



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**PARTICIPACIÓN DE LAS OXIDASAS *AtPAO1* y *AtPAO2* EN
LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE
OXÍGENO DURANTE LA INTERACCIÓN DE *Arabidopsis*
CON BACTERIAS DEL GÉNERO *Pseudomonas***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA
QFB. FRANCISCO IGNACIO JASSO ROBLES

DIRECTOR
DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ
KESSLER



SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

NOVIEMBRE 2016

*El fruto que deseamos
recibir proviene de sembrar
la semilla correspondiente*

Ven. Damcho

ཨོཾ་མ་ཎི་པདྨེ་ཧྲུཿ

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Epigenética, Regulación Génica y Biología del Estrés en Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Investigación Científica Básica 2011 - Conacyt (169509).

Cooperacion Bilateral Conacyt (190390)

Beca-Tesis del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): 331514

DEDICATORIA

A mi Madre, mis Abuelos, mi Familia y Lalo por su valioso amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Margarita por darme la oportunidad de formarme bajo su dirección.

A Eli, el Dr. Fer y todo el laboratorio UB3 del IIB-INTECH por recibirme en tierras Argentinas.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Epigenética, Regulación Génica y Biología del Estrés en Plantas.

A mis compañeros de la generación 2014-2016 de la Maestría en Ciencias en Biorprocesos.

A mis sinodales el Dr. Marco, la Dra. Ruth y la Dra. Luz.

A Caty, Jaime, Mateo y Mila por su amistad.

A la vida...

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	vi
Resumen.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Anabolismo de Poliaminas.....	2-3
1.2. Catabolismo de Poliaminas.....	3-5
1.3. Poliamina Oxidasas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	5-6
1.4. Poliaminas en interacción planta-microorganismo.....	7-8
1.5. La interacción <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Pseudomonas</i>	8-13
1.6. Las poliaminas en la interacción <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> - <i>Pseudomonas</i>	13
1.7. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. MATERIAL VEGETAL, MEDIOS DE CULTIVO Y MÉTODOS DE CRECIMIENTO.....	17
4.1.1. Material vegetal empleado en el estudio.....	17
4.1.2. Desinfección del material vegetal y cultivo <i>in vitro</i>	17
4.1.3. Siembra del material vegetal en maceta.....	17-18
4.2. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	18

4.2.1.	Cepas empleadas en el estudio.....	18-19
4.3.	INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>Arabidopsis</i> CON BACTERIAS DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	19
4.4.	CUENTAS VIABLES DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC).....	19-20
4.5.	AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	20
4.5.1.	Aislamiento de ADN plasmídico.....	20-21
4.5.2.	Aislamiento de ADN genómico.....	21
4.5.3.	Aislamiento de ARN total.....	21
4.6.	TECNICAS DE AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE GENES ESPECÍFICOS.....	22
4.6.1.	Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante RT-PCR.....	22-23
4.6.2.	Oligonucleótidos empleados.....	23-24
4.7.	PLÁSMIDOS.....	24-25
4.8.	CLONACIÓN Y RECOMBINACIÓN DE LOS MARCOS DE LECTURA DE LOS GENES <i>AtPAO1</i> Y <i>AtPAO2</i>	25-26
4.9.	MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN.....	26
4.10.	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y DE POLIAMINAS EN TEJIDOS VEGETALES.....	26
4.10.1.	Detección histoquímica de peróxido de hidrógeno.....	26-27
4.10.2.	Detección histoquímica del ión radical superóxido.....	27
4.10.3.	Cuantificación de peróxido de hidrógeno.....	27-28
4.10.4.	Cuantificación del ión radical superóxido.....	28
4.10.5.	Cuantificación de poliaminas libres.....	28
4.11.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE POLIAMINA OXIDASAS.....	29
5.	RESULTADOS.....	30
5.1.	Los genes <i>AtPAO</i> se expresan diferencialmente en la interacción <i>Arabidopsis-Pseudomonas</i>	30

5.2.	Las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes <i>AtPAO1</i> Y <i>AtPAO2</i> de <i>Arabidopsis</i> están afectadas en la Respuesta a <i>Pseudomonas</i>	31
5.3.	Expresión de los genes <i>AtPAO1</i> y <i>AtPAO2</i> en las líneas mutantes insercionales de T-DNA.....	32
5.4.	Determinación del número de unidades formadoras de colonias en las líneas mutantes <i>Atpao</i> infectadas con <i>Pseudomonas syringae</i>	33-34
5.5.	Cuantificación de EROs en las líneas mutantes de los genes de poliamina oxidasa en interacción con <i>Pseudomonas</i>	34-37
5.6.	Detección histoquímica de EROs en las líneas mutantes de poliamina oxidasas.....	37-40
5.7.	Cuantificación de niveles de PAs y actividad enzimática PAO, en las líneas mutantes <i>Atpao</i>	40-42
5.8.	Construcciones para la sobreexpresión de <i>AtPAO1</i> y <i>AtPAO2</i>	42-44
6.	DISCUSIONES DE RESULTADOS.....	47-52
7.	CONCLUSIONES.....	53
8.	PERSPECTIVAS.....	54
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	55-62

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Biosíntesis de poliaminas en plantas.....	3
Figura 2. Catabolismo de poliaminas en plantas.....	4
Figura 3. Entrada y colonización de <i>P. syringae</i> en la planta.....	10
Figura 4. Sistema inmune de las plantas: modelo de “zig-zag”.....	12
Figura 5. Expresión de los genes <i>AtPAO</i> en interacción <i>A. thaliana</i> - <i>Pseudomonas</i>	30
Figura 6. Tipificación de las líneas mutantes de poliamina oxidasas.....	31
Figura 7. Expresión de <i>AtPAO1</i> y <i>AtPAO2</i> en líneas mutantes.....	32
Figura 8. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> en líneas mutantes de poliamina oxidasas.....	34
Figura 9. Determinación cuantitativa de H ₂ O ₂ en líneas mutantes de poliamina oxidasas.....	35
Figura 10. Determinación cuantitativa de peróxido de hidrógeno en líneas mutantes de poliamina oxidasas en interacción con <i>P. syringae</i>	36
Figura 11. Determinación cuantitativa del ión radical superóxido en líneas mutantes de poliamina oxidasas en interacción con <i>P. syringae</i>	37
Figura 12. Detección histoquímica de H ₂ O ₂ en las líneas mutantes de <i>Atpao</i>	38

Figura 13. Detección histoquímica del ión radical superóxido en interacción de las líneas mutantes de <i>AtPAO</i> con <i>P. syringae</i>	39
Figura 14. Expresión de los genes <i>AtRBOHD</i> , <i>AtRBOHF</i> , <i>PRX33</i> y <i>PRx34</i> en líneas mutantes <i>Atpao</i>	40
Figura 15. Contenido de PAs en las líneas mutantes <i>Atpao</i> en la interacción con <i>P. syringae</i>	41
Figura 16. Actividad enzimática PAO en las líneas mutantes <i>Atpao</i>	42
Figura 17. Construcciones para la sobreexpresión de genes <i>AtPAO</i> en <i>A. thaliana</i>	43
Figura 18. Amplificación de los genes <i>AtPAO1</i> y <i>AtPAO2</i> a partir de colonias resistentes de <i>A. tumefaciens</i>	44

INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes de interés.....	23-24

RESUMEN

Las poliaminas (PAs) son aminas alifáticas de bajo peso molecular, las cuales tienen una importante actividad regulatoria en las células vegetales. Las principales PAs son la putrescina (Put), la espermidina (Spd), la espermina (Spm) y la termoespermina (tSpm). Estas moléculas se han visto involucradas en diferentes procesos de desarrollo vegetal y en la respuesta al estrés, por ejemplo, en el estrés biótico. El interés por estudiar la regulación de PAs a través del catabolismo ha crecido, ya que aún se desconocen muchas de las implicaciones de la degradación de PAs en eventos fisiológicos y de respuesta a estrés, así como la importancia del sitio donde se catabolizan.

El catabolismo de PAs depende de dos grandes familias de oxidasas clasificadas de acuerdo a la afinidad por el sustrato (diamina o triamina y tetraamina) y a su cofactor: las diamina oxidasas dependientes de cobre (DAO) encargadas de la desaminación oxidativa de la Put, y las poliamina oxidasas dependientes de flavina (PAO) involucradas en la degradación de poliaminas superiores como la Spd, Spm y tSpm. Los principales productos de degradación incluyen aminoaldehídos, diaminopropano y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han identificado cinco genes que codifican para enzimas PAO. Las enzimas AtPAO1 y AtPAO5 se localizan en el citosol, mientras que las enzimas AtPAO2, AtPAO3 y AtPAO4 se localizan en el peroxisoma. La compartimentalización de las enzimas PAO implica que las PAs pueden ser degradadas en diferentes compartimentos intracelulares, y que dependiendo de la afinidad de cada PAO por su sustrato existan regiones preferentes para la degradación de una PA en particular. Además, la generación de moléculas derivadas del catabolismo, como el H_2O_2 pueden variar en su concentración. Recientemente se ha propuesto que el H_2O_2 producido por el catabolismo de PAs y otras enzimas involucradas en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (NADPH oxidasa, peroxidasas, SOD (super oxido

dismutasa), etc) pueden participar de manera conjunta en una señalización con múltiples efectos en defensa, desarrollo y la muerte celular programada.

En el presente trabajo de tesis se inició la caracterización de dos PAOs de *A. thaliana* con localización subcelular distinta: AtPAO1 (citoplásmica) y AtPAO2 (peroxisomal) en la interacción con bacterias del género *Pseudomonas*. Estas oxidasas se inducen a las 72 h post-infección en la interacción con *Pseudomonas syringae* y se mantienen reprimidas en interacción con *Pseudomonas viridiflava*. De acuerdo al análisis de la línea doble mutante (*Atpao1-1* x *Atpao2-1*) en interacción con *P. syringae*, se evidenció la susceptibilidad a la infección respecto a plantas silvestres (ecotipo Col-0) y en la mutante sencilla *Atpao1-1* se observó una resistencia a la infección. Resultados histoquímicos y cuantitativos sugieren que la línea doble mutante produce menos peróxido de hidrógeno y del ión radical superóxido (O_2^-) al compararla con las líneas mutantes sencillas y las plantas silvestres.

De acuerdo a estos resultados podemos resaltar la importancia de las PAOs y su ubicación intracelular en la interacción *Arabidopsis-P. syringae*, el H_2O_2 derivado del catabolismo de PAs así como la posible relación con otras enzimas tales como la NADPH oxidasa.

1. INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (PAs) son aminos alifáticas de bajo peso molecular, las cuales participan en procesos celulares importantes tales como división, crecimiento, diferenciación celular y muerte celular. Las PAs principales son la diamina putrescina (Put); las tetraminas espermidina (Spd) y espermina (Spm) y el isómero estructural de la Spm la termoespermina (tSpm) (Mathews et al. 2002). A nivel molecular, las PAs desempeñan múltiples funciones en la estabilización de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), la condensación de la cromatina, el procesamiento del ARN, y en la traducción y activación post-traducciona de proteínas (Childs et al. 2003). Las PAs comenzaron a estudiarse en mamíferos, pero ha crecido el interés por su estudio en plantas, ya que se han visto incrementos en los niveles de PAs en diferentes eventos fisiológicos y de desarrollo importantes como: la embriogénesis, germinación, rizogénesis, organogénesis, iniciación y desarrollo floral, así como en el desarrollo y maduración de frutos, y en la senescencia. Las PAs también participan en la respuesta y defensa a diferentes tipos de estrés que afectan el desarrollo vegetal, como el estrés por sequía, estrés por las altas y bajas temperaturas, estrés por salinidad, metales pesados, estrés oxidativo y el estrés biótico (Kakkar et al. 2002; Alcázar et al. 2010; Hussain et al. 2011). En células vegetales, las PAs se encuentran distribuidas en todos los compartimentos celulares en dos fracciones, la fracción soluble que consiste de PAs libres y de PAs conjugadas a ácidos hidroxycinámicos (el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido cinámico) y la fracción insoluble que son las PAs unidas a macromoléculas como proteínas, polisacáridos de la pared y la membrana plasmática (Jiménez-Bremont et al. 2014; Bagni y Tassoni, 2001; Martin-Tanguy, 2001). La concentración de estas moléculas está finamente regulada por su transporte, conjugación, anabolismo y catabolismo lo que es esencial ante condiciones de estrés como por ejemplo, la interacción de una planta con un microorganismo.

1.1. Anabolismo de Poliaminas

La biosíntesis de PAs inicia con la formación de Put. Existen dos rutas anabólicas, a partir de los aminoácidos ornitina y arginina. La primera vía de formación de Put es directa, en esta vía está involucrada la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), esta enzima lleva a cabo una reacción de descarboxilación de la ornitina; la segunda vía es indirecta y depende de la formación del intermediario agmatina por descarboxilación de arginina dada por la enzima arginina descarboxilasa (ADC). La agmatina es hidrolizada por la enzima agmatina iminohidrolasa, produciendo N-carbamoilputrescina; esta última es convertida a Put por medio de la N-carbamoilputrescina amidohidrolasa (Fig. 1). Las PAs superiores Spd, Spm y tSpm, son sintetizadas a partir de Put por la adición de grupos aminopropilo mediante las enzimas espermidina sintasa (SPDS), espermina sintasa (SPMS) y termoespermina sintasa (tSPMS), respectivamente. Los grupos aminopropilo son generados por la descarboxilación de la S-adenosilmetionina (SAM) mediante la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) (Fig. 1).

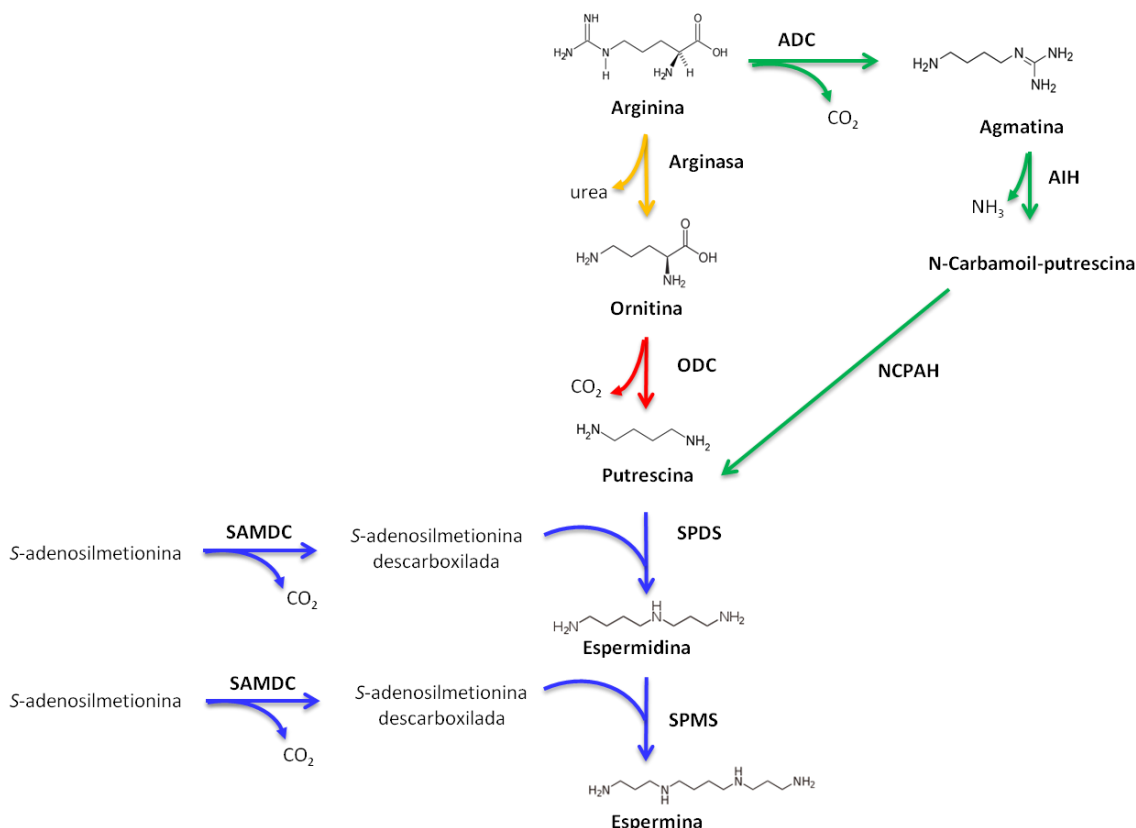


Figura 1. Biosíntesis de poliaminas en plantas. La biosíntesis de poliaminas ocurre por acción de las enzimas: ODC (ornitina descarboxilasa), ADC (arginina descarboxilasa), SAMDC (S-adenosilmetionina descarboxilasa), SPDS (espermidina sintasa) y SPMS (espermina sintasa). Las flechas en rojo indican la biosíntesis de Put a partir de ornitina. Las flechas en azul indican la ruta de biosíntesis de Put a partir de arginina. Las flechas en color amarillo indican las rutas de biosíntesis de Spd y Spm a partir de Put.

1.2. Catabolismo de Poliaminas

Las diaminas (Put y Cad) que funcionan como precursoras de poliaminas superiores, son degradadas por diamina oxidasas dependientes de cobre (DAO). Las poliamina oxidasas (PAO) son las enzimas encargadas de catabolizar a las triamina y tetraminas (Spm, Spd, tSpm y NorSpm). Existen diferentes isoformas de enzimas PAO que varían en su afinidad por el sustrato. (Federico y Angelini, 1991; Takahashi et al 2010; Fincato et al. 2011). En la planta modelo *Arabidopsis*

thaliana se han identificado cinco genes que codifican para enzimas PAO. Las poliamina oxidasas AtPAO1 y AtPAO5 se localizan en el citosol, y las enzimas AtPAO2, AtPAO3 y AtPAO4 se localizan en el peroxisoma (Takahashi et al. 2010). Los productos del catabolismo son 4-aminobutanal y N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal y la producción conjunta de 1,3-diaminopropano y H₂O₂ (Fig. 2) (Cona et al. 2006).

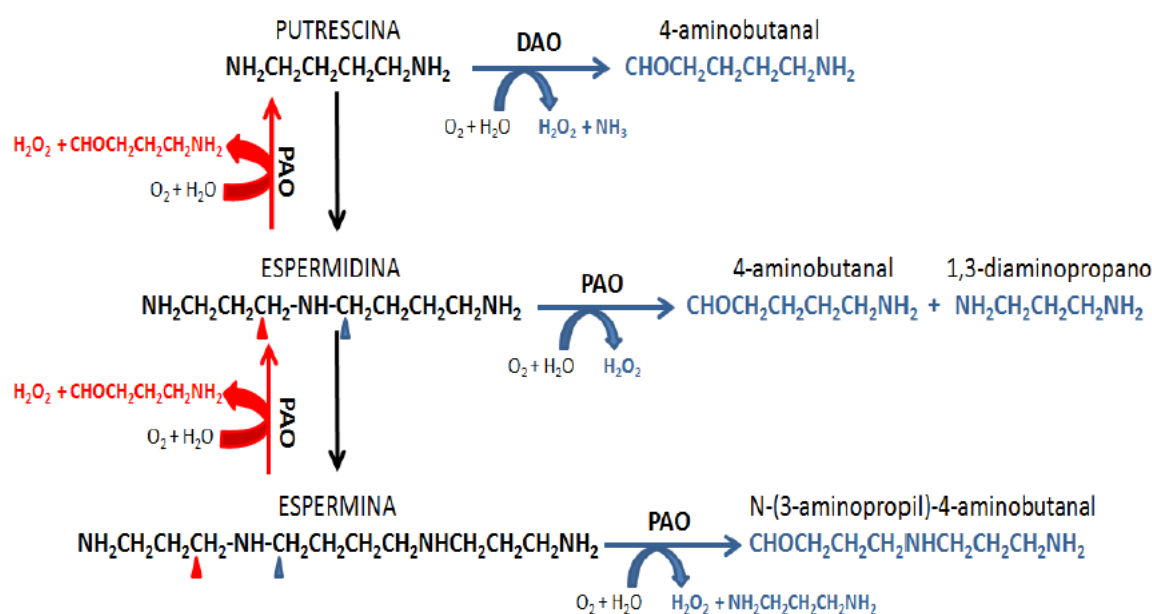


Figura 2. Catabolismo de poliaminas en plantas. El catabolismo de PAs es mediado por la acción de enzimas diamino oxidasa (DAO), que catabolizan Put; y poliamina oxidasas (PAO) que catabolizan Spd y Spm. Las PAOs participan en el catabolismo terminal y de interconversión de PAs. En azul se muestran los productos del catabolismo terminal de PAs. Las flechas en rojo indican el sentido de la ruta de interconversión. Los triángulos en azul y rojo indican los carbonos que son oxidados por las enzimas PAO en cada una de las rutas catabólicas.

Se ha descrito que los productos del catabolismo de PAs participan en procesos de desarrollo y respuesta al estrés en plantas. El H₂O₂, se ha visto involucrado en la maduración y lignificación de la pared celular, en la estimulación de la síntesis de otras especies reactivas de oxígeno (EROs) como el óxido nítrico (ON), en

señalización intracelular y en desencadenar la muerte celular programada. Por otro lado, el ácido γ -aminobutírico (GABA), que se produce durante el catabolismo de Put y Spd se ha relacionado con el estrés hídrico, con funciones de osmoregulación y modulación del pH celular, además de tener un papel como molécula señal (Bouché y Fromm, 2004).

1.3. Poliamina Oxidasas en *Arabidopsis thaliana*.

Se han identificado cinco genes que codifican para poliamina oxidasa en *A. thaliana*. Estas poliamina oxidasas fueron nombradas de la *AtPAO1* a la *AtPAO5*.

AtPAO1

La poliamina oxidasa 1 de *A. thaliana* se localiza en el citoplasma y cataboliza principalmente Spm, T-Spm y Norspm. Esta enzima no realiza interconversión de PAs, no tiene la capacidad de oxidar a la Spd (Tavladoraki et al. 2006; Kamada-Nobusada et al. 2008; Moschou et al. 2008). *AtPAO1* se expresa principalmente en la zona de transición de la raíz y el meristemo apical, en la zona de elongación de la raíz y en las anteras (Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2012).

AtPAO2

La poliamina oxidasa 2 se localiza en el peroxisoma, y su catabolismo es de interconversión, teniendo afinidad por la Spd, la cual se oxida a Spm y subsecuentemente a Put. También cataboliza Nor.Spm, T-Spm y N¹-acetil-Spm (Moschou et al. 2008; Kamada-Nobusada et al. 2008; Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2011). *AtPAO2* se expresa en diferentes tejidos, y células del centro quiascente, de la columela y en células de polen (Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2012).

AtPAO3

La poliamina oxidasa 3 de *A. thaliana* se ubica en el peroxisoma, y convierte la Spd a Put vía Spm, también cataboliza Nor-Spm, T-Spm y N¹-acetil-Spm con menos afinidad (Moschou et al. 2008; Kamada-Nobusada et al. 2008; Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2011). Principalmente se expresa en la columela, en los estomas y células de polen (Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2012). Está involucrada en el desarrollo del tubo polínico y la producción de la semilla (Wu et al. 2010).

AtPAO4

La poliamina oxidasa 4 se localiza en el peroxisoma, su actividad es de interconversión y tiene mayor afinidad por Spm y menor afinidad por Spd, formando Put (Moschou et al. 2008; Kamada-Nobusada et al. 2008; Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2011). Esta poliamina oxidasa se expresa principalmente en la raíz y en tejidos florales, a excepción de los pétalos (Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2012). Un reporte reciente sugiere que la AtPAO4 tiene un papel en el proceso de senescencia, ya que una línea mutante insercional de este gen muestra un retraso en este proceso, lo cual se relaciona al incremento de Spm, a una disminución de EROs (en particular H₂O₂), y un aumento de ON (Sequera-Mutiozabal et al. 2016).

AtPAO5

La poliamina oxidasa 5 se ubica en el citoplasma (Fincato et al. 2011), el catabolismo que lleva a cabo es de interconversión, tiene preferencia como sustrato a la Spm y T-Spm, además puede tomar como sustrato a las poliaminas acetiladas como la N¹-acetil-Spm. Su expresión principalmente está dada en tejido vascular, en la raíz y en los hipocotilos (Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2012).

1.4. Poliaminas en interacción planta-microorganismo

En diferentes interacciones planta-microorganismo se han reportado cambios importantes en los niveles de PAs libres y conjugadas y también en los niveles de

H₂O₂ (Jiménez-Bremont et al., 2014; Jasso-Robles et al., 2016). Recientemente, se ha tenido gran interés por comprender el papel de las enzimas PAO en interacciones planta-microorganismo, principalmente por el papel que juega el H₂O₂ (producto del catabolismo de PAs) en la señalización y defensa.

Conforme avanza la interacción de un microorganismo (biotrófico, hemibiotrófico o necrotrófico) con la planta, se observan alteraciones en los niveles de PAs libres y conjugadas. Estos cambios son el resultado de un incremento en la expresión de los genes de biosíntesis y catabolismo de PAs y de sus actividades enzimáticas. Los cambios más dramáticos se observan en tejidos que son colonizados por los microorganismos. Las primeras evidencias que indican una relación entre los cambios en el contenido de PAs y plantas infectadas por patógenos fueron descritas en la interacción de la cebada y los hongos *Puccinia hordei* y *Blumeria graminis f. sp.* En esta interacción se observa un incremento en las concentraciones de PAs en el tejido infectado, principalmente Put, Spm y PAs conjugadas, así como un aumento en la actividad de las enzimas ADC, ODC, SAMDC, amina oxidasas(AO) y PAO (Greenland y Lewis 1984, Walters et al. 1985). En la interacción del hongo *B. graminis f. sp. hordei* con plantas de cebada se reportó un aumento en el contenido de Put y Spd, lo cual se asocia como resultado de la resistencia de la planta en contra del patógeno (Cowlwy y Walters, 2002; Ashir et al. 2004). La acumulación de PAs fue explicada como producto de una alta actividad de las enzimas de biosíntesis, particularmente la enzima ADC.

También se ha descrito que plantas de tabaco que expresan el gen de la poliamina oxidasa de maíz *ZmPAO1*, muestran una mayor resistencia a la infección por *P. syringae* y por *Phytophthora parasítica* en comparación a plantas silvestres, dando como resultado una disminución de los signos característicos de la infección (Moschou et al., 2009).

En *Arabidopsis*, la adición exógena de Spm induce la expresión de genes involucrados en defensa, y tiene como resultado la inhibición de la replicación del virus del mosaico del pepino (CMV) (Mitsuya et al. 2009). Esto indica que la Spm

actúa como una molécula de señalización, la cual regula la expresión de genes en respuesta a la infección (González et al. 2011).

Existe evidencia de que la planta puede modificar sus niveles de PAs en respuesta al microorganismo, pero también el microorganismo puede modular el metabolismo de PAs de la planta a su beneficio, independientemente de su estilo de vida. Un ejemplo de ello es la interacción de la proteína C2 del virus BSCTV el cual infecta a la remolacha con la proteína SAMDC1. Esta proteína interactúa con el sitio PEST de SAMDC1 mandándola a degradación por el proteosoma, esto incrementa la susceptibilidad a la infección por el virus (Zhang et al. 2011).

1.5. La interacción *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas*

Los patógenos de plantas pueden tener estilos de vida biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos. Los patógenos biotróficos, se alimentan del tejido vivo de las plantas, mientras que los necrotróficos se alimentan de tejido vegetal muerto. Hay algunos patógenos que se comportan como ambos (biotróficos y necrotróficos), en distintas etapas de la interacción con su hospedero (Katagiri et al. 2002). A estos patógenos se les llama hemibiotróficos y se caracterizan por secretar un amplio rango de efectores (proteínas con actividad regulatoria o enzimática), las cuales son internalizadas a la célula hospedera mediante sistemas de secreción tipo III. Los efectores participan en suprimir la respuesta inmune de la planta, regulando los procesos de muerte celular.

Pseudomonas syringae es una bacteria gram negativa, perteneciente al grupo de las proteobacterias, con un estilo de vida hemibiotrófico. Esta bacteria puede causar infecciones en cultivares de interés comercial con grandes pérdidas económicas (Xin y Yang He. 2013). Existen varios patovares (pv) de *P. syringae* las cuales tienen como hospedero diferentes especies de plantas. *P. syringae* es empleado como microorganismo modelo en el estudio interacción planta-patógeno con especies como *Solanum lycopersicum* (tomate), *Phaseolus vulgaris* (frijol) y

Nicotiana tabacum (tabaco) (Xin y He, 2013). *P. syringae* fue el primer patógeno identificado para la planta modelo *A. thaliana*, específicamente las cepas *P. syringae* pv. *tomato*, pv. *maculicola*, pv. *pisi* y pv. *atroporpurea*. El establecimiento del modelo de interacción *A. thaliana*- *P. syringae* ha contribuido al entendimiento y elucidación de los mecanismos que se establecen en una interacción hemibiotrófica, el reconocimiento del patógeno, las cascadas de señalización, la susceptibilidad del hospedero, así como la virulencia o avirulencia del patógeno (Katagiri et al. 2002; Xin y He. 2013)

P. syringae infecta de manera local el tejido vegetal, principalmente el tejido foliar y el fruto. El inicio de la infección se da primero en la superficie del tejido de la planta sana, donde la bacteria tiene un crecimiento epifítico (Fig. 3a y 3b). Si las condiciones son óptimas para el crecimiento de la bacteria (lluvia constante, humedad alta y temperatura moderada), esta puede entrar a la planta a través de los estomas o por una fisura vegetal (Fig. 3c), colonizando principalmente la zona apoplástica (Fig. 3d) (Beattie et al. 1995, Hirano et al. 2000, Melotto et al. 2008). Los primeros signos de infección son la apariencia mojada (“water-soaked”) en las hojas infectadas durante las primeras 48 h post-inoculación. Al tercer día de infección (72 h) es cuando hay una mayor colonización en la planta, aparecen zonas cloróticas y necróticas en el tejido vegetal infectado (Fig. 3e) (Xin y Yang He. 2013).

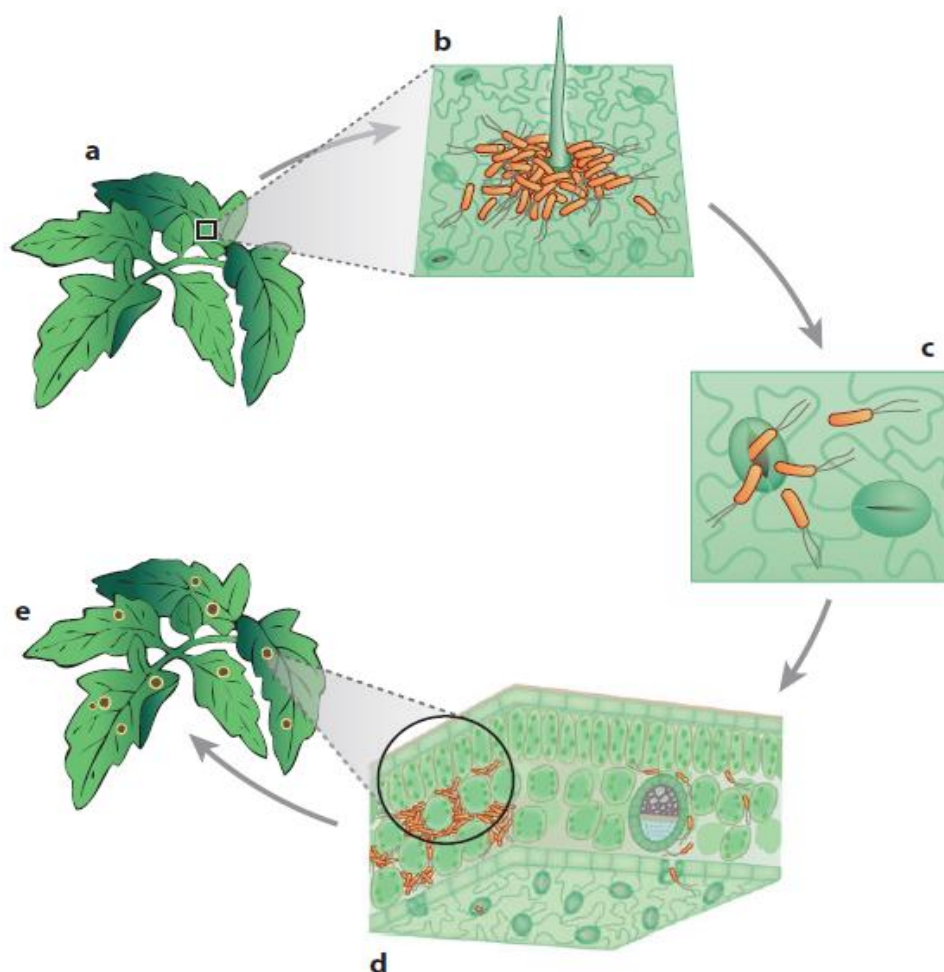


Figura 3. Entrada y colonización de *P. syringae* en la planta. a) Al inicio de la interacción la planta no muestra signos aparentes de infección, (b) la bacteria crece de manera epifítica (c) para poder ingresar al interior del tejido vegetal a través de aperturas naturales (estomas, hidatódos). (d) *P. syringae* coloniza principalmente el apoplasto, (e) los signos de infección aparecen. Imagen tomada y modificada de Xin y He 2013.

En la primera etapa de la interacción, la bacteria es reconocida por un receptor de la membrana plasmática vegetal llamado FLS2 ("Flagellin sensing 2") el cual reconoce a un péptido de 22 aminoácidos denominado flagelina, este péptido se encuentra en el flagelo de la bacteria y es suficiente para inducir en menos de 1 h la expresión del receptor FLS2 (Katagiri et al. 2002, Jones y Dangl 2006). El reconocimiento de la flagelina desencadena la inmunidad mediada por patrones moleculares ó PTI (Por sus siglas en ingles PAMP- triggered immunity) (Fig. 4). La PTI involucra la activación de varias cinasas como CDKs (cinasa dependientes de

calcio) y MAPKs (quinasas activadas por mitógeno), enzimas como NADPH oxidasas, se observan incrementos en las concentraciones intracelulares de Ca^{+2} y de EROs, entre otras, que tendrán como resultado la transcripción de genes en respuesta a patógenos, así como la producción de fitohormonas y fitoalexinas, el cierre estomático y la muerte celular programada (Jones y Dangl 2006; Zvereva y Pooggin 2012). En la segunda etapa de la interacción, la bacteria internaliza dentro de la célula mediante el sistema de secreción tipo III efectores (factores de virulencia) los cuales son proteínas que van a bloquear la primera respuesta de defensa (PTI) y como resultado se obtendrá una inmunidad mediada por efectores ó ETI (por sus siglas en inglés Effector-triggered immunity) (Fig. 4) (Katagiri et al. 2002; Jones y Dangl 2006; Zvereva y Pooggin; 2012). En el caso de *P. syringae* se han descrito cerca de 28 efectores (Xin y He, 2013). Las plantas han adquirido genes de resistencia o genes “R”. Estos genes codifican para proteínas “R” las cuales pertenecen a la familia NB-LRR (nucleotide binding site-leucine rich repeat), y participan en el reconocimiento de los efectores o de la acción de los efectores dando lugar a la inmunidad ETI, la cual es una respuesta rápida y amplificadora de la inmunidad PTI, que termina en una resistencia a la infección, o una reacción hipersensible (por sus siglas en ingles HR) (Fig. 4) (Jones y Dangl 2006; Zvereva y Pooggin 2012).

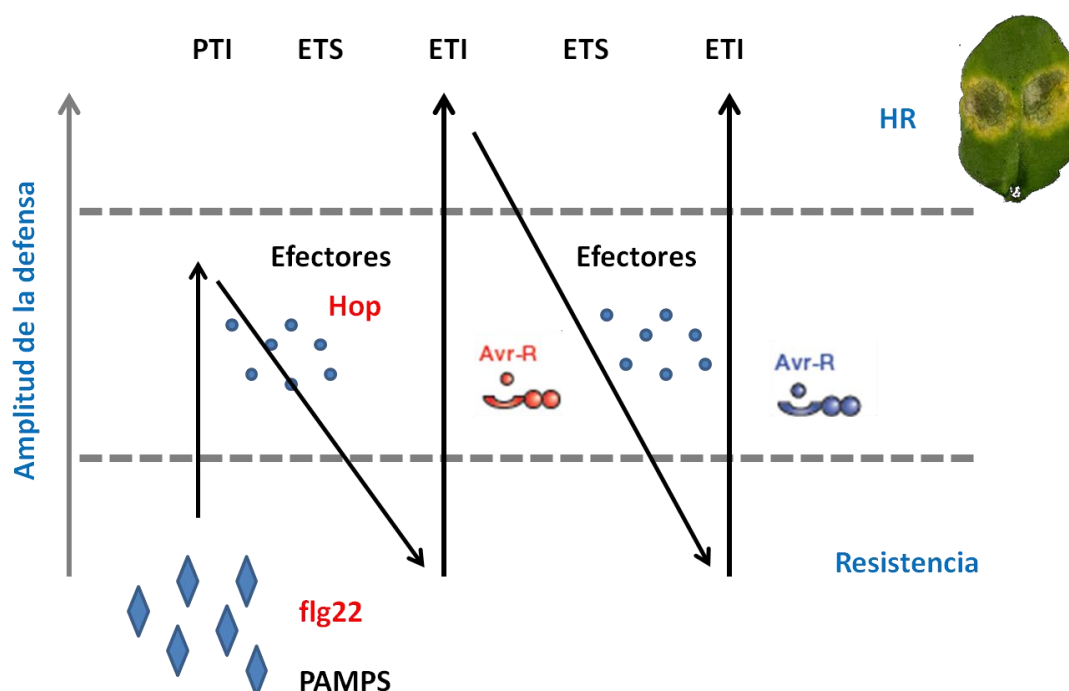


Figura 4. Sistema inmune de las plantas: modelo de “zig-zag”. En la primera fase de la infección, la planta reconoce a las moléculas asociadas a patrones (PAMPS) a través de receptores específicos PRRs para desencadenar la primera respuesta inmune denominada inmunidad mediada por patrones (PTI). En la segunda fase si la infección es exitosa, el patógeno internaliza a la célula vegetal efectores de naturaleza proteica los cuales inhiben la PTI. En la tercera fase de la infección los efectores son reconocidos por proteínas NB-LRR, estas proteínas desencadenan una inmunidad mediada por efectores (ETI), la cual puede tener como resultado una respuesta hipersensible (HR). Imagen tomada y modificada de Jones y Dangl 2006.

En el caso de *A. thaliana* se ha identificado dos proteínas R importantes en la respuesta a *Pseudomonas syringae*: RPS2 y RPM1. Estas proteínas R detectan cambios en la estructura de otra proteína llamada RIN4, la cual es blanco de efectores como AvrRpm1, AvrB y AvrPt2. En particular RPS2 detecta cortes proteolíticos sobre RIN4 inducidos por AvrPt2; mientras que RPM1 detecta la fosforilación de RIN4 mediada por AvrB (Xin y He, 2013). Al detectar cambios en RIN4, las proteínas R desencadena la respuesta ETI.

Pseudomonas viridiflava es otra especie de *Pseudomonas* que infecta *Arabidopsis*, esta especie fue aislada en soya. *Arabidopsis* en interacción con *P. viridiflava* presenta signos de infección semejantes a los descritos con *P. syringae*, y se sugiere un proceso semejante para el establecimiento de la interacción, sin embargo; cada especie cuenta con efectores específicos lo que puede cambiar la respuesta del hospedero.

1.6. Las poliaminas en la interacción *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas*

Hasta el momento existe poca información del papel que juegan las poliaminas en la interacción con bacterias del género *Pseudomonas* con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En 2011, González y colaboradores, encontraron que la acumulación de Spm, mediada por la sobre-expresión del gen de la espermina sintasa *AtSPMS*, brinda una mayor resistencia a la infección empleando como modelo la interacción *A. thaliana*- *P. viridiflava*. Por el contrario, se reportó que líneas mutantes insercionales del gen de la espermina sintasa (*Atspm-1*) de *Arabidopsis* muestran más susceptibilidad a la infección, lo cual se refleja en una mayor colonización y daño del tejido vegetal (Gonzalez et al. 2011). En este trabajo se evidencia que la oxidación de Spm por medio de enzimas PAO contribuye en parte a la resistencia al patógeno.

Recientemente se describió que las isoformas de la enzima arginina descarboxilasa (ADC1 y ADC2), implicadas en la síntesis de Put, tienen un papel diferencial en la interacción con *Pseudomonas* (Rossi et al. 2015). El gen *AtADC1* se induce a las 24 y 48 h post-inoculación con *P. syringae*; sin embargo, se reporta una mayor contribución de la actividad enzimática de *AtADC2* en la interacción (Rossi et al. 2015). Otro caso es el de la T-Spm, isómero estructural de la spm, donde se observó que el tratamiento con T-spm y la sobre-expresión de *TSPMS* en *Arabidopsis*, incrementa la resistencia hacia *P. viridiflava* (Marina et al. 2013).

1.7. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).

La producción de EROs es común durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, estas se producen en diferentes compartimentos celulares y tienen un incremento cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés biótico o abiótico (Moller et al. 2007; Miller et al. 2010).

La idea de que las EROs son moléculas tóxicas para la célula vegetal, producto del metabolismo de la planta ha cambiado con el tiempo. Actualmente se cuenta con información la cual sugiere que las EROs son moléculas involucradas en la señalización de la célula vegetal, y que son encargadas de traducir diversas señales ambientales activando la transcripción de genes involucrados en respuesta al estrés (Polidoros et al. 2005; Baxter et al. 2014).

Las EROs son producto de la excitación del O_2 a la forma singulete (1O_2) (Triantaphylidès y Havaux, 2009), o de la transferencia de electrones a la molécula del O_2 , formando el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 o el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) (Mittler. 2002). Existen distintas vías por las cuales se producen EROs como la fotosíntesis, la NADPH oxidasa, amina oxidasas y peroxidasas de la pared celular.

La producción de EROs también está relacionada al catabolismo de PAs; se ha propuesto que el H_2O_2 producto del catabolismo de PAs actúa como molécula de señalización y defensa en la interacción planta-patógeno (Walters et al. 2003; Hussain et al. 2011; Jiménez-Bremont et al. 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo de PAs sufre cambios significativos durante una interacción planta-microorganismo. Esta observación se ha hecho para interacciones de plantas con patógenos con estilos de vida diversos (biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos). En general se han observado incrementos en PAs libres, PAs conjugadas, e incluso se hace evidente la producción de H_2O_2 siendo una de las fuentes importantes el catabolismo de PAs. Sin embargo, a la fecha existe información insuficiente del papel que juegan genes implicados en el catabolismo de poliaminas en estrés biótico. En particular se desconoce el papel que juegan los genes *AtPAO1 –AtPAO2* implicados en el catabolismo de PAs en *Arabidopsis thaliana* en la interacción con bacterias del género *Pseudomonas*, las cuales tienen un estilo de vida hemibiotrófico. Se ha sugerido que el H_2O_2 producido por degradación de PAs superiores como Spd y Spm por medio de la actividad enzimática PAO, podría participar en procesos de defensa, de señalización celular y de muerte celular. La localización intracelular de las enzimas PAOs en citoplasma y peroxisoma sugiere que los productos del catabolismo de PAs pueden ejercer efectos sitio específicos y contribuir de manera diferencial en la respuesta de la planta.

El desarrollo del presente trabajo de Tesis contribuirá al entendimiento del papel del catabolismo de PAs y la producción de H_2O_2 durante la interacción *A. thaliana*-*Pseudomonas* y como precedente para estudios posteriores que tendrán impacto en otras interacciones planta-microorganismo del tipo necrotrófico y hemibiotrófico que afectan cultivos de interés agronómico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecular y funcionalmente los genes *AtPAO* de *Arabidopsis thaliana* en la interacción con bacterias del género *Pseudomonas*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar mediante qRT-PCR los perfiles de expresión de los genes *AtPAO1*, *AtPAO2*, *AtPAO3*, *AtPAO4* y *AtPAO5* durante la interacción con *Pseudomonas spp.*
2. Caracterizar líneas mutantes insercionales de T-DNA de genes que codifican poliamina oxidasas de citoplasma (*Atpao1-1*) y de peroxisoma (*Atpao2-1*), y una doble mutante *Atpao1-1* y *Atpao2-1* durante la interacción con *Pseudomonas spp.*
3. Determinar los niveles de poliaminas y peróxido de hidrógeno en las líneas mutantes en interacción con *Pseudomonas*.
4. Generar líneas sobreexpresantes de *Arabidopsis* de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL, MEDIOS DE CULTIVO Y MÉTODOS DE CRECIMIENTO

4.1.1. Material vegetal empleado en el estudio.

Para el desarrollo de los experimentos en el presente estudio se empleó la planta modelo *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia (Col-0) como control, las líneas mutantes insercionales sencillas de T-DNA *Atpao1-1* (SALK_013026.56.00.x), *Atpao2-1* (SALK_049456.42.05.x) y la doble mutante *Atpao1-1 x Atpao2-1* producto de la cruce de las mutantes sencillas.

4.1.2. Desinfección del material vegetal y cultivo *in vitro*.

Las semillas de *Arabidopsis* del ecotipo silvestre y las líneas mutantes se desinfectaron superficialmente con 1 mL de etanol al 96% por 2 min, seguido de 1 mL de solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% (6% de cloro) durante 8 min. El exceso de cloro se eliminó con cinco lavados con agua destilada estéril. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente, y los lavados se realizaron por agitación en un equipo MIX MATE (Eppendorf, Hauppauge. NY) a una velocidad de 1800 rpm. Las semillas estériles se dejaron estratificando en oscuridad durante 48h a 4°C. Posteriormente, se sembraron en medio MS 0.5X (pH 5.7), con 1.5% de sacarosa (p/v) y 1.2 % de agar (p/v) (Murashigue y Skoog. 1962).

4.1.3. Siembra del material vegetal en maceta.

Para los cultivos en maceta se empleó una mezcla de vermiculita, perlita y sustrato comercial (Sunshine mix #3) en una proporción 1:1:3. Esta mezcla fue esterilizada en autoclave a una temperatura de 120 °C, 15 libras de presión, durante 30 min. Las plántulas obtenidas por germinación *in vitro*, se transfirieron a la edad de 15 días a cultivos en maceta. Dichas plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento vegetal, con condiciones controladas de 16h luz (3000

luxes) y 8h oscuridad a una temperatura de 22°C, para la realización de experimentos posteriores o para obtención de la semilla.

4.2. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

4.2.1. Cepas empleadas en el estudio

Escherichia coli

La cepa de *E. coli* Top-10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) fue empleada para clonar y replicar de manera estable plásmidos de alto número de copias. Como medio de cultivo líquido se empleó LB (Luria-Bertani) compuesto por 1% (p/v) peptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) de cloruro de sodio (NaCl). En caso de requerir medios de cultivos sólidos se agregó 1.5% (p/v) de agar bacteriológico. El medio de cultivo se preparó con agua destilada y se esterilizó a 120 °C, 15 libras de presión, por 20 min. Cuando fue necesario, se adicionó el antibiótico kanamicina (50 µg/ml), el cual se esterilizó por filtración. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 h.

Agrobacterium tumefaciens

La cepa de *A. tumefaciens* GV2260 (Deblaere et al. 1985) fue empleada para transferir de forma estable las construcciones de interés en plantas de *Arabidopsis* empleando el método de inmersión floral como se describe más adelante. Esta cepa fue crecida en medio LB líquido suplementado con los siguientes antibióticos: ampicilina (100 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Los dos primeros, son para seleccionar la cepa de *A. tumefaciens* y el tercer antibiótico es específico del vector de interés, en este caso pEarley-Gate201. En caso de medios de cultivo sólidos se agregó 1.5% (p/v) de agar bacteriológico. Los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121 °C, 15 libras de presión por 20 min. Los cultivos se crecieron a 28 °C.

***Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000.**

La cepa de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 fue empleada para realizar los estudios de interacción planta-patógeno. Los cultivos se crecieron en medio KB compuesto por 2% (p/v) de peptona, 0.15% (p/v) de sulfato de magnesio (MgSO₄) y 0.15% (p/v) de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄). En caso de medios de cultivo sólido, se agregó 1.5% (p/v) de agar bacteriológico. El medio de cultivo se preparó con agua destilada y se esterilizó a 120 °C, 15 libras de presión, por 20 min. Los cultivos se crecieron a 28°C durante 2 días.

***Pseudomonas viridiflava* pvalb8**

La cepa de *P. viridiflava* pvalb8 también fue empleada para realizar los estudios de interacción planta-patógeno. Esta cepa fue crecida en las mismas condiciones que *P. syringae* empleando el medio de cultivo KB y una temperatura de 28 °C.

4.3. INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Arabidopsis* CON BACTERIAS DEL GÉNERO *Pseudomonas*.

Las cepas de *P. syringae* y *P. viridiflava* fueron crecidas en medio KB hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.4-0.5 a 600 nm. Posteriormente, las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas con una solución de cloruro de magnesio (MgCl₂) 10 mM pH 7.0. Enseguida se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, y se resuspendieron en MgCl₂ para alcanzar una densidad de 4 x 10⁸ UFC/mL. Con esta suspensión de bacterias, se inocularon plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad y se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 h post inoculación para experimentos posteriores.

4.4. CUENTAS VIABLES DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Las cuentas de UFC se realizaron tomando la parte aérea de plántulas infectadas con *Pseudomonas* a las 24, 48 y 72 h post-inoculación. En cada tiempo de análisis, se consideraron 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas. Cada réplica

técnica consta de dos plántulas. En cada caso, se realizó la desinfección superficial del material vegetal con 1 mL de etanol al 70%, posteriormente se realizaron tres lavados con la solución de MgCl_2 10 mM pH 7.0 para eliminar el etanol restante. La muestra se homogenizó con pistilo en 200 μL de MgCl_2 y se aforó a 500 μL . Se realizaron las siguientes diluciones seriadas: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000. De cada dilución se sembraron 10 μL en medio de cultivo KB. Se incubó por 24 h a 28°C y se contaron las UFC.

4.5. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plásmidico se extrajo de *E. coli* por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Se partió de un inóculo en 3 mL de medio de cultivo LB, el cual se centrifugó por 2 min a 13000 rpm hasta obtener una pastilla de células. La pastilla se resuspendió en 200 μL de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0), después se agregaron 400 μL de la solución II (hidróxido de sodio 0.2 N, dodecil sulfato de sodio al 1%) y se mezcló por inversión y se dejó 5 min en hielo. Posteriormente se agregó la solución III (acetato de potasio 5 M, 7.6% de ácido acético glacial) y se mezcló por inversión y se dejó en hielo de 15 a 30 min. Después se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El ADN plasmidico se precipitó con 600 μL de isopropanol frío a -80 °C por 1 h. Después se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla que se obtuvo se lavó con 500 μL de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. La pastilla se resuspendió en agua miliQ y se trató con ARNasa (0.003 mg/ μL), 1 h a 37 °C.

4.5.2. Aislamiento de ADN genómico.

La extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* se realizó empleando el método de cetil-trimetil amonio (por sus siglas en inglés CTAB) (Wagner et al. 1987). El tejido vegetal (50-100 mg) se homogenizó con pistilo en nitrógeno líquido y se le agregaron 300 μL de CTAB 2X, se mezcló en vortex y se incubó por 45 min a

65°C en un bloque de calentamiento. Se adicionaron 300 µL de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 13000 rpm por 3 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 300 µL de isopropanol y 30 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se dejó reposando en hielo durante 15 min. Para obtener la pastilla se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se realizó el lavado de la pastilla con etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. La pastilla se resuspendió en agua miliQ y se trató con ARNasa (0.003 mg/µL) por 1 h a 37°C.

4.5.3. Aislamiento de ARN total.

El ARN total fue extraído de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad (50 mg aproximadamente de tejido molido en nitrógeno líquido), empleando el método de TRI Reagent de acuerdo a las especificaciones del fabricante (SIGMA, St. Louis. MO). Este método se basa en la extracción de ARN empleando una mezcla de fenol-cloroformo e isotiocianato de guanidina de acuerdo a lo desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). El tejido vegetal molido fue homogenizado con 500 mL del reactivo durante 3 min, posteriormente se añadieron 100 µL de cloroformo y se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm a 4°C en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo nuevo y se le añadió 500 µL de isopropanol y se dejó reposar 10 min, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se descarta y la pastilla se lava con 1 mL de etanol al 70%. El ARN total se resuspende en agua miliQ tratada con 0.01% de DEPC. La integridad de ARN fue analizada en un gel de agarosa desnaturizante con formaldehído. La concentración del ARN obtenido fue determinada en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo scientific).

4.6. TECNICAS DE AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE GENES ESPECÍFICOS

4.6.1. Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante RT-PCR

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 2 µg de ARN total obtenido de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad sometidas a condiciones de estrés biótico. Una vez obtenido el ARN total, este fue digerido con la enzima DNase-free (1 U/µL) (Thermo), durante 30 min a 37°C eliminando así el ADN genómico presente. La síntesis de ADNc se realizó empleando el kit SuperScrip First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad. CA). Cada reacción (30 µL) contenía 2 µg de ARN total, 1 µL de Oligo-dT 50 µM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 3 µL de buffer Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM con KCl 50 mM, 6 µL de MgCl₂ 5 mM, 3 µL de ditioneitol (DTT) 10 mM, 1 µL de inhibidor de RNasa Recombinante (RNAseOUT) y 1 µL de Transcriptasa Reversa (SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase). La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 50 min. De manera simultánea se realizaron reacciones control sin Transcriptasa Reversa para verificar la ausencia de ADN genómico. Un microlitro de cada ADNc fue empleado como templado para los análisis de PCR.

Los genes *PDF2* (At1G13320) y *UBQ5* (At3G462250) fueron empleados como control de carga. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se realizó en un termociclador CFX96™ TOUCH REAL-TIME PCR (Bio-Rad. Hercules. CA), empleando la química de detección SYBRGreen. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 10 µL conteniendo 1 µL de ADNc como templado (El ADNc se diluyó para obtener una concentración de 100 µg/µL), Supermix (SsoAdvanced Universal SYBRGreen. Bio-Rad. Hercules. CA) y oligonucleótidos (10 pmol µL/ µL) específicos para cada gen de interés (Tabla 1). Las condiciones de amplificación programadas para cada gen fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 60 s (etapa de desnaturalización); y 60°C por 30 s. La cuantificación de transcrito se basó en un valor de ciclo umbral (Ct), normalizando la expresión de

cada gen a los controles internos de *PDF2* y *UBQ5* empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para cada muestra se analizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

4.6.2. Oligonucleótidos empleados

Para los ensayos de expresión por PCR tiempo real, se diseñaron diferentes parejas de oligonucleótidos los cuales amplifican para diferentes genes que se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes de interés.

Gen	No. de acceso base de datos TAIR	Oligonucleótidos		Tamaño del amplicon (pb)
PDF2	At1G13320	AtPDF2 Fw	5'-TCA ACA TCT GGG TCT TCA CTT AGC-3'	93
		AtPDF2 Rv	5'-GAT GCA ATC TCT CAT TCC GAT AGT C-3'	
UBQ5	At3g62250	AtUBQ5 Fw	5'-TCG ACG CTT CAT CTC GTC CT-3'	155
		AtUBQ5 Rv	5'-CGC TGA ACC TTT CCA GAT CC-3'	
AtPAO1	At5g13700	AtPAO1Fw	5'-CCC CAG TTG GAC GGA TAT TC-3	165
		AtPAO1Rv	5'-ACT CTG CTT CAT CTC TTC CAA C-3'	
AtPAO2	At2g43020	AtPAO2 RT Fw	5'-TGG AGC GGT ATG GTG AGT TG-3'	135
		AtPAO RT Rv	5'-TGG AGC GGT ATG GTG AGT TG-3'	
AtPAO3	At2g43020	OVERFWPAO3	5'-ACT GAG AGT GCC ATT GGA TAA TC-3'	156
		OVERRVPAO3	5'-ATC TCA TGT TCG AGC TCT CCA T-3'	
AtPAO4	At1g65840	AtPAO4 qRTFw	5'-CAA AGG TAT ATC TTT GAA CGA CTC G-3'	145
		AtPAO4 qRTRv	5'-CCT GCT TCT GTC	

			TGT TAA GCA G-3'	
AtPAO5	At4g29720	AtPAO5FW	5'-GGA TGA CCT AGA CGC AAT GG-3'	152
		AtPAO5Rv	5'-CAC CAT GAG TTG TGG AGT AAT G-3	
AtPRX33	At3g49110	AtPRX33 Fw	5'-GTG GTG AAC TCC AAC TCT CTA C-3'	132
		AtPRX34 Rv	5'-CAA CTT GAG ATC CCG CTT ATT TAT C-3'	
AtPRX34	At3g49120	AtPRX34 Fw	5'-CCA ACT ACA GGA ACT CAA GGA C-3'	143
		AtPRX34 Rv	5'-GTA TTC TTG TAG CCA CAT ATT GGG-3'	
AtRBOHD	At5G47910	AtRBOH Fw	5'-GAC TTC CAC AAA GAG AAC TTC TAG-3'	166
		AtRBOH Rv	5'-GTA ACC AAC AAA ACG GTA GGG ATA-3'	
AtRBOHF	At1g64060	AtRBOH Fw	5'-GCT TAG CAA ACT ATG CAA CAC ATT C-3'	105
		AtRBOH Rv	5'-TAG AGG GCT TTT GGC TTC TTC C-3'	
AtPAO1	At5g13700	AtPAO1 ORF Fw	5'-CAC CAT GTC TAC CGC CTC CGT CAT C-3'	1419
		AtPAO1 ORF Rv	5'-CTA GCT TGT GCC TGA GAT AAA TTT AAC-3'	
AtPAO2	At2g43020	AtPAO2 ORF Fw	5'-CAC CAT GGA GTC CAG GAA AAA CTC TGA TC-3'	1473
		AtPAO2 ORF Rv	5'-TTA GAG ACG AGA TAT AAG AAG AGG TAC A-3'	

4.7. PLÁSMIDOS

A continuación se describen los plásmidos empleados en este trabajo para la clonación y recombinación del marco de lectura de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2*.

pENTR/D-TOPO: Plásmido bacteriano de 2601 pb, contiene un sitio pUC ori para su autoreplicación y el cassette de resistencia a kanamicina. Este vector puede ser secuenciado por medio de los oligonucleótidos universales M13 y T7, los clones pueden ser transferidos a un vector destino por medio de la tecnología Gateway gracias los sitios de recombinación attL1 y attL2. Este vector cuenta con un borde GTGG al 3' del sitio de clonación, lo que permite la inserción direccionada del producto de PCR con una secuencia complementaria CACC al extremo 5' previo al sitio de inicio de la traducción (ATG) del gen de interés (Invitrogen. Carlsbad. CA).

pEarley-Gate201: Plásmido bacteriano de 11,779 pb, contiene resistencia a kanamicina y cloranfenicol en bacteria, y al herbicida BASTA en planta. Este vector permite la expresión de genes de interés en plantas. El cassette de integración al genoma vegetal está conformado por el promotor CaMV 35S, el epítoto HA, el extremo N-terminal del marco de lectura de interés y el terminador de la octopino sintasa. Este vector está basado en la tecnología Gateway y contiene los sitios de recombinación attR1 y attR2.

4.8. CLONACIÓN Y RECOMBINACIÓN DE LOS MARCOS DE LECTURA DE LOS GENES *AtPAO1* Y *AtPAO2*.

El marco de lectura de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* fue amplificado con los oligonucleótidos específicos *AtPAO1*-orf-fw, *AtPAO1*-orf-rv, *AtPAO2*-orf-fw y *AtPAO2*-orf-rv, respectivamente (Tabla 1). Los productos de PCR de 1,419 pb (*AtPAO1*) y de 1,473 pb (*AtPAO2*), fueron clonados en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. Para ligar el gen de interés se realizó una reacción la cual contenía 1 µL de solución salina, 0.5 µL del vector de entrada y 5 µL de ADN purificado (100-300 ng). Se dejó incubando durante toda la noche a temperatura ambiente y se guardó a -20 °C para su posterior transformación en células de *E.coli* quimiocompetentes.

Los vectores generados *AtPAO1*-pENTER y *AtPAO2*-pENTER fueron secuenciados por ambas cadenas para verificar cada construcción. Estos vectores

fueron empleados para la recombinación de los marcos de lectura *AtPAO1* y *AtPAO2* al vector destino pEarley-Gate201.

La reacción de recombinación se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen. Carlsbad. CA) empleando la enzima LR-clonasa. La reacción de recombinación se realizó empleando concentraciones equivalentes de ADN de entrada y destino (aprox. 150 ng), se incubó a 25 °C por 2 h, y se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10. Los vectores obtenidos fueron secuenciados en ambas cadenas para verificar la construcción.

4.9. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

Se empleó el método de inmersión floral (Floral dip) para la transformación de *Arabidopsis*: Para ello se emplearon plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 las cuales se sembraron en tierra (16 plantas por maceta) y se crecieron bajo condiciones controladas 16/8 h luz/oscuridad a una temperatura de 22±1°C hasta el desarrollo de botones florales (6 semanas de edad aprox.). Al momento de la transformación, se eliminaron las silicuas y las flores, dejando únicamente los botones florales cerrados, los cuales se sumergieron en la solución de transformación durante 8 min. Esta solución contiene la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 transformada con las construcciones de interés. Las macetas se colocaron de manera horizontal, resguardadas de la luz durante 24h, y posteriormente se transfirieron a condiciones de crecimiento controladas hasta la obtención de semillas.

4.10. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y DE POLIAMINAS EN TEJIDOS VEGETALES.

4.10.1. Detección histoquímica de peróxido de hidrógeno.

La detección de H₂O₂ se realizó en plántulas de *Arabidopsis* 15 días de edad del ecotipo silvestre Col-0 y de las líneas mutantes (*Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x*

Atpao2-1). Las muestras analizadas fueron infiltradas con una solución de 0.1 mg/mL de 3,3-diaminobencidina en un buffer TRIS-acetato 50 mM (pH 5.0). La infiltración se realizó empleando una bomba de vacío durante 1 min. Las muestras permanecieron en la solución resguardadas de la luz a 25°C durante 24 h. Posteriormente, se colectó el tejido vegetal y se sometió a un proceso clarificación en una solución de etanol al 80 % y se trató a 70 °C durante 10 min. Finalmente las hojas fueron montadas en una laminilla y embebidas con una solución 1:1:1 (v/v/v) de ácido láctico:fenol:agua para ser observadas al microscopio.

4.10.2. Detección histoquímica del ión radical superóxido.

La detección de $O_2^{\cdot -}$ se realizó en plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad del ecotipo silvestre Col-0 y de las líneas mutantes (*Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x Atpao2-1*). Las muestras analizadas fueron infiltradas con una solución de 122 μ M de Nitro azul de Tetrazolio (NBT). La infiltración se llevó a cabo empleando una bomba de vacío aplicando de 8 a 10 pulsos de 10 segundos cada uno. Las muestras se incubaron a 30°C en oscuridad por 2 h. La solución de NBT se retiró y las muestras se clarificaron con una solución de 9:1 etanol:glicerina a una temperatura de 70°C por 10 min. Las muestras fueron montadas en una laminilla y embebidas con una solución 1:1:1 (v/v/v) de ácido láctico:fenol:agua para ser observadas al microscopio.

4.10.3. Cuantificación de peróxido de hidrógeno.

La cuantificación de H_2O_2 se realizó en plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad. Las muestra analizadas fueron plántulas del ecotipo silvestre Col-0 infectadas a las 0, 24, 48 y 72 h. Al finalizar de cada tiempo de infección las plantas fueron sumergidas en la solución de reacción conteniendo 4-aminoantipirina 100 μ M, ácido 3,5-diclorobencensulfónico (DCHBS) 1 mM y la peroxidasa 0.06 mg/mL. Las muestras se infiltraron por 1 min y se incubaron a 30 °C por 2 h en oscuridad. El medio de incubación se colectó centrifugando a 13000 rpm por 5 min y se midió la absorbancia a 515 nm en un espectofotómetro (Eppendorf, Hauppauge. NY). La concentración de H_2O_2 se obtuvo a partir de las

absorbancias obtenidas y el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 (2.6×10^4 M/cm).

4.10.4. Cuantificación del ión radical superóxido.

La cuantificación del $\text{O}_2^{\cdot -}$ se realizó en plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad. Las muestra analizadas fueron plántulas del ecotipo silvestre Col-0 infectadas a las 0, 24, 48 y 72 h. Al finalizar de cada tiempo de infección las plantas fueron sumergidas en la solución de reacción conteniendo XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) al 0.5 mM. Las muestras se infiltraron por 1 min y se incubaron a 30 °C por 5 h en oscuridad. El medio de incubación se colectó centrifugando a 13000 rpm por 5 min y se midió la absorbancia a 470 nm en un espectofotómetro (Eppendorf, Hauppauge. NY). La concentración de superóxido se obtuvo a partir de las absorbancias obtenidas y el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 (2.6×10^4 M/cm).

4.10.5. Cuantificación de poliaminas libres.

La cuantificación de PAs libres se llevó a cabo en plántulas de *Arabidopsis* no inoculadas e infectadas con *P. syringae*. Se pesaron 50 mg de tejido vegetal y se trató con 150 μL de ácido perclórico al 5%, se incubó a 4°C en oscuridad por 24 h y después se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se tomaron 60 μL del sobrenadante y se adicionaron 6 μL del estándar interno HTD 0.1 mM. Se agregaron 60 μL de Na_2CO_3 saturado para alcalinizar el extracto (es necesario un pH alcalino para que la dansilación se produzca) y 75 μL de cloruro de dansilo, y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 24 h. La reacción de dansilación se detuvo con prolina 100 mg/mL y se extrajeron los dansil derivados con tolueno. Las muestras se secaron al vacío y se resuspendieron con acetonitrilo. Para el análisis se empleó una columna de C_{18} fase reversa de 40 cm. La columna se equilibró con acetonitrilo/agua (70:30). Se trabajó con un flujo 1.5 mL/min.

4.11. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE POLIAMINA OXIDASAS.

Para determinar la actividad enzimática se pesaron 200 mg de tejido vegetal y se homogenizó con una solución que contenía 0.2 M de buffer de fosfatos pH 7.0, y 1 mM de PMSF. Después se centrifugó y el sobrenadante se separó para su posterior uso en la determinación de la actividad AtPAO y para determinar el contenido total de proteína.

La actividad AtPAO fue determinada por espectrofotometría. La mezcla de reacción contenía 0.2 M de buffer de fosfatos pH 7.0, 0.06 mg de peroxidasa de rabanito, 100 μ M de 4-aminoantipirina, 1mM de ácido 3,5-dicloro-2-diclorobencensulfónico en un volumen total de 100 μ L. La reacción se llevó a cabo adicionando 2 μ L del sustrato (Spm, Spd y NorSpd), y se incubó por 2 min a 30 °C. La actividad AtPAO se expresó en nKat/mg de proteína. La proteína total fue determinada haciendo uso del método de Bradford, usando como estándar de referencia la albúmina de suero bovino (Bradford, 1976).

5. RESULTADOS

5.1. Los genes *AtPAO* se expresan diferencialmente en la interacción *Arabidopsis-Pseudomonas*.

Para analizar los niveles de expresión de los genes *AtPAO1*, *AtPAO2*, *AtPAO3*, *AtPAO4* y *AtPAO5* de *A. thaliana* en la interacción con las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas viridiflava*, se inocularon plantas de *A. thaliana* con cada una de las bacterias y se procesaron las muestras para realizar los ensayos de expresión por qRT-PCR. Durante la interacción *A. thaliana*-*P. viridiflava* se observa que los cinco genes *AtPAO* se reprimen en todos los tiempos de interacción analizados (Fig. 5a). Por el contrario, en la interacción *A. thaliana*-*P. syringae* se observa un incremento en la expresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* a las 48, 72 y 96 h post-inoculación (Fig. 5b). El gen *AtPAO2* muestra el mayor incremento (2.5 veces) en los niveles del transcrito a las 72h de interacción, con respecto al control no inoculado. A las 72 h también se observa un ligero incremento en la expresión del gen *AtPAO4*.

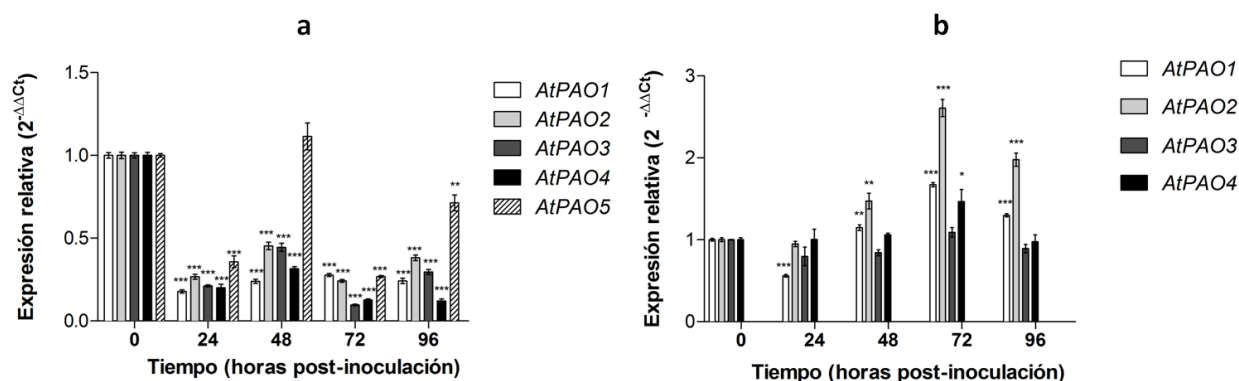


Figura 5. Expresión de los genes *AtPAO* en interacción *A. thaliana*- *Pseudomonas*. Se empleó 1 µg de ARN total de plántulas de 15 días de edad en interacción con a) *P. viridiflava* y b) *P. syringae* pv. tomato DC3000, a las 0, 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación. Se empleó 1 µL de ADNc (aprox.100 ng) como molde para la amplificación de cada gen por qPCR en presencia de SYBR-Green. La expresión de cada transcrito se basó en el valor de ciclo umbral (CT) y se normalizó al gen de *UBQ5* empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD y el análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA de una vía * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

5.2. Las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* de *Arabidopsis* están afectadas en la respuesta a *Pseudomonas*.

Para determinar el papel de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* en la interacción *A. thaliana*-*P. syringae* se emplearon las líneas mutantes SALK 013026.56.x (*Atpao1-1*) y SALK 049456.42.05.x (*Atpao2-1*) obtenidas del Instituto Salk. Estas líneas mutantes se emplearon para generar una doble mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1*. Los resultados de la tipificación de las líneas mutantes se muestran en la figura 6, en cada caso la inserción del T-DNA fue validada con oligonucleótidos específicos diseñados en los bordes del T-DNA y en el gen de interés que (Tabla 1). En la figura 6 se muestra la presencia del T-DNA en las mutantes sencillas y la doble mutante en los carriles 6, 9, 12 y 15 con un amplicón de 1300 pb. Este amplicón fue obtenido con el oligonucleótido Salk5 y los oligonucleótidos FW específicos de cada gen. En los carriles 5, 8, 11 y 14 se observa ausencia de amplificación del marco de lectura del gen de interés al emplear oligonucleótidos específicos de cada gen, por lo tanto, se confirma la inserción del T-DNA. En el carril 2 se muestra el amplicón generado por los oligonucleótidos específicos de *AtPAO1* en el ecotipo parental Col-0.

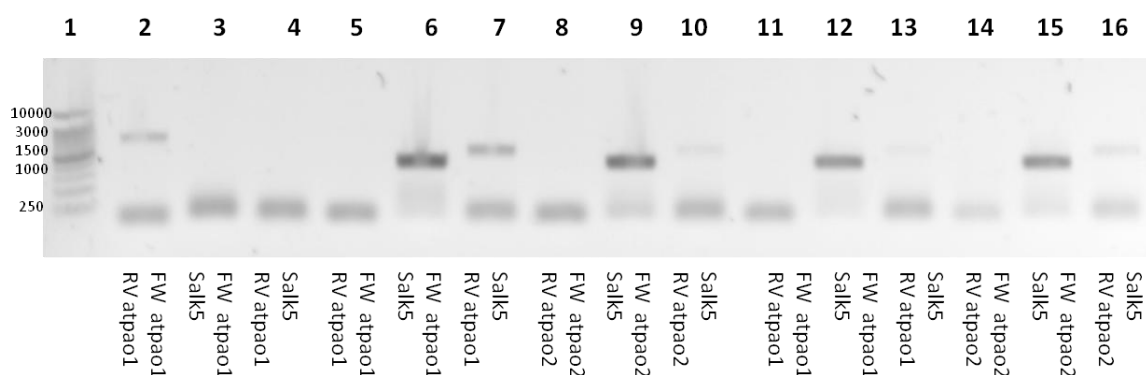


Figura 6. Tipificación de las líneas mutantes de poliamina oxidasas. Carril 1 marcador de peso molecular 1Kb, carriles 2-4 Col-0; carriles 5-7 mutante sencilla *Atpao1-1*; carriles 8-10 mutante sencilla *Atpao2-1*; carriles 11-16 doble mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1*.

5.3. Expresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* en las líneas mutantes insercionales de T-DNA.

En las líneas mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) y en la línea doble mutante (*Atpao1-1* x *Atpao2-1*) previamente tipificadas como positivas para inserción de T-DNA se midieron los niveles de expresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2*. En cada caso se espera que la inserción afecte la expresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* respectivamente, y que se observen nulos o bajos niveles de expresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* con respecto al ecotipo control Col-0. En la mutante *Atpao1-1* los niveles de expresión de *AtPAO1* son mucho menores a los de Col-0, teniendo una represión de aprox. 3 veces. De igual manera para la línea mutante *Atpao2-1* los niveles de expresión de *AtPAO2* se encuentran abatidos respecto al control (15 veces) y para la línea doble mutante la expresión de *AtPAO1* y *AtPAO2* se encuentran por debajo de los niveles de expresión observados en el ecotipo Col-0 (Fig. 7).

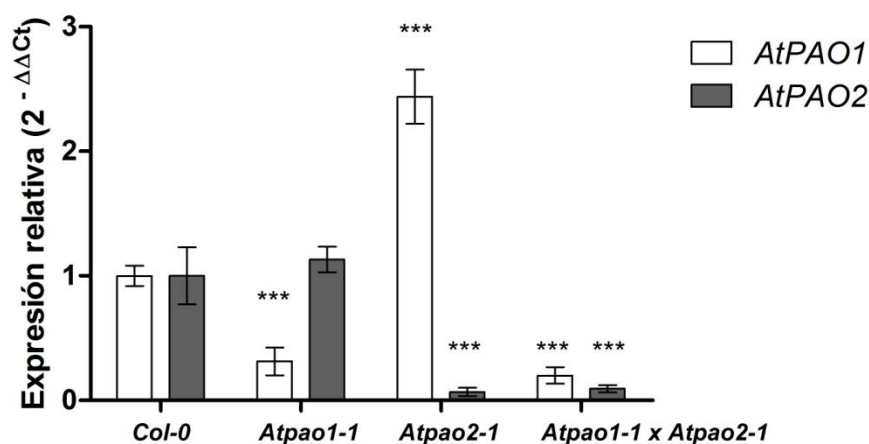


Figura 7. Expresión de *AtPAO1* y *AtPAO2* en líneas mutantes. Se obtuvo ARN total de plántulas de Col-0, las mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) y la doble mutante (*Atpao1-1* x *Atpao2-1*) de 15 días de edad para los análisis de expresión. Se empleó 1 μ L (aprox. 100 ng) de ADNc como molde para la amplificación de cada gen por qPCR en presencia de SYBR-Green. La expresión de cada transcrito se basó en el valor de ciclo umbral (CT) y se normalizó al gen de referencia *PDF2* empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD y el análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA de una vía * $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ y ***, $p \leq 0.001$.

5.4. Determinación del número de unidades formadoras de colonias en las líneas mutantes *Atpao* infectadas con *Pseudomonas syringae*.

Para determinar el crecimiento de *P. syringae* en líneas mutantes de poliamina oxidasas, se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en plántulas de 15 días de edad infectadas por 0, 24, 48 y 72 h con *P. syringae*.

En la figura 8a se muestran las UFC por planta para la mutante sencilla *Atpao1-1* y como control Col-0. A las 72 h post-infección se observa una disminución significativa en el título de UFC en la mutante sencilla *Atpao1-1* lo que sugiere que esta mutante es más resistente a la infección que el ecotipo silvestre. Para la mutante sencilla *Atpao2-1* se observa un incremento en las UFC a las 48 h, mientras que a las 72 h el número de UFC en las mutantes es semejante al ecotipo Col-0 (Fig. 8b).

En la figura 8c se observa que a las 72 h post-inoculación la línea mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1* es más susceptible a la infección por *P. syringae* ya que existe una diferencia significativa en el crecimiento bacteriano el cual es mucho mayor al observado en el ecotipo control.

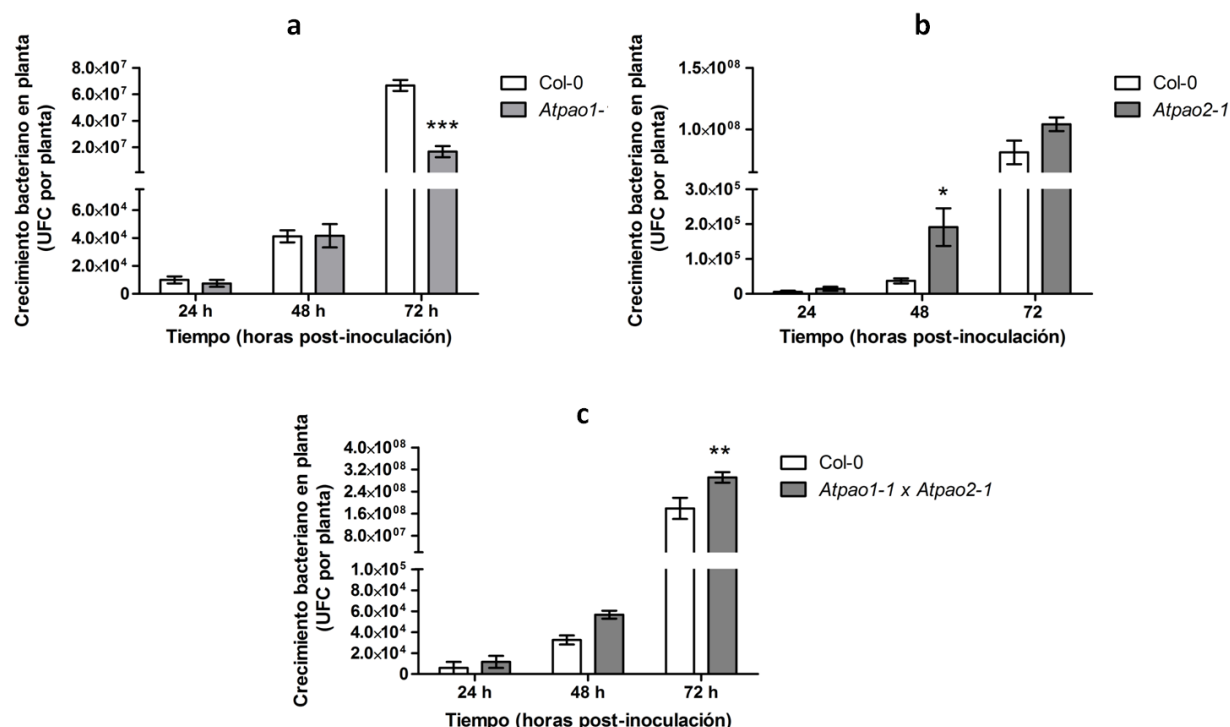


Figura 8. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* en líneas mutantes de poliamina oxidasas. a) *Atpao1-1*, b) *Atpao2-1* y c) *Atpao1-1 x Atpao2-1*. El número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por planta fueron evaluadas a las 24, 48 y 72 h post-inoculación. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD y el análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA de dos vías * $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ y ***, $p \leq 0.001$.

5.5. Cuantificación de EROs en las líneas mutantes de los genes de poliamina oxidasa en interacción con *Pseudomonas*.

Se determinó de manera cuantitativa el contenido de peróxido de hidrógeno en las líneas mutantes *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x Atpao2-1*, así como en el ecotipo silvestre Col-0 en plántulas de 15 días de edad, no inoculadas e inoculadas con *P. syringae*. En la figura 9, se muestra el contenido de H₂O₂ en plántulas de las líneas mutantes y el ecotipo silvestre no inoculadas. Es de llamar la atención que la concentración de H₂O₂ en las líneas mutantes sencillas *Atpao1-1* y *Atpao2-1* incrementa 3 veces con respecto a Col-0 (Fig 9), mientras que la línea doble mutante (*Atpao1-1 x Atpao2-1*) presenta concentraciones semejantes a las de Col-0 (Fig 9).

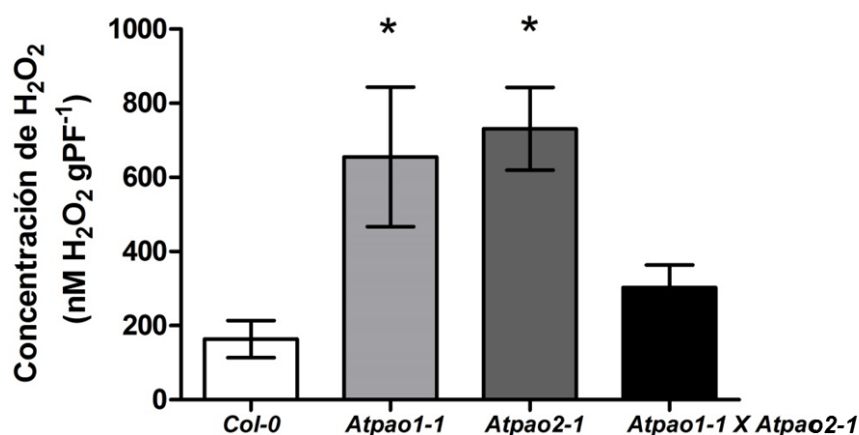


Figura 9. Determinación cuantitativa de H₂O₂ en líneas mutantes de poliamina oxidasas. Se determinó el H₂O₂ en plántulas de 15 días de edad de Col-0 (control), *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1* x *Atpao2-1*. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD y el análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA de una vía $p \leq 0.05$; *, $p \leq 0.01$ y ***, $p \leq 0.001$.

Posteriormente, se evaluó el contenido de H₂O₂ en plántulas inoculadas con *P. syringae* a las 24, 48 y 72 h post-infección. En el ecotipo silvestre Col-0, se observa que los niveles de H₂O₂ van incrementando conforme avanza la infección, alcanzando las concentraciones más altas a las 48 y 72 h (Fig. 10). En el caso de la línea mutante sencilla *Atpao1-1* se observa que a las 24h de infección presenta concentraciones de H₂O₂ similares a las de Col-0, sin embargo, a las 48 y 72 h el contenido de H₂O₂ es menor al alcanzado por Col-0. En la mutante *Atpao2-1* se observa que las concentraciones de H₂O₂ son similares a las de Col-0 a las 24 y 72 h de infección, mientras que a las 48 h los niveles de H₂O₂ son menores a los de Col-0. Finalmente, la línea doble mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1* tiene un comportamiento semejante al de la mutante sencilla *Atpao2-1* en el que la concentración de H₂O₂ son similares a los observados en Col-0 a las 24 y 72 h, mientras que a las 48 h son menores que Col-0.

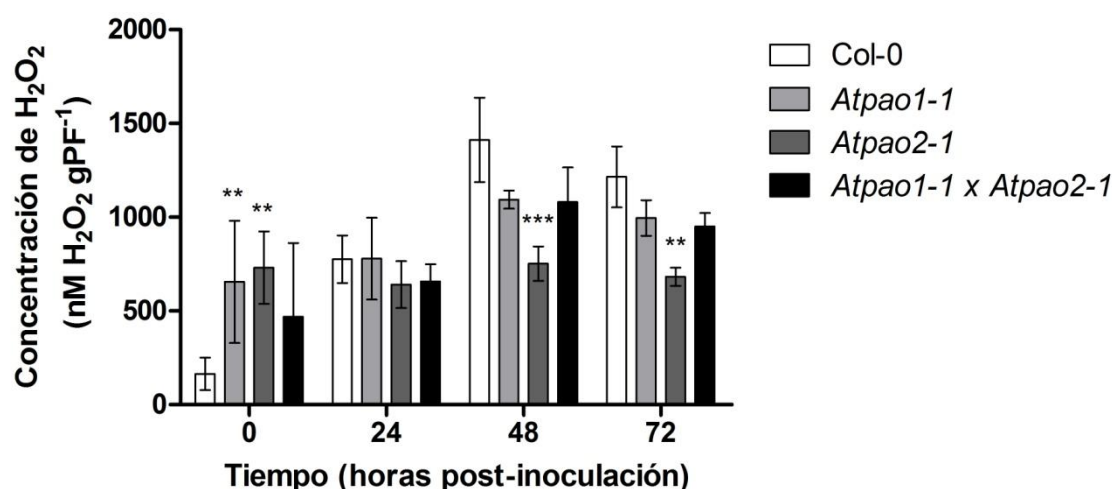


Figura 10. Determinación cuantitativa de peróxido de hidrógeno en líneas mutantes de poliamina oxidasas en interacción con *P. syringae*. Se determinó el contenido de H_2O_2 de hidrógeno a los tiempos de 0, 24, 48 y 72 h de Col-0 (control), *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1* x *Atpao2-1* en interacción con *P. syringae*. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD y el análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA de dos vías $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ y ***, $p \leq 0.001$.

Una observación interesante es que conforme transcurre la infección, las mutantes sencillas *Atpao1-1* y *Atpao2-1* difícilmente alcanzan concentraciones mayores de H_2O_2 mayores a los observados en estas mismas plantas sin inocular con la bacteria.

Además del H_2O_2 se determinó el contenido del ión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en líneas mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*), en la doble mutante (*Atpao1-1* x *Atpao2-1*) y en el ecotipo silvestre Col-0 en plántulas de 15 días de edad infectadas y no inoculadas con *P. syringae*. Como se muestra en la figura 11, el contenido del $O_2^{\cdot-}$ es mayor en la línea mutante *Atpao2-1* que en el control en plantas no inoculadas con la bacteria, e incrementa significativamente a las 24 y 72 h post-infección. En la mutante *Atpao1-1* el contenido de $O_2^{\cdot-}$ incrementa significativamente a las 48 y 72 h post-infección; esta mutante no muestra cambios significativos en el contenido de esta especie reactiva con respecto al control en plantas no inoculadas. Finalmente la línea doble mutante muestra concentraciones

similares a las de Col-0 a las 0 y 24 h, y concentraciones inferiores a las 48 y 72 h post-infección.

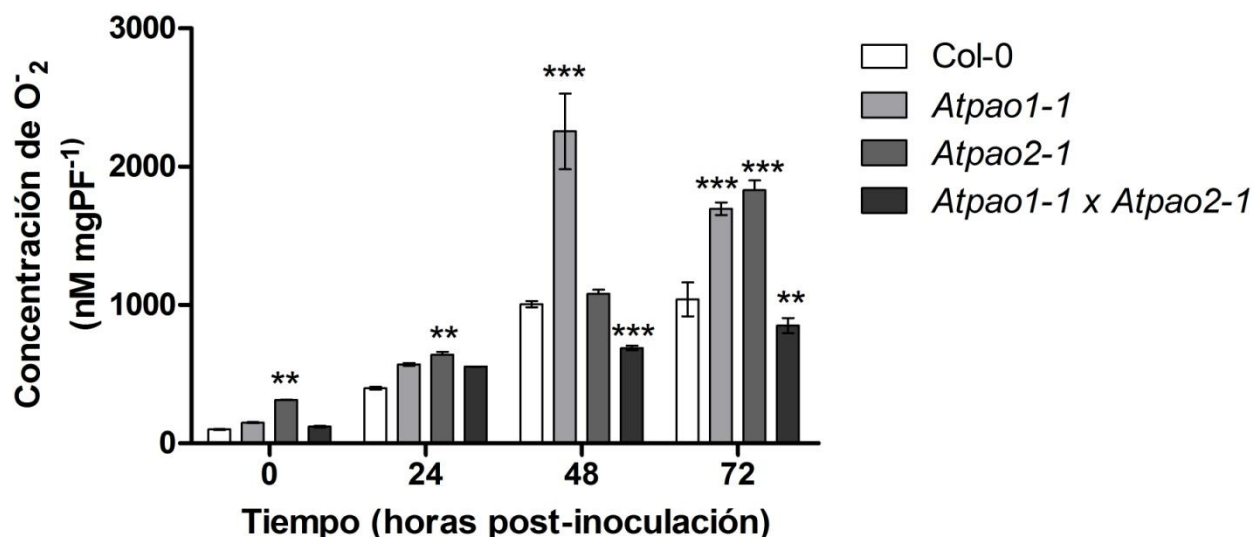


Figura 11. Determinación cuantitativa del ión radical superóxido en líneas mutantes de poliamina oxidasas en interacción con *P. syringae*. Se determinó el superóxido a los tiempos de 0, 24, 48 y 72 h de Col-0 (control), *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x Atpao2-1* en interacción con *P. syringae*. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD y el análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA de dos vías $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ y ***, $p \leq 0.001$.

5.6. Detección histoquímica de EROs en las líneas mutantes de poliamina oxidasas.

El análisis histoquímico se realizó para detectar O_2^- y H_2O_2 en plántulas de 15 días de edad en Col-0 y las líneas mutantes *Atpao* con y sin infección. En la figura 12 se muestra la detección histoquímica de H_2O_2 en las líneas mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) y la línea doble mutante (*Atpao1-1 x Atpao2-1*) en plantas de 15 días de edad no inoculadas con la bacteria. Se observa que en las mutantes sencillas hay una mayor señal de producción de H_2O_2 *in situ* principalmente en los cotiledones, así mismo, se observa como la doble mutante presenta una menor

señal comparando con las mutantes sencillas, y muy similar al ecotipo silvestre Col-0.

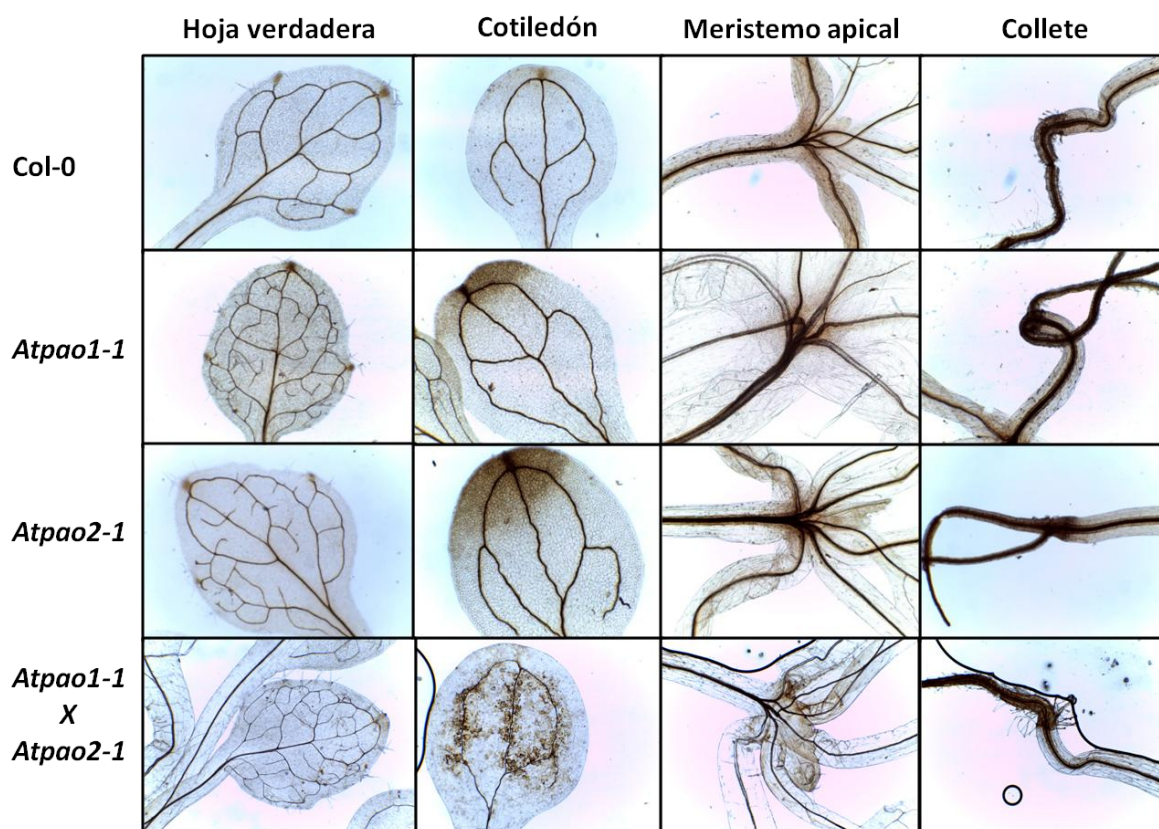


Figura 12. Detección histoquímica de H_2O_2 en las líneas mutantes de *Atpao*. Se muestran tejidos de la parte aérea de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad, la hoja verdadera, el cotiledón, el meristemo apical y el collete. Col-0, las mutantes sencillas *Atpao1-1* y *Atpao2-1* y la doble mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1*. Las plántulas se tiñeron con DAB (3,3-diaminobencidina) para la detección *in situ* de H_2O_2 el cual se observa de color marrón. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

En cuanto a la determinación histoquímica del ión radical $O_2^{\cdot -}$ no se observan significativas diferencias entre el control y las líneas mutantes en plantas no inoculadas. En plantas infectadas, se observa que se conforme van transcurriendo las horas post-infección, hay regiones con señales localizadas de la producción *In situ* del radical superóxido (Fig. 13). En el caso de la mutante *Atpao1-1* podemos observar cómo se localiza el ión radical superóxido en la periferia de la hoja, así mismo para la doble mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1* la cual presenta un patrón

similar al de *Atpao1-1*. En la línea mutante *Atpao2-1* se observa que también hay una localización muy particular del radical superóxido en la hoja, teniendo sitios con una mayor intensidad en el centro de la hoja (Fig. 13).

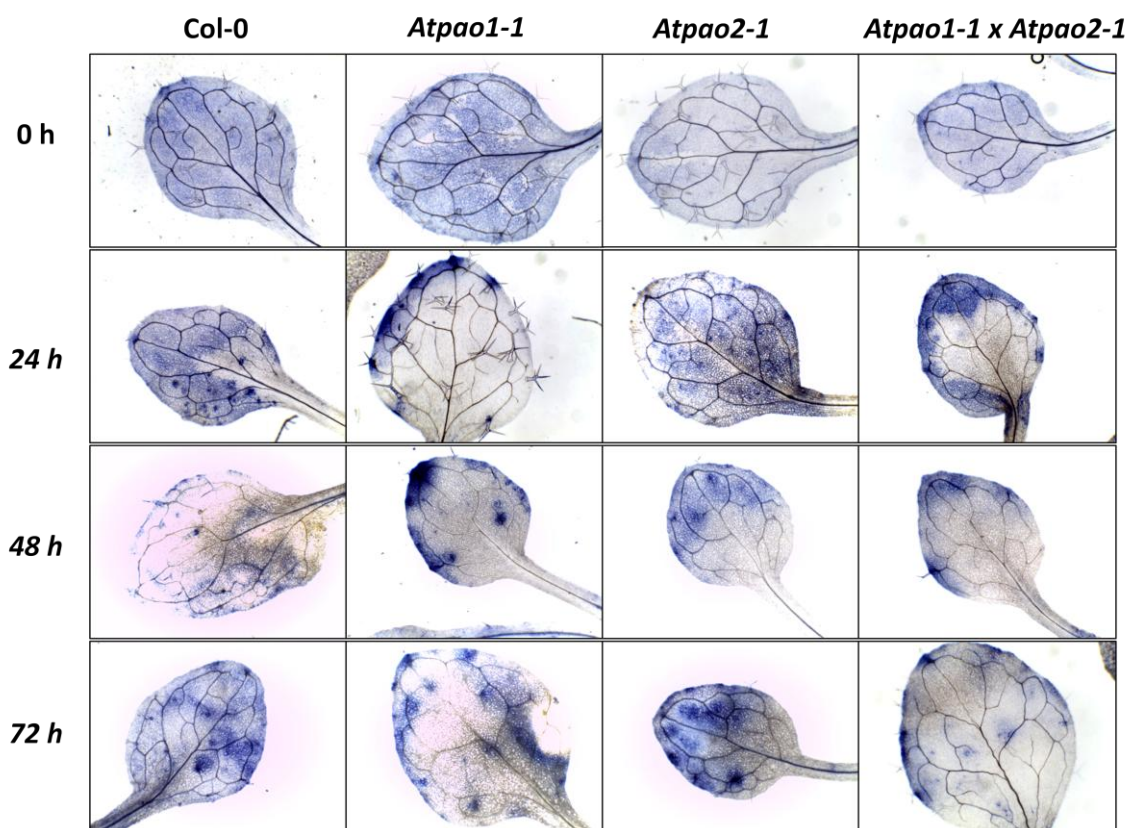


Figura 13. Detección histoquímica del ión radical superóxido en interacción de las líneas mutantes de *Atpao* con *P. syringae*. Se muestran hojas verdaderas de plántulas de las mutantes sencillas *Atpao1-1* y *Atpao2-1*, la doble mutante *Atpao1-1 x Atpao2-1* y Col-0 a las 0, 24, 48 y 72 h post-infección. Las plántulas se tiñeron con NBT (nitro azul de tetrazolio) para la detección *in situ* de superóxido el cual se observa de color azul. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

Las tinciones histoquímicas nos indican que las concentraciones de las especies reactivas H_2O_2 y el O_2^- se encuentran alteradas en las líneas mutantes *Atpao*. En base a este resultado se determinaron los niveles de expresión de genes que codifican para enzimas que son importantes en la producción de las especies reactivas de oxígeno como la NADPH oxidasa (*AtRBOHD* y *AtRBOHF*) y las peroxidasas de pared de clase III (*PRX33* y *PRX34*). Se observa que los genes

AtRBOHD y *AtRBOHF* se encuentran inducidos en la línea doble mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1* a las 72 h post-infección mostrando un incremento de 4 y 1.6 veces respecto al control. En la mutante *Atpao2-1* aumenta la expresión de *AtRBOHD* 3 veces (Fig. 14). En la mutante sencilla *Atpao1-1* incrementa la expresión del gen *PRX33* 1.5 veces (Fig. 14).

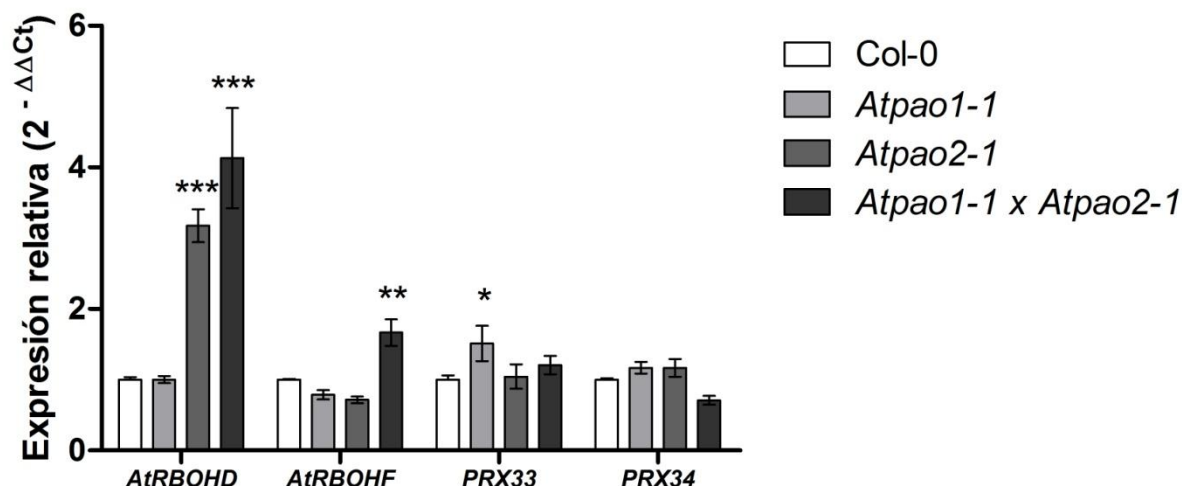


Figura 14. Expresión de los genes *AtRBOHD*, *AtRBOHF*, *PRX33* y *PRX34* en líneas mutantes. Se obtuvo ARN total de plántulas de Col-0, las mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) y la doble mutante (*Atpao1-1* x *Atpao2-1*) de 15 días de edad para los análisis de expresión. Se empleó 1 μ L (aprox. 100 ng) de ADNc como molde para la amplificación de cada gen por qPCR en presencia de SYBR-Green. La expresión de cada transcrito se basó en el valor de ciclo umbral (CT) y se normalizó al gen de referencia *UBQ5* empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD y el análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA de una vía * $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ y ***, $p \leq 0.001$.

Cuantificación de niveles de PAs y actividad enzimática PAO, en las líneas mutantes *Atpao*.

Los niveles de PAs se determinaron de manera cuantitativa en plántulas de 15 días del ecotipo silvestre Col-0 y de las líneas mutantes *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1* x *Atpao2-1* en interacción con *P. syringae* a las 0, 24, 48 y 72 h post-infección. En la figura 15a se observa un incremento gradual en el contenido de Put conforme avanza el proceso de infección, este incremento es indicador de que

las plantas se encuentran infectadas. El perfil de Put es similar entre Col-0 y las líneas mutantes *Atpao*. Para la Spd (fig. 15b) se observa que los niveles de esta poliamina no presentan cambios significativos en las líneas mutantes con respecto a Col-0 en el transcurso de la infección, de igual forma para la Spm (Fig. 15c).

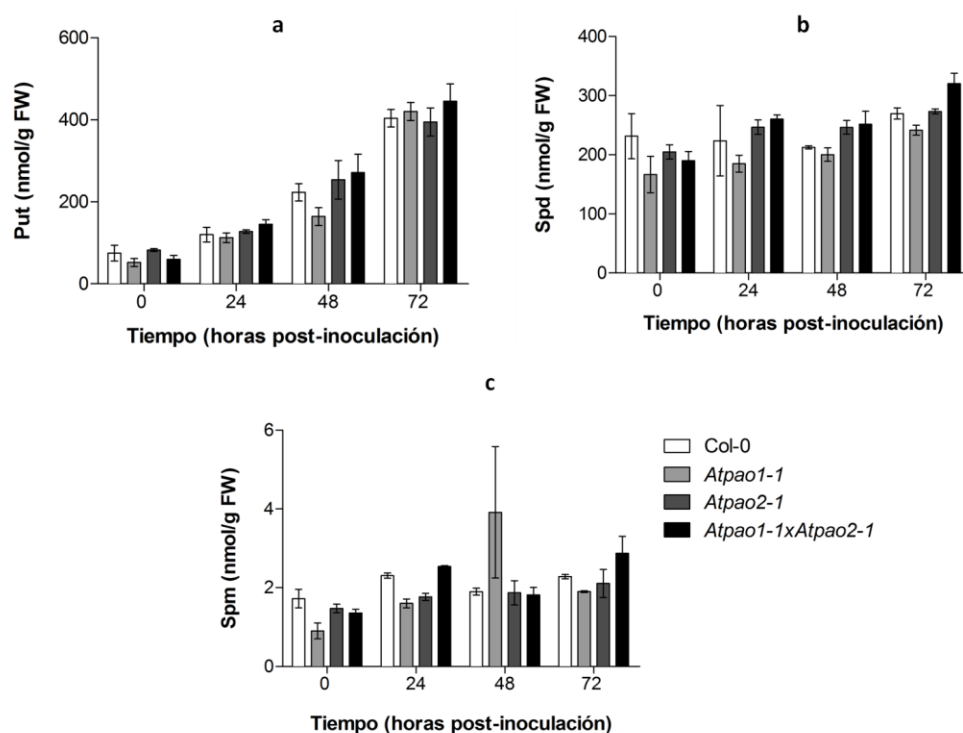


Figura 15. Contenido de PAs en las líneas mutantes *Atpao* en la interacción con *P. syringae*. Se determinó el contenido de PAs: a) Put, b) Spd y c) Spm a las 0, 24, 48 y 72 h post-inoculación de Col-0 (control), *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x Atpao2-1* con *P. syringae*.

Posteriormente, se midió la actividad enzimática PAO en las líneas mutantes *Atpao* de 15 días de edad para Spm, Spd y Nor-Spd. Se observa que para el sustrato Spm, la actividad enzimática disminuye en las líneas mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) y en la línea doble mutante (*Atpao1-1 x Atpao2-1*) (Fig. 16). Respecto a la Spd no existe diferencia significativa en la actividad enzimática respecto al ecotipo silvestre Col-0 y para Nor-Spd se observa una disminución de la actividad enzimática para *Atpao1-1 x Atpao2-1* (Fig. 16).

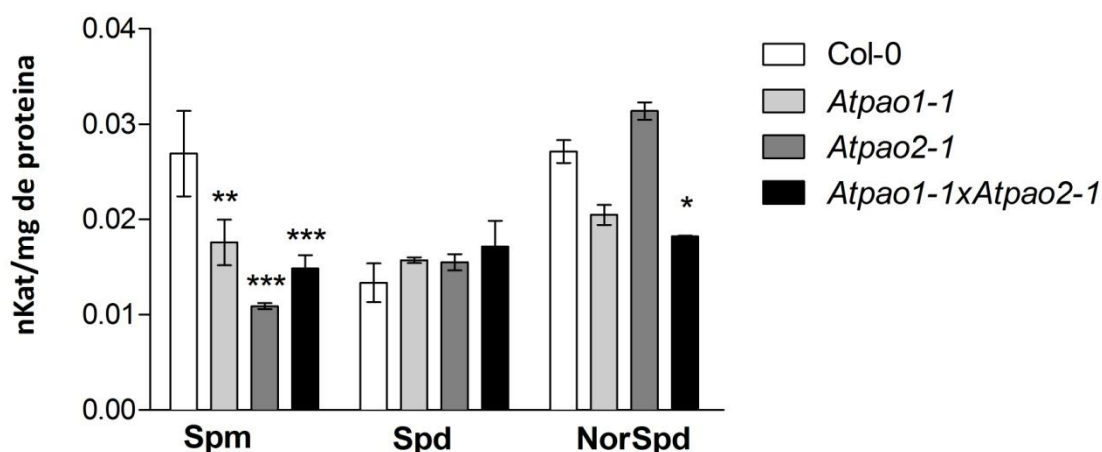


Figura 16. Actividad enzimática PAO en las líneas mutantes *Atpao*. Se determinó la actividad enzimática en plántulas de 15 días de edad de Col-0 (control), *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x Atpao2-1*. Los datos son el resultado de la media de 3 réplicas biológicas $\pm$ SD. El análisis estadístico entre las líneas mutantes y Col-0 se realizó de acuerdo a ANOVA *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ y ***, $p \leq 0.001$.

5.7. Construcciones para la sobreexpresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* en *Arabidopsis*.

Para obtener las construcciones para la sobreexpresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2*, se amplificó el marco de lectura de estos dos genes y se clonaron en el vector de entrada p-Enter-D-Topo para ser replicado en la bacteria quimiocompetente *E. coli* TOP 10. Después se recombinó en el vector destino p-EarleyGate201 y se obtuvieron las construcciones *35S::AtPAO1* y *35S::AtPAO2* para sobreexpresar estos genes *AtPAO* e incrementar su actividad en citoplasma y peroxisoma (Fig.17). Se obtuvo una construcción adicional, *35S::AtPAO2SPS*, para sobreexpresar *AtPAO2* sin el péptido señal que la localiza en el peroxisoma, con esto se pretende que la enzima se localice en citoplasma y analizar el fenotipo resultado de la sobreexpresión de una PAO de peroxisoma (Fig. 17).

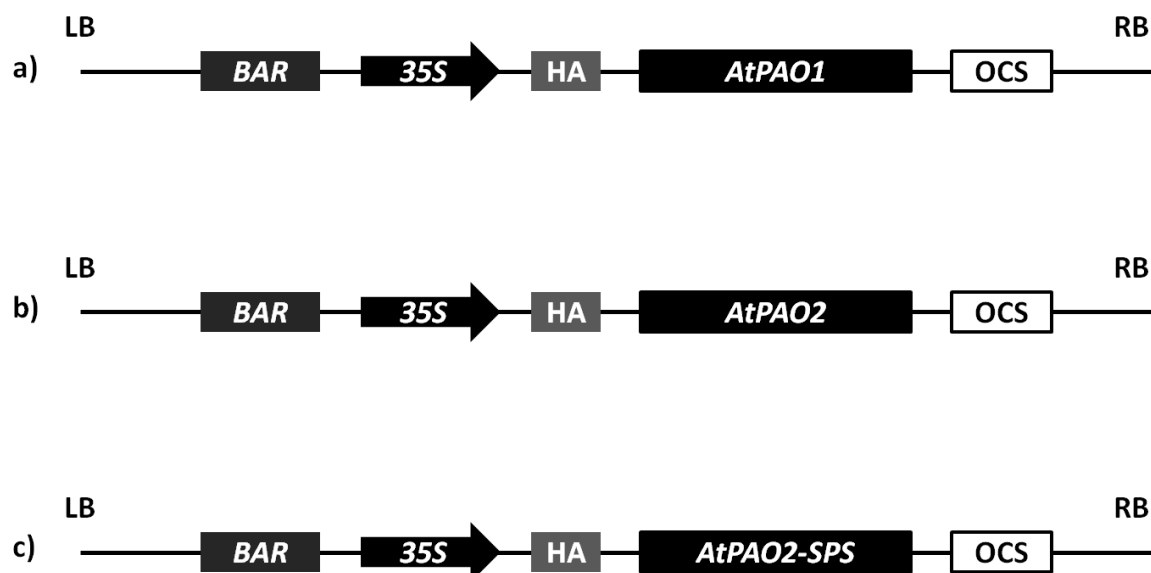


Figura 17. Construcciones para la sobreexpresión de genes *AtPAO* en *A. thaliana*. Las construcciones se realizaron en el vector de expresión pEarleyGate201, para a) *35S::AtPAO1*, b) *35S::AtPAO2* y c) *35S::AtPAO2SPS* sin péptido señal. Este vector contiene los siguientes elementos: *BAR* (gen resistencia a BASTA), el promotor *35S*, la etiqueta *HA* (hemaglutinina) y el terminador *OCS* (octopina sintasa). El cassette de resistencia es hacia el herbicida BASTA.

Una vez obtenidas las construcciones, estas fueron verificadas por PCR y secuenciadas por ambas cadenas. Posteriormente, cada construcción se transfirió a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260. Una vez seleccionadas las colonias resistentes, se realizó un PCR de colonia con los oligonucleótidos específicos del gen, para comprobar la presencia del transgen (Fig. 18). De las dos clonas obtenidas para cada construcción, las dos contienen la construcción.

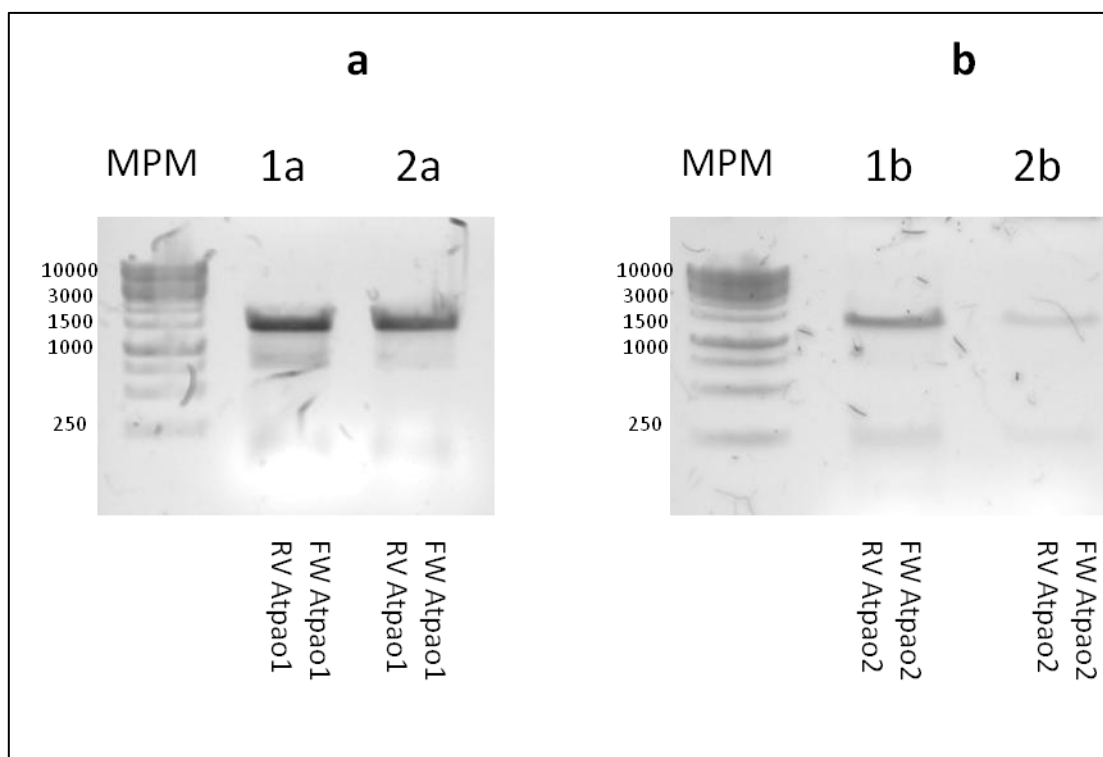


Figura 18. Amplificación de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* a partir de colonias resistentes de *A. tumefaciens*. En el primer carril de las dos figuras (a y b) se muestra el marcador de peso molecular. Para a) *AtPAO1* y b) *AtPAO2* se muestra la amplificación con los oligonucleótidos específicos de cada gen.

Estas cepas de *Agrobacterium* transformadas con la construcción correspondiente, se emplearon para transformar las plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 para la obtención de semilla y continuar con la selección hasta obtener líneas homocigotas.

6. DISCUSION DE RESULTADOS.

El estudio de las PAs ha tomado importancia por su indispensable participación en diferentes procesos de desarrollo y en la respuesta al estrés en plantas. En los últimos años ha surgido un notorio interés por el estudio de las PAs en cuanto a su regulación, específicamente la regulación dada por el catabolismo de las mismas. Este proceso es mediado por las enzimas amina oxidasas (DAOs y PAOs), las cuales son importantes en diversos eventos fisiológicos y de desarrollo, así como en la respuesta al estrés abiótico y biótico. Se ha sugerido que el H₂O₂ generado como producto durante la degradación de PAs superiores en fracciones de oxidación catalizadas por las enzimas PAO, constituye una molécula de señalización que media la respuesta de las PAs como reguladores de crecimiento. En el presente trabajo se explica la participación de poliamina oxidasas de *Arabidopsis* con diferente localización intracelular, en la interacción con *Pseudomonas syringae*. Como herramienta se emplean tres líneas mutantes de poliamina oxidasas, dos mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) y una mutante doble (*Atpao1-1 x Atpao2-1*).

Como primer enfoque, se analizó el perfil de expresión de los genes *AtPAO* en hojas de plantas de *Arabidopsis* inoculadas con bacterias del género *Pseudomonas*. En el caso particular de la interacción *Arabidopsis-P. viridiflava* los cinco genes *AtPAO* se encuentran reprimidos en todos los tiempos de infección analizados. En caso contrario, en la interacción *Arabidopsis-P. syringae* se observa que los genes *AtPAO1* Y *AtPAO2* se expresan desde las 48 h post-infección. Estos resultados sugieren diferencias en el reconocimiento y respuesta de la planta ante diferentes especies del género *Pseudomonas*. De manera interesante, nuestros resultados se relacionan con lo publicado recientemente por Lou y colaboradores (2016), donde al medir la expresión de las cinco *AtPAO* en interacción con *P. syringae*, encuentran que *AtPAO1* y *AtPAO2* se expresan a partir de las 24 h post-infección. Cabe mencionar que el método de infección que se utilizó en este trabajo y el trabajo ya publicado, es diferente. En este trabajo se inocularon plantas de 15 días de edad de una forma más natural con ayuda de un

surfactante ($MgCl_2$) y en el trabajo antes mencionado se infiltraron plantas de 3 semanas de edad con una jeringa. La infiltración ocasiona un daño mecánico y podría afectar los tiempos de inducción de un gen en particular. Las poliamina oxidasas responden a daño mecánico, en particular el gen *ZmPAO1*. En plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que sobreexpresan *ZmPAO1*, se observó que este gen y la enzima codificada, la cual tiene una localización extracelular en apoplasto, responden a daño mecánico en células del mesocotilo. Los autores muestran que un incremento en la producción de H_2O_2 durante el catabolismo de PAs, va de la mano con un aumento en la lignificación de la pared celular, sugiriendo un papel importante para las poliamina oxidasas en respuesta a daño mecánico y recuperación del tejido posterior al daño (Tisi et al. 2008).

Derivado de los resultados obtenidos en los análisis de expresión, se decidió evaluar la participación de las poliamina oxidasas *AtPAO1* y *AtPAO2* en la defensa y respuesta de *Arabidopsis* ante *P. syringae*. Para ello se emplearon las líneas mutantes insercionales de T-DNA sencillas y dobles: *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x Atpao2-1*. El primer ensayo consistió en determinar si existe variación en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) encontradas en plantas silvestres y mutantes inoculadas con *Pseudomonas*. Se observó que la mutante sencilla *Atpao2-1* y la mutante doble *Atpao1-1 x Atpao2-1* son más susceptibles a la infección por *P. syringae*, mostrando un incremento en el número de UFC. En cambio la mutante *Atpao1-1* muestra mayor resistencia a la infección respecto al ecotipo silvestre Col-0. La diferencia entre los genes *AtPAO* seleccionados es la localización intracelular de la proteína codificada, *AtPAO1* en citoplasma y *AtPAO2* en peroxisoma. En este sentido, el fenotipo particular de cada línea puede estar relacionado con el sustrato que cataboliza cada PAO, su localización intracelular y al papel principal que realiza, ya sea catabolismo terminal o de interconversión. Los ensayos realizados para determinar la actividad enzimática PAO en estas líneas mutantes muestran una disminución significativa en la actividad enzimática *AtPAO*, en particular hacia el sustrato Spm. En este sentido se reportó que al inhibir la actividad enzimática *AtPAO* con SL-1106 (el cual es un análogo estructural de PAs), existe un incremento en la susceptibilidad de *Arabidopsis* a la

infección por *P. viridiflava* (en comparación a plantas no tratadas con el inhibidor) (Gonzalez et al. 2011). Estos autores demuestran que niveles elevados de Spm así como la actividad PAO son importantes para la resistencia al patógeno. El efecto del inhibidor SL-1106 sobre la interacción puede explicar en parte lo que observamos en la línea doble mutante (*Atpao1-1* x *Atpao2-1*), la cual muestra una mayor susceptibilidad a la infección por *P. syringae* y como se mencionó previamente, una menor actividad enzimática AtPAO, en específico una menor actividad de degradación de Spm.

Es de gran relevancia tomar en cuenta el estilo de vida del patógeno, en esta situación *P. syringae* es una proteobacteria caracterizada por tener dos estilos de vida interconectados de manera espacial y temporal. Una etapa inicial epifítica, en la que la bacteria coloniza a la superficie sana de la hoja y posteriormente, una etapa endófito en la que la bacteria se internaliza en el apoplasto. En términos de patogenicidad, *P. syringae* es considerada una bacteria hemibiotrófica, lo que implica que al inicio de la infección se comporta como un patógeno biotrófico, el cual no daña a la célula para poder nutrirse. Sin embargo, al final de la infección, cuando la bacteria alcanza el pico poblacional en el apoplasto, ésta se comporta como un patógeno necrotrófico el cual ocasiona muerte celular y necrosis del tejido vegetal para poder nutrirse (Melotto et al. 2008).

Como se ha descrito ampliamente, las plantas responden a patógenos con estilos de vida variados (biotrófico, necrotrófico y hemibiotrófico) mediante la activación de diferentes rutas de señalización encabezados por fitohormonas. Esta señalización activa genes de defensa y genera una respuesta que puede tener fenotipos de resistencia o susceptibilidad al estrés. Las principales fitohormonas descritas en estrés biótico como el ácido salicílico, etileno, y los jasmonatos pueden inducir de manera positiva la transcripción de los genes PAO. Por ejemplo los promotores de poliamina oxidasas de maíz (*ZmPAO1-6*) contienen cajas regulatorias de respuesta a fitohormonas (ABA, metil jasmonato, etileno, entre otras) (Jasso-Robles et al. 2016). En *Citrus sinensis* también se reportó la presencia de elementos regulatorios ABRE, ERE, TCA, GARE. etc, en los

promotores de los genes *CsPAO*, lo que reitera que estos genes son regulados por fitohormonas como ABA, etileno, ácido salicílico y giberelinas (Wang y Liu, 2015). En la interacción *Arabidopsis-Pseudomonas*, una de las vías de señalización más estudiada es la mediada por ácido salicílico (en defensa) y la mediada por ABA (en el cierre de estomas), es probable que estas vías activen a los genes *AtPAO* como parte de la respuesta de defensa (Melotto et al. 2008). Es bien sabido que las PAs pueden regular canales iónicos y que de esta manera pueden participar en la regulación de la apertura estomática. Es probable que las diferencias en susceptibilidad en las líneas mutantes *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y *Atpao1-1 x Atpao2-1* pueda deberse a cambios en la apertura estomática que afecten al ingreso de la bacteria al apoplasto. Esta posibilidad queda como una perspectiva a explorar.

Por otro lado, la variación en el contenido de EROs en las líneas mutantes *Atpao*, es otro parámetro que puede afectar la susceptibilidad de las mismas a la infección. Por ejemplo, la línea doble mutante (*Atpao1-1 x Atpao2-1*) es más susceptible a la infección comparado con el ecotipo silvestre Col-0. En plantas no inoculadas muestra un contenido de H_2O_2 semejante a Col-0, esto se determinó de manera cuantitativa y mediante un análisis histoquímico. Sin embargo, en la interacción, esta línea mutante no alcanza los niveles de H_2O_2 del ecotipo silvestre, especialmente a las 48 y 72 h tiene un contenido significativamente menor, lo que puede explicar en parte su susceptibilidad a *Pseudomonas*. En el caso de las mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) se observa que las plantas no inoculadas presentan concentraciones mayores de H_2O_2 (3 veces más que una planta silvestre). En la interacción con *Pseudomonas*, estas líneas mutantes casi no incrementan su contenido de H_2O_2 ; es probable que un contenido inicial de H_2O_2 elevado sea suficiente para frenar la infección. En 2016 Sagor y colaboradores, miden la producción de H_2O_2 y el radical $O_2^{\cdot-}$ en líneas mutantes sencilla *Atpao1-2* y *Atpao5-2*, y en la línea doble mutante *Atpao1-2 x Atpao5-2*, y se muestra que el contenido de H_2O_2 y el radical $O_2^{\cdot-}$ esta disminuido en la doble mutante (*Atpao1-2 x Atpao5-2*) respecto a las mutantes sencillas y el ecotipo silvestre Col-0. Esta información puede explicar los resultados obtenidos

previamente mencionados, ya que la doble mutante *Atpao1-1 x Atpao2-1* presenta concentraciones disminuidas o semejantes de estas especies reactivas de oxígeno respecto al ecotipo silvestre Col-0. Se puede sugerir que al ser líneas mutantes de dos genes *AtPAO*, y que la actividad enzimática se encuentra abatida, se ven disminuidos los niveles de estas especies. Esta información es importante ya que se ha demostrado que el H_2O_2 puede tener funciones y blancos diferentes en la célula vegetal, dependiendo del espacio intracelular donde se genere (Swelam et al. 2014). La línea doble mutante *Atpao1-2 x Atpao5-2* presenta una tolerancia al estrés hídrico y salino, se sugiere que es por una baja de EROs en esta línea específicamente ya que se encuentran mutados los genes *AtPAO* que codifican para las poliamina oxidasas que se localizan en citoplasma (Sagor et al. 2016). En la línea doble mutante que se emplea en este trabajo los genes de poliamina oxidasas que se encuentran mutados son *AtPAO1* la cual se localiza en citoplasma, y *AtPAO2* que se le ubica en peroxisoma.

En la interacción *Arabidopsis-P. syringae* se ha descrito la participación de genes y enzimas involucradas en la producción de EROs, principalmente la producción de H_2O_2 , como es el caso de las enzimas homólogas entre mamíferos y plantas NADPH-oxidasas y las enzimas de pared peroxidasas (PRX33 y PRX34). Se ha reportado que en el caso de los genes que codifican para RBOH, los genes que se expresan en la interacción *Arabidopsis-P. syringae* son *RBOHD* y *RBOHF* de los 10 que existen en *Arabidopsis* (Jones y Dangl 2001; Torres et al. 2002; Torres y Dangl 2005). *RBOHD* es una enzima importante en la producción de H_2O_2 así como las PAOs también tienen un aporte importante en la producción de H_2O_2 en interacciones planta-patógeno (Jasso-robles et al. 2016). En la interacción *Arabidopsis-P. syringae* la *RBOHD* y *RBOHF* se encuentran desreguladas en las tres líneas mutantes principalmente en la mutante *Atpao2-1* donde *RBOHD* esta aumentada en la expresión y lo que puede sugerir los niveles altos del radical $O_2^{\cdot-}$ y por ende de H_2O_2 . Las peroxidasas son enzimas que principalmente catabolizan el H_2O_2 a H_2O . Existen 73 genes que codifican para las peroxidasas de clase III, algunas enzimas de esta familia como son las peroxidasas apoplásticas (PRX33 y PRX34) que en lugar de catabolizar, tienen la capacidad de generar H_2O_2 . En la

línea mutante *Atpao1-1* la *PRX33* se encuentra aumentada en su expresión, este resultado puede explicar los niveles altos de H_2O_2 en esta línea mutante así como la resistencia a la infección por *P. syringae* ya que el H_2O_2 que genera esta peroxidasa es extracelular y de acuerdo con Moschou y colaboradores en 2010, la generación del H_2O_2 como resultado de la sobreexpresión de *ZmPAO1* en el apoplasto, confiere resistencia a tabaco a la infección por *P. syringae*.

Respecto a los niveles de PAs libres en las líneas mutantes y el ecotipo silvestre Col-0 en interacción con *P. syringae* no existen cambios significativos lo cual se puede discutir en relación al catabolismo de interconversión que se puede estar llevando a cabo como una manera de homeostasis en los niveles de PAs. En lo relacionado al contenido de Put, existe un incremento evidente en el transcurso de la infección. Este resultado concuerda con lo reportado en otros trabajos de interacción planta-microorganismo, por ejemplo en la interacción maíz-*U. maydis* donde los niveles de Put se encuentran aumentados en tumores de maíz inducidos por el hongo (Rodríguez-Kessler et al. 2008; Jasso-Robles et al. 2016).

7. CONCLUSIONES

Las poliamina oxidasas de *Arabidopsis thaliana* se expresan diferencialmente durante la interacción con bacterias del género *Pseudomonas*. De la familia de genes *AtPAO*, *AtPAO1* y *AtPAO2* están implicados en la interacción con *P. syringae* ya que la pérdida de función de estos genes compromete la respuesta de la planta. La mutante sencilla *Atpao1-1* es más resistente a la infección por *P. syringae* y tiene un mayor contenido de H_2O_2 . La mutante *Atpao2-1* presenta títulos bacterianos semejantes a los observados en Col-0, aunque el contenido de EROs es mayor. Así mismo la línea doble mutante *Atpao1-1* x *Atpao2-1* es más susceptible a la infección por *P. syringae*, presentando una disminución significativa en la producción de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$. La actividad enzimática PAO disminuye en las líneas mutantes, en particular su capacidad por degradar Spm. Como consecuencia se observa una desregulación en la producción de H_2O_2 y de otros genes implicados en la síntesis de $O_2^{\cdot-}$ como la NADPH oxidasa. Nuestros resultados sugieren que existe una relación entre el catabolismo de PAs y la actividad de la enzima NADPH oxidasa. Además, se resalta la importancia del catabolismo intracelular de PAs y la producción de H_2O_2 como actores importantes en la señalización intracelular y la posible regulación de la respuesta al estrés biótico mediada por EROs.

8. PERSPECTIVAS

Seleccionar las plantas sobreexpresantes *35S:AtPAO1*, *35S:AtPAO2* y *35S:AtPAO2SPS*.

Medir niveles de PAs conjugadas en las líneas mutantes *Atpao* en la interacción *Arabidopsis-Pseudomonas*.

Realizar ensayos histoquímicos y de cuantificación de EROs utilizando un inhibidor específico para PAOs.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*. **231**: 1237-1239.

Angelini R, Tisi A, Rea G, Chen M, Botta M, Federico R y Cona A. 2008. Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiol*. **146**: 1162-1177.

Arabidopsis. A useful weed. Ce1/56: 263-269. Bent A.F. (2000). *Plant Physiol* **124**: 1540-1547.

Asthir, B., Spoor, W., and Duffus, C. 2004. Involvement of polyamines, diamine oxidase and polyamine oxidase in resistance of barley to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Euphytica*. **136**: 307–312.

Bagni N and Tassoni. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids*. **20**: 301-317.

Baxter A, Mittler R. Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling. *Journal of Experimental Botany*. **65**: 1229-1240.

Beattie A. and Lindow E. 1995. The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. *Annu Rev of Phytopathol*. **33**: 145-172.

Birboim H. and Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. **7**: 1513-1523.

Bouche N. and Fromm H. 2004. GABA in plants: just a metabolite?. Trends in *Plant science*. **9**: 110-115.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.

Childs, A. C., Mehta, D. J., and Gerner, E. W. 2003. Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 1394–1406

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal bBiochem.* **162**: 156-159.

Clough S.J. y Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743.

Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. 2006. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.* **10**: 2277-2289.

Cowley, T., and Walters, D. R. 2002. Polyamine metabolism in an incompatible interaction between barley and the powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *J. Phytopathol.* **150**: 581–586.

Deblaere R, Bytebier B, Greve H, Deboeck F, Schell J, Montagu M, Leemans J. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research.* **13**: 4777-4788.

Federico R. and Angelini R. 1991. Polyamine catabolism in plants. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants.* 42-53.

Fincato P, Moschou P, Ahou A, Angelini R, Roubelakis-Angelakis A, Federico R, Tavladoraki P. 2012. The members of *Arabidopsis thaliana* PAO gene family

exhibit distinct tissue- and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development. *Amino Acids*. **42**: 831-841.

Fincato P, Moschou PN, Spedaletti V, Tavazza R, Angelini R, Federico R, Roubelakis-Angelakis KA, Tavladoraki P. 2011. Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *J. Exp Bot*. **62**: 1155-1168.

Gonzalez M, E, Gómez Minguet F, Carrasco-Sorli P, Blázquez M, A, Carbonell J, Ruiz O, A, y Pieckenstain F, L. 2011. Perturbation of *spermine synthase 1* gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis thaliana* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant physiol*.

Greenland, A. J., and Lewis, D. H. 1984. Amines in barley leaves infected by brown rust and their possible relevance to formation of "green islands". *New Phytol*. **96**: 283–291.

Hernández J, Ferrer M, Jiménez A, Ros Barceló A, Sevilla F. 2001. Antioxidant Systems and $O_2^{\cdot -}$ / H_2O_2 Production in the apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. *Plant Physiol*. **127**: 817-831.

Hirano S. and Upper D. 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*- a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Annu Rev of Phytopathol*. **64**:624-653.

Hussain S, Muhammad A, Maqbool A, Kadambot H. 2001. Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotech Adv*. **29**: 300-311.

Jasso-Robles I, Jiménez-Bremont F, Becerra-Flora A, Juárez-Montiel M, González E, Pieckenstain L, García de la Cruz R, Rodríguez-Kessler M. 2016.

Inhibition of polyamine oxidase activity affects tumor development during the maize-*Ustilago maydis* interaction. *Plant Physiol and Biochem.* **102**: 115-124.

Jimenez-Bremont J, Marina M, Guerrero-González L, Rossi F, Sánchez-Rangel D, Rodríguez-Kessler M, Ruíz O, Gárriz A. 2014. Physiological and molecular implantations of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Front Plant Sci.* **5**: 1-14

Jones J, Dangl J. 2006. The Plant Immune System. *Nature.* **444**: 323-329.

Jones J. and Dangl J. 2006. The plant immune system. *Nature.* **444**: 323-329.

Kakkar K R, Sawhney K V. 2002 Polyamine research in plants – a changing perspective. *Physiol Plantarum.* **116**: 281-292-

Kakkar K R, Sawhney K V. 2002 Polyamine research in plants – a changing perspective. *Physiol Plantarum.* **116**: 281-292-

Kamada-Nobusada T, Hayashi M, Fukazawa M, Sakakibara H, Nishimura M. 2008. A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4 is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1272-1282.

Katagiri F, Thilmony R, Yang H. 2002. The *Arabidopsis thaliana*- *Pseudomonas syringae* Interaction. *The Arabidopsis Book.*

Lou Y, Bor M, Yan J, Preuss A, Jander G. 2016. *Arabidopsis* NATA1 acetylates putrescine and decreases defense-related hydrogen peroxide accumulation. *Plant Physiol.*

Marcé M, Brown D, Capell T, Figueras X, Tiburcio A. 1995. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as

their dansyl derivates: application to plant and animal tissues. *J. of Chrom.* **666**: 329-335.

Marina M, Sierra V, Rambia J, González E, Blázquez A, Carbonell J, Pieckenstein F, Ruiz O. 2013. Thermospermine catabolism increases *Arabidopsis thaliana* resistance to *Pseudomonas viridiflava*. *J Exp Botany*. **64**: 1393-1402.

Martin-Tanguy J. 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Reg.* **34**: 135-148.

Mathews C, Van Holde K, Ahern G, Bioquímica. 2002. 3ra edición. Perarson.

Melotto M, Underwood W, Yang He. 2008. Role of stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. **46**: 101-122.

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Enviroment*. **33**: 453-467.

Mitsuya Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Matsumura H, Takahashi H, Terauchi R, Kusano T. 2009. Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *J of Plant Physiol*. **166**: 626-643.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. **7**: 405-410.

Mittler Ron y Blumwald Eduardo 2010. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 443-62.

Moller M, Jensen E, Hansson A. 2007. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu Rev of Plant Biol.* **58**: 459-481.

Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis GD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA. 2008. Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell.* **20**:1708-1724.

Moschou, P. N., Sarris, P. F., Skandalis, N., Andriopoulou, A. H., Paschalidis, K. A., Panopoulos, N. J., et al. 2009. Engineered polyamine catabolism preinduces tolerance of tobacco to bacteria and oomycetes. *Plant Physiol.* **149**: 1970–1981.

Polidoros A.N, Mylona P.V, Pasentsis K, Scandalios,J.G, Tsaftaris A.S. 2005. The maize alternative oxidase 1a (Aox1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox Rep.* **10**: 71–78.

Rodríguez A, Taleisnik E. 2012. Determination of Reactive Oxygen Species in Salt-Stressed Plant Tissues. *Plant Salt Tol.* **913**: 225-236.

Rodríguez-Kessler M, Ruiz OA, Maiale S, Ruiz-Herrera J, Jiménez-Bremont JF. 2008. Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiol Biochem.* **46**: 805-814.

Rossi F, Marina M, Pieckenstain F. 2015. Role of Arginine decarboxylase (ADC) in *Arabidopsis thaliana* defence the pathogenic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Biol.* **17**: 831-839.

Sagor G, Zhang S, Kojima S, Simm S, Berberich T, Kusano T. 2016. Reducing Cytoplasmic Polyamine Oxidase Activity in Arabidopsis Increases Salt an Drought Tolerance by Reducing Reactive Oxygen Species Production and Increasing Defence Gene Expression. *Front in plant Sci.* **7**: 1-16

Sequera-Mutiozabal M, Tiburcio F, Alcázar R. 2016. Drought Stress Tolerance in Relation to Polyamine Metabolism in Plants. *Drought stress Tolerance in Plants*. **1**: 267:286.

Sewelam, N., Jaspert, N., Kelen, K. V. D., Schmitz, J., Frerigmann, H., Tognetti, V.B.,etal. 2014.Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes differentially modulates the plant transcriptome. *Mol Plant*. **7**:1191–1210.

Takahashi Y, Cong R, Sagor GHM, Niitsu M, Berberich T, Kusano T. 2010. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*. **29**: 965-995.

Tavladoraki P, Rossi N, Saccuti G, Perez-Amador A, Polticelli F, Angelini R, Federico R. 2006. Heterologous Expression and Biochemical Characterization of Polyamine Oxidase from *Arabidopsis* Involved in Polyamine Back Conversion. *Plant Physiol*. **141**: 1519-1532.

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley–powdery mildew interaction. *Plant J*. **11**: 1187–1194.

Torres A. and Dangl J. 2005. Function of the respiratory busrst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*. **8**: 397-403.

Torres, M. A., Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. 2002. *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. **99**:517–522.

Triantaphylidés C. and Havaux M. 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant science*. **14**: 219-228.

Walters, D. R., and Shuttleton, M. A. 1985. Polyamines in the roots of turnip infected with *Plasmodiophora brassicae* Wor. *New Phytol.* **100**: 209–214.

Xin and Yang He. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000: A model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annu Rev of Phytopathol.* **51**: 473-498.

Zereva S. and Pooggin M. 2012. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses*. **4**: 2578-2597.

Zhang, W., Jeon, B. W., and Assmann, S. M. 2011. Heterotrimeric G-protein regulation of ROS signaling and calcium currents in Arabidopsis guard cells. *J Exp Bot.* **62**: 2371–2379.