., 2017. Conservation of chitin-induced MAPK signaling pathways in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 58 (6), 993–1002. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx042>.
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., Niu, D., 2022. Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants* 11 (3), 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>.
- Yuan, M., Huang, Y., Ge, W., Jia, Z., Song, S., Zhang, L., Huang, Y., 2019. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC Genom.* 20 (1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5513-0>.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., 2017. Translational switching from growth to defense – a common role for TOR in plant and mammalian immunity? *J. Exp. Bot.* 68 (9), 2077–2081. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx120>.
- Zhang, M., Su, J., Zhang, Y., Xu, J., Zhang, S., 2018. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 45, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.012>.

6.2. Resultados no Publicados.

6.2.1. Marco de referencia.

P. aeruginosa PAO1 produce diferentes factores de virulencia que hacen la hacen muy competitiva y altamente patógena para *A. thaliana*. Las combinaciones de mutaciones en los genes péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) *ambB/pvdI* y *PA4078/pvdL* modificaron la producción de PAO1-CDPs y la producción de otros factores de virulencia, aumentando la producción de PC y RLs (Díaz-Pérez et al., 2022).

En los resultados publicados en Solis-Ortiz et al., 2022, se observó que la actividad de MPK3/MPK6 se promovió al confrontar *A. thaliana* contra la cepa tipo silvestre PAO1 y las dos mutantes *ambB/pvdI* y *PA4078/pvdL*, sin embargo, no se observó esta promoción en la confrontación con la mutante *rhlI/lasI*, la cual tiene disminución en la producción de factores de virulencia, pero sobreproducción en producción de CDPs. Por el contrario, se observó que la fosforilación de TOR-S6K disminuye en la confrontación de *A. thaliana* contra *ambB/pvdI*, *PA4078/pvdL* y PAO1. De lo anterior se deduce que estos factores de virulencia son importantes para la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1, sin embargo, se desconoce qué tipo de respuesta de defensa activan los RLs y la PC, así como el efecto que estos tienen por si solos sobre la germinación, desarrollo y crecimiento de *A. thaliana*.

6.2.2 Resultados de la experimentación

En primera instancia, se revisaron los efectos que tienen los RLs (Fig. 17) y la PC (Fig. 18) sobre el desarrollo de *A. thaliana* Col-0. Ambos experimentos mostraron los efectos negativos de estos dos factores de virulencia sobre la línea tipo silvestre, donde se observa que disminuye el tamaño de la raíz primaria, se aumenta el número de raíces adventicias y disminuye el peso fresco de manera dosis dependiente.

El efecto negativo de los RLs y la PC que se observa sobre el sistema radicular, sugiere que estos factores de virulencia son importantes para la patogenicidad de

Pseudomonas aeruginosa PAO1. Además de la disminución del tamaño de la raíz, se observa un efecto negativo sobre el follaje de las plántulas, las cuales muestran un color amarillento de forma dosis dependiente (Figuras 17 y 18).

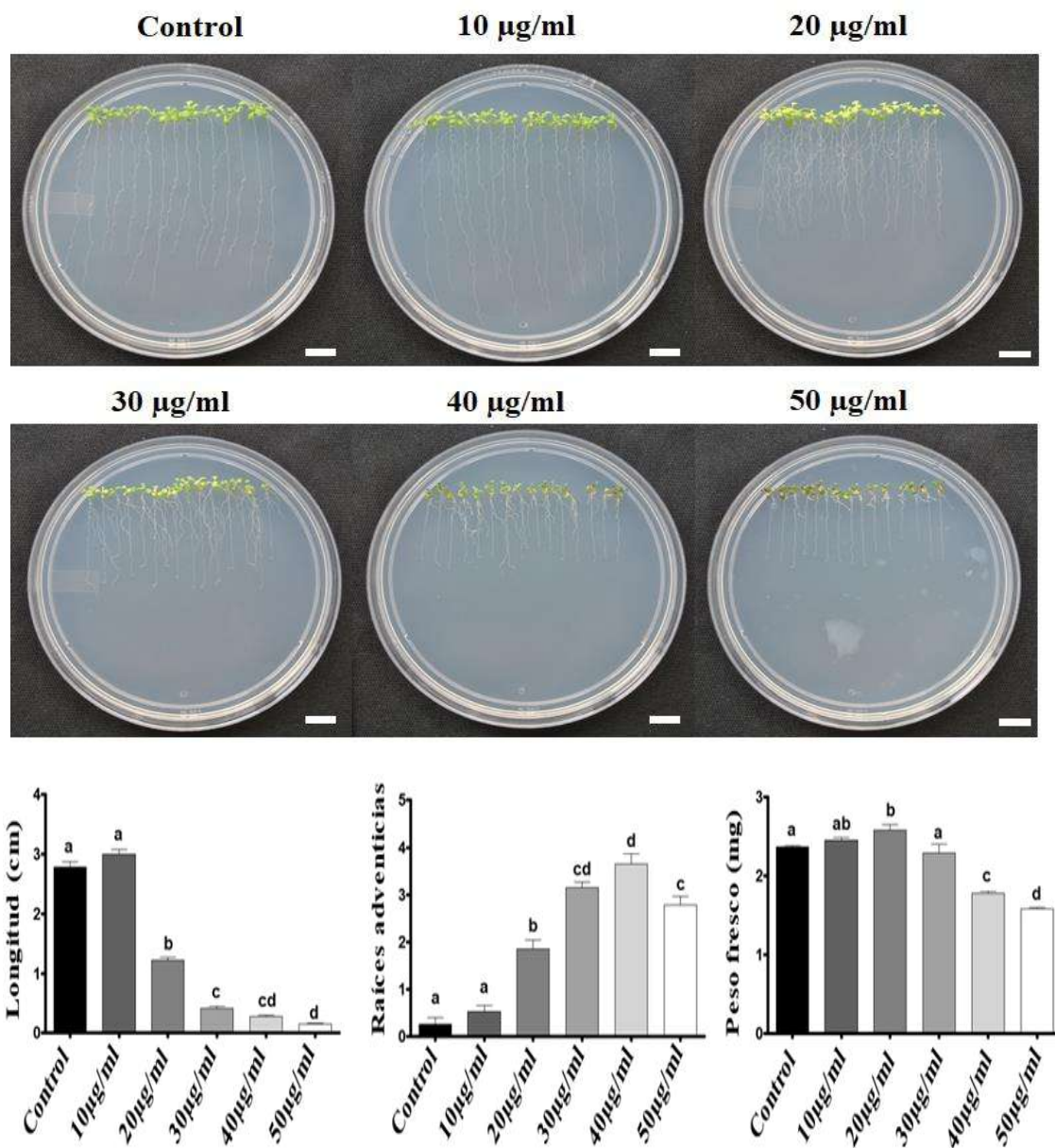


Figura 17. Efecto negativo de los RLs de *P. aeruginosa* PAO1, sobre el desarrollo de *A. thaliana*.

Plantas de *A. thaliana* tipo silvestre Col-0 fueron germinadas y crecidas por cinco días en medio MS con sacarosa 6%, posteriormente las plantas fueron transferidas al mismo medio suplementado con RLs (0 –control, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL). Las plantas fueron crecidas por siete días más (A) y entonces se registraron los parámetros de longitud de la raíz principal, número de raíces adventicias y peso fresco. Se muestra el promedio de tres experimentos independiente con una n=15. Las barras de error son las DS de un ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey y las letras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

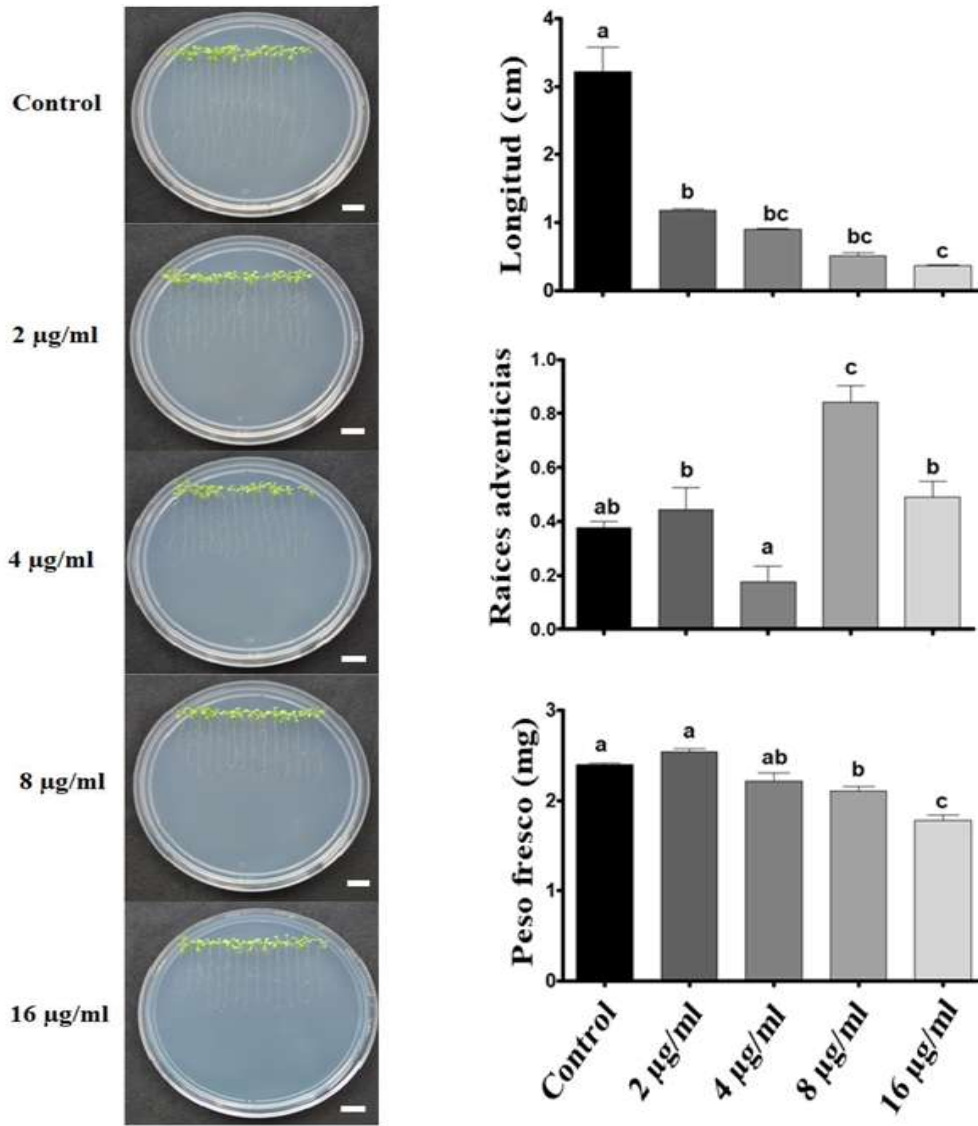


Figura 18. Efecto negativo de la PC de *P. aeruginosa* PAO1 sobre el desarrollo de *A. thaliana*.

Plantas de *A. thaliana* tipo silvestre Col-0 fueron germinadas y crecidas por cinco días en medio MS sacarosa 6%, posteriormente las plantas fueron transferidas al mismo medio suplementado con diferentes dosis de PC (0 -control-, 2, 4, 8 y 16 µg/mL). Las plantas fueron crecidas por siete días más y entonces se midieron los parámetros de longitud de la raíz principal, número de raíces adventicias y peso fresco. Se muestra el promedio de tres experimentos independiente con una n=15. Las barras de error son las DS de un ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey y las letras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

El crecimiento se ve afectado tanto con los RLs, como con la piocianina (Figuras 19 y 20). Los efectos más evidentes de cambio de coloración en el follaje (color amarillento) son con el tratamiento de RLs, mientras que, con el tratamiento de PC, se ve un efecto negativo más evidente en el desarrollo de la raíz primaria, aunque el tratamiento de RLs también afecta el crecimiento de este órgano. En cuanto a la biomasa del follaje, se evidencia

que ambos factores de virulencia la disminuyen, lo que concuerda con lo previamente descrito por otros autores como Margalha, et al., 2019 y McMillan et al., 2021, quienes describen que el desarrollo de la planta se ve comprometido ante el ataque de un patógeno, para poder activar la respuesta de defensa.

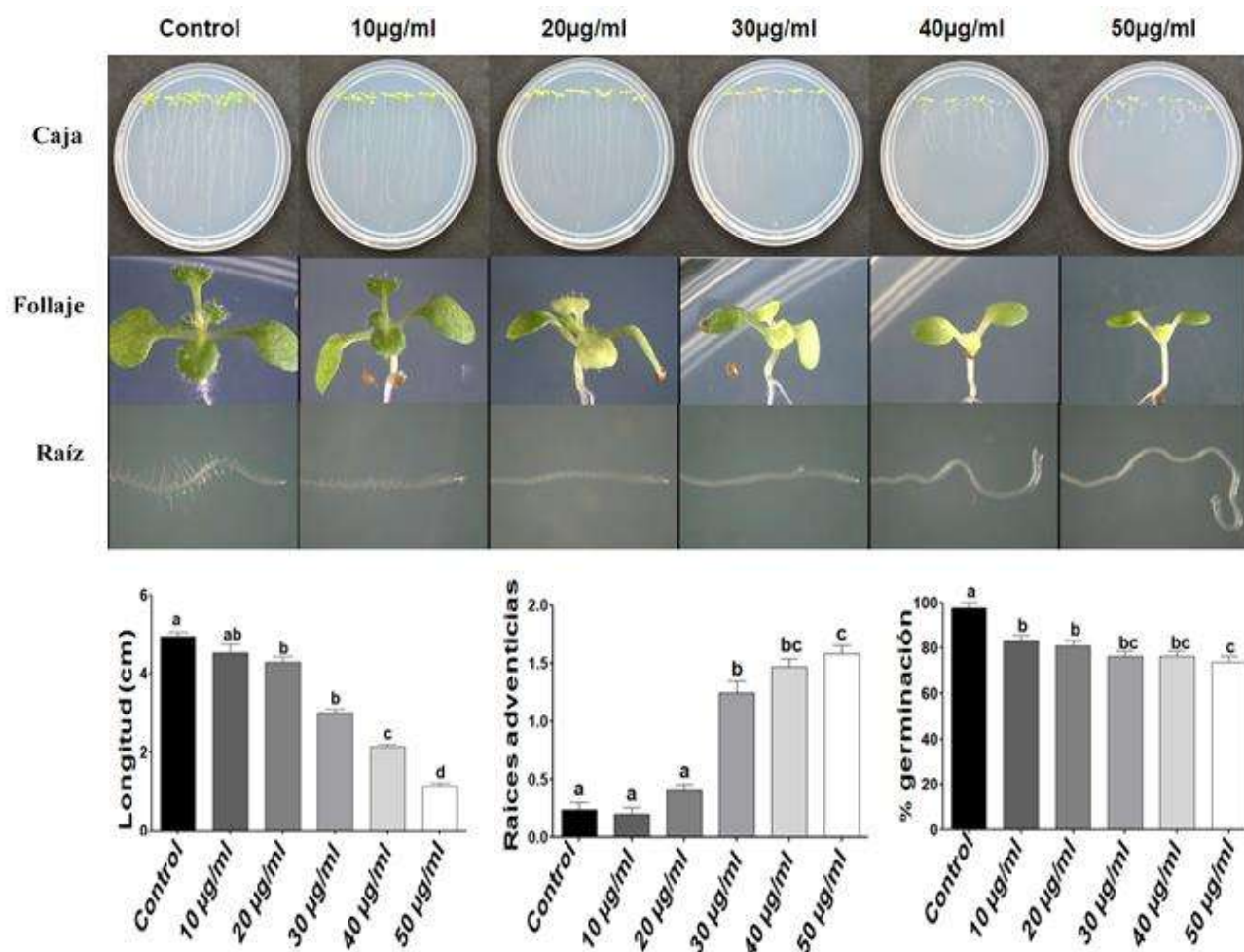


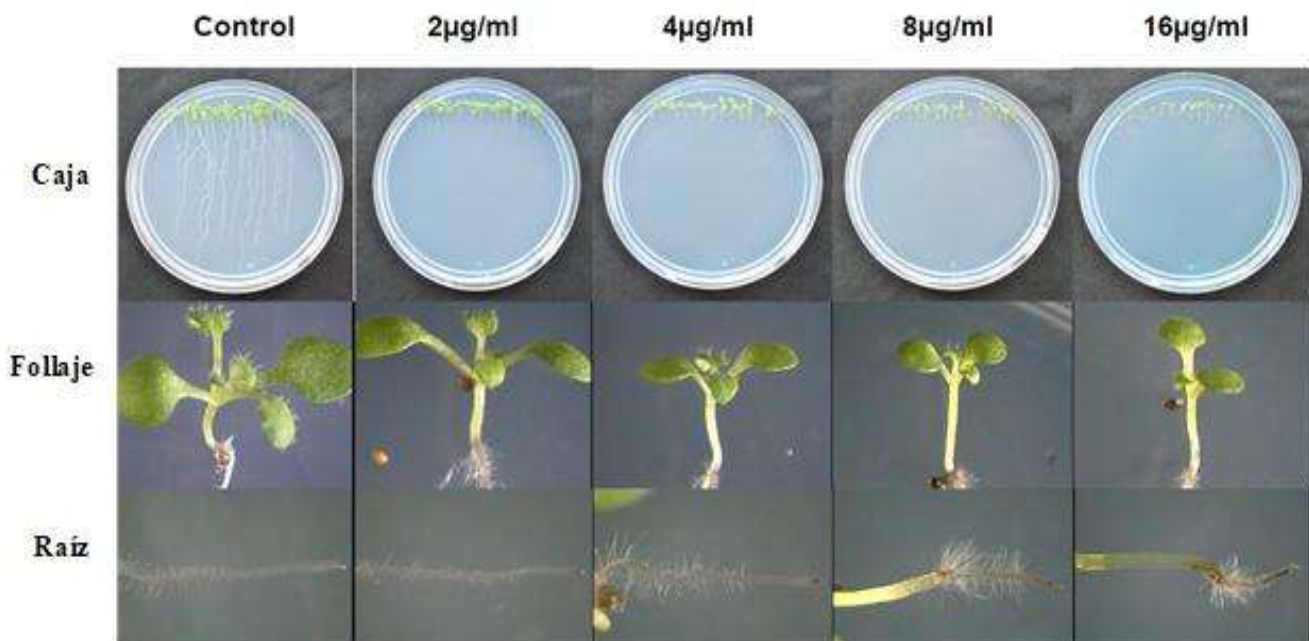
Figura 19. Efecto de los RLs de *P. aeruginosa* PAO1 sobre el crecimiento de *A. thaliana*.

Las plantas de *A. thaliana* Col-0 fueron sembradas sobre medio MS 6% sacarosa suplementado con RLs (0 - control-, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL) donde se dejaron crecer durante un periodo de doce días. Se muestran acercamientos del follaje y las raíces de plántulas representativas. A los 12 días en tratamiento se midieron los parámetros de longitud de la raíz primaria, el número de raíces adventicias y el peso fresco. Se muestra el promedio de tres experimentos independiente con una n=15. Las barras de error son las DS de un ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey y las letras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

Los resultados además mostraron datos interesantes sobre el desarrollo de la raíz, donde los RLs disminuyen la formación de pelos radiculares en la raíz primaria y además se observa un crecimiento anormal, donde la raíz principal parece irse enroscando, ambos datos

de forma dosis dependiente (Figura 19). En cuanto a los efectos de la PC, se observa que el tamaño de la raíz principal es afectado de forma negativa desde la dosis de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual sugiere que dosis menores pueden afectar el desarrollo y crecimiento de la raíz principal en Col-0 y además se observa que hay formación de pelos radiculares, lo cual sugiere una compensación por la disminución drástica del tamaño de la raíz principal, con lo cual la planta puede seguir adquiriendo los nutrientes necesarios para su supervivencia, pues aunque el follaje disminuye su biomasa, no se torna amarillento como en el caso del tratamiento con RLs (Figura 20).

Finalmente, se observa que con ambos tratamientos de RLs y PC, se disminuye la biomasa de las plantas, además de que el porcentaje de germinación se ve afectado, lo cual sugiere que estos factores de virulencia también pueden afectar el proceso de germinación de las plantas (Figura 19 y 20), sin embargo, se sugiere realizar más estudios para determinar la relevancia de estos factores de virulencia sobre el porcentaje de germinación de *A. thaliana*, y además se sugiere realizar estudios sobre el efecto de los RLs y PC sobre plantas de otras especies de interés agroindustrial con el objetivo de tener datos más amplios sobre el potencial patógeno de estos factores de virulencia.



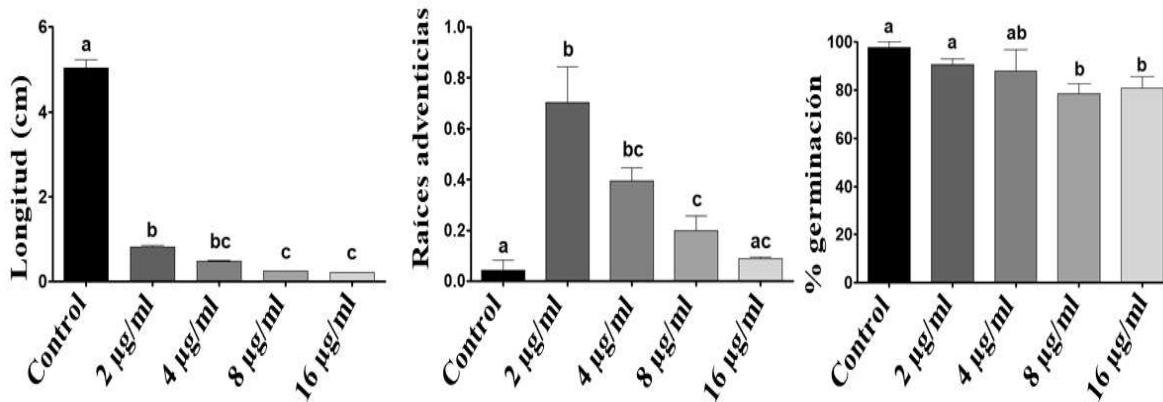


Figura 20. Efecto de la PC de *P. aeruginosa* PAO1 sobre el crecimiento de *A. thaliana*.

Las plantas de *A. thaliana* Col-0 fueron sembradas sobre medio MS 6% sacarosa suplementado con PC (0 - control-, 2, 4, 8 y 16 µg/mL) donde se dejaron crecer durante un periodo de doce días. Se muestran acercamientos del follaje y las raíces de plántulas representativas. A los 12 días en tratamiento se midieron los parámetros de longitud de la raíz primaria, el número de raíces adventicias y el peso fresco. Se muestra el promedio de tres experimentos independiente con una n=15. Las barras de error son las DS de un ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey y las letras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

En la respuesta de defensa en *A. thaliana*, se activan vías como la de MAPK, SnRK1 y se desactiva la vía de AtTOR, comprometiendo el desarrollo y el crecimiento de la planta y redirigiendo la energía a la activación de mecanismos como a la expresión de genes de defensa como *PR-1* y *LOX2*, los cuales están asociados a las fitohormonas SA y JA respectivamente. Esto indica que la respuesta de defensa en plantas es altamente intrincada, pues además puede haber sinergia con señalización de ET y ABA, para que la planta logre su supervivencia y la resistencia a patógenos; en algunos casos los mecanismos que las plantas activan pueden ser más drásticos, como la respuesta hipersensible (HR) y la muerte celular, para evitar la propagación de algún patógeno. Para analizar este efecto de los RLs y la PC, se utilizaron líneas reporteras *PR-1::GUS* y *LOX2::GUS* que permiten observar la expresión de estos genes de manera indirecta por la actividad de β -glucuronidasa.

Así, se analizaron los efectos de RLs a diferentes tiempos de tratamiento sobre la expresión de *PR-1::GUS* y *LOX2::GUS* (Fig. 21). Los resultados mostraron que la expresión de *PR-1* es dosis dependiente y se activa desde las 12 horas). Por su parte, la expresión de *LOX2* se activa desde tiempos más cortos, pues desde las 6 horas con RLs se observa actividad la β -glucuronidasa, que también es dosis dependiente (Fig. 22).

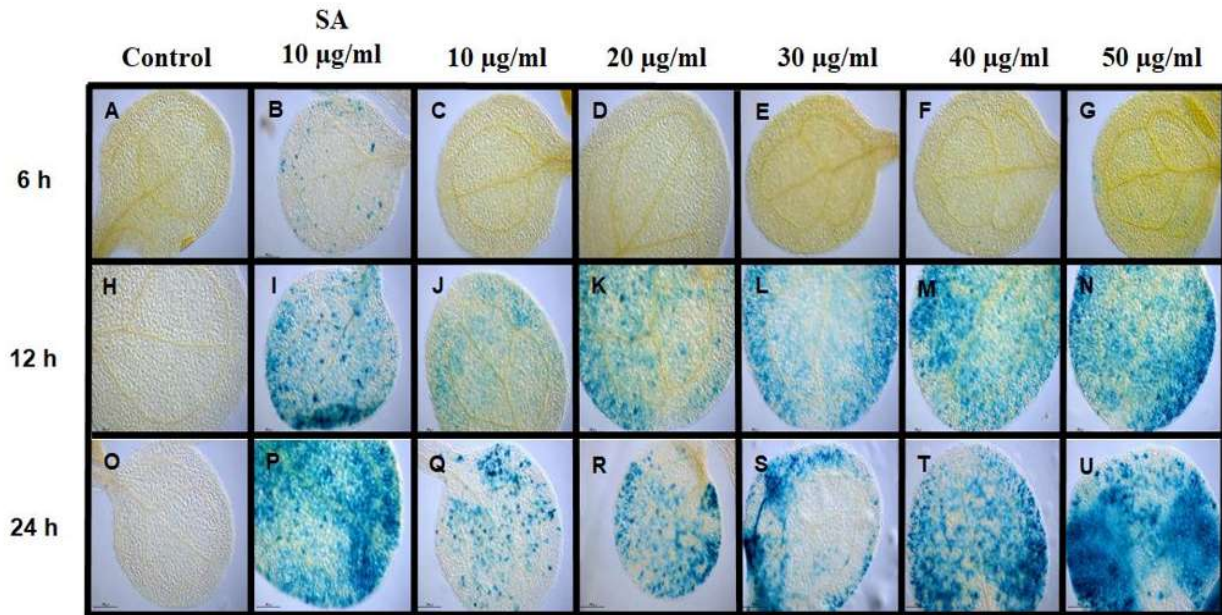


Figura 21. Expresión de *PR-1::GUS* en hojas de *A. thaliana* por efecto de los RLs de *P. aeruginosa* PAO1.

La línea *PR-1::GUS* de *A. thaliana* fue tratada con RLs (10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL) por diferentes tiempos, 6 horas (A-G), 12 horas (H-N) y 24 horas (O-U). Como control positivo se utilizó SA (10 µg/mL). Las fotografías son representativas de un total de tres experimentos con una n=3. Barras de escala = 200 µm.

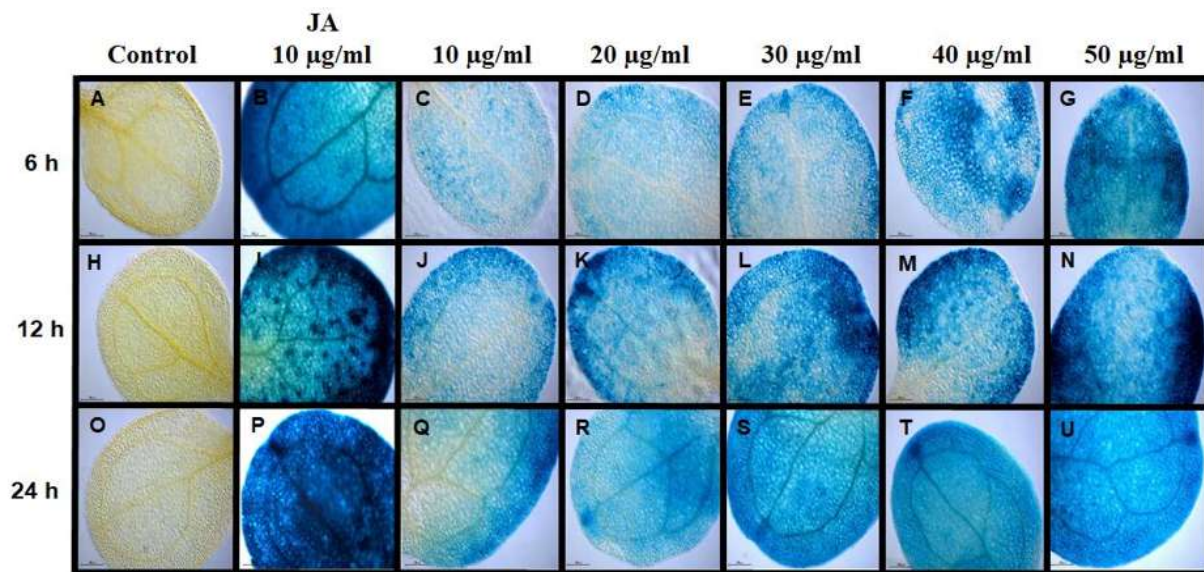


Figura 22. Actividad de *LOX2::GUS* en hojas de *A. thaliana* por efecto de los RLs de *P. aeruginosa* PAO1.

La línea *LOX2::GUS* de *A. thaliana* fue tratada con RLs (10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL) por diferentes tiempos, 6 horas (A-G), 12 horas (H-N) y 24 horas (O-U). Como control positivo se utilizó JA (10 µg/mL). Las fotografías son representativas de tres experimentos con una n=3. Barras de escala = 200 µm.

En cuanto a PC, se observó que tanto en *PR-1::GUS* y *LOX2::GUS* hay una activación de la expresión de estos genes de forma dosis dependiente, pero de igual forma se observa que la

activación de *PR-1* es más tardía que la de *LOX2*, pues *PR-1* se activa hasta las 12 horas de tratamiento, mientras que *LOX2* se activa desde las 6 horas (Figuras 23 y 24).

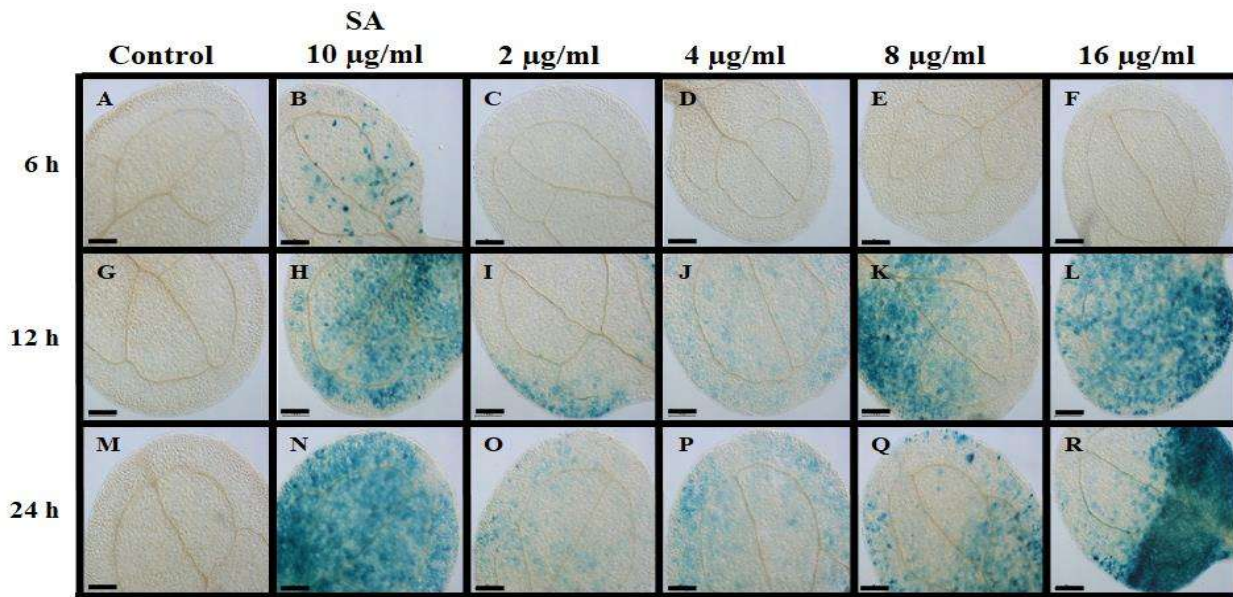


Figura 23. Actividad de *PR-1::GUS* en hojas de *A. thaliana* por efecto de la PC de *P. aeruginosa* PAO1.

La línea *PR-1::GUS* de *A. thaliana* fue tratada con PC (2, 4, 8 y 16 µg/mL) por diferentes tiempos; 6 horas (A-F), 12 horas (G-L) y 24 horas (M-R). Como control positivo se utilizó SA (10 µg/mL). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes con una n=3. Barras de escala = 200 µm.

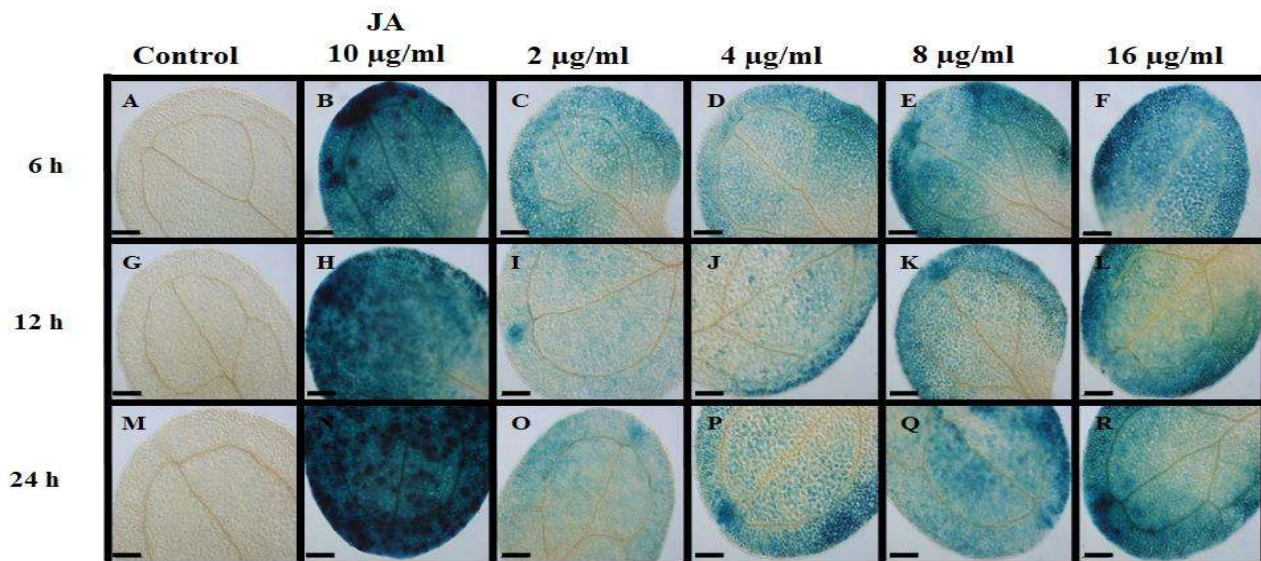
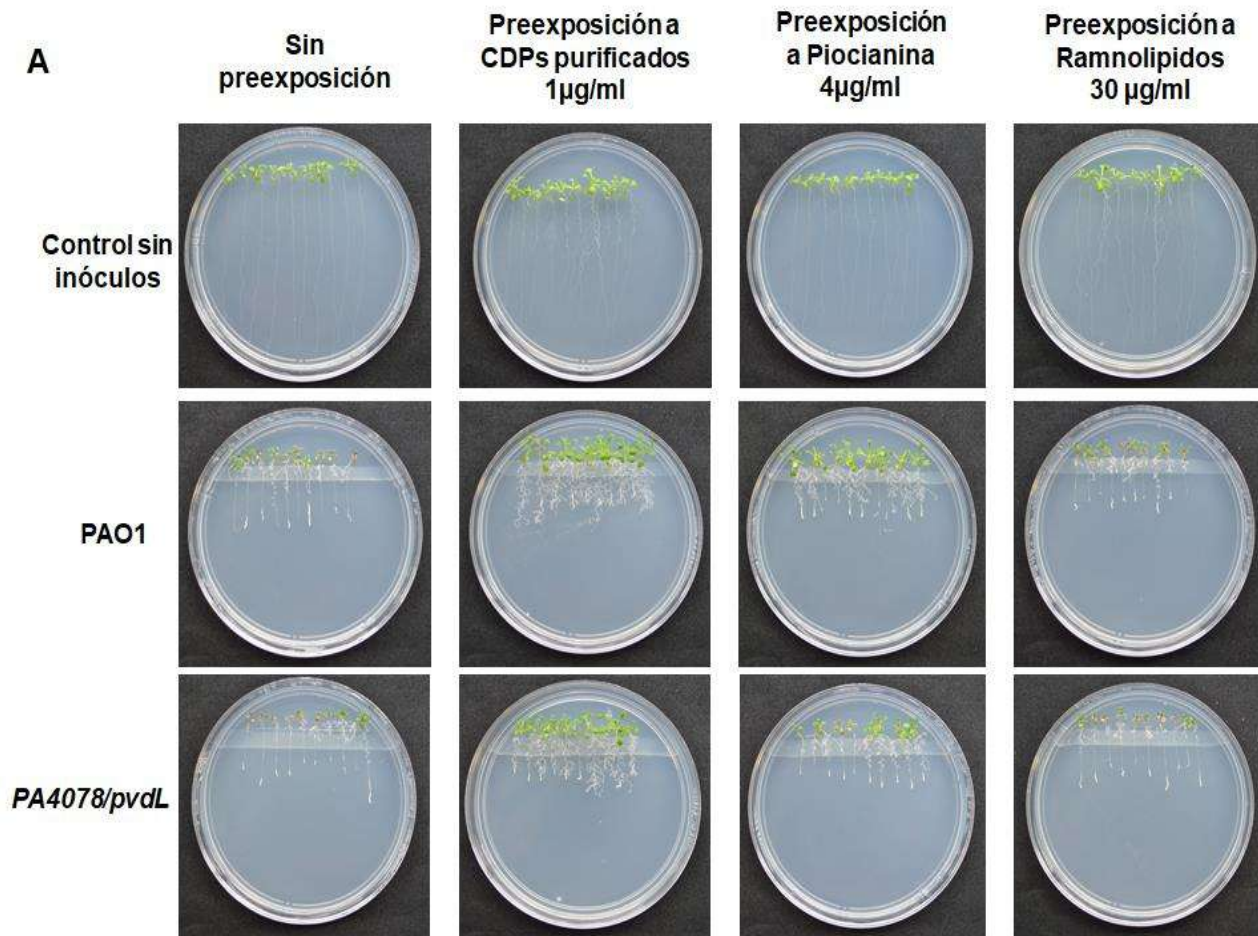


Figura 24. Actividad de *LOX2::GUS* en hojas de *A. thaliana* por efecto de la PC de *P. aeruginosa* PAO1.

La línea *LOX2::GUS* de *A. thaliana* fue tratada con PC (2, 4, 8 y 16 µg/mL) por diferentes tiempos; 6 horas (A-F), 12 horas (G-L) y 24 horas (M-R). Como control positivo se utilizó JA (10 µg/mL). Las fotografías son representativas de un total de tres experimentos independientes con una n=3. Barras de escala = 200 µm.

Los resultados sugieren que la capa del sistema inmune que se activa con RLs y PC es la respuesta sistémica adquirida (SAR), pues se encuentran activas las señalizaciones de SA y JA, aunque a diferentes tiempos, lo cual sugiere también que la señalización de JA está íntimamente ligada a la respuesta de defensa ante microorganismos patógenos. Se sugiere que a diferencia de los PAO1-CDPs, que actúan como elicitores activando la respuesta sistémica inducida (SIR), los RL y PC actúan como patrones moleculares asociados a patógenos, como lo hace la flg-22 de *P. aeruginosa*, activando el módulo de las cinas MPK3/MPK6. Sin embargo, reportes anteriores sugieren que moléculas como RLs pueden ser usadas como elicitores, para proteger a las plantas ante microorganismos como *B. cinerea* (Varnier et al., 2009). De tal manera, se decidió confrontar el efecto elicitor de los RLs sugerido por Varnier et al., 2009, contra el efecto elicitor de los PAO1-CDPs (Solis-Ortiz et al., 2022), así como evaluar el como posible efecto elicitor de la piocianina.



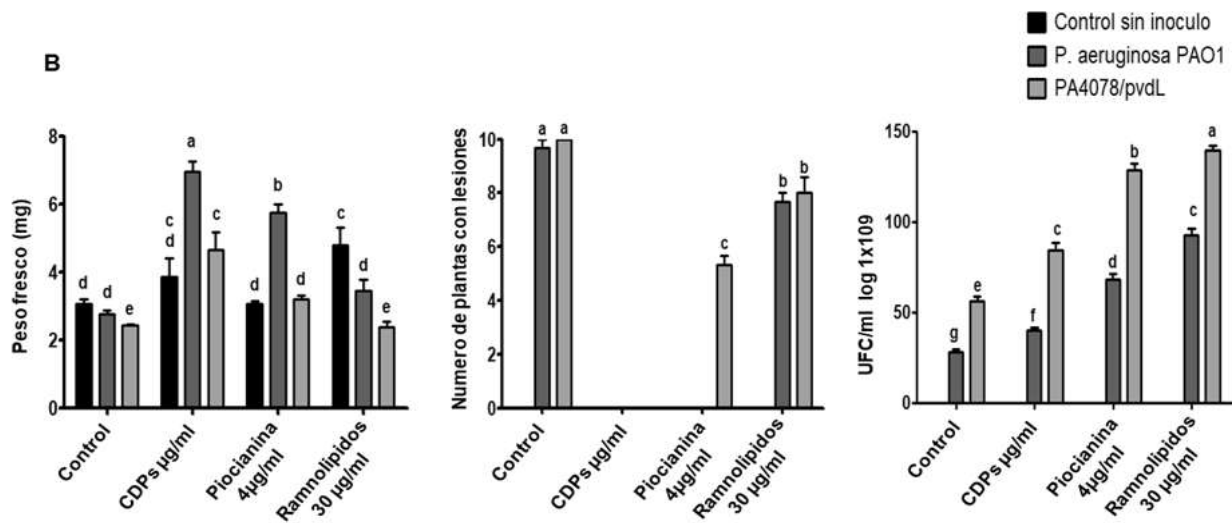


Figura 25. Efecto de la preexposición de *A. thaliana* Col-0 a PAO1-CDPs, PC y RLs contra *P. aeruginosa* PAO1 y PA4078/pvdL.

Las plantas fueron crecidas por cinco días en medio basal y posteriormente se transfirieron a placas con tratamientos de PAO1-CDPs (1 µg/ml), PC (2 µg/ml) y RLs (30 µg/ml) donde se mantuvieron por un periodo de dos días. Posteriormente, las plantas preexpuestas se transfirieron sobre estrías de las cepas PAO1 y PA4078/pvdL, donde se mantuvieron por un periodo adicional de seis. Finalmente se registraron el peso fresco, el número de plantas con lesiones y UFC/ml log₁₀ 1x10⁹. Las barras representan el promedio de una n=10 de tres tratamientos independientes. Las barras de error indican la SD de un ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey, a P≤0.05.

Los resultados mostraron que la preexposición a PAO1-CDPs, es más efectiva contra el efecto patógeno de PAO1 y PA4078/pvdL, mientras que la preexposición a PC fue efectiva contra PAO1, pero no contra PA4078/pvdL. Por su parte, la preexposición a RLs no protegió a la planta contra los efectos negativos de PAO1 ni PA4078/pvdL (Fig. 25). Estos resultados sugieren que la preexposición a PAO1-CDPs es más efectiva contra organismos hemibiotróficos, como lo es *P. aeruginosa* PAO1, aunque se comprometa el desarrollo y crecimiento de la planta, compensando la energía empleada en la activación de la respuesta de defensa mediante SIR, en la que intervienen las señalizaciones de fitohormonas y la participación de las cascadas de señalización de MAPK cinasas y TOR-S6K, así como la activación de genes de respuesta a patógenos como *PR-1* y *LOX2* en respuesta a los estímulos con RLs y PC que activan a SAR.

6.2.3. Discusión de resultados no publicados.

Los RLs son un componente importante para la formación de biofilm por *P. aeruginosa* PAO1 el cual es considerado importante para que PAO1 infecte al huésped y se comporte de manera patógena (Ahator & Zhang, 2019; Díaz-Pérez et al., 2022; Rudrappa & Bais, 2008), sin embargo, por si solos disminuyen el tamaño de la raíz principal en plantas de *A. thaliana* Col-0 además de generar un color amarillento en el follaje de estas (Figura 17). Además, los RLs disminuyen el porcentaje de germinación y la formación de pelos radiculares (Figura 19), lo cual sugiere que los RLs son importantes para la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1, debido al daño observado en el crecimiento y desarrollo de las plantas tratadas con estos. Por otro lado, la PC es otro factor de virulencia de gran importancia para *P. aeruginosa* PAO1, catalogado como sideroforo que es útil para el aprovechamiento de Fe (Ahator & Zhang, 2019; Díaz-Pérez et al., 2022; Merino, 2007), sin embargo en estos resultados, se observa que es un factor de virulencia que no genera color amarillento en las plantas, pero si disminuye el tamaño de sus raíces principales (Figura 18), además de generar la formación de pelos radiculares, disminuyendo el porcentaje de germinación y disminuyendo la biomasa de las plantas (Figura 20). Una similitud entre ambos tratamientos es la generación de raíces adventicias que se vio aumentada de forma dosis dependiente, lo cual sugiere que la planta puede activar mecanismos para garantizar la supervivencia, ante el efecto negativo de moléculas patógenas como los RLs y la PC, pues las raíces adventicias proporcionan a la planta un mecanismo para seguir aprovechando los nutrientes del medio, además de darle soporte ((Guan et al., 2015; Lakehal & Bellini, 2019). Los efectos observados sugieren que las plantas cumplen con la teoría de redirección de energía ante el estímulo de un patógeno, donde la planta redirecciona la energía hacia la defensa, haciendo que las plantas queden pequeñas y no se desarrollen normalmente (Margalha et al., 2019; Radchuk et al., 2010; Rosenberger & Chen, 2018). En cuanto a la defensa de la planta, se revisó la actividad de dos genes reporteros de las vías del ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA), utilizando las líneas transgénicas *LOX2::GUS* y *PR-1::GUS* respectivamente. JA y SA son fitohormonas importantes para la respuesta de defensa en plantas, las cuales están implicadas en la activación de la RH, así como la activación la SAR y/o la ISR (McMillan et al., 2021; Yildiz et al., 2021; Zeier, 2021). Tanto *LOX2::GUS* como *PR-1::GUS* se trataron con dosis de RLs y PC, y se pudo observar que hay actividad tanto de JA como SA de forma dosis dependiente

y en base al tiempo del tratamiento, donde la actividad de JA se observa desde tiempos de 6 horas de tratamiento (Figuras 22 y 24), mientras que la actividad de SA es más evidente desde las 12 horas de tratamiento (Figuras 21 y 23). Lo cual sugiere que la actividad de JA es una actividad temprana y es de las primeras respuestas que activan las plantas ante el estímulo de un patógeno, la cual además es relacionada con la actividad de etileno para la activación de la ISR, mientras que la actividad de SA es una respuesta tardía y está relacionada con la SAR. Dados los resultados, observamos que hay una respuesta intrincada de ambas líneas de defensa como lo señala la literatura (Lin & Agehara, 2021; Vlot et al., 2021). Una vez que se revisaron los distintos escenarios de los efectos de los RLs y PC sobre *A. thaliana*, también se revisó la activación del sistema de defensa mediante la preexposición a estos factores de virulencia, con una confrontación posterior con cepas patógenas de PAO1, con el objetivo de comparar los resultados con los publicados en (Solis-Ortiz et al., 2022). Ambas evidencias sugieren que la respuesta de defensa en plantas es intrincada pues hay participación de ISR y SAR, con la participación de las fitohormonas SA y JA, activando el switch que redirecciona la energía de desarrollo hacia defensa (Margalha et al., 2019; McMillan et al., 2021), mediante la inactivación de AtTOR y activación de MPK3/MPK6. Estos resultados también soportan que las mutantes patógenas de PAO1 empleadas, logran activar a MPK3/MPK6, pues estas son mutantes con producción alta de RLs y PC, los cuales han demostrado ser factores importantes para la patogenicidad de PAO1. Los factores de virulencia o efectores de las bacterias pueden ser censados por las plantas para activar las cascadas de MAPK (M. Zhang et al., 2018; Zhou & Zhang, 2020), mediante receptores de membrana (Macho & Zipfel, 2014; W. Zhang et al., 2013), sin embargo ese es un enfoque que no se revisó en este trabajo, pero se puede abordar para la continuidad de este proyecto en trabajos posteriores.

6.3. CONCLUSIONES.

Los CDPs actúan como elicitores de la respuesta de defensa de *A. thaliana*, al “inmunizar” la planta se contrarrestan los efectos negativos de las mutantes patógenas de *P. aeruginosa* PAO1 los cuales se relacionan principalmente con RLs y PC, que son factores de virulencia importantes para la patogenicidad de PAO1.

El mecanismo de defensa se activa mediante un switch entre las vías de señalización de AtTOR y MAPKs en el módulo MPK3/MPK6, desencadenando la respuesta sistémica inducida con los CDPs, pues se activa a *LOX2* asociado a JA, pero no a *PR-1* asociado a SA.

Los ramnolípidos y piocianina activan la respuesta sistémica adquirida al activar tanto la expresión de *LOX2* como de *PR-1*. La actividad elicitora de los CDPs se evidencia más en comparación con la actividad elicitora promovida por los RLs y PC.

Como perspectivas, queda pendiente el mapeo total de la vía de MAPKs para la activación de MPK3/MPK6 ante el efecto de los RLs y PC. Otra perspectiva importante es la revisión de los receptores implicados en el reconocimiento de los RLS, PC y CDPs por las plantas. Finalmente, el último enfoque es la revisión del nivel de expresión de los genes defensa ya revisados, así como otros que estén implicados durante los tratamientos con RLs, PC y CDPs.

7. ARTICULO DE DIVULGACIÓN

U.M.S.N.H. | Año 9 / Julio-Agosto/ No. 52

ARTÍCULO

Inmunidad como defensa ¿en plantas?

Cristhian Said Solis Ortiz y Homero Reyes de La Cruz



Cristhian Said Solis Ortiz, Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas en la Opción Químico Biológicas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
saidsolis7@gmail.com

Homero Reyes de La Cruz, Profesor-Investigador responsable del Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
homeroreyes@yahoo.com

Tienes las defensas bajas ¿Cuántas veces hemos escuchado la frase cuando nos enfermamos por haber contraído infecciones por algún tipo de agente patógeno como bacterias, virus, hongos o algún parásito? Si bien es cierto que todos tenemos una máquina que nos protege y defiende de estos agentes patógenos, también es cierto que no siempre tiene éxito, y es en ese momento, cuando atacan las infecciones causadas por estos bichos microscópicos o por ingerir huevecillos de parásitos que producen pavor y hasta repulsión como las tenias (*Taenia solium*), mejor conocida como **solitaria**.

¿Cómo es esta maquinaria de defensa?

La maquinaria de defensa de los seres humanos está compuesta por toda una red de células y respuestas humorales, tales como los macrófagos, Linfocitos B, Linfocitos T, basófilos, eosinófilos, tejidos como los ganglios linfáticos, entre otros, que son generados por nuestro propio cuerpo. Además, se ha descrito que el sistema inmunitario de los humanos tiene varias líneas de defensa: la **Inmunidad innata** (natural o inespecífica) que permite controlar la mayor parte de los agentes patógenos que llegan al organismo; la **Inmunidad adquirida** (adaptativa o específica) que proporciona al organismo una respuesta frente a cada agente infeccioso, y que además, se caracteriza por presentar memoria inmunológica propia, la cual evita que el mismo agente infeccioso provoque enfermedad en una segunda infección; y las **Barreras naturales**, como el cerumen de los oídos o el incómodo moco que sale por nuestra nariz, las cuales protegen de la infección de estos agentes patógenos.

Este tipo de sistema defensivo no es exclusivo del humano, también se ha descrito en otras especies animales (otros mamíferos, aves, anfibios, reptiles e incluso insectos), en los que se describe una maquinaria de células y respuestas humorales que son producidas por sus mismos órganos, para intentar contrarrestar enfermedades causadas por diferentes agentes patógenos como el parvovirus canino, la gripe porcina A(H1N1), la gripe aviar A(H5N1), la cisticercosis (causada

por *Taenia solium*), entre otros. Pero, ¿te has preguntado si otros seres vivos como las plantas, también cuentan con un sistema de defensa parecido al de los animales o al de nosotros?

La respuesta es ¡sí!

Por ser las plantas organismos sésiles, quizás pensamos que éstas solo nacen, crecen, se reproducen y mueren, y no se defienden de sus posibles atacantes. Las amenazas que mayormente conocemos son la falta de agua (sequía), el exceso de lluvia y las temperaturas extremas, factores clasificados como de estrés tipo abiótico, lo que significa que las plantas sufren de estrés.

Además de estas amenazas, también tienen problemas de salud como nosotros, provocados por microorganismos patógenos como las bacterias y los hongos, algunos insectos, nemátodos y virus, que son considerados como factores de estrés biótico. Ejemplos de ellos son: la bacteria *Xantomonas orizae* que causa la pudrición de cultivos de vainas de arroz; el hongo *Botrytis cinerea* causante del moho gris o pudrición de cultivos de fresa, zarzamora, tomate, entre otras siembras; y dentro de los virus, uno de los más comunes es el Virus del Mosaico del Tabaco que afecta principalmente al tabaco.

Como podemos ver, los humanos no somos los únicos que tenemos problemas de salud y de estrés. Las plantas también los tienen, de tal manera que, debido a sus estrategias de defensa son organismos que han triunfado en la cadena evolutiva y selectiva.

Hasta el momento, sabemos que las plantas son una alternativa efectiva para contrarrestar muchas de nuestras enfermedades, pues de ellas extraemos una gran cantidad de compuestos, algunos de los cuales son reconocidos como fármacos. Sin embargo, a estos seres vivos ¿Quién los protege o cómo se protegen?

Generalmente, lo más conocido de esta defensa vegetal son los mecanismos tanto estructurales como bioquímicos, ya que las plantas han desarrollado barreras físicas como ceras, espinas, vellosidades, tricomas, entre otras, así como estrategias para la síntesis de compues-



tos químicos que son el arsenal para atacar a sus enemigos, inhibiendo el embate o eliminándolos (ver *Saber Más* 51:19-21).

Pero, ¿las plantas desarrollan inmunidad frente a sus atacantes?

Aunque en las plantas no se ha descrito un sistema de respuesta inmune compuesto por células similar al de humanos, éstas han desarrollado mecanismos que detectan la presencia de microorganismos patógenos, donde las moléculas liberadas suelen ser reconocidas por receptores acoplados a la membrana de las células de las plantas. Posteriormente a esto, se desencadenan una serie de señales intracelulares que generan la liberación de fitohormonas como el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el ácido abscísico, los que además de regular el crecimiento y desarrollo vegetal, también regulan la expresión de genes de respuesta inmune de las plantas. Así es, las plantas tienen mecanismos considerados como de inmunidad; pero, ¿cómo es esta respuesta?

Estas moléculas activan diversos genes de defensa para mejorar la fortificación de la pared celular, para la producción de proteínas de resistencia a patógenos, para la producción de metabolitos secundarios como la camalexina, que funciona como una fitoalexina y cuya función es la de disuadir a patógenos como bacterias y hongos.

Por si fuera poco, las plantas tienen sistemas de defensa contra patógenos que se asemejan al de nosotros, pues en éstas también se desencadenan respuestas rápidas ante infecciones y respuestas de memoria, mecanismo descrito como la respuesta hipersensible en plantas, que consiste en que las células que han sido infectadas en una parte de la planta, mueren para evitar la propagación de la infección hacia los demás órganos de la planta, deteniendo así el avance del patógeno. Además, las plantas cuentan con la respuesta sistémica adquirida, que implica mecanismos complejos de señalización desde donde es el ataque hacia toda la planta; es un mecanismo que alerta para atacar al patógeno y que induce otras formas de defensa.

Actualmente esto puede causar controversia, ya que cuando hablamos de sistema inmune, inme-

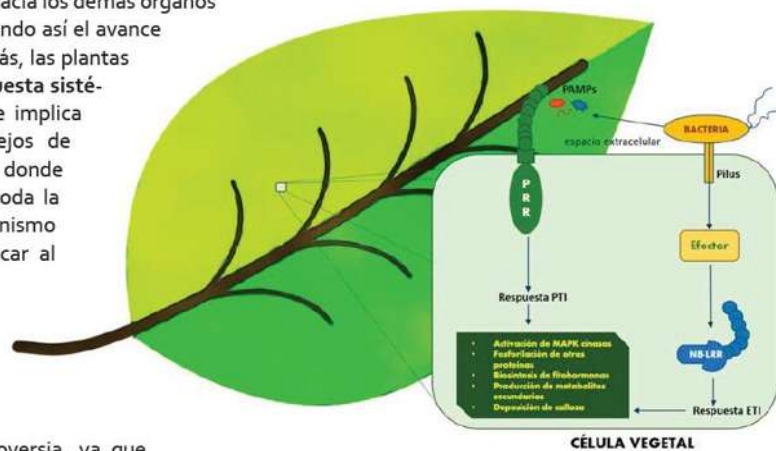
diatamente pensamos en células de defensa especializadas y anticuerpos. Aunque hasta el momento, no se ha descrito que las plantas generen este tipo de células o partículas especializadas que reconozcan patógenos y los eliminen, ya vimos que tienen células que cuentan con diversos mecanismos generados por ellas mismas para protegerse.

Si bien se evita llamarle sistema inmune a estos mecanismos que ocurren en las plantas, nombrándose como respuesta de defensa contra patógenos, con el análisis de ciertas respuestas de defensa se observa que se asemejan tanto en humanos como en plantas, lo cual nos hace relacionar ambos conceptos, señalando de esta manera y tajantemente que, si bien no se les llama igual, el objetivo de estos sistemas es el mismo: la **defensa del hospedero**.

Adicionalmente, las plantas cuentan con líneas de defensa las cuales son inmunidad asociada a patrones moleculares asociados a patógenos (PTI, por sus siglas en inglés) e inmunidad asociada a efectores (ETI, por sus siglas en inglés), donde la primera línea es activada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés); mientras que la segunda línea de defensa es activada por efectores moleculares y es una línea de defensa más robusta y sostenida que la primera.

La respuesta inmune como defensa en plantas

Cabe mencionar que en humanos también se reconocen diferentes PAMPs a través de la maquinaria involucrada en la respuesta inmune. Ambas líneas de defensa en plantas, regulan la expresión de fitohormonas como el ácido salicílico y el ácido jasmónico, los cuales pueden tener actividades





independientes, sinérgicos o de competencia entre sí, dependiendo de las necesidades de defensa de la planta.

Comparando ambos sistemas, el de plantas y el de mamíferos, los dos tienen mecanismos de reconocimiento de patógenos; ambos tienen memoria de defensa; en ambos casos el reconocimiento de un patógeno implica la activación de cascadas de señalización que activa la producción de otras sustancias que ayudan en la defensa; ambos tienen respuestas localizada y sistémica; y además, recientemente se reporta que en plantas, la preexposición a moléculas de origen microbiano, puede ayudar a entrenar el sistema de defensa y a desencadenar respuestas efectivas en eventos posteriores ante los patógenos.

Esto último, es similar al efecto que presentan las vacunas hechas con virus atenuados, que ayudan a entrenar al cuerpo humano para eventos de exposición posterior, como es el caso de las vacunas contra el sarampión, la hepatitis B o la influenza. Todo lo anterior resulta interesante, ya que abre una puerta hacia nuevas alternativas para el cuidado de cultivos de interés agrícola, lo cual se puede traducir en la reducción de pérdidas económicas en ese sector a causa de infecciones por patógenos.

Aún quedan dudas por esclarecer acerca del sistema de defensa de las plantas; sin embargo, como aporte inicial, en este artículo expusimos un análisis concreto que permite aseverar que las plantas tienen un sistema inmune como parte de sus respuestas de defensa contra patógenos.



Ojito-Ramos K. y Portal O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología vegetal*, 10(1):3-19.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/266/240>

Toche P.P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4):446-457.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864012703358>

Jiménez G.S., Ducoing H.P. y Sosa M.R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3):355-363.
<https://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>

8.- ANEXOS

8.1. Artículo de colaboración.

Durante el desarrollo de este trabajo se colaboró en otras líneas de investigación del laboratorio de donde derivó la siguiente publicación internacional en la que estoy incluido como coautor. Mismo que puede ser consultado directamente en el siguiente enlace:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-022-02095-5>

Díaz-Pérez, S. P., Solis, C. S., López-Bucio, J. S., Valdez Alarcón, J. J., Villegas, J., & Campos-García, J. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*, 1-15.

Microbial Ecology
<https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>

HOST MICROBE INTERACTIONS



Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation

Sharel Pamela Díaz-Pérez¹ · Christian Said Solis¹ · Jesús Salvador López-Bucio² · Juan J. Valdez Alarcón³ · Javier Villegas⁴ · Homero Reyes-De la Cruz² · Jesús Campos-García¹

Received: 9 December 2021 / Accepted: 29 July 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium for humans, animals, and plants, through producing different molecular factors such as biofilm, siderophores, and other virulence factors which favor bacterial establishment and infection in the host. In *P. aeruginosa* PAO1, the production of these factors is regulated by the bacterial quorum sensing (QS) mechanisms. From them, siderophores are involved in iron acquisition, transport, and homeostasis. They are also considered some of the main virulence factors in *P. aeruginosa*; however, detailed mechanisms to induce bacterial pathogenesis are poorly understood. In this work, through reverse genetics, we evaluated the function of bacterial pathogenesis in the *pvd* cluster genes, which are required for synthesizing the siderophore pyoverdine (PVD). Single *pvdI*, *pvdJ*, *pvdL*, and double mutant strains were analyzed, and contrary to expected, the *pvdL* and *pvdI* mutations increased the concentration of PVD and other phenazines, such as pyocyanin (PYO) and phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and also an increased biofilm production and morphology depending on the autoinducer 2-alkyl-4-quinolone (PQS) and the QS molecules acyl-homoserine lactones. Consequently, in the *in vivo* pathogenicity model of *Caenorhabditis elegans*, the mutations in *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* increased the survival of the worms exposed to supernatants or biofilms of the bacterial cultures. However, the double mutant *pvdI/pvdJ* increased its toxicity in agreeing with the biofilm production, PVD, PYO, and PCA. The findings indicate that the mutations in *pvd* genes encode non-ribosomal peptide synthetases impacted the biofilm's structure, but suppressively also of the phenazines, confirming that the siderophores contribute to the bacterial establishment and pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1.

Keywords Non-ribosomal peptide synthetases · *Pseudomonas aeruginosa* · Quorum sensing · Biofilm · Siderophores · Pyoverdine · Pyocyanin

Jesús Campos-García
jesus.campos@umich.mx

¹ Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. U-3, Ciudad Universitaria, CP. 58030 Morelia, Michoacán, México

² Laboratorio de Control Traduccional, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

³ Centro de Estudios Multidisciplinarios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Michoacán, México

⁴ Laboratorio de Interacción Suelo, Planta, Microorganismo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic, pathogenic bacterium that causes pneumonia [1], sepsis [2], and other acute infections that commonly affect immunocompromised patients [3]. QS is a cell-to-cell communication system that uses signal molecules (autoinducers) to enable hierarchical signaling networks [4] and coordinate diverse physiological processes the bacterial density through modulating a vast number of genes that drive the production of proteases, elastase, exotoxins, rhamnolipids, pyocyanin, hydrogen cyanide, and some of the considered as virulence factors and also oxidative stress and antibiotic resistance, motility, and biofilm formation; additionally, the QS systems regulate immune response evasion in humans and animals [5].

Published online: 11 August 2022

Springer

6]. *Pseudomonas aeruginosa* possesses at least four functional QS circuits, two of them are mediated by N-acyl-homoserine lactones (HSL) known as *Las* and *Rhl*, and two are mediated by quinolones and carbaldehyde called *Pqs* and *Iqs* QS systems, respectively [7]). The autoinducers of *Las* and *Rhl* systems are *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) and *N*-butanoyl-*L*-homoserine lactone (C4-HSL), which are synthesized by the LasI and RhlI acyl-*L*-homoserine lactone synthases, respectively [6, 8, 9]. The *Pqs*-QS system involves the participation of 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1*H*)-quinolone (PQS), 2-heptyl-4-hydroxyquinoline (HHQ), and 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide (HQNO) autoinducers that are synthesized by the enzymes encoded in the *pqsABCDHR* gene cluster. Both QS systems link signal transduction to LysR-type transcription regulators, LasR, RhlR, and PqsR, which specifically respond to the cognate signal molecules [6, 10, 11]. Lastly, the *Iqs* system is defined by the 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde signaling molecule (IQS, also known as aeruginaldehyde and its down-product, the dihydroaeruginone, Dha), which is synthesized by the enzymes from the *ambBCDE* gene cluster [5, 6, 12]. The *Iqs* system by IqsR protein regulates the *Pqs* QS-system into the PqsR transcriptional regulator and, consequently, acts on the RhlR regulator from the *Rhl* QS-system.

Biofilms are complex, robust structures resulting from organized social communities of microorganisms connected to a surface constituted by an extracellular polymeric matrix (polysaccharides, lipids, proteins, and extracellular DNA) and are different from planktonic bacterial cells, which typically form heterogenic communities with a high cell density that respond coordinately and modulate gene expression and physiological activities [13]. Biofilms allow the microorganisms to resist antibiotics, oxidative stress, nutrient deprivation, and evading the host's immune responses, which is an essential factor in bacterial colonization and pathogenesis [14–16]. In *P. aeruginosa*, a biofilm is commonly associated with chronic infections; it contains extracellular molecules such as cyanide, rhamnolipids, elastase, pyocyanin, and siderophores regulated through QS systems [13, 16, 17].

Likewise, the production of siderophores, such as pyoverdine — a fluorescent peptide-siderophore — is essential for iron acquisition and biofilm formation at the infection site [17]. At least 60 different pyoverdine molecules produced by diverse *Pseudomonas* strains have been chemically characterized; they consist of a dihydroquinoline-type chromophore linked to a peptide (sequences strain-specific) [18].

Pyoverdine biosynthesis in *P. aeruginosa* and fluorescent *Pseudomonads* is a complex process involving the *pvd* gene cluster. At least 12 different gene products have been described; the resulting proteins allow the production of more than 60 different pyoverdines [18, 19]. The *Pseudomonas* pyoverdines share the structure of the

chromofluorophore ((1*S*)-5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1*H*-pyrimido-[1,2-*a*]quinoline-1-carboxylic acid) but differ in the attached strain-specific peptide chain which is synthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) [18, 19]. The pyoverdine synthesis involves first the biosynthesis by the siderosome at the cytoplasmic level, participating the NRPS PvdL, PvdI, PvdJ, and PvdD, also with the other enzymes such as PvdH, PvdF, and PvdA. After the siderophores are produced, they are transported to the periplasm space, where they are modified and finally exported out of the bacterial cell by a complex mechanism of secretion or recycling to iron acquisition where multiple proteins participate (PvdE, PvdQ, PvdP, PvdO, PvdN, PvdT, PvdR, OpmQ, FpvA, FpvC, FpvF, FpvR, FpvI, PvdS, etc. [18].

Despite that, it has been demonstrated that the siderophores synthesized by the NRPS play essential roles in cell–cell communication and biofilm formation, which regulates the infective and colonization capacity of the bacterium on the host poorly understood. There is controversy about the role of the *pvd* genes in *P. aeruginosa*. Some studies suggest that it is crucial in establishing and maintaining bacterial infection. In contrast, other studies indicate that the *pvd* genes are dispensable in producing pyoverdine [20].

This study aimed to characterize the effect of mutation on NRPS encoded in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* genes, which have been involved in the synthesis of pyoverdine siderophores, a range of virulence factors production also as in the biofilm production/structure, and pathogenesis of the *P. aeruginosa* bacteria.

Methods

Bacterial Strains

The mutant strains used in this study were derived from the *P. aeruginosa* PAO1 (Table 1). All strains were grown in Luria–Bertani (LB) with their respective antibiotics. *Escherichia coli* JM109 (pSB1075) was added to 100 µg/mL of ampicillin. For *P. aeruginosa*, 200 µg/mL streptomycin, 60 µg/mL tetracycline, and 50 µg/mL gentamicin were used.

Mutagenesis Procedure

Mutants were constructed using triparental conjugation as previously described [26]. Using the *P. aeruginosa* PAO1 wild-type strain and the single mutants, the pRK2013 helper plasmid and the *Escherichia coli* S17.1 strain containing the respective plasmids pK*pvdL*::*Gm^R*, pK*pvdJ*::*Gm^R*, and pK*pvdL*::*Gm^R*, whose plasmids contain the *pvdI*, *pvdJ*, or *pvdL* genes, interrupted with a gentamycin resistance cassette (Table 1). Bacterial transconjugants were selected from

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or references
Strains		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1SM	Spontaneous streptomycin resistant mutant derived from PAO1 strain	[21]
$\Delta lasI/\Delta rhlI$	Double mutant in the <i>lasI</i> and <i>rhlI</i> genes derived from <i>P. aeruginosa</i> PAO1	[22]
$\Delta pvdI$	PAO1::ISlacZ/hah, Tc ^R , transposon insertion in ORF PA2402, Tc ^R	[23]
$\Delta pvdJ$	PAO1::ISlacZ/hah, Tc ^R , transposon insertion in ORF PA2400, Tc ^R	[23]
$\Delta pvdL$	PAO1::ISlacZ/hah, Tc ^R , transposon insertion in ORF PA2424, Tc ^R	[23]
$\Delta pvdI/\Delta pvdJ$	Double mutant strain derived from $\Delta pvdI$, mutated with the pKpvdJ::Gm ^R plasmid, Tc ^R , Gm ^R	This study
$\Delta pvdJ/\Delta pvdL$	Double mutant strain derived from $\Delta pvdJ$, mutated with the pKpvdL::Gm ^R plasmid, Tc ^R , Gm ^R	This study
$\Delta pvdL/\Delta pvdI$	Double mutant strain derived from $\Delta pvdL$, mutated with the pKpvdI::Gm ^R plasmid, Tc ^R , Gm ^R	This study
Plasmids		
pGEM-T	Plasmid used for PCR fragments cloning; Ap ^R	Invitrogen
pGpvdI	pGEM-T easy with 1.1 kbp DNA fragment containing <i>pvdI</i> from PAO1, disrupted with a gentamycin resistance cassette (900 bp) ligated into <i>SalI</i> site of <i>pvdI</i> gene	This work
pGpvdJ	pGEM-T easy with 1.1 kbp DNA fragment containing <i>pvdJ</i> from PAO1, disrupted with a gentamycin resistance cassette (900 bp) ligated into <i>XhoI</i> site of <i>pvdJ</i> gene	This work
pGpvdL	pGEM-T easy with 1.1 kbp DNA fragment containing <i>pvdL</i> from PAO1, disrupted with a gentamycin resistance cassette (900 bp) ligated into <i>XhoI</i> site of <i>pvdL</i> gene	This work
pKOK4	pBR325 derived mob+ plasmid; Tc ^R , Ap ^R , Cm ^R	[24]
pRK2013	Conjugation helper plasmid, Tra, ColE1 replicon; Km ^R	[25]
pKpvdI::Gm ^R	pKOK4 with <i>EcoRI</i> fragment containing <i>pvdI</i> ::Gm ^R from pGpvdI	This work
pKpvdJ::Gm ^R	pKOK4 with <i>EcoRI</i> fragment containing <i>pvdJ</i> ::Gm ^R from pGpvdJ	This work
pKpvdL::Gm ^R	pKOK4 with <i>EcoRI</i> fragment containing <i>pvdL</i> ::Gm ^R from pGpvdL	This work

plates with the appropriate antibiotics and submitted to PCR for characterization.

Quorum Sensing Assay

The QS AHL-dependent assay was performed using the *E. coli* JM109 reporter strain transformed in the pSB1075 plasmid, which contains the transcriptional fusion *plasRlasIRhII::luxCDABE* and produces luminescence in response to 3-oxo-C12-HSL [27]. *E. coli* JM109 (pSB1075) was grown overnight in LB liquid medium at 37 °C with shaking. The culture was diluted with fresh LB medium to obtain an optical density (OD) of 0.1 at 600 nm (OD600), 200 µL of cultures were distributed in each well of a 96-well culture plate and incubated for 2 h at 37 °C. Subsequently, 50 µL of cell-free supernatants of *P. aeruginosa* cultures was added to each well and incubated at 37 °C with slight shaking. The OD600 and luminescence were determined on the 96-well culture plates using a ChemiDoc MP imaging system (BioRad) [28].

Determination of Virulence Factors

Biofilm

Cultures of *P. aeruginosa* strains were adjusted to an optical density (O.D.) at 600 nm = 0.1 with LB; 100 µL aliquots of

diluted cultures were collocated into 96-well culture plates and incubated at 37 °C for 48 h. Biofilm was quantified by dyeing the 96-well plate with violet crystal, and spectrophotometric absorbance was measured at 550 nm [29]. Protein content in biofilm was determined by the Bradford method (Biorad).

eDNA

eDNA was extracted from biofilms collected from 24-well culture plates, suspended in water, mixed with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and after with chloroform:isoamyl alcohol (24:1). The aqueous phase was mixed with three volumes of isopropanol and 1/10 volume of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and stored at -20 °C for 18 h to precipitation. The eDNA was collected by centrifugation (13,000 × g for 20 min at 4 °C) and washed three times with 70% ethanol, air-dried, and then dissolved in 10 µL of TE buffer (Tris HCl/1 mM EDTA, pH 8.0). The amount of eDNA was determined at UV 260 nm using a spectrophotometer [30].

Elastase

Elastase determination was carried out using the Elastin Congo Red assay (ECR) [31]. 250 µL samples of cell-free

supernatants were treated with 10 mg of ECR; the samples were dissolved in 0.1 M Tris-HCl and 1 mM CaCl₂ at pH 7. The samples were incubated for 16 h at 37 °C with light shaking. The remaining ECR was eliminated by centrifugation at 10,000×g for 5 min, and the absorbance of supernatants was measured at 495 nm in a spectrophotometer.

Pyocyanin

One milliliter of the cell-free supernatant was mixed with 1 mL of chloroform, and the organic fraction was collected and mixed with 1 mL 0.2 N HCl. The organic fraction was then separated, and the absorbance was measured at 520 nm in a spectrophotometer [28].

Alkaline protease

Cultures of *P. aeruginosa* strains were adjusted to OD₆₀₀=0.1 in yeast extract salts (YES) medium and incubated at 37 °C for 48 h. Protease activity was determined by protein halo degradation after staining plates with Coomassie blue (0.1%) in acetic acid-methanol (3:1) for 30 min. Later, dishes were washed with acetic acid (10%), methanol (50%), and distilled H₂O. A transparent halo around the bacterial colony indicates the protein hydrolysis, which was measured using a ruler.

Rhamnolipids

Cell-free supernatants obtained from cultures of *P. aeruginosa* strains grown at 37 °C for 48 h were used to quantify rhamnolipids using the orcinol method rhamnose based on a standard curve of rhamnose measuring absorbance at 545 nm in a spectrophotometer [32].

Pyochelin

Five milliliters of cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains cultures was adjusted pH to 3.0 with citric acid and extracted by adding 1 mL of chloroform. Then, the organic phase was collected and evaporated. Pyochelin was dissolved with 1 mL of methanol 80%, and the absorbance was measured at 313 nm; quantification was performed using the molar extinction coefficient (ε) for pyochelin 4900 M⁻¹ cm⁻¹ in MeOH/H₂O [33].

Pyoverdine

Cell-free supernatants (100 μL) of the *P. aeruginosa* strains cultures were added with 900 μL of a pyridine/acetic acid solution (pyridine 50 mM, acetic acid 50 mM, pH 5.0) and mixed. Absorbance was measured spectrophotometrically at 380 nm, and quantification was performed using the molar

extinction coefficient (ε) of pyoverdine 16,500 M⁻¹ cm⁻¹ [33].

Cyclodipeptides

P. aeruginosa PAO1 strains were grown in 20 mL of LB medium at 37 °C by 48 h with 150 rpm shaking. Cyclodipeptides from cell-free supernatants were extracted with acidified ethyl acetate solvent, evaporated in a rotavapor at 60 °C, and dissolved in methanol. Samples were analyzed by HPLC and GC-MS as previously described [28, 34].

Survival Assays using *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans Bristol N2 worms (provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota) were synchronized by hypochlorite isolation of eggs from gravid adults [35]. L1 larvae were transferred onto nematode growth medium plates seeded with the *E. coli* OP50 strain grown on the plates as a food source. The larvae were incubated at 18 °C for 4–5 days until they reached the young adult phase. Worms were incubated with a cell-free medium collected from bacterial cultures of PAO1 strains grown for 48 h in LB medium or biofilm. For each experiment, 20–30 worms were incubated at 25 °C and scored for life at 6, 12, 24, and 48 h. For statistical purposes, at least three replicates per trial were carried out. *C. elegans* worms were considered dead when they stopped moving and did not respond to a nudge with a platinum wire. The fluorescence microscopy images were taken using a fluorescent and phase-contrast inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) with PlanFluor 4×, 10× dry lenses, and an AmScope ML300 3.1 MP digital color camera.

Microscopy and image acquisition of biofilm structures

Cultures of *P. aeruginosa* PAO1 strains were adjusted to OD₆₀₀=0.1 with LB. 100 μL aliquots of diluted cultures were collocated into 96-well culture plates and incubated at 37 °C for 48 h. After the medium was eliminated, propidium iodide (PI) and SYTO9 stains were added. Plates were washed using PBS and analyzed using a confocal laser scanning microscope (Olympus Fluoview FV1000). All microscopy images were recorded using filter sets for monitoring PI and SYTO9 fluorescence, respectively. Images were obtained using a 40× by 1.3 objective. Simulated 3D images and sections were generated using the Olympus FV1000 software package. Additionally, photographs of biofilms obtained by confocal microscopy were analyzed to determine surface plots and biomass content using the ImageJ (NIH Image) and Comstat2 software [36].

Phenazines Analysis by LC–MS

Twenty milliliters of cell-free supernatants — from the *P. aeruginosa* PAO1 cultures grown in LB medium at 37 °C, under 150 rpm for 48 h — was extracted with an acidified ethyl acetate solvent, evaporated in a rotavapor at 60 °C, and dissolved in 1 mL of methanol. The phenazines were quantified using random liquid chromatography-mass spectrometry (LC–MS/MS), consisting of an ACQUITY UPLC and Xevo TQ-S (Waters). One-microliter samples were injected into a reverse-phase LC column ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 × 50 mm, 1.7 μm) using 0.4 mL/min flow with the gradient program. Eluent A was composed of 4 mM of ammonium-formate and 0.1% formic acid in water, and eluent B was composed of acetonitrile (100%). A linear gradient was used as follows: from 90% A:10% B for 4 min, 10% A:90% B for 1.0 min, 90% A:10% B by 1 min, and finally 1 min for equilibration. A flow rate of 0.4 mL/min was used. The column temperature was maintained at 40 °C, while the samples in the autosampler were at 10 °C. For detection, a Xevo TQ-S instrument was used in the scan (range of 100–2000 *m/z*) and multiple-reaction monitoring (MRM) modes. The MS/MS transition-specific parameters were determined for each compound. All compounds were measured using a capillary voltage of 2.20 (kV) at a gas desolvation temperature of 500 °C, gas flow N₂ (800 L/h), cone gas flow (50 L/h), and nebulizer gas flow (7.0 Bar). Calculations were performed using each compound's peak areas of the quantifier transition. MS/MS acquisition phenazine was operated in the same parameter using fixed collision energy 30 eV in positive mode.

RT-qPCR

RNA total from the *P. aeruginosa* strains cultures was obtained after 24 h of growth as described [37], treated with DNase (Thermo Fischer Scientific). It was utilized to obtain cDNA through Superscript II Reverse Transcriptase using reverse random primers (Thermo Fischer Scientific) in a reaction volume of 20 μL for 1 μg of RNA material, according to the manufacturer's instructions. The resulting reaction was diluted to 50 μL, and 2 μL was added to a qPCR SYBR-Green reaction mix which contains 5 μL of PCR master mix, 0.5 μL of forward and reverse primers for each gene to evaluate (Table S1, supplementary material), and deionized sterile water to a final volume of 10 μL. The qPCR reaction was performed in a ABI StepOne thermocycler (Applied Biosystems) with the thermal cycling program 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 5 s, and 60 °C for 30 s. The product was routinely examined using a dissociation curve as suggested by Applied Biosystems, and the amount of transcript was compared with the relative Ct method with *rpoS* gene as an internal reference control. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to

analyze the experimental data of the genes *lasI*, *rhlA*, *psqA*, *phzS*, *pslA*, *pelB*, and *pvdL*.

Statistical Analysis

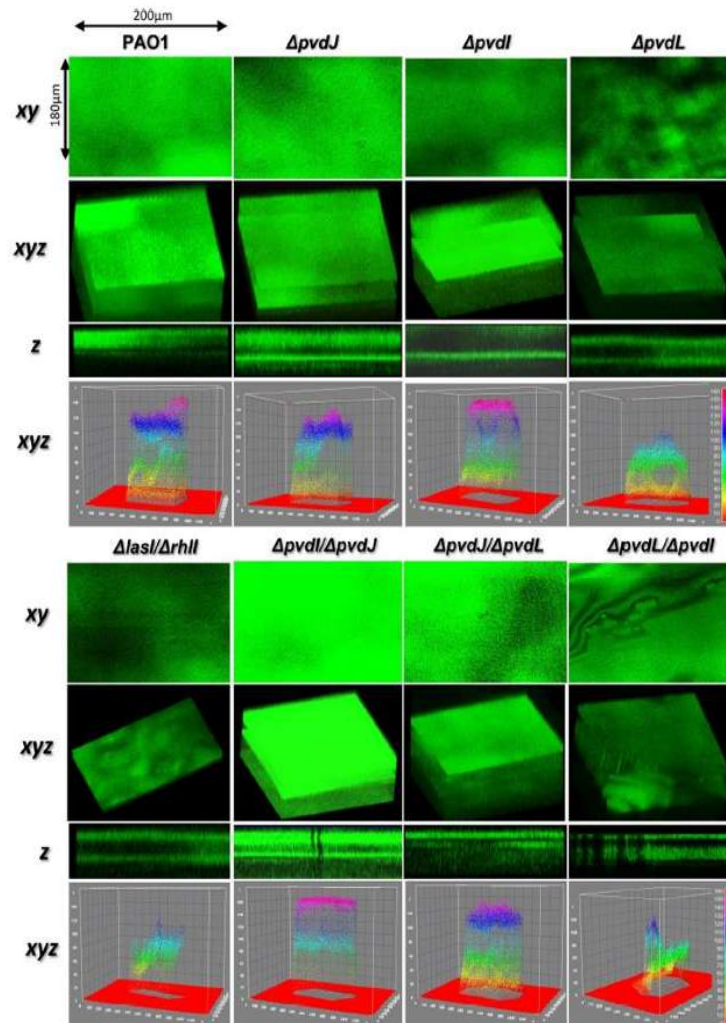
For all experiments, the overall data were statistically analyzed by using the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc.). One-way variance (ANOVA) analyses with Tukey's post hoc tests were performed to determine treatments' statistical differences.

Results

The Mutation of *pvd* Genes Modifies Biofilm Structure in *P. aeruginosa* PAO1 and Biofilm Production

Biofilm formation was determined into the single and double mutants in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* genes — which encode NRPS described as being required for the pyoverdine synthesis — and evaluated the effect on the biofilm structure by confocal microscopy. The biofilm's typically smooth and uniform morphology in the *P. aeruginosa* PAO1 strain is observed (Fig. 1). Figure 2a and b show the quantification of the fluorescence intensity rendered by bacterial cells and the thickness of the biofilm, respectively. In addition, surface plots showed clearly the constitution of layers and intensity of complexity of the particles, observed as dots (Fig. 1; analyzed by ImageJ and Comstat2 software as described [36]). The biofilm structure of the $\Delta pvdJ$ mutant displays similar characteristics to the WT strain (Figs. 1 and 2a and b). The mutant $\Delta pvdI$ showed decreased fluorescence intensity (*xy* plane) and decreased internal compaction (*z* plane) than the WT, and interestingly, the $\Delta pvdL$ mutant exhibited the most substantial impairment in fluorescence intensity, thickness, and internal biofilm complexity; its biofilm contained rough structures, like mountains, and delicate linear structures like thin fibers (Figs. 1 and 2a and b). The double mutant $\Delta pvdII/\Delta pvdJ$ shows similar characteristics to WT, and the double mutant $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ severely affected their biofilm structure (producing thin biofilm layers with irregular morphology) and decreased fluorescence intensity (Figs. 1 and 2a and b). The $\Delta pvdJ$ and the double mutant $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ showed similar morphology and structure to the WT strain; however, the complexity was affected (*z* plane). Unexpectedly, the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$, although it showed a structure like the WT strain, presented a significant increment in the fluorescence intensity and complexity on the biofilm layer on all planes. As a negative control, the double mutant

Fig. 1 Biofilm structure analyses in the *P. aeruginosa* *pvd* mutants. The *P. aeruginosa* strains were grown on LB medium in 96-well plates to analyze biofilm structure and production. Representative images of biofilm structures in the *pvd* mutants were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) at 48 h of culture at 37 °C. The biofilms were stained with SYTO9 (green) to live cell staining. The image magnification is 40×. The *xy* plane corresponds to a view from the top of the biofilm layer (2-D dimension). The *xyz* plane corresponds to a picture of the biofilm layer in the 3-D dimension. The *z* plane indicates the structure of biofilm seen in a cross-sectional view. Plots of surface analysis 3-D show the constitution of layers and intensity of complexity and particles count-intensity (analyzed by ImageJ software)



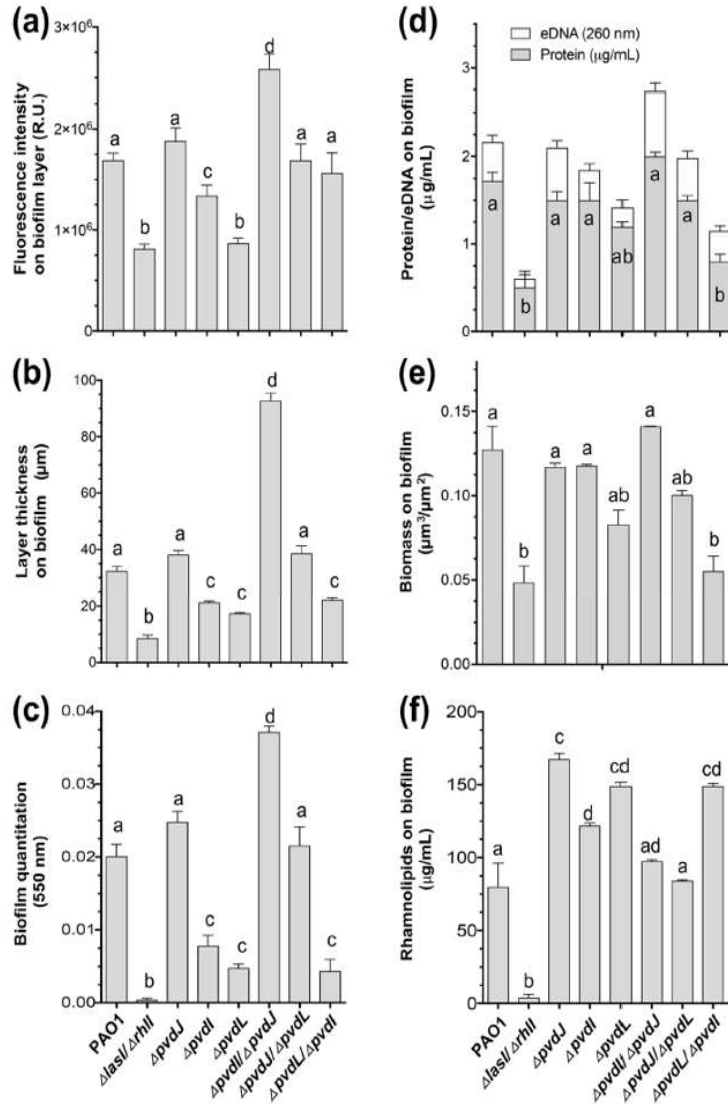
$\Delta lasI/\Delta rhII$ was included. In agreement with previous studies describing AHL-dependent mutations, the biofilm layers are impaired and decreased in fluorescence intensity (Figs. 1 and 2a and b).

In quantifying biofilm production by crystal violet spectrophotometric method, the $\Delta pvdJ$ and $\Delta pvdI/\Delta pvdL$ mutants produced similar amounts of biofilm to the WT strain, while the $\Delta pvdI$, $\Delta pvdL$, and $\Delta pvdI/\Delta pvdI$ mutants produced significantly less biofilm than WT strain (Fig. 2c). As expected, in the $\Delta lasI/\Delta rhII$ strain, the amount of biofilm was almost totally undetected. At the same time, in concordance with the fluorescence method, the mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ exhibited the most increased biofilm production. (Fig. 2c), and the protein and DNA quantitation and biomass determination

were consistent between the different techniques of biofilm analysis (Fig. 2a–e).

The biofilm-mediated bacterial pathogenicity is also associated with various virulence factors; thus, several virulence factors were determined in the *pvd* mutants. The rhamnolipid production was increased in the single mutants *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* and the double mutant $\Delta pvdL/\Delta pvdI$, compared to the WT strain (Fig. 2f). As expected, the $\Delta lasI/\Delta rhII$ double mutation reduced the production of rhamnolipids, proteases, and elastase; however, the single or double *pvd* mutants did not show significant differences in the production of protease and elastase compared with the WT strain (Fig. S1, supplementary material).

Fig. 2 Determination of parameters on biofilms from the *P. aeruginosa pvd* mutants. Images obtained from confocal laser scanning microscopy (CLSM) shown in the figure were analyzed by the following: **a** biofilm quantitation by CLSM as fluorescence intensity (*xy* plane). **b** The layer thickness of the biofilm was determined by CLSM (*xyz* plane). **c** Biofilm quantitation was determined by staining with crystal violet and quantifying OD at 550 nm. **d** Protein and DNA determination in biofilm by Bradford method and optic density at 260 nm, respectively. **e** Biomass determination in biofilms using images obtained from CLSM by ImageJ and Comstat2 software [36]. **f** Rhamnolipids quantitation in cultures of *P. aeruginosa* strains growth in LB medium at 48 h of incubation at 37 °C. Bars represent the means ± SE of at least three independent experiments. One-way ANOVA analysis was performed with Tukey post hoc test. Values with significant differences ($P < 0.05$) are denoted by lowercase letters



Mutation of the *pvd* Genes Modifies the Quorum Sensing Response in *P. aeruginosa* PAO1

To determine whether the modifications of biofilm observed in the *pvd* mutants are associated with QS-dependent modulation, the QS-AHL system functionality was evaluated using a biosensor strain (*E. coli* transformed with the plasmid *plasmRlasIRhl::luxCDABE*) [27]. The cell-free supernatants of the double mutant $\Delta lasI/\Delta rhII$, as expected, produced less than 10% of fluorescence than that of the PAO1 WT strain (100%) (Fig. 3a). Interestingly, the single mutants

$\Delta pvdJ$, $\Delta pvdI$, and $\Delta pvdL$ showed 15–35% in the level of fluorescence induced into the AHL-biosensor compared with that of the WT (Fig. 3a). Although the double *pvd* mutants showed increased fluorescence levels compared to the single *pvd* mutants, the induction levels of the biosensor by the double mutants remained below that of the WT strain (~50% average).

To evaluate whether the *pvd* mutations in the *P. aeruginosa* PAO1 strain modify the response of the *pqs*-QS system, the PQS autoinducer content was determined in culture supernatants. Results showed that the PQS amounts

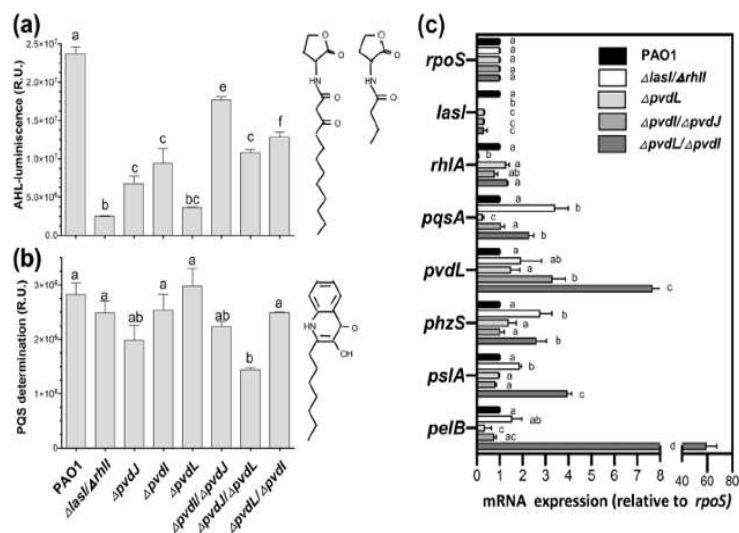


Fig. 3 Participation of QS systems in the *pvd* mutants of *P. aeruginosa*. Cell-free supernatants from cultures of the *P. aeruginosa* strains grown in LB medium for 48 h at 37 °C were used to determine the induction of QS systems and gene expression. **a** Induction of the *lasI/rhl*-dependent biosensor by cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains, determined by bioluminescence generation. The assay was performed using the *E. coli* JM109 reporter strain harboring the pSB1075 plasmid, producing luminescence in response to 3-oxo-C₁₂-HSL. **b** Determination of PQS, 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1*H*)-quinolone

in cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains by HPLC. **c** The relative expression levels of transcripts through RT-qPCR assays for the *P. aeruginosa* strains are shown. Data were analyzed by the 2^{-ΔΔC_t} method using *rpoS*, a reference gene. The results are presented as expression-fold changes. Bars represent the means of at least three independent experiments (a–b), or three replicates of RT-qPCR (c). One-way ANOVA with a Tukey post hoc test was used to compare treatments. Values with significant differences (*P* < 0.05) are denoted by lowercase letters

decreased ~25% in the cell-free supernatants from cultures of the $\Delta pvdJ$ and $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ mutants, while that at ~50% in the $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ mutant (Fig. 3b). mRNA quantitation determined by RT-qPCR at 24 h of cultivation on the indicated mutants showed that the expression of the *lasI* and *rhIA*, as expected in the double mutant $\Delta lasI/\Delta rhII$, was almost undetected, but significantly, the *lasI* decreased in the *pvd* mutants tested (Fig. 3c). On the contrary, the *rhIA* gene expression remains similar to the WT strain in the *pvd* mutants (Fig. 3c). For its part, the expression of the *pqsA* gene was increased in the $\Delta lasI/\Delta rhII$ and the $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ mutant but decreased its expression in the $\Delta pvdL$ mutant.

To explore whether the differential production of virulence factors observed in the *pvdL*, *pvdI*, and *pvdJ* mutants are associated with the interference of the QS circuits involved in siderophore and phenazine synthesis, mRNA quantitation was determined (Fig. 3c). The expression of the *phzS* gene involved in the phenazines synthesis showed increased expression in the $\Delta lasI/\Delta rhII$ and $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ double mutants; a similar behavior was observed in the *pslA* expression (encodes a glycosyl transferase involved in exopolysaccharides required for biofilm formation) [38]. The *pvdL* expression was significantly increased in the double mutants $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ and $\Delta pvdL/\Delta pvdI$. However,

the *pelB* expression (encodes an outer-membrane porin involved in polysaccharides exporting essential for biofilm formation) [39] was impaired in the *pvdL* and double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ but suppressively increased strongly in the double mutant $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ (Fig. 3c).

Mutation of the *pvd* Genes Modifies the Production Phenazines in *P. aeruginosa* PAO1

To evaluate whether the mutation on the *pvd* genes modifies the production of secondary metabolites, also considered virulence factors, quantitation of cyclodipeptides (CDPs) and phenazines was carried out. The cyclo (L-Pro-L-Phe), cyclo (L-Pro-L-Val), and cyclo (L-Pro-L-Tyr) quantitation in the cell-free supernatants of *P. aeruginosa* cultures indicate that individually some mutants produced less of some CDPs. Even total CDP amounts in the *pvd* mutants were not observed compared with the PAO1 WT strain (Fig. 4a–c).

Determining the virulence factor pyocyanin in cell-free supernatants of *P. aeruginosa* cultures shows that the *pvd* mutants (single or double) significantly increased pyocyanin production compared to the PAO1 WT strain, where the $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ mutant was the better producer of pyocyanin (Fig. 4d). In addition, we evaluated the production

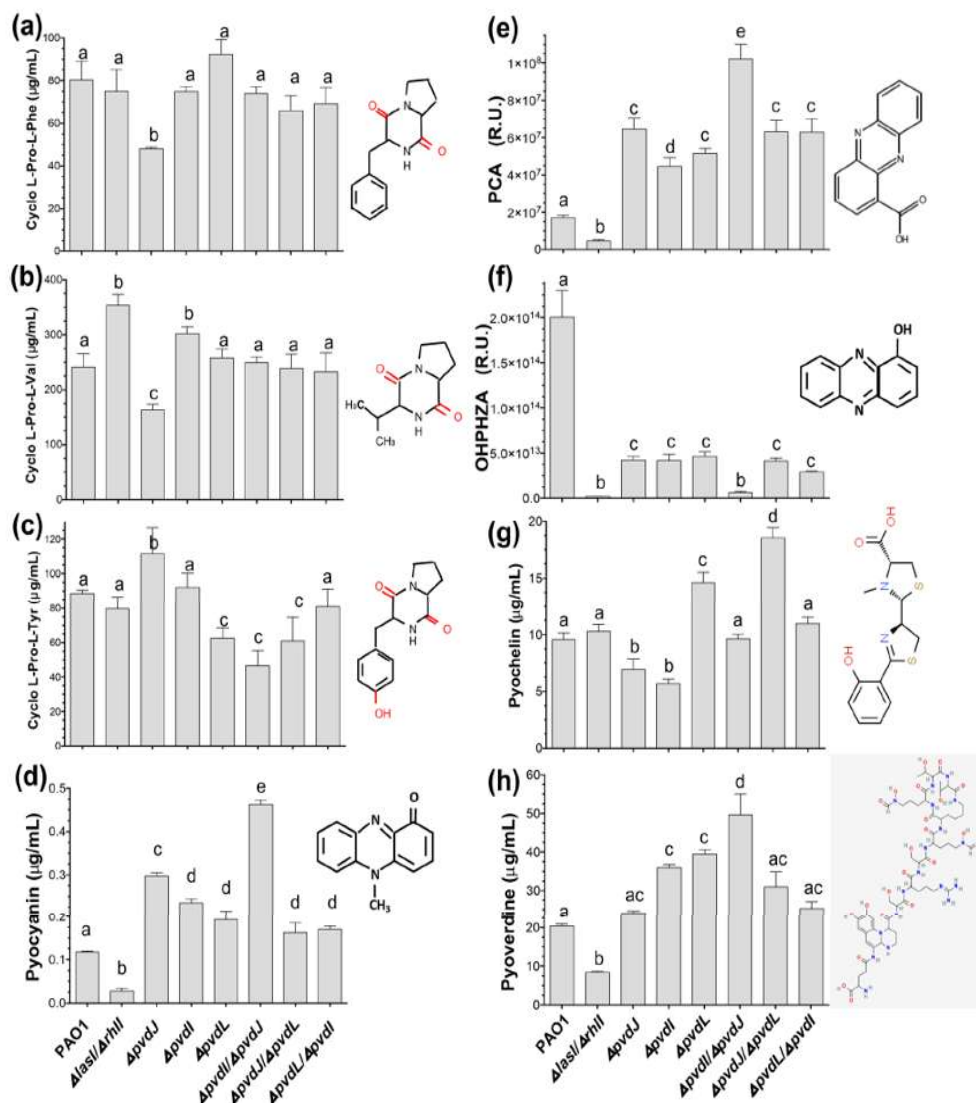


Fig. 4 Determination of secondary metabolites and phenazines in the *pvd* mutants of *P. aeruginosa*. Metabolite determination in cell-free supernatants from cultures of the *P. aeruginosa* strains grown in LB medium for 48 h at 37 °C, as described in the “Materials and Methods.” **a–c** Cyclodipeptides, **a** cyclo (L-Pro-L-Phe), **b** cyclo (L-Pro-L-Val), **c** cyclo (L-Pro-L-Tyr), **d** pyocyanin, **e** PCA, phenazine-1-

carboxylic acid, **f** OHPHAZ, 1-hydroxyphenazine, **g** pyochelin, **h** pyoverdine. Bars represent the means of at least three independent experiments. One-way ANOVA with a Tukey post hoc test was used to compare treatments. Values with significant differences ($P < 0.05$) are denoted by lowercase letters

of PCA and OHPHAZ phenazines in the cell-free supernatants by LC–MS. Notably, the yield of PCA was significantly increased in all the *pvd* mutants, with the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ again the highest PCA producer (Fig. 4e). However, an opposite effect was observed in the OHPHAZ phenazine production, where its production was

significantly impaired in all *pvd* mutants compared to the WT strain. In contrast, the mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ yielded the lowest amounts of OHPZA, similar to the $\Delta lasI/\Delta rhlI$ negative control strain (Fig. 4f). Thus, the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ increased the production of pyocyanin and PCA but impaired OHPHAZ production.

Mutation of the *pvd* Genes Increases the Production of Pyochelin and Pyoverdine Siderophores in *P. aeruginosa* PAO1

Likewise, the iron-sequester siderophores pyochelin and pyoverdine were determined in the cell-free supernatants of the PAO1 cultures. Results show that the mutant strains $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ and $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ produced similar amounts of pyochelin as compared to the WT and double mutant $\Delta lasI/\Delta rhII$ strains. However, the single mutants $\Delta pvdI$ and $\Delta pvdJ$ produced less pyochelin, while the single mutant

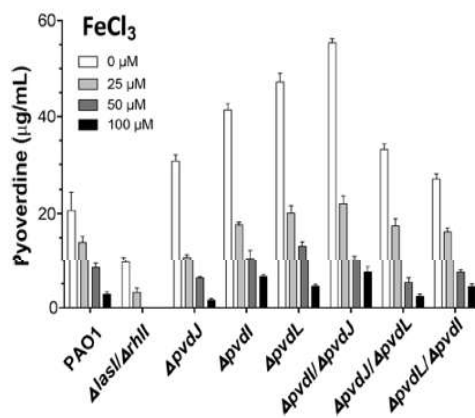


Fig. 5 Effect of iron in the pyoverdine production in the *pvd* mutants of *P. aeruginosa*. Cultures of *P. aeruginosa* strains grown in M9 minimal medium for 48 h at 37 °C with the addition of different concentrations of $FeCl_3$ as indicated were utilized to analyze the pyoverdine content as described in the “Materials and Methods.” Bars represent the means of at least three independent experiments

$\Delta pvdL$ and the double mutant $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ produced the highest amounts of pyochelin (Fig. 4g).

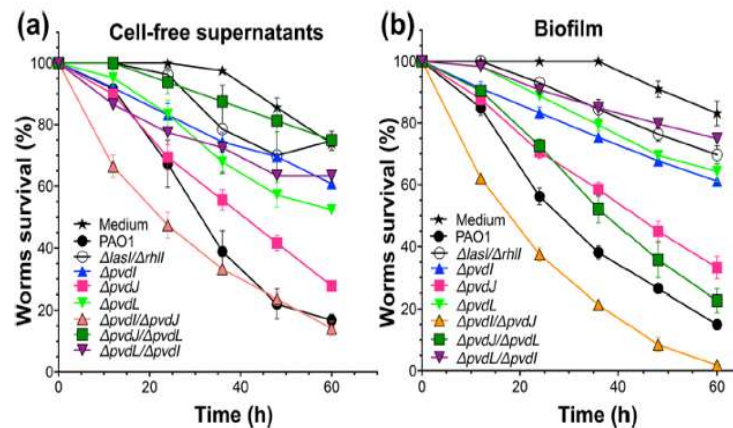
On the other hand, the production of pyoverdine in the *P. aeruginosa pvd* mutants showed an unexpected finding; the production of pyoverdine in the single mutant supernatants, $\Delta pvdI$ and $\Delta pvdL$, and in the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ was significantly increased as compared to the WT strain (Fig. 4h). However, as expected, when the mutants were grown in a medium supplemented with increased concentrations of $FeCl_3$ (0–100 μM), the pyoverdine content decreased depending on the iron concentration in the culture medium (Fig. 5). Taken together, the data indicate that mutations in the *pvd* genes increased pyoverdine production, which was reverted by iron supplementation in the culture media.

Mutation of the *P. aeruginosa pvd* Genes Increases the Death of *Caenorhabditis elegans* Worms

Caenorhabditis elegans is currently used as a host model to evaluate in vivo infection procedures, including the pathogenic *P. aeruginosa* bacterium [40]. Thus, cell-free supernatants and biofilm from cultures of the *pvd* mutants were used to evaluate the pathogenicity using the in vivo worm model. As expected, the worm’s survival plots showed that the PAO1 WT strain was more virulent than the *pvd* mutants. Importantly, the supernatant from the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ was more virulent than that of the WT PAO1 strain. (Fig. 6a). Interestingly, the supernatants of the double mutants $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ and $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ showed a percentage of worms survival similar to the $\Delta lasI/\Delta rhII$ control strain (Fig. 6a). Thus, the killing capability of the cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains was as follows: $\Delta pvdI/\Delta pvdJ > PAO1 > \Delta pvdJ > \Delta pvdL > \Delta pvdI > \Delta pvdL/\Delta pvdI > \Delta lasI/\Delta rhII > \Delta pvdJ/\Delta pvdL$.

Likewise, we evaluated the survival of *C. elegans* worms in the presence of biofilm samples from the *P. aeruginosa*

Fig. 6 Toxicity of cultures of the *pvd* mutants of *P. aeruginosa* on *C. elegans* worms. Adult *C. elegans* worms (20 individuals) were incubated with cell-free supernatants obtained after the growth of *P. aeruginosa* strains in LB medium for 48 h at 37 °C (a) and biofilm (b). Worm survival was determined at indicated times as described in “Materials and Methods.” Bars represent the means \pm standard error (SE) of three independent assays



bacterial cultures grown for 48 h. Results showed similar behavior as when supernatants were used; biofilm from the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ was more pathogenic than that of the WT PAO1 strain. Still, the biofilm from the $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ mutant was less harmful (Fig. 6b). The biofilm killing capability of the *P. aeruginosa* strains on the worm model was as follow: $\Delta pvdI/\Delta pvdJ > \text{PAO1} > \Delta pvdJ/\Delta pvdL > \Delta pvdJ > \Delta pvdI > \Delta pvdL > \Delta lasI/\Delta rhII \geq \Delta pvdL/\Delta pvdI$.

Discussion

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium in which QS controls the production of multiple virulence factors involved in its pathogenicity. In *P. aeruginosa*, as in other pathogen bacteria, forming biofilms is essential for establishing chronic and severe infections, favoring host colonization [16]. In clinical isolates of *P. aeruginosa*, the structures in the biofilms are vastly different; this variation has been correlated to the degree of bacterial virulence, while in a planktonic form, the bacterium is less virulent than when the biofilms are structured [41]. Bacterial pathogenesis mediated by biofilms is controlled by several regulatory factors and the expression of a hierarchically regulated QS system to produce a diversity of virulence factors [6].

In a previous study, Gonzalez et al. (2017) described that mutation of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) modifies the pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1 in *A. thaliana* depending on the production of pyocyanin [28]. Thus, the role of the NRPS in modulating the virulence factors production in *P. aeruginosa* is of great interest to elucidate and understand their relationship with pathogenicity.

In this study, we determined in *P. aeruginosa* PAO1 the effects of mutation in the *pvd* genes, involved in the synthesis of the pyoverdine siderophores, on bacterial pathogenicity. The mutagenesis approach in the PAO1 strain was carried out in the *pvdJ*, *pvdI*, and *pvdL* loci encoding for NRPS described as the primary enzymes involved in pyoverdine siderophores synthesis [19].

The mutation of the *pvd* genes caused a substantial modification of the biofilm structure (Fig. 1). In this sense, the biofilm morphology in the single *pvdI* and *pvdL* mutants showed that the biofilm thickness was significantly decreased, but not for the *pvdJ* mutant, where film thickness increased with a double mutation in the $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ genes. Contrarily, in the double mutant $\Delta pvdL/\Delta pvdI$, the biofilm formation and structure were significantly impaired, consistent with an increase in rhamnolipids production (Figs. 1 and 2). Additionally, the single mutation of the *pvdL* gene showed the most substantial modifications in biofilm structure and complexity; that is in agreement with mRNA expression of the *pelB* gene

involved in exopolysaccharides synthesis and transport, which are essential for biofilm formation [38, 39]. These results indicate that the mutation in the *P. aeruginosa* *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* genes modifies the biofilm composition, showing a correlation with the rhamnolipids content. In agreement, it has been described that the rhamnolipids and the expression of the *pslA* and *pelB* genes are essential to produce, export, and maintain biofilm architecture, facilitating the degradation of the matrix, decreasing the cellular adhesion, favoring the dispersion, and activating the motility of the bacteria contained in the biofilms [16, 38, 39, 42].

Pathogenic bacteria use diverse mechanisms (i.e., production of virulence factors) to evade the immune response by inactivating critical components of the immune system, which is crucial for the invasion of host tissues [43]. *Pseudomonas aeruginosa* produces a variety of extracellular products which possess potent biological activity in mammalian tissues, such as proteolytic enzymes, elastase, and alkaline protease, all of which are regulated by the QS systems [43]. Studies describe that the increase of the elastase and protease is associated with highly complex and more robust biofilm structures, while their decrease results in superficial, unstructured biofilm layers [17]. In our study, changes in the production of these virulence factors in the NRPS-mutants studied were not observed (Fig. S1) and did not show a correlation with the modifications to structure biofilm observed (Fig. 1), suggesting the implication of other virulence factors.

In *P. aeruginosa*, QS has a dual role: the modulation of the virulence factors and induction of the host immune response [44]. In addition, the biofilm formation in *P. aeruginosa* is regulated by QS dependent on *N*-acyl homoserine lactones (QS-AHL) [16]. Also, it has been described that AHL-dependent QS hierarchically regulates downstream QS systems such as the *Pqs* QS-system, which utilizes the quinolone PQS as an autoinducer, which also can modulate the biofilm production and structure [16, 45].

In our study, we further confirmed that the mutation of the NRPS encoded in the *pvd* genes modified the AHL-dependent *las*-QS signaling (Fig. 3a). The double mutant $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ was the only strain that changed the production of the PQS quinolone, the autoinducer of the *Pqs*-QS system (Fig. 3b); however, the *pvd* mutations modified the mRNA expression of the *pqsA* gene (Fig. 3c). This is the first report describing in *P. aeruginosa* that the PQS synthesis is associated with the NRPS (PvdL and PvdJ) modulation. Consequently, the regulation of genes dependent on the *Pqs* QS system may be altered. These findings suggest that mutation of the *pvdL* gene modifies the PQS production. Therefore, the *Pqs* QS-system, also known as the *las*-QS system, can be responsible for the observed biofilm structure modifications, several virulence factors, biofilm

development, and iron-starvation response be modified by the PQS system [10].

Other factors described as modulators of QS are the CDPs. These molecules are involved in the bacterial signaling of QS independent of the *Las/Rhl/Pqs* systems [7]. In *P. aeruginosa*, the CDPs are synthesized by NRPS, which molecules interfere with AHL QS signaling [28, 46]. In this study, our results indicate that the NRPS (PvdI/PvdJ/PvdL) did not modify CDP synthesis (Fig. 4a–c).

On the other hand, phenazine synthesis is associated with biofilm production, which is required for the bacteria establishment in both the host and the lungs of cystic fibrosis patients [47]. *P. aeruginosa* secreted three main phenazines: pyocyanin, phenazine-1-carboxamide, and 1-hydroxyphenazine (OHPHAZ), where OHPHAZ is from phenazine-1-carboxylic acid (PCA) [48]. Pyocyanin plays a role in the multi-species interactions, exacerbation of host pathogenesis, ROS generation, and iron acquisition, being widely described as related to the *P. aeruginosa* pathogenesis [17]. OHPHAZ is implicated in ROS generation, host cilia dysfunction, and iron acquisition, while PCA improves biofilm formation, iron acquisition, and antibiotic resistance [49].

Our study found that mutations in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* significantly increased the production of the

phenazines, pyocyanin (PYO), and PCA; oppositely, the output of OHPHAZ was impaired (Fig. 4d–f). The synthesis of PYO involves an intermediary from the chorismic acid, first to obtain PCA, and subsequently PYO; collaterally is also produced the phenazine-1,6-dicarboxylic acid (PDC), and 1-hydroxyphenazine (OHPHAZ), which all compounds possess multiple biological properties [50]. These findings indicate that in the *P. aeruginosa* PAO1, the NRPS PvdI/PvdJ/PvdL mutations consequently induce the synthesis of other siderophores such as pyochelin or phenazines such as PYO and PCA. Additionally, we can suggest that the pool of OHPHAZ was decreased in function on demand of metabolite precursors required PYO synthesis (Fig. 7). These findings indicate that although the *pvd* genes are essential for the synthesis of pyoverdine, these are also involved in the phenazines synthesis.

In *P. aeruginosa*, it has been described that iron chelation is vital for the establishment of bacterial infection and progression towards a chronic disease where available iron is limited [19]. The siderophores such as pyochelin and pyoverdine can sequester iron from host depots to improve the bacterial establishment during the infection (Fig. 7); additionally, the siderophores can act as signaling molecules [54]. PQS cooperatively stimulates the iron scavenging

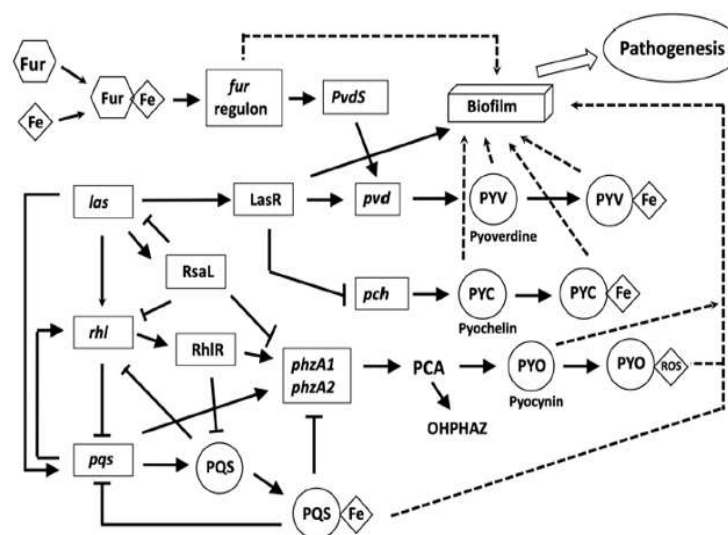


Fig. 7 Model of the interaction of the quorum-sensing system with siderophores biosynthesis and biofilm formation in *P. aeruginosa* PAO1. Iron deprivation induces the expression of the *fur* regulon, which generates the Fur regulator and induce the expression of the PvdS sigma factor. This controls the *pvd* regulon of biosynthesis of pyoverdines (PYV), a kind of siderophore that is involved in the iron acquisition and iron homeostasis. On the other hand, the *las*-QS system regulates the *pqs* operon, which consequently modulates the *pqs*-QS system. The PQS function as an iron sequester also modulates the

phzA1/phzA2 operons involved in the synthesis of phenazines (PCA and OHPHAZ), also as for the ROS scavenger iron-dependent pyocyanin (PYO). Siderophores are essential in the formation of the biofilm structure, rendering with other virulence factors a biofilm structure critical to the establishment of pathogenicity and resistance of *P. aeruginosa* to hosts or environmental niches (the model was adapted from the findings obtained in this work and from models described previously [51–53])

siderophores, such as pyoverdine and pyochelin, resulting in the modulation of siderophore production under different environmental and nutritional conditions [55].

Contrary to impairing the pyoverdine production, in our study, the production of these siderophores was favored mainly in the *pvd* double mutations (Fig. 4g and h). In agreement, the supplementation of iron reverted the overproduction of pyoverdine in a dose-dependent manner (Fig. 5). This finding suggests that multiple participants in the regulation of gene expression of structural genes, regulatory genes, and transport-involved, among other modifications in the pyoverdine structure, show the complexity of the pyoverdines synthesis and the multiple factorial points that are involved in their synthesis and modulation (Fig. 7).

The nematocidal activity of the siderophore pyoverdine has been reported in *P. aeruginosa*, revealing that it is sufficient to kill *C. elegans* [56]. Deletion of the *pvdD* and *pvdJ* genes in *P. syringae* caused the inhibition of pyoverdine production and attenuated virulence against *C. elegans* worms [56]. Furthermore, the deletion of the *pvdD* and *pvdJ* genes negatively impacts phenazine production, which affects the killing capability of *P. aeruginosa* over *C. elegans* [57]. Nevertheless, in our study, it was demonstrated that in the *pvd* mutants, increased pyoverdine concentration was correlated with the decreased capability to cause the fast mortality of *C. elegans*, except for the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$, which continued to be killing at similar levels to the WT strain (Fig. 6a). In *P. aeruginosa*, biofilm is a protective structure for bacterial growth, essential for survival in nosocomial environments; it may also maintain the persistence of the inflammatory response in chronic bacterial infections, favored by the excretion of diverse virulence factors. However, the degree of pathogenicity, expression of virulence factors, or resistance to antibiotics by bacteria cannot always be associated with the ability to form biofilms [58, 59]. But our results point to the possibility that increasing biofilm formation correlates with increased virulence factors, i.e., pyocyanin production as shown in $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ strain, and this modification correlates with increased mortality of *C. elegans*. Whereas, those mutants impaired on biofilm production show decreased killing capability on the in vivo pathogenicity of *C. elegans* model, showing from most virulent to least: $\Delta pvdI/\Delta pvdJ > \text{PAO1} > \Delta pvdJ > \Delta pvdL > \Delta pvdI > \Delta pvdL/\Delta pvdI > \Delta lasI/\Delta rhlI > \Delta pvdJ/\Delta pvdL$. The behavior was similar when utilizing supernatants and biofilms (Fig. 6b).

On the other hand, the PQS system in *P. aeruginosa* regulates the synthesis of several virulence factors, forming an intercommunication between the two central QS systems *Las* and *Rhl* systems. In *P. aeruginosa*, the PYO

synthesis is performed by two paralogous gene clusters (*phz1* and *phz2*), in which the PqsE protein and the *Rhl* QS system regulate its synthesis, along with other virulence factors, such as biofilm and rhamnolipids, all of which are important for the bacterial pathogenicity [47]. Our findings showed that the *las*-QS and *pqs*-QS systems modulate the PYO synthesis pathway, where both PYO and PCA significantly increase concentration for the *pvd* mutants (Figs. 4 and 7).

The role of pyocyanin in iron acquisition has been studied, although how PCA phenazine favors biofilm production by promoting iron chelation is poorly understood. In this context, the iron acquisition in *P. aeruginosa* is associated with the siderophores, pyochelin, and pyoverdine [18, 19]. The pyochelin (low affinity by iron) is synthesized by enzymes encoded into the *pchDCBA* genes cluster. In contrast, pyoverdine types (high affinity by iron) are encoded into the *pvd* genes clusters located in different operons conforming in the PAO1 strain around 20 regulatory and structural proteins [60].

To our knowledge, this is the first report in *P. aeruginosa* that explores the *pvd* gene involvement in the biofilm structure and phenazines production by a QS-dependent mechanism. Our findings showed that the single mutations carried out by transposon insertion in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* were insufficient to abolish the PVD synthesis, indicating that specific modules on the NRPS are functional or that redundancy of function could occur. It further confirms that the NRPS PvdI, PvdJ, and PvdL are involved in synthesizing the pyoverdine siderophore and phenazines, which were found to impact the biofilm structure and the biofilm-associated bacterial establishment pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>.

Acknowledgements We thank Pseudomonas Genome Center Annotation and UWGC for PAO1-transposon mutants donation.

Author Contribution JC-G conceived and designed the study. Material preparation, data collection, and analysis were performed by SD-P, SS, and JV-A. The manuscript was written by SD-P, JV, HR-C, JSL-B, and JC-G, JV-A, JSL-B, and JC-G supported administrative, technical, or material. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México (grant number 256119) and by a Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo/C.I.C.2.14 grant.

Declarations

Ethics Approval Not applicable.

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

References

- Crouch Brewer S, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV Jr (1996) Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 109:1019–1029. <https://doi.org/10.1378/chest.109.4.1019>
- Hirakata Y, Furuya N, Tateda K, Kaku M, Yamaguchi K (1993) In vivo production of exotoxin A and its role in endogenous *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. Infect Immun 61:2468–2473. <https://doi.org/10.1128/iai.61.6.2468-2473.1993>
- Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis 5:279–313. <https://doi.org/10.1093/clinids/5.2.279>
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. EMBO J 22:3803–3815. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366>
- Dandekar AA, Greenberg EP (2013) Plan B for quorum sensing. Nat Chem Biol 9:292–293. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1233>
- Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell 6:26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Ahator SD, Zhang L (2019) Small Is Mighty—Chemical communication systems in *Pseudomonas aeruginosa*. Annu Rev Microbiol 73:559–578. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>
- de Kievit TR, Iglewski BH (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun 68:4839–4849. <https://doi.org/10.1128/iai.68.9.4839-4849.2000>
- Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3:685–695. <https://doi.org/10.1038/nrm907>
- Rampioni G, Falcone M, Heeb S, Frangipani E, Fletcher MP, Dubern JF, Visca P, Leoni L, Cámara M, Williams P (2016) Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog 12:e1006029. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006029>
- Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 184:6472–6480. <https://doi.org/10.1128/jb.184.23.6472-6480.2002>
- Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Chang C, Dong Y, Williams P, Zhang L-H (2013) A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. Nat Chem Biol 9:339–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- Turkina MV, Vikström E (2019) Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Innate Immun 11:263–279. <https://doi.org/10.1159/000494069>
- Vital-Lopez FG, Reifman J, Wallqvist A (2015) Biofilm formation mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* predicted via genome-scale kinetic models of bacterial metabolism. PLoS Comput Biol. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004452>
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA (2020) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Mol Sci 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Brindhadevi K, LewisOscar F, Mylonakis E, Shanmugam S, Verma TN, Pugazhendhi A (2020) Biofilm and quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. Process Biochem 96:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001>
- Das T, Manoharan A, Whiteley G, Glasbey T, Manos J (2020) Chapter 3 - *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and infections: roles of extracellular molecules. In: Yadav, MK, Singh, BP (eds.) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms. Elsevier, pp. 29–46
- Ringel MT, Brtner T (2018) The biosynthesis of pyoverdines. Microb Cell 5:424–437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>
- Schalk IJ, Guillon L (2013) Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. Environ Microbiol 15:1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
- Gulick AM (2017) Nonribosomal peptide synthetase biosynthetic clusters of ESKAPE pathogens. Nat Prod Rep 34:981–1009. <https://doi.org/10.1039/c7np00029d>
- Wong SM, Mekalanos JJ (2000) Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 97:10191–10196. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>
- Li L-L, Malone JE, Iglewski BH (2007) Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. J Bacteriol 189:4367–4374. <https://doi.org/10.1128/jb.00007-07>
- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV, Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 100:14339–14344. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036282100>
- Kokotek W, Lotz W (1991) Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. Gene 98:7–13. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90097-u](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90097-u)
- Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci USA 76:1648–1652
- Díaz-Pérez AL, Zavala-Hernández AN, Cervantes C, Campos-García J (2004) The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 70:5102–5110. <https://doi.org/10.1128/aem.70.9.5102-5110.2004>
- Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS (1998) Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. FEMS Microbiol Lett 163:185–192
- Gonzalez O, Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Díaz-Pérez AL, Magana-Duenas V, Lopez-Bucio J, Campos-García J (2017) Non-ribosomal peptide synthetases from *Pseudomonas aeruginosa* play a role in cyclodipeptide biosynthesis, quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. Microb Ecol 73:616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>
- Coffey BM, Anderson GG (2014) Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 1149:631–641. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48
- Panariello BHD, Klein MI, Pavarina AC, Duarte S (2017) Inactivation of genes *TEC1* and *EFG1* in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. J Oral Microbiol 9:1385372–1385372. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1385372>
- Köhler T, Ouertatani-Sakouhi H, Cosson P, van Delden C (2014) QsrO a novel regulator of quorum-sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE 9:e87814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087814>
- Wang Q, Fang X, Bai B, Liang X, Shuler PJ, Goddard WA 3rd, Tang Y (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. Biotechnol Bioeng 98:842–853. <https://doi.org/10.1002/bit.21462>
- Hoegy F, Mislin GL, Schalk IJ (2014) Pyoverdine and pyochelin measurements. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 1149:293–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_24
- Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proc Natl Acad Sci (USA) 108:7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>

35. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. WormBook, ed The *C. elegans* research community. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
36. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology (Reading, England) 146(Pt 10):2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>
37. Díaz-Pérez AL, Núñez C, Meza Carmen V, Campos-García J (2018) The expression of the genes involved in leucine catabolism of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by the transcriptional regulator LiuR and by the CbrAB/Crc system. Res Microbiol 169(6):324–334. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.05.004>
38. Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, Richardson SH, Ma L, Ralston B, Parsek MR, Anderson EM, Lam JS, Wozniak DJ (2009) Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. Mol Microbiol 73:622–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>
39. Marmont LS, Whitfield GB, Rich JD, Yip P, Giesbrecht LB, Stremick CA, Whitney JC, Parsek MR, Harrison JJ, Howell PL (2017) PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 292:19411–19422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.812842>
40. Powell JR, Ausubel FM (2008) Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 415:403–427. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-570-1_24
41. Thöming JG, Tomasch J, Preusse M, Koska M, Grahl N, Pohl S, Willger SD, Kaefer V, Müsken M, Häußler S (2020) Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. NPJ Biofilms Microbiomes 6:2. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0113-6>
42. Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Sydlatk C, Rosenau F, Blank LM (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. Microb Cell Fact 10:80. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80>
43. Laarman AJ, Bardoe BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JAG, Rooijackers SHM (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. J Immunol 188:386–393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>
44. Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B (2017) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article. Immunol Lett 190:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.002>
45. Cooke AC, Florez C, Dunshee EB, Lieber AD, Terry ML, Light CJ, Schertzer JW (2020) *Pseudomonas* quinolone signal-induced outer membrane vesicles enhance biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. mSphere 5. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01109-20>
46. Campbell J, Lin Q, Geske GD, Blackwell HE (2009) New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. ACS Chem Biol 4:1051–1059. <https://doi.org/10.1021/cb900165y>
47. García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M (2020) The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. J Med Microbiol 69:25–34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>
48. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 183:6454–6465. <https://doi.org/10.1128/jb.183.21.6454-6465.2001>
49. O'Brien S, Fothergill JL (2017) The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. FEMS Microbiol Lett 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx128>
50. Wang S, Huang Z, Wan Q, Feng S, Xie X, Zhang R, Zhang Z (2020) Comparative genomic and metabolomic analyses of two *Pseudomonas aeruginosa* strains with different antifungal activities. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01841>
51. Lin J, Cheng J, Wang Y, Shen X (2018) The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore. Front Cell Infect Microbiol 8:230. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00230>
52. Higgins S, Heeb S, Rampioni G, Fletcher MP, Williams P, Cámara M (2018) Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. Front Cell Infect Microbiol 8:252. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00252>
53. Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A, Genah S, Banin E, Visca P, Imperi F (2017) Ferric uptake regulator fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 199. <https://doi.org/10.1128/jb.00472-17>
54. Little AS, Okkotsu Y, Reinhart AA, Damron FH, Barbier M, Barrett B, Oglesby-Sherrouse AG, Goldberg JB, Cody WL, Schurr MJ, Vasil ML, Schurr MJ (2018) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation status differentially regulates pyocyanin and pyoverdine production. mBio 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02318-17>
55. Popat R, Harrison F, da Silva AC, Easton SA, McNally L, Williams P, Diggle SP (2017) Environmental modification via a quorum sensing molecule influences the social landscape of siderophore production. Proc Biol Sci 284. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0200>
56. Bashir A, Tian T, Yu X, Meng C, Ali M, Li L (2020) Pyoverdine-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas syringae* MB03 and the role of iron in its pathogenicity. Int J Mol Sci 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21062198>
57. Cezairliyan B, Vinayavekhin N, Grenfell-Lee D, Yuen GJ, Saghatelian A, Ausubel FM (2013) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. PLoS Pathog 9:e1003101. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003101>
58. Gajdác M, Baráth Z, Kárpáti K, Szabó D, Usai D, Zanetti S, Donadu MG (2021) No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a laboratory-based in vitro study. Antibiotics (Basel, Switzerland) 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091134>
59. Moser C, Jensen PØ, Thomsen K, Kolpen M, Rybtkje M, Lauland AS, Trøstrup H, Tolker-Nielsen T (2021) Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. Front Immunol 12:625597–625597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625597>
60. Moon CD, Zhang X-X, Matthijs S, Schäfer M, Budzikiewicz H, Rainey PB (2008) Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. BMC Microbiol 8:7. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-7>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Acquaah, G. (2009). *Principles of plant genetics and breeding*. John Wiley & Sons.
- Agredano-Moreno, L. T., de la Cruz, H. R., Martínez-Castilla, L. P., & de Jiménez, E. S. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular BioSystems*, 3(11), 794–802.
- Ahator, S. D., & Zhang, L. (2019). Small Is Mighty—Chemical Communication Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 559–578. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>
- Ahmad, B., Raina, A., & Khan, S. (2019). Impact of biotic and abiotic stresses on plants, and their responses. In *Disease resistance in crop plants* (pp. 1–19). Springer.
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, 17(2), 73–90.
- Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M., & Sarker, S. D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, 5(4), 404–417.
- Albert, I., Böhm, H., Albert, M., Feiler, C. E., Imkampe, J., Wallmeroth, N., Brancato, C., Raaymakers, T. M., Oome, S., & Zhang, H. (2015). An RLP23–SOBIR1–BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nature plants*, 1(10), 1–9.
- Albert, V., & Hall, M. N. (2015). MTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.001>
- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2019). The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiological Research*, 219, 26–39.
- Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J. (2007). Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 92–105.
- Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular nutrition & food research*, 52(1), 79–104.
- Atkinson, N. J., Lilley, C. J., & Urwin, P. E. (2013). Identification of genes involved in the response of Arabidopsis to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant physiology*, 162(4), 2028–2041.
- Attaran, E., Zeier, T. E., Griebel, T., & Zeier, J. (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(3), 954–971.
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature immunology*, 6(10), 973–979.
- Bahar, O., Mordukhovich, G., Luu, D. D., Schwessinger, B., Daudi, A., Jehle, A. K., Felix, G., & Ronald, P. C. (2016). Bacterial outer membrane vesicles induce plant immune responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(5), 374–384.
- Bakshi, A., Moin, M., Kumar, M. U., Reddy, A. B. M., Ren, M., Datla, R., Siddiq, E. A., & Kirti, P. B. (2017). Ectopic expression of Arabidopsis Target of Rapamycin (AtTOR) improves water-use efficiency and yield potential in rice. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16.
- Balmer, D., Planchamp, C., & Mauch-Mani, B. (2013). On the move: Induced resistance in monocots. *Journal of experimental botany*, 64(5), 1249–1261.

- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Dougherty, K. M., Biswas, S., Mukhtar, M. S., Vicente, J., Holub, E. B., & Dangl, J. L. (2012). The molecular basis of host specialization in bean pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions*, *25*(7), 877–888.
- Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J. L., Bautor, J., & Parker, J. E. (2006). Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in Arabidopsis immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the nudix hydrolase NUDT7. *The Plant Cell*, *18*(4), 1038–1051.
- Bastedo, D. P., Khan, M., Martel, A., Seto, D., Kireeva, I., Zhang, J., Masud, W., Millar, D., Lee, J. Y., & Lee, A. H.-Y. (2019). Perturbations of the ZED1 pseudokinase activate plant immunity. *PLoS pathogens*, *15*(7), e1007900.
- Bauer, S., Mekonnen, D. W., Hartmann, M., Yildiz, I., Janowski, R., Lange, B., Geist, B., Zeier, J., & Schäffner, A. R. (2021). UGT76B1, a promiscuous hub of small molecule-based immune signaling, glucosylates N-hydroxypipicolinic acid, and balances plant immunity. *The Plant Cell*, *33*(3), 714–734.
- Bednarek, P. (2012). Chemical warfare or modulators of defence responses—the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, *15*(4), 407–414.
- Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V., & Valier, A. (2002). Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit. *Plant Disease*, *86*(6), 599–602.
- Bellezza, I., Peirce, M. J., & Minelli, A. (2014). Cyclic dipeptides: From bugs to brain. *Trends in molecular medicine*, *20*(10), 551–558.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., & Staskawicz, B. J. (1994). RPS2 of Arabidopsis thaliana: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, *265*(5180), 1856–1860.
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., de Jonge, R., Burgman, W. P., Burmølle, M., Herschend, J., Bakker, P. A., & Pieterse, C. M. (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME journal*, *12*(6), 1496–1507.
- Bernsdorff, F., Döring, A.-C., Gruner, K., Schuck, S., Bräutigam, A., & Zeier, J. (2016). Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and-independent pathways. *The Plant Cell*, *28*(1), 102–129.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J. F., Pöschl, Y., Gust, A. A., Scheel, D., & Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(19), 8067–8072. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810206106>
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant*, *8*(4), 521–539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Bittner, F., Oreb, M., & Mendel, R. R. (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(44), 40381–40384.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of Microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition. *Ann. Rev. Plant Biol*, *60*, 379–406.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—Fuel for the fire. *Molecular plant-microbe Interactions*, *22*(5), 487–497.

- Bomberger, J. M., MacEachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S., O'Toole, G. A., & Stanton, B. A. (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS pathogens*, *5*(4), e1000382.
- Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual review of phytopathology*, *55*, 257–286.
- Bredenbruch, F., Geffers, R., Nimtz, M., Buer, J., & Häussler, S. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environmental microbiology*, *8*(8), 1318–1329.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R., & Häussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Journal of bacteriology*, *187*(11), 3630–3635.
- Brint, J. M., & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *Journal of bacteriology*, *177*(24), 7155–7163.
- Cai, J., Jozwiak, A., Holoidovsky, L., Meijler, M. M., Meir, S., Rogachev, I., & Aharoni, A. (2021). Glycosylation of N-hydroxy-pipecolic acid equilibrates between systemic acquired resistance response and plant growth. *Molecular plant*, *14*(3), 440–455.
- Caruana, J. C., & Walper, S. A. (2020). Bacterial membrane vesicles and their applications as vaccines and in biotechnology. En *Bacterial Membrane Vesicles* (pp. 219–251). Springer.
- Cecchini, N. M., Roychoudhry, S., Speed, D. J., Steffes, K., Tambe, A., Zodrow, K., Konstantinoff, K., Jung, H. W., Engle, N. L., & Tschaplinski, T. J. (2019). Underground azelaic acid–conferred resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *32*(1), 86–94.
- Cecchini, N. M., Steffes, K., Schläppi, M. R., Gifford, A. N., & Greenberg, J. T. (2015). *Arabidopsis* AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nature communications*, *6*(1), 1–12.
- Chahtane, H., Nogueira Füller, T., Allard, P.-M., Marcourt, L., Ferreira Queiroz, E., Shanmugabalaji, V., Falquet, J., Wolfender, J.-L., & Lopez-Molina, L. (2018). The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in *Arabidopsis*. *eLife*, *7*, e37082. <https://doi.org/10.7554/eLife.37082>
- Chandler, C. E., Horspool, A. M., Hill, P. J., Wozniak, D. J., Schertzer, J. W., Rasko, D. A., & Ernst, R. K. (2019). Genomic and phenotypic diversity among ten laboratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, *201*(5), e00595-18.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., & Chaudhuri, B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, *468*(7323), 527–532.
- Chen, T., Nomura, K., Wang, X., Sohrabi, R., Xu, J., Yao, L., Paasch, B. C., Ma, L., Kremer, J., & Cheng, Y. (2020). A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature*, *580*(7805), 653–657.
- Chen, Y.-C., Holmes, E. C., Rajniak, J., Kim, J.-G., Tang, S., Fischer, C. R., Mudgett, M. B., & Sattely, E. S. (2018). N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(21), E4920–E4929.
- Chin, S., Behm, C. A., & Mathesius, U. (2018). Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. *Plants*, *7*(4), 85.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D., Felix, G., & Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, *448*(7152), 497–500.

- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297.
- Chrzanowski, \Lukasz, \Lawniczak, \Lukasz, & Czaczyk, K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 401–419.
- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, 18(8), 1247–1256.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in plant science*, 16(10), 524–531.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol*, 53(1), 97–119.
- Corona-Sánchez, I., Peña-Urbe, C. A., González-López, O., Villegas, J., Campos-García, J., & de la Cruz, H. R. (2019). Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* modulate the maize (*Zea mays* L.) root system and promote S6 ribosomal protein kinase activation. *PeerJ*, 7, e7494.
- Couto, D., & Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537–552.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582.
- Criollo-Arteaga, S., Moya-Jimenez, S., Jimenez-Meza, M., Gonzalez-Vera, V., Gordon-Nunez, J., Llerena-Llerena, S., Ramirez-Villacis, D. X., van 't Hof, P., & Leon-Reyes, A. (2021). Sulfur Deprivation Modulates Salicylic Acid Responses via Nonexpressor of Pathogenesis-Related Gene 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/plants10061065>
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol*, 66(487), 10–1146.
- Dakora, F. D., & Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Food security in nutrient-stressed environments: exploiting plants' genetic capabilities*, 201–213.
- Daniel Rexin, Meyer, C., Robaglia, C., & Veit, B. (2015). *TOR signalling in plants | Biochemical Journal | Portland Press*. <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/470/1/1/48608/TOR-signalling-in-plants?redirectedFrom=fulltext>
- de Kievit, T. R., Kakai, Y., Register, J. K., Pesci, E. C., & Iglewski, B. H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlII regulation. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11251.x>
- De Vleeschauwer, D., Gheysen, G., & Höfte, M. (2013). Hormone defense networking in rice: Tales from a different world. *Trends in plant science*, 18(10), 555–565.
- De Vleeschauwer, D., Seifi, H. S., Filipe, O., Haeck, A., Huu, S. N., Demeestere, K., & Höfte, M. (2016). The DELLA Protein SLR1 Integrates and Amplifies Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Innate Immunity in Rice. *Plant Physiology*, 170(3), 1831–1847. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01515>
- De Vleeschauwer, D., Xu, J., & Höfte, M. (2014). Making sense of hormone-mediated defense networking: From rice to *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 5, 611.
- Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2012). SOS—too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in plant science*, 17(9), 538–545.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-

- heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(5), 1339–1344.
- Díaz-Pérez, S. P., Solís, C. S., López-Bucio, J. S., Valdez Alarcón, J. J., Villegas, J., & Campos-García, J. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pycocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*, 1–15.
- Diggle, S. P., Cornelis, P., Williams, P., & Cámara, M. (2006). 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Old molecules, new perspectives. *International journal of medical microbiology*, *296*(2–3), 83–91.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M., & Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular microbiology*, *50*(1), 29–43.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., & Cámara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *Journal of Bacteriology*, *184*(10), 2576–2586.
- Ding, Y., Dommel, M., & Mou, Z. (2016). Abscisic acid promotes proteasome-mediated degradation of the transcription coactivator NPR1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *86*(1), 20–34.
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*, *173*(6), 1454–1467.
- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., & Meyer, C. (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annual Review of Plant Biology*, *67*(1), 261–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*(8), 539–548.
- Dubern, J.-F., Cigana, C., De Simone, M., Lazenby, J., Juhas, M., Schwager, S., Bianconi, I., Döring, G., Eberl, L., Williams, P., Bragonzi, A., & Cámara, M. (2015). Integrated whole-genome screening for *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes using multiple disease models reveals that pathogenicity is host specific. *Environmental Microbiology*, *17*(11), 4379–4393. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12863>
- Durán-Maldonado, M. X., Hernández-Padilla, L., Gallardo-Pérez, J. C., Díaz-Pérez, A. L., Martínez-Alcantar, L., Reyes De la Cruz, H., Rodríguez-Zavala, J. S., Pacheco-Rodríguez, G., Moss, J., & Campos-García, J. (2020). Bacterial cyclodipeptides target signal pathways involved in malignant melanoma. *Frontiers in oncology*, *10*, 1111.
- Erb, M. (2019). Plant biology: Evolution of volatile-mediated plant–plant interactions. *Current Biology*, *29*(18), R873–R875.
- Eslami, P., Hajfarajollah, H., & Bazsefidpar, S. (2020). Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC advances*, *10*(56), 34014–34032.
- Etesami, H., & Jeong, B. R. (2018). Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, *147*, 881–896.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, *3*, 222.
- Feinbaum, R. L., Urbach, J. M., Liberati, N. T., Djonovic, S., Adonizio, A., Carvunis, A.-R., & Ausubel, F. M. (2012). Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS pathogens*, *8*(7), e1002813.

- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS letters*, 476(1–2), 52–54.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122), 754–756.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C., & Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 184(23), 6472–6480.
- Garrocho-Villegas, V., & Sánchez de Jiménez, E. (2012). TOR pathway activation in *Zea mays* L. tissues: Conserved function between animal and plant kingdoms. *Plant signaling & behavior*, 7(6), 675–677.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, 67(3), 159–173.
- Gill, S. S., Gill, R., Trivedi, D. K., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Ansari, M. W., Ansari, A. A., Johri, A. K., Prasad, R., & Pereira, E. (2016). *Piriformospora indica*: Potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in microbiology*, 7, 332.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, 43, 205.
- Glessner, A., Smith, R. S., Iglewski, B. H., & Robinson, J. B. (1999). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *Journal of bacteriology*, 181(5), 1623–1629.
- González, J. E., & Keshavan, N. D. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 859–875.
- González, O., Ortíz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., & Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host. *Microbial Ecology*, 73(3), 616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>
- González-López, O., Palacios-Nava, B. B., Peña-Urbe, C. A., Campos-García, J., López-Bucio, J., García-Pineda, E., & Reyes de la Cruz, H. (2021). Growth promotion in *Arabidopsis thaliana* by bacterial cyclodipeptides involves the TOR/S6K pathway activation. *Journal of Plant Physiology*, 257, 153343. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153343>
- Graham, T. L. (1998). Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(1–2), 135–144.
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W., & Dangl, J. L. (1995). Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269(5225), 843–846.
- Gruner, K., Griebel, T., Návarová, H., Attaran, E., & Zeier, J. (2013). Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Frontiers in plant science*, 4, 252.
- Guan, L., Murphy, A. S., Peer, W. A., Gan, L., Li, Y., & Cheng, Z.-M. (Max). (2015). Physiological and Molecular Regulation of Adventitious Root Formation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(5), 506–521. <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1090831>
- Hall, M. N. (2016). TOR and paradigm change: Cell growth is controlled. *Molecular Biology of the Cell*, 27(18), 2804–2806. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0311>
- Hartmann, M., & Zeier, J. (2019). N-hydroxypipicolinic acid and salicylic acid: A metabolic duo for systemic acquired resistance. *Current opinion in plant biology*, 50, 44–57.

Hartmann, M., Zeier, T., Bernsdorff, F., Reichel-Deland, V., Kim, D., Hohmann, M., Scholten, N., Schuck, S., Bräutigam, A., & Hölzel, T. (2018). Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity. *Cell*, *173*(2), 456–469.

Hassan, S., & Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of experimental botany*, *63*(9), 3429–3444.

Hatsugai, N., Igarashi, D., Mase, K., Lu, Y., Tsuda, Y., Chakravarthy, S., Wei, H.-L., Foley, J. W., Collmer, A., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2017). A plant effector-triggered immunity signaling sector is inhibited by pattern-triggered immunity. *The EMBO Journal*, *36*(18), 2758–2769. <https://doi.org/10.15252/embj.201796529>

Hauser, F., Waadt, R., & Schroeder, J. I. (2011). Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Current Biology*, *21*(9), R346–R355.

Henfling, J. (1980). *Effect of abscisic acid on rishitin and lubimin accumulation and resistance to Phytophthora infestans and Cladosporium cucumerinum in potato tuber tissue slices.*

Hernández Padilla, L. (2016). *Efecto de los ciclodipeptidos producidos por Pseudomonas aeruginosa sobre la vía de señalización mTOR/PI3K/Akt/S6k en células cancerosas humanas.*

Hernández-Padilla, L., Reyes de la Cruz, H., & Campos-García, J. (2020). Antiproliferative effect of bacterial cyclodipeptides in the HeLa line of human cervical cancer reveals multiple protein kinase targeting, including mTORC1/C2 complex inhibition in a TSC1/2-dependent manner. *Apoptosis*, *25*(9), 632–647.

Hernández-Padilla, L., Vázquez-Rivera, D., Sánchez-Briones, L. A., Díaz-Pérez, A. L., Moreno-Rodríguez, J., Moreno-Eutimio, M. A., Meza-Carmen, V., Cruz, H. R.-D. la, & Campos-García, J. (2017). The Antiproliferative Effect of Cyclodipeptides from Pseudomonas aeruginosa PAO1 on HeLa Cells Involves Inhibition of Phosphorylation of Akt and S6k Kinases. *Molecules*, *22*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>

Holloway, a B., & Morgan, A. F. (1986). Genome organization in Pseudomonas. *Annual Reviews in Microbiology*, *40*(1), 79–105.

Holloway, B. W. (1955). Genetic recombination in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, *13*(3), 572–581.

Holmes, E. C., Chen, Y.-C., Sattely, E. S., & Mudgett, M. B. (2019). An engineered pathway for N-hydroxypipicolinic acid synthesis enhances systemic acquired resistance in tomato. *Science Signaling*, *12*(604), eaay3066.

Horspool, A. M., & Schertzer, J. W. (2018). Reciprocal cross-species induction of outer membrane vesicle biogenesis via secreted factors. *Scientific reports*, *8*(1), 1–12.

Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*, *7*(8), 1267–1287.

Ichinose, Y., Taguchi, F., & Mukaihara, T. (2013). Pathogenicity and virulence factors of Pseudomonas syringae. *Journal of general plant pathology*, *79*(5), 285–296.

Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *27*(4), 325–333.

Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., & Levy, R. (2003). Comprehensive transposon mutant library of Pseudomonas aeruginosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(24), 14339–14344.

- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Lipka, V., Kogel, K.-H., & Schäfer, P. (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of Arabidopsis roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant physiology*, *156*(2), 726–740.
- John, F., Roffler, S., Wicker, T., & Ringli, C. (2011). Plant TOR signaling components. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(11), 1700–1705. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17662>
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil–root interface. *Plant and soil*, *321*(1), 5–33.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, *444*(7117), 323–329.
- Jones, J. D., Vance, R. E., & Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*, *354*(6316), aaf6395.
- Jossier, M., Bouly, J.-P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., & Thomas, M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *59*(2), 316–328.
- Jubic, L. M., Saile, S., Furzer, O. J., El Kasmi, F., & Dangl, J. L. (2019). Help wanted: Helper NLRs and plant immune responses. *Current opinion in plant biology*, *50*, 82–94.
- Juhas, M., Eberl, L., & Tümmler, B. (2005). Quorum sensing: The power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental microbiology*, *7*(4), 459–471.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, *324*(5923), 89–91.
- Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, *15*(6), 375–387.
- Klessig, D. F., Choi, H. W., & Dempsey, D. A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: Past, present, and future. *Molecular plant-microbe interactions*, *31*(9), 871–888.
- Kulkarni, H. M., Nagaraj, R., & Jagannadham, M. V. (2015). Protective role of *E. coli* outer membrane vesicles against antibiotics. *Microbiological research*, *181*, 1–7.
- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology*, *64*, 163–184.
- Kumar, A. S., Lakshmanan, V., Caplan, J. L., Powell, D., Czymmek, K. J., Levia, D. F., & Bais, H. P. (2012). Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. *The Plant Journal*, *72*(4), 694–706.
- Kumar, P. S., Duraipandiyan, V., & Ignacimuthu, S. (2014). Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, *30*(9), 435–446.
- Kusajima, M., Okumura, Y., Fujita, M., & Nakashita, H. (2017). Abscisic acid modulates salicylic acid biosynthesis for systemic acquired resistance in tomato. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*(9), 1850–1853.
- Lachaud, C., Da Silva, D., Cotellet, V., Thuleau, P., Xiong, T. C., Jauneau, A., Brière, C., Graziana, A., Bellec, Y., & Faure, J.-D. (2010). Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by d-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell calcium*, *47*(1), 92–100.
- Lakehal, A., & Bellini, C. (2019). Control of adventitious root formation: Insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*, *165*(1), 90–100. <https://doi.org/10.1111/ppl.12823>

- Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Lazdunski, A., & Williams, P. (1995). Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecular microbiology*, *17*(2), 333–343.
- Lewenza, S., Falsafi, R. K., Winsor, G., Gooderham, W. J., McPhee, J. B., Brinkman, F. S., & Hancock, R. E. (2005). Construction of a mini-Tn5-luxCDABE mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: A tool for identifying differentially regulated genes. *Genome research*, *15*(4), 583–589.
- Liang, X., & Zhou, J.-M. (2018). Receptor-like cytoplasmic kinases: Central players in plant receptor kinase-mediated signaling. *Annual review of plant biology*, *69*, 267–299.
- Liebrand, T. W., van den Berg, G. C., Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, J. H., America, A. H., Sklenar, J., Jones, A. M., Tameling, W. I., & Robatzek, S. (2013). Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(24), 10010–10015.
- Lin, S.-Y., & Agehara, S. (2021). Foliar application of defoliant after winter chill accumulation changes phytohormone dynamics and improves budbreak in blackberry under subtropical climatic conditions. *Plant Growth Regulation*, *94*(2), 171–181.
- Liu, H., Senthilkumar, R., Ma, G., Zou, Q., Zhu, K., Shen, X., Tian, D., Hua, M. S., Oelmüller, R., & Yeh, K. W. (2019). Piriformospora indica-induced phytohormone changes and root colonization strategies are highly host-specific. *Plant signaling & behavior*, *14*(9), 1632688.
- Liu, Y., Sun, T., Sun, Y., Zhang, Y., Radojčić, A., Ding, Y., Tian, H., Huang, X., Lan, J., & Chen, S. (2020). Diverse roles of the salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in plant immunity. *The Plant Cell*, *32*(12), 4002–4016.
- López-Bucio, J. S., Salmerón-Barrera, G. J., Ravelo-Ortega, G., Raya-González, J., León, P., de la Cruz, H. R., Campos-García, J., López-Bucio, J., & Guevara-García, Á. A. (2019). Mitogen-activated protein kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, *250*(4), 1177–1189. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03212-4>
- Lu, C., Han, M.-H., Guevara-Garcia, A., & Fedoroff, N. V. (2002). Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(24), 15812–15817. <https://doi.org/10.1073/pnas.242607499>
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., & He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(1), 496–501.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, *63*(1), 541–556.
- Luna, E., Bruce, T. J., Roberts, M. R., Flors, V., & Ton, J. (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant physiology*, *158*(2), 844–853.
- Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell*, *54*(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028>
- Margalha, L., Confraria, A., & Baena-González, E. (2019, abril 1). *SnRK1 and TOR: modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses | Journal of Experimental Botany | Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/jxb/article/70/8/2261/5355779?login=true>
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Huguency, P., Frey, A., & Marion-Poll, A. (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in

abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal*, *15*(10), 2331–2342.

Martínez-Medina, A., Van Wees, S. C., & Pieterse, C. M. (2017). Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant, cell & environment*, *40*(11), 2691–2705.

Mashburn, L. M., & Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, *437*(7057), Article 7057. <https://doi.org/10.1038/nature03925>

McMillan, H. M., Zebell, S. G., Ristaino, J. B., Dong, X., & Kuehn, M. J. (2021). *Protective plant immune responses are elicited by bacterial outer membrane vesicles—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221112472031634X>

Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual review of phytopathology*, *46*, 101.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, *126*(5), 969–980.

Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology*, *51*(1), 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>

Merino, L. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Una bacteria con personalidades múltiples. *Revista argentina de microbiología*, *39*(3), 143–143.

Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, *19*(10), 16240–16265.

Millet, Y. A., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D., & Ausubel, F. M. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell*, *22*(3), 973–990.

Mohnike, L., Rekhter, D., Huang, W., Feussner, K., Tian, H., Herrfurth, C., Zhang, Y., & Feussner, I. (2021). The glycosyltransferase UGT76B1 modulates N-hydroxy-pipecolic acid homeostasis and plant immunity. *The Plant Cell*, *33*(3), 735–749.

Molitor, A., Zajic, D., Voll, L. M., Pons-Kühnemann, J., Samans, B., Kogel, K.-H., & Waller, F. (2011). Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(12), 1427–1439.

Mordecia, E. A. (2011). Pathogen impacts on plant communities: Unifying theory, concepts, and empirical work. *Ecological Monographs*, *81*(3), 429–441.

Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of experimental Botany*, *59*(3), 501–520.

Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F. A., & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant signaling molecules*, 157–168.

Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., & Narusaka, Y. (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant Journal*, *60*(2), 218–226.

- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A.-C., & Zeier, J. (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell*, *24*(12), 5123–5141.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. P., & Jones, J. D. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, *18*(9), 650–655.
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, *43*(4), 496–518.
- Newitt, J. T., Prudence, S. M., Hutchings, M. I., & Worsley, S. F. (2019). Biocontrol of cereal crop diseases using streptomycetes. *Pathogens*, *8*(2), 78.
- Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P., & Jones, J. D. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, *592*(7852), 110–115.
- Nguyen, Q.-M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., & Kim, S. H. (2021). Recent advances in effector-triggered immunity in plants: New pieces in the puzzle create a different paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4709.
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., & Niu, D. (2017). Induced Systemic Resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent Signaling Pathway and Activates PAMP-Triggered Immunity in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 238. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00238>
- Nimma, S., Ve, T., Williams, S. J., & Kobe, B. (2017). Towards the structure of the TIR-domain signalosome. *Current opinion in structural biology*, *43*, 122–130.
- Noh, S. W., Seo, R., Park, J.-K., Manir, Md. M., Park, K., Sang, M. K., Moon, S.-S., & Jung, H. W. (2017). Cyclic Dipeptides from *Bacillus vallismortis* BS07 Require Key Components of Plant Immunity to Induce Disease Resistance in Arabidopsis against *Pseudomonas* Infection. *The Plant Pathology Journal*, *33*(4), 402–409. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2016.0255>
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., & Paul Bolwell, G. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, *236*(3), 765–779.
- Ochsner, U. A., & Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(14), 6424–6428.
- Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2016). Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cellular microbiology*, *18*(11), 1525–1536.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., del Río, R. E., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(17), 7253–7258.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Park, S. Y., Kim, Y.-S., Ahn, C.-B., & Je, J.-Y. (2016). Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. *Journal of Functional Foods*, *20*, 88–95.
- Pata, M. O., Hannun, Y. A., & Ng, C. K.-Y. (2010). Plant sphingolipids: Decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytologist*, *185*(3), 611–630.

- Pathirana, R. D., & Kaparakis-Liaskos, M. (2016). Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cellular microbiology*, *18*(11), 1518–1524.
- Pecher, P., Lennart Eschen, L., Herklotz, S., Naumann, K., Weyhe, M., Lee, J., Scheel, D., & Uhrig, J. F. (2014, abril 22). *The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses—Pecher—2014—New Phytologist—Wiley Online Library*. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nph.12817>
- Peck, S., & Mittler, R. (2020). Plant signaling in biotic and abiotic stress. En *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Número 5, pp. 1649–1651). Oxford University Press UK.
- Peng, Y., van Wersch, R., & Zhang, Y. (2018). Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(4), 403–409.
- Perneel, M., D'hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., & Höfte, M. (2008). Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environmental Microbiology*, *10*(3), 778–788.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(20), 11229–11234.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, *179*(10), 3127–3132.
- Peters, K., Breitsameter, L., & Gerowitt, B. (2014). Impact of climate change on weeds in agriculture: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *34*(4), 707–721.
- Petersen, J., & Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nature cell biology*, *9*(11), 1263–1272.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., & Parker, J. E. (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, *103*(7), 1111–1120.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, *5*(5), 308–316.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, *28*, 489–521.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, *8*(8), 1225–1237.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, *52*, 347–375.
- Pitzschke, A., Datta, S., & Persak, H. (2014). Salt stress in *Arabidopsis*: Lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3. *Molecular plant*, *7*(4), 722–738.
- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(4), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.008>
- Pogány, M., von Rad, U., Grun, S., Dongó, A., Pintye, A., Simoneau, P., Bahnweg, G., Kiss, L., Barna, B., & Durner, J. (2009). Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis*-*Alternaria* pathosystem. *Plant physiology*, *151*(3), 1459–1475.

- Pozo, M. J., Van Der Ent, S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New phytologist*, *180*(2), 511–523.
- Pye, M. F., Dye, S. M., Resende, R. S., MacDonald, J. D., & Bostock, R. M. (2018). Abscisic acid as a dominant signal in tomato during salt stress predisposition to phytophthora root and crown rot. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 525.
- Pye, M. F., Hakuno, F., MacDonald, J. D., & Bostock, R. M. (2013). Induced resistance in tomato by SAR activators during predisposing salinity stress. *Frontiers in plant science*, *4*, 116.
- Radchuk, R., Emery, R. N., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J. E., Feil, R., Weschke, W., & Weber, H. (2010). Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *The Plant Journal*, *61*(2), 324–338.
- Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L., & Weber, H. (2006). Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiology*, *140*(1), 263–278.
- Ramirez-Prado, J. S., Abulfaraj, A. A., Rayapuram, N., Benhamed, M., & Hirt, H. (2018). Plant Immunity: From Signaling to Epigenetic Control of Defense. *Trends in Plant Science*, *23*(9), 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.06.004>
- Ranf, S. (2017). Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Current Opinion in Plant Biology*, *38*, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.011>
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*, *49*, 317–343.
- Rocafort, M., Fudal, I., & Mesarich, C. H. (2020). Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Current opinion in plant biology*, *56*, 9–19.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumberas, V., & González-Guzmán, M. (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *25*(10), 3871–3884.
- Rodrigues, J. M., Coutinho, F. S., Dos Santos, D. S., Vital, C. E., Ramos, J. R. L. S., Reis, P. B., Oliveira, M. G. A., Mehta, A., Fontes, E. P. B., & Ramos, H. J. O. (2021). BiP-overexpressing soybean plants display accelerated hypersensitivity response (HR) affecting the SA-dependent sphingolipid and flavonoid pathways. *Phytochemistry*, *185*, 112704.
- Rosenberger, C. L., & Chen, J. (2018). To grow or not to grow: TOR and SnRK2 coordinate growth and stress response in *Arabidopsis*. *Molecular cell*, *69*(1), 3–4.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F. G., Tör, M., de Vries, S., & Zipfel, C. (2011). The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*, *23*(6), 2440–2455.
- Rubil, N., Kalachova, T., Hauser, T. P., & Burketová, L. (2021). Specialist aphids feeding causes local activation of salicylic and jasmonic acid signaling in *Arabidopsis* veins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-21-0203-SC>
- Rubil, N., Kalachova, T., Hauser, T. P., & Burketová, L. (2022). Specialist aphid feeding causes local activation of salicylic and jasmonic acid signaling in *Arabidopsis* veins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *35*(2), 119–124.

- Rudrappa, T., & Bais, H. P. (2008, febrero 20). *Curcumin, a Known Phenolic from Curcuma longa, Attenuates the Virulence of Pseudomonas aeruginosa PAO1 in Whole Plant and Animal Pathogenicity Models | Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf072591j>
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, *148*(3), 1547–1556.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *The plant cell*, *8*(10), 1809.
- Sabatini, D. M. (2017). Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(45), 11818–11825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716173114>
- Salem, M. A., Li, Y., Wiszniewski, A., & Giavalisco, P. (2017). Regulatory-associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of Arabidopsis seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential. *The Plant Journal*, *92*(4), 525–545.
- Salt, S. D., Tuzun, S., & Kuć, J. (1986). Effects of β -ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold. Mimicry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina* Adam. *Physiological and molecular plant pathology*, *28*(2), 287–297.
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Hugues Renault, J., Renault, C., Baillieux, F., & Dorey, S. (2012). *Rhamnolipids Elicit Defense Responses and Induce Disease Resistance against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Pathogens That Require Different Signaling Pathways in Arabidopsis and Highlight a Central Role for Salicylic Acid | Plant Physiology | Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/plphys/article/160/3/1630/6109552?login=true>
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., & Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Reports*, *32*(7), 1085–1098. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1441-2>
- Savoia, D. (2014). New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiology*, *9*(7), 917–928.
- Sawinski, K., Mersmann, S., Robatzek, S., & Böhmer, M. (2013). Guarding the green: Pathways to stomatal immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(6), 626–632.
- Schenk, S. T., & Schikora, A. (2015). AHL-priming functions via oxylipin and salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 784.
- Schnake, A., Hartmann, M., Schreiber, S., Malik, J., Brahmann, L., Yildiz, I., von Dahlen, J., Rose, L. E., Schaffrath, U., & Zeier, J. (2020). Inducible biosynthesis and immune function of the systemic acquired resistance inducer N-hydroxypipicolinic acid in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Journal of experimental botany*, *71*(20), 6444–6459.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A., & McCarty, D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science*, *276*(5320), 1872–1874.
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. *Nature reviews microbiology*, *13*(10), 605–619.
- Schwechheimer, C., Sullivan, C. J., & Kuehn, M. J. (2013). Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, *52*(18), 3031–3040.
- Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., & Koshiba, T. (2000). Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *23*(4), 481–488.

- Seyfferth, C., & Tsuda, K. (2014). Salicylic acid signal transduction: The initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in plant science*, 5, 697.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J. E., & Innes, R. W. (2003). Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science*, 301(5637), 1230–1233.
- Sharifi, R., & Ryu, C.-M. (2016). Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to Arabidopsis seedlings for eliciting induced resistance, or both? *Frontiers in microbiology*, 7, 196.
- Shi, L., Wu, Y., & Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: Conservation and innovation. *Development*, 145(13). <https://doi.org/10.1242/dev.160887>
- Shigenaga, A. M., & Argueso, C. T. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 56, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.005>
- Shine, M. B., Gao, Q., Chowda-Reddy, R. V., Singh, A. K., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2019). Glycerol-3-phosphate mediates rhizobia-induced systemic signaling in soybean. *Nature communications*, 10(1), 1–13.
- Singh, A. K., & Chamovitz, D. A. (2019). Role of Cop9 signalosome subunits in the environmental and hormonal balance of plant. *Biomolecules*, 9(6), 224.
- Singh, U. B., Malviya, D., Singh, S., Kumar, M., Sahu, P. K., Singh, H. V., Kumar, S., Roy, M., Imran, M., & Rai, J. P. (2019). Trichoderma harzianum-and methyl jasmonate-induced resistance to *Bipolaris sorokiniana* through enhanced phenylpropanoid activities in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in microbiology*, 10, 1697.
- Singh, U. B., Singh, S., Malviya, D., Karthikeyan, N., Imran, M., Chaurasia, R., Alam, M., Singh, P., Sarma, B. K., & Rai, J. P. (2019). Integration of anti-penetrant tricyclazole, signaling molecule salicylic acid and root associated *Pseudomonas fluorescens* enhances suppression of *Bipolaris sorokiniana* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Pathology*, 101(4), 943–954.
- Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), 56–60. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00008-0)
- Solé, M., Scheibner, F., Hoffmeister, A.-K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., Jordan, M., Lautier, M., Arlat, M., & Büttner, D. (2015). *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* secretes proteases and xylanases via the Xps type II secretion system and outer membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 197(17), 2879–2893.
- Solis-Ortiz, C. S., Gonzalez-Bernal, J., Kido-Díaz, H. A., Peña-Urbe, C. A., López-Bucio, J. S., López-Bucio, J., Guevara-García, Á. A., García-Pineda, E., Villegas, J., & Campos-García, J. (2022). Bacterial cyclodipeptides elicit Arabidopsis thaliana immune responses reducing the pathogenic effects of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ambB/pvdl and PA4078/pvdl strains on plant development. *Journal of Plant Physiology*, 153738.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews immunology*, 12(2), 89–100.
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., & Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18842–18847.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., & Kazan, K. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760–770.

- Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J., & Poole, K. (1998). Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: LasRllasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS microbiology letters*, *166*(2), 341–345.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, *406*(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., Berendsen, R. L., Bakker, P. A., Feussner, I., & Pieterse, C. M. (2018). MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(22), E5213–E5222.
- Sun, Y., Li, L., Macho, A. P., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J.-M., & Chai, J. (2013). Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science*, *342*(6158), 624–628.
- Tamaoki, D., Seo, S., Yamada, S., Kano, A., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2013). Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant signaling & behavior*, *8*(6), e24260.
- Tateda, C., Zhang, Z., Shrestha, J., Jelenska, J., Chinchilla, D., & Greenberg, J. T. (2014). Salicylic acid regulates Arabidopsis microbial pattern receptor kinase levels and signaling. *The plant cell*, *26*(10), 4171–4187.
- Tayi, L., Maku, R., Patel, H. K., & Sonti, R. V. (2016). Action of multiple cell wall-degrading enzymes is required for elicitation of innate immune responses during *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* infection in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *29*(8), 599–608.
- Teixeira, P. J. P., Colaianni, N. R., Fitzpatrick, C. R., & Dangl, J. L. (2019). Beyond pathogens: Microbiota interactions with the plant immune system. *Current opinion in microbiology*, *49*, 7–17.
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. A. J. (2011, enero). *Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy | The Plant Cell | Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/plcell/article/23/1/4/6094997?login=true>
- Timmermann, T., Poupin, M. J., Vega, A., Urrutia, C., Ruz, G. A., & González, B. (2019). Gene networks underlying the early regulation of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN induced systemic resistance in Arabidopsis. *PLoS One*, *14*(8), e0221358.
- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. *Molecular plant-microbe interactions*, *15*(1), 27–34.
- Toribio, J., Escalante, A. E., & Soberón-Chávez, G. (2010). Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of lipid science and technology*, *112*(10), 1082–1087.
- Toyofuku, M., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2010). The Effect of a Cell-to-Cell Communication Molecule, *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), Produced by *P. aeruginosa* on Other Bacterial Species. *Microbes and Environments*, *25*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1264/jjsme2.ME09156>
- Truman, W., Bennett, M. H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., & Grant, M. (2007). Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the national academy of sciences*, *104*(3), 1075–1080.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, *13*(4), 459–465.

- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, *4*, 356.
- Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, P. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2015). Cell signalling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventionism. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, *83*(2), 165–174.
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M. C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Körbes, A. P., Memelink, J., & Ritsema, T. (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOII-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *The Plant Cell*, *25*(2), 744–761.
- Van der Ent, S., Verhagen, B. W., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M. G., Pel, M. J., Joosten, R. G., Proveniers, M. C., Van Loon, L. C., & Ton, J. (2008). MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *146*(3), 1293–1304.
- van Hulst, M., Pelser, M., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M., & Ton, J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(14), 5602–5607.
- VARNIER, A.-L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., GARCIA-BRUGGER, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., RENAULT, J.-H., Kauffmann, S., & Pugin, A. (2009). Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to Botrytis cinerea in grapevine. *Plant, cell & environment*, *32*(2), 178–193.
- Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., & Dorey, S. (2010). Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *International journal of molecular sciences*, *11*(12), 5095–5108.
- Vázquez-Rivera, D., González, O., Guzmán-Rodríguez, J., Díaz-Pérez, A. L., Ochoa-Zarzosa, A., López-Bucio, J., Meza-Carmen, V., & Campos-García, J. (2015). Cytotoxicity of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines. *BioMed research international*, *2015*.
- Vleeschauwer, D. D., Filipe, O., Hoffman, G., Seifi, H. S., Haeck, A., Canlas, P., Bockhaven, J. V., Waele, E. D., Demeestere, K., Ronald, P., & Hofte, M. (2018). Target of rapamycin signaling orchestrates growth–defense trade-offs in plants. *New Phytologist*, *217*(1), 305–319. <https://doi.org/10.1111/nph.14785>
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, *47*, 177–206.
- Vlot, A. C., Sales, J. H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., Chen, Y., Wenig, M., & Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*, *229*(3), 1234–1250.
- Vogel, C., Bodenhausen, N., Grisse, W., & Vorholt, J. A. (2016). The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health. *New Phytologist*, *212*(1), 192–207.
- Volgers, C., Savelkoul, P. H., & Stassen, F. R. (2018). Gram-negative bacterial membrane vesicle release in response to the host-environment: Different threats, same trick? *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(3), 258–273.
- Vos, C. M., De Cremer, K., Cammue, B. P., & De Coninck, B. (2015). The toolbox of *T richoderma* spp. In the biocontrol of *B otrytis cinerea* disease. *Molecular plant pathology*, *16*(4), 400–412.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P., & Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, *187*(13), 4372–4380.

- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., & von Wettstein, D. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(38), 13386–13391.
- Waller, F., Mukherjee, K., Deshmukh, S. D., Achatz, B., Sharma, M., Schäfer, P., & Kogel, K.-H. (2008). Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related Sebaciniales species. *Journal of plant physiology*, *165*(1), 60–70.
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *Journal of experimental botany*, *64*(5), 1263–1280.
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L., & Mysore, K. S. (2012). Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiology*, *158*(4), 1789–1802.
- Wang, P., Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C.-C., Liu, X., Fu, L., Hou, Y.-J., Du, Y., Xie, S., & Zhang, C. (2018). Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Molecular cell*, *69*(1), 100–112.
- Wang, Y., Li, D., Huan, X., Zhang, L., & Song, H. (2014). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a putative nonribosomal peptide synthase AmbB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, *70*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14001782>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Wattana-Amorn, P., Charoenwongsa, W., Williams, C., Crump, M. P., & Apichaisataienchote, B. (2016). Antibacterial activity of cyclo (L-Pro-L-Tyr) and cyclo (D-Pro-L-Tyr) from *Streptomyces* sp. Strain 22-4 against phytopathogenic bacteria. *Natural product research*, *30*(17), 1980–1983.
- Weller, D. M., Mavrodi, D. V., van Pelt, J. A., Pieterse, C. M., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2012). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, *102*(4), 403–412.
- Wenig, M., Ghirardo, A., Sales, J. H., Pabst, E. S., Breitenbach, H. H., Anritter, F., Weber, B., Lange, B., Lenk, M., & Cameron, R. K. (2019). Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. *Nature communications*, *10*(1), 1–14.
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R., & Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in plant science*, *5*, 655.
- Wild, M., Davière, J.-M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., & Achard, P. (2012). The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *The Plant Cell*, *24*(8), 3307–3319.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, *414*(6863), 562–565.
- Williams, C., Fernández-Calvo, P., Colinas, M., Pauwels, L., & Goossens, A. (2019). Jasmonate and auxin perception: How plants keep F-boxes in check. *Journal of Experimental Botany*, *70*(13), 3401–3414.
- Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P., & Bycroft, B. W. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate

- production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9427–9431.
- Winzer, K., & Williams, P. (2001). Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(2), 131–143.
- Withers, J., & Dong, X. (2017). Post-translational regulation of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.004>
- Wittek, F., Kanawati, B., Wenig, M., Hoffmann, T., Franz-Oberdorf, K., Schwab, W., Schmitt-Kopplin, P., & Vlot, A. C. (2015). Folic acid induces salicylic acid-dependent immunity in *A. rabidopsis* and enhances susceptibility to *A. lternaria brassicicola*. *Molecular Plant Pathology*, 16(6), 616–622.
- Wu, L., Huang, Z., Li, X., Ma, L., Gu, Q., Wu, H., Liu, J., Borriss, R., Wu, Z., & Gao, X. (2018). Stomatal closure and SA-, JA/ET-signaling pathways are essential for *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 to restrict leaf disease caused by *Phytophthora nicotianae* in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in microbiology*, 9, 847.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V., & Després, C. (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell reports*, 1(6), 639–647.
- Xiao, G., He, J., & Rahme, L. G. (2006). Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology*, 152(6), 1679–1686.
- Xin, X.-F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328.
- Xu, G., Greene, G. H., Yoo, H., Liu, L., Marqués, J., Motley, J., & Dong, X. (2017). Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature*, 545(7655), 487–490.
- Xu, J., & Zhang, S. (2015, enero). *Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138514002490>
- Xu, Z.-Y., Zhang, X., Schläppi, M., & Xu, Z.-Q. (2011). Cold-inducible expression of AZI1 and its function in improvement of freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of plant physiology*, 168(13), 1576–1587.
- Yamaguchi, Y., & Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 351–357.
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C.-S., Tong, X.-H., Zeng, L.-J., Li, Q., Xiao, L.-T., Sun, T., Li, J., & Deng, X.-W. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19), E1192–E1200.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., & Yoshida, S. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(6), 1678–1692.
- Yildiz, I., Mantz, M., Hartmann, M., Zeier, T., Kessel, J., Thurow, C., Gatz, C., Petzsch, P., Köhrer, K., & Zeier, J. (2021). The mobile SAR signal N-hydroxy-pipecolic acid induces NPR1-dependent transcriptional reprogramming and immune priming. *Plant physiology*, 186(3), 1679–1705.
- Yoo, H., Greene, G. H., Yuan, M., Xu, G., Burton, D., Liu, L., Marqués, J., & Dong, X. (2020). Translational regulation of metabolic dynamics during effector-triggered immunity. *Molecular Plant*, 13(1), 88–98.
- Yu, K., Pieterse, C. M., Bakker, P. A., & Berendsen, R. L. (2019). Beneficial microbes going underground of root immunity. *Plant, Cell & Environment*, 42(10), 2860–2870.

- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, *11*(3), 386.
- Yuan, M., Huang, Y., Ge, W., Jia, Z., Song, S., Zhang, L., & Huang, Y. (2019). Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC Genomics*, *20*(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5513-8>
- Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., & Xin, X.-F. (2021). PTI-ETI crosstalk: An integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *62*, 102030. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>
- Zabala, G., Zou, J., Tuteja, J., Gonzalez, D. O., Clough, S. J., & Vodkin, L. O. (2006). Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of glycine max in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biology*, *6*(1), 1–18.
- Zamioudis, C., Hanson, J., & Pieterse, C. M. (2014). β -Glucosidase BGLU 42 is a MYB 72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *A. thaliana* roots. *New Phytologist*, *204*(2), 368–379.
- Zamioudis, C., Korteland, J., Van Pelt, J. A., van Hamersveld, M., Dombrowski, N., Bai, Y., Hanson, J., Van Verk, M. C., Ling, H.-Q., & Schulze-Lefert, P. (2015). Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB 72 expression in *Arabidopsis* roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *The Plant Journal*, *84*(2), 309–322.
- Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *25*(2), 139–150.
- Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2017). Translational switching from growth to defense – a common role for TOR in plant and mammalian immunity? *Journal of Experimental Botany*, *68*(9), 2077–2081. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx120>
- Zeier, J. (2021). Metabolic regulation of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, *62*, 102050. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102050>
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., & Chen, S. (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell host & microbe*, *7*(4), 290–301.
- Zhang, M., Su, J., Zhang, Y., Xu, J., & Zhang, S. (2018). Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, *45*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.012>
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (1998). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(13), 7433–7438.
- Zhang, W., Fraiture, M., Kolb, D., Löffelhardt, B., Desaki, Y., Boutrot, F. F., Tör, M., Zipfel, C., Gust, A. A., & Brunner, F. (2013). *Arabidopsis* receptor-like protein30 and receptor-like kinase suppressor of BIR1-1/EVERSHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. *The Plant Cell*, *25*(10), 4227–4241.
- Zhou, J.-M., & Zhang, Y. (2020). Plant immunity: Danger perception and signaling. *Cell*, *181*(5), 978–989.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., Felix, G., & Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, *428*(6984), 764–767.
- Zou, J., Rodriguez-Zas, S., Aldea, M., Li, M., Zhu, J., Gonzalez, D. O., Vodkin, L. O., DeLucia, E., & Clough, S. J. (2005). Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Molecular plant-microbe interactions*, *18*(11), 1161–1174.