



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**Participación de los transportadores de
poliaminas AtPUT en la interacción
*Arabidopsis-Pseudomonas***

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

PRESENTA:

**QFB. EMMANUEL FLORES
HERNÁNDEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. MARGARITA
RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ-
KESSLER**

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA JULIO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**Participación de los transportadores de
poliaminas AtPUT en la interacción
*Arabidopsis-Pseudomonas***

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

PRESENTA:

QFB. EMMANUEL FLORES HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y
DOMÍNGUEZ-KESSLER**

SINODALES

PRESIDENTE:

**DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ-
KESSLER**

SECRETARIO:

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

VOCAL:

DRA. MARIA ELISA GONZALEZ

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Beca-Tesis del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

“El programa de Maestría o Doctorado en Ciencias en Bioprosos
de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC)
del CONACyT, registro 000588, en el Nivel Consolidado

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 713109



Participación de los transportadores de poliaminas AtPUT en la interacción *Arabidopsis-Pseudomonas* by Emmanuel Flores Hernández is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Agradecimientos Académicos

Sin duda alguna, la primera persona en merecer este agradecimiento es mi asesora de tesis, la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez-Kessler, ya que, gracias a sus constantes consejos, su apoyo incondicional y todo el conocimiento que me ha transmitido, esta tesis fue posible. Asimismo, agradecer por su revisión, consejo y recomendaciones a mis asesoras la Dra. Ruth Elena Soria Guerra y la Dra. Maria Elisa Gonzalez.

Por otra parte, poco es de una persona sin un buen equipo de trabajo. En este sentido, el Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo posee un excelente equipo, conformado por quien yo considero uno más de mis asesores, el M. Francisco Ignacio Jasso. Además, dos excelentes ayudantes que sin duda alguna poseen un gran potencial académico, Paulina Alvarado y Mariana Morquecho. Asimismo, el resto de ese equipo lo conforman Juan Manuel García, Araceli Rivera, Suric Chavarria, Blanca Zuñiga y Luis Manuel Capuchino quienes sin duda en mayor o menor medida han contribuido a la realización de este trabajo.

Por último, aunque no menos importante, agradecer a los integrantes de nuestro laboratorio hermano, el Laboratorio del Metabolismo del RNA por todos los consejos y conocimientos brindados.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	11
I.I SISTEMA INMUNE EN PLANTAS.....	12
I.I.I Inmunidad desencadenada por patrones (PTI).....	15
I.I.III Susceptibilidad desencadenada por el efector (ETS).....	19
I.I.IV Inmunidad mediada por efectores ETI.....	20
I.I.V Respuesta hipersensible (HR).....	24
I.I.VI Resistencia sistémica adquirida (SAR)	27
I.I.VII Modelo de inmunidad espacial	31
I.II PARTICIPACIÓN HORMONAL EN RESPUESTA A PATÓGENOS	34
I.II.I Ácido salicílico en defensa.....	35
I.II.II Ácido jasmónico en defensa	39
I.II.III Etileno en defensa	41
I.II.IV Diafonía entre las vías SA y JA/ET.....	44
I.III PAs EN INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO.....	46
I.IV TRANSPORTE DE PAs	51
I.V PAs Y FITOHORMONAS DE DEFENSA.	56
I.VI <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato DC3000</i> . UN PATOSISTEMA MODELO.....	58
I.VI.I Isla de patogenicidad tripartita y sistema de secreción de tipo III	62
I.VI.II Batería de efectores	63
I.VI.III Coronatina	65
II. ANTECEDENTES	67
II.I Base de datos BAR uToronto	67
III. JUSTIFICACIÓN	71
V. OBJETIVOS	72
V.I Objetivo general.....	72
V.II Objetivos específicos.....	72
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	73
VI.I Material vegetal.....	73
VI.II Genotipificación y análisis de expresión de las líneas mutantes insercionales	73
VI.III Condiciones de crecimiento.....	74
VI.IV Cepa bacteriana, inoculación de plantas y estimación de títulos bacterianos en planta	74

VI.V	Evaluación de la respuesta sistémica adquirida (SAR)	75
VI.VI	Extracción de RNA	76
VI.VII	Síntesis de DNA complementario (cDNA)	77
VI.VIII	Análisis de expresión génica	77
VI.IX	Análisis histoquímico de ROS	78
VI.X	Análisis estadístico	78
VII.	RESULTADOS	79
VIII.	CONCLUSIÓN	80
X.	ANEXOS	81
XI.	BIBLIOGRAFÍA	83

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de Zig-Zag del sistema inmune de la planta.....	14
Figura 2. Respuestas celulares y fisiológicas desencadenadas por PTI.	18
Figura 3. Supresión del sistema de PTI por efectores patógenos.	20
Figura 4. Dinámica de señalización intracelular de los receptores NB-LRR..	22
Figura 5. Importancia de la señalización local y distal para el desarrollo de SAR.....	28
Figura 6. Regulación de las vías biosintéticas de los ácidos salicílico (SA) y n-hidroxipecólico (NHP) durante el establecimiento de la SAR.	30
Figura 7. Modelo de inmunidad espacial.....	32
Figura 8. Representación esquemática de la diafonía de fitohormonas en la inmunidad de las plantas.....	35
Figura 9. Regulaciones de genes dependientes de proteínas NPR por SA. ..	37
Figura 10. Estructura molecular de las principales PAs.....	46
Figura 11. Transportadores de PAs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Escherichia coli</i>	51
Figura 12. Localización subcelular de los transportadores de PAs en plantas y conformación estructural predicha de AtPUT3.	53
Figura 13. Morfología de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomate</i> DC3000 (<i>Pst</i>)..	59
Figura 14 Diagrama de <i>Pst</i> , con rasgos clave de virulencia y aptitud física ilustrados.	61
Figura 15. Entrada de <i>Pst</i> en las hojas y superación del cierre del estoma. .	64
Figura 16. Niveles de expresión de los transportadores <i>AtPUT</i> en respuesta a <i>Pst</i> de acuerdo con la base de datos uBar Toronto.....	68
Figura 17. Niveles de expresión de los transportadores de <i>A. thaliana</i> en respuesta a <i>Pst</i> obtenidos en el LIPM.	70

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Cambios en los niveles de expresión de los genes <i>AtPUT</i> tras la infiltración con una solución de MgCl ₂ 10 mM (Mock) o <i>Pst</i>	69
---	----

Resumen

En la naturaleza, las interacciones entre plantas y patógenos son muy recurrentes, por ende, las plantas han generado sofisticados mecanismos de defensa, que se activan tras el reconocimiento del patógeno e inducen la producción de una gran variedad de proteínas y metabolitos. Dentro de estos últimos se encuentran las poliaminas (PAs), que son compuestos alifáticos policatiónicos presentes en todos los organismos vivos. Las PAs participan en procesos importantes como la proliferación, el desarrollo y el crecimiento celular. Además, durante la interacción planta-patógeno las PAs contribuyen a la defensa al favorecer la biosíntesis de fitohormonas como el ácido jasmónico, estimular la expresión de genes como *AtNHL10* que induce la respuesta hipersensible (HR) y, tras conjugarse con ácidos hidroxicinámicos, generar compuestos antimicrobianos. Adicional a lo anterior, al catabolizarse generan peróxido de hidrógeno, un componente esencial en el desarrollo de la respuesta inmune.

En general, los niveles de PAs incrementan en el sitio de infección, al favorecerse su biosíntesis; sin embargo, se desconoce aún como contribuye el transporte de PAs a esta acumulación y en general a la respuesta de defensa de la planta. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar la participación de los transportadores de PAs de la familia AtPUT en *A. thaliana* en respuesta al estrés biótico inducido por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*).

Para cumplir con este objetivo, se caracterizaron líneas mutantes insercionales de T-DNA de los cinco genes *AtPUT* de *Arabidopsis*. Tras el desafío con *Pst*, las líneas mutantes mostraron un fenotipo de resistencia al patógeno en comparación al ecotipo silvestre. Además, las líneas mutantes presentaron un incremento en la producción del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y cambios en la expresión del gen *PR-1*, un marcador importante de la vía del ácido salicílico. De manera interesante, la línea mutante *Atput2-1*, presentó un abatimiento de la respuesta sistémica adquirida, cuando se reinoculó en hojas distales con *Pst*. En conjunto, los resultados obtenidos indican que el transporte de PAs es determinante en el desenlace de la interacción *Arabidopsis-Pst*.

Palabras clave: Transportadores de poliaminas, *Pseudomonas*, *Arabidopsis*.

Abstract

The interactions between plants and pathogens are very recurrent in nature, therefore, plants have generated defense mechanisms, which are activated after recognition of the pathogen and induce the production of multiple proteins and metabolites, such as polyamines (PAs). PAs are polycationic aliphatic compounds present in all living organisms. PAs participate in important processes such as cell proliferation, plant growth and development. Furthermore, during plant-pathogen interactions, PAs contribute to defense through stimulation of phytohormone biosynthesis (i.e. jasmonic acid), regulation of gene expression (i.e., *AtNHL10* that induces the hypersensitive response) and, by conjugation with hydroxycinnamic acids, acting as antimicrobial compounds. Also, when catabolized they generate hydrogen peroxide, an essential signaling molecule for defense responses.

In general, PAs levels increase at the site of infection by *de novo* síntesis; however, it is still unknown how PA transport contributes to this accumulation and, in general, to the defense response of the plant. In this sense, the objective of the present work is to evaluate the participation of the *Arabidopsis thaliana* AtPUT family of PA transporters of in response to the biotic stress induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*).

We characterized insertional T-DNA mutant lines of the five *Arabidopsis AtPUT* genes. In response to *Pst* inoculation, all the mutant lines showed a pathogen resistance phenotype compared to the wild ecotype. Furthermore, the mutant lines showed an increase in the production of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and changes in the expression of the *PR-1* gene, an important marker of the salicylic acid pathway. Interestingly, the mutant line *Atput2-1* was unable to induce SAR when it was re-inoculated in distal leaves with *Pst*. Taken together, the results obtained indicate that the transport of PAs is decisive in the outcome of the *Arabidopsis-Pst* interaction.

Keywords: Polyamine transporters, *Pseudomonas*, *Arabidopsis*

I. INTRODUCCIÓN

La domesticación de cultivos no solo marcó el origen de la agricultura, sino la transición de la actividad humana del nomadismo al sedentarismo. A partir de ese momento, la alimentación humana se basó, en gran medida, en la producción agrícola. A la fecha, el patrón de dependencia de la agricultura como fuente de alimentos no ha cambiado. Además, a pesar de la evolución en la producción agrícola de un modelo tradicional a uno industrializado, aún persisten problemas como las enfermedades de las plantas, mismos que dañan la cantidad y la calidad de los cultivos. Es así como los patógenos que infectan las plantas y los métodos para controlarlos se convirtieron en tema de estudio (Purayannur *et al.*, 2017). Hasta ahora, los agentes químicos como pesticidas y fungicidas son los preferidos en el control de plagas y patógenos. Sin embargo, la contaminación que generan, no solo en el sitio de aplicación sino al medio ambiente en general, en conjunto con la gran cantidad de reportes que informan sobre afectaciones a la salud de las poblaciones humanas cercanas a los sitios de uso, han hecho que su aplicación sea controversial.

A modo de crear métodos de control de enfermedades agrícolas que sean más amigables con el ambiente y la salud, con una eficacia igual o mayor que los métodos utilizados hasta ahora, existe un creciente interés por el desarrollo de estrategias destinadas a crear cultivos con una mayor tolerancia a las enfermedades que permitan mejorar la producción agrícola. Situación que se vuelve cada vez más necesaria ante una creciente demanda de alimentos por una población mundial en rápida expansión. Sin embargo, además de las características en la tolerancia al estrés, se pretende que las estrategias utilizadas no disminuyan o afecten las características organolépticas del producto y mucho menos sus cualidades nutritivas, sino por el contrario, mantengan su sabor y posean una nutrición mejorada.

Uno de los candidatos principales, que cumple con la mayoría de estos requisitos, es la modulación de los niveles de poliaminas (PAs). Ya que, existen múltiples reportes donde se encontró que manipular las vías de señalización que conducen a modificaciones en los niveles de PAs en las células vegetales, tiene

éxito en mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, esta manipulación específica, conducía a favorecer la respuesta al estrés, tanto biótico como abiótico (Alcázar y Tiburcio, 2014). Esta diversidad de funciones deriva en parte de la capacidad de las PAs para interactuar con sitios cargados negativamente en moléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. También se deriva de su capacidad para conjugarse con una variedad de macromoléculas, como compuestos fenólicos y proteínas. Además, se ha descubierto que algunos productos del catabolismo de las PAs desempeñan funciones de señalización críticas en una variedad de procesos fisiológicos, celulares y de desarrollo (Masson *et al.*, 2017). Sin embargo, y muy a pesar de lo que se conoce, queda mucho por dilucidar acerca de estos procesos con el fin de permitir el desarrollo de mejores estrategias destinadas a diseñar plantas con mayor tolerancia al estrés y un crecimiento mejorado.

Hasta ahora, se reconocen cuatro procesos metabólicos que participan en la regulación de los niveles de PAs: biosíntesis, catabolismo, conjugación y transporte. Ahora bien, se ha elucidado la participación de la biosíntesis, catabolismo y conjugación en las respuestas al estrés por patógenos (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). Sin embargo, no se conoce como participa el transporte de PAs en este proceso en específico.

I.I SISTEMA INMUNE EN PLANTAS

En su entorno natural, las plantas coexisten en una relación íntima con comunidades microbianas altamente dinámicas. Como consecuencia, las plantas han desarrollado sistemas inmunes activos, inducibles y estrechamente regulados que median las interacciones con los microbios. El resultado de estas complejas interacciones es un factor determinante para la supervivencia y el estado físico de las plantas (Ramírez-Prado *et al.*, 2018).

En este sentido, tras una interacción planta-patógeno, existen dos resultados principales. El primero, cuando no se produce ninguna enfermedad, la interacción es incompatible y la planta es resistente. Bajo este escenario, el patógeno no puede diferenciarse y reproducirse, porque las defensas preformadas e inducibles de la

planta lo impiden. En el segundo de los casos, la colonización exitosa permite el desarrollo de la enfermedad y se conoce como interacción compatible. Bajo esta condición, la propagación del patógeno se da a expensas de la planta huésped, con una consecuente repercusión en el desarrollo vegetal, caracterizado por: retraso en el crecimiento, daño a los tejidos y, en algunas ocasiones, la muerte. Bajo esta condición, la planta es susceptible y el patógeno virulento (Schulze *et al.*, 2019).

Al respecto, los patógenos virulentos, son responsables de importantes reducciones de rendimiento en los cultivos. Se ha estimado que entre el 13% y el 16% de la producción mundial de cultivos se pierde cada año debido a las enfermedades que producen, con el consiguiente impacto económico y social (Vurro *et al.*, 2010). Como consecuencia, los patógenos de plantas son importantes agentes ecológicos que pueden afectar la composición de las poblaciones de plantas (Pagán y García-Arenal, 2018). Para su estudio, los patógenos pueden clasificarse de acuerdo con su estilo de vida en: biotróficos, hemibiotróficos y necrotrofos. Los patógenos biotróficos se alimentan de tejidos vivos y han desarrollado estrategias para explotar recursos mientras mantienen vivo al huésped; por otro lado, los patógenos necrotrofos generalmente comienzan destruyendo a su huésped con toxinas y luego consumen su contenido. Por último, los patógenos hemibiotróficos, comienzan con una estrategia biotrófica pero eventualmente pueden vivir y alimentarse del tejido muerto (Bürger y Chory, 2019).

Afortunadamente, las características de la morfología y anatomía de una planta sirven como defensa contra la invasión de la mayoría de los microorganismos. La cutícula y las paredes celulares forman barreras mecánicas contra la entrada de microorganismos, logrando que muchos patógenos potenciales no obtengan acceso a las células vegetales y sus recursos, porque carecen de los medios para superar estas barreras. Asimismo, existe un sistema de defensa química preformada, conformado por compuestos con actividad antimicrobiana conocidos como fitoanticipinas, un ejemplo es la saponina avenacina A-1 que se encuentra en *Avena sativa* (Schulze *et al.*, 2019).

Por otro lado, a diferencia de los mamíferos, las plantas carecen de células de defensa móviles y un sistema inmune adaptativo somático. Sin embargo, han desarrollado un sistema de defensa sofisticado para establecer la inmunidad innata

contra los ataques de patógenos microbianos. Dicho sistema es descrito por el modelo de “ziz-zag” (Figura 1), que describe la batalla evolutiva entre plantas y patógenos desde un punto de vista molecular, y propone la existencia de dos niveles de defensa en el sistema inmune de la planta: inmunidad desencadenada por patrones moleculares (PTI) e inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006; van der Burgh, y Joosten, 2019).

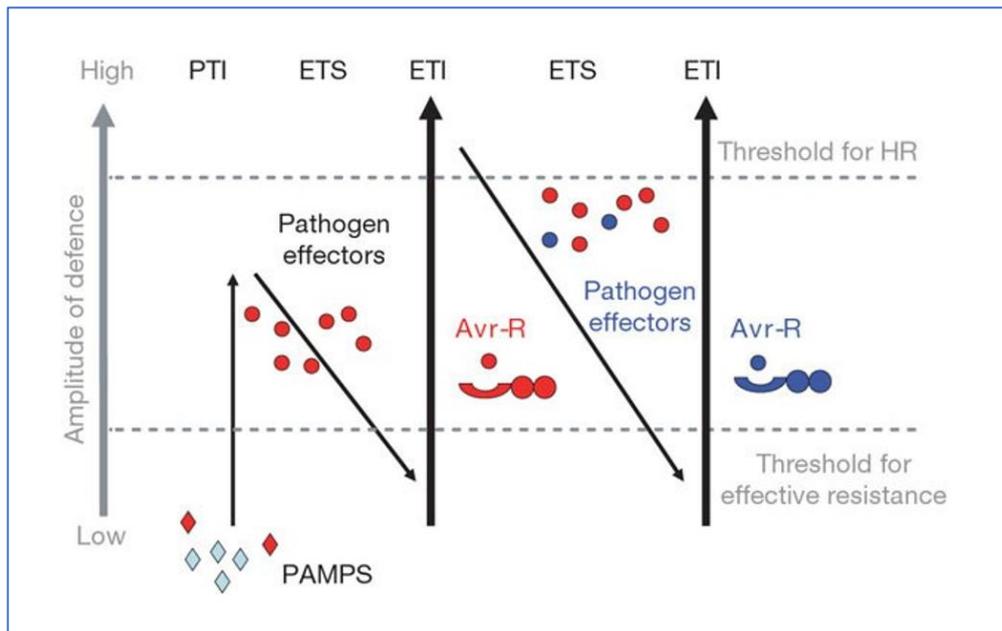


Figura 1: Modelo de zig-zag del sistema inmune de la planta. La respuesta inmune inicia cuando las plantas detectan los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (diamantes azules o rojos) a través de los receptores de reconocimiento de patrones de la superficie celular (PRR) generando así la inmunidad activada por PAMP (PTI). Sin embargo, los patógenos exitosos liberan efectores (círculos rojos) que interfieren con la PTI, lo que resulta en una susceptibilidad activada por el efector (ETS). Como respuesta, la planta, reconoce los efectores (tras el reconocimiento, los efectores se conocen como proteínas de avirulencia, Avr) mediante receptores intracelulares (NB-LRR), conocidos también como proteínas R, generando así el complejo Avr-R que desencadena la inmunidad activada por el efector (ETI), y que a menudo induce la muerte celular programada del tejido infectado, en un proceso conocido como respuesta hipersensible (HR). Por último, algunos patógenos obtienen nuevos efectores (círculos en azul) que contribuyen a suprimir la ETI. La selección favorece los nuevos alelos NB-LRR de la planta que pueden reconocer uno de los efectores recién adquiridos, lo que resulta nuevamente en ETI. (Tomado de Jones y Dangl, 2006).

I.I.I Inmunidad desencadenada por patrones (PTI)

El primer nivel de defensa se activa tras la percepción de patrones moleculares estructurales conservados del patógeno (PAMP), que identifican de manera general a los microorganismos. Se han identificado varios PAMPs, siendo los más estudiados la flg22 (un péptido de flagelina bacteriana de 22 residuos conservado evolutivamente), el epítipo elf18 del factor de elongación bacteriano Tu (EF-Tu) y la quitina (un componente de paredes celulares de hongos) (Jones y Dangl, 2006, Ramirez-Prado *et al.*, 2018). Sin embargo, los patrones moleculares reconocidos por la planta se asocian típicamente a una clase de microorganismos independientemente de la patogenicidad, por lo que se optó por una nueva denominación: patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP). Además, se considera una nueva clase de señales que son inducidas por moléculas endógenas derivadas del huésped que surgen a partir del daño causado por un patógeno, denominados patrones moleculares asociados al daño (DAMP). Los DAMP vegetales incluyen péptidos pequeños, nucleótidos y oligosacáridos derivados de la pared celular. Ejemplo de ellos es la proteína HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN B3 (HMGB3) de *Arabidopsis thaliana*, que es liberada a la matriz extracelular cuando las membranas celulares están dañadas por el ataque del hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* (Boller y Felix, 2009; Yu *et al.*, 2017). La detección de MAMP y DAMP se da por los receptores de reconocimiento de patrones de la superficie celular (PRRs).

Los receptores PRR se clasifican en dos grupos según el motivo de aminoácidos característico de la región extracelular. El primer grupo incluye a las quinzasas similares a los receptores (RLK) ricas en leucina (LRR), ejemplos de este grupo son: FLS2 y EFR que reconocen flagelina bacteriana y EF-Tu, respectivamente. Estructuralmente, estos receptores poseen un ectodominio potencialmente implicado en la unión del ligando, un único dominio transmembrana y un dominio de quinasa intracelular (Couto y Zipfel, 2016; Desaki *et al.*, 2019). Sin embargo, tanto FLS2 como EFR poseen una actividad quinasa débil; por lo tanto, para inducir respuestas inmunes necesitan formar un complejo con el correceptor BAK1, de una manera dependiente de ligando (Chinchilla *et al.* 2007; Heese *et al.*

2007). BAK1 tiene un dominio LRR en la región extracelular y un dominio quinasa en la región intracelular y juega un papel importante en la activación de la señalización inmune (Couto y Zipfel 2016; Ranf 2017).

Dentro de este mismo grupo, se han incluido algunas proteínas similares a receptores (RLP) ricas en leucina (LRR). El ejemplo típico de estos receptores lo constituye RLP23, que reconoce a la toxina NECROSIS- AND ETHYLENE-INDUCING PEPTIDE 1 (NEP1)-LIKE PROTEIN (NLP) que está presente en hongos, bacterias y oomicetos y causa a la planta necrosis rápida y producción de etileno (Oome *et al.*, 2014, Albert *et al.*, 2015). En lo que respecta a su estructura, comparte la misma conformación básica que los receptores RLK, excepto que no presentan un dominio quinasa o cualquier otro dominio de señalización intracelular reconocible. Por esta razón, tras la unión del ligando, RLP23 se activa y forma un complejo con el receptor quinasa SOBIR1, para posteriormente reclutar a BAK1, dando origen a un complejo tripartito que genera una transfosforilación entre SOBIR1 y BAK1 que activa la señalización de la respuesta inmune (Zipfel, 2009; Couto y Zipfel, 2016; Saijo y Loo, 2020).

Por otro lado, el segundo grupo incluye a las proteínas RLK que contiene motivos de lisina (LysM), tal como CERK1 que reconoce la quitina de los hongos (específicamente quitooctaosa y quitoheptaosa) y el peptidoglicano bacteriano (Desaki *et al.*, 2019). A diferencia de los receptores ricos en leucina, CERK1 de *A. thaliana* no necesita correceptores, debido a que AtCERK1 se une directamente a la quitina e inicia la señalización inmune, sugiriendo que puede actuar como un RLK todo en uno en la respuesta inmune inducida por quitina.

Recientemente, se han descrito otros tipos de receptores para MAMP. Por ejemplo, en *A. thaliana* se encontró que se requiere BULB-TYPE LECTIN S-DOMAIN-1 RECEPTOR-LIKE KINASE LORE (SD1-29), para el reconocimiento de lipopolisacárido (LPS), MAMP presente en las bacterias Gramnegativas. La estructura de LORE es completamente diferente de los receptores LRR y LysM mencionados hasta ahora. Sugiriendo con esto, la necesidad de una mayor investigación en el sistema de reconocimiento MAMP en las plantas, considerando no solo las moléculas LRR y LysM, sino también otras (Ranf *et al.*, 2015; Desaki *et al.*, 2019).

La activación de los receptores PRR, desencadena una cascada de señalización intracelular compleja, que conduce a una serie de respuestas de defensa conocidas, originalmente, como inmunidad activada por PAMP (PTI), proceso que se muestra en la Figura 2 (Jones y Dangl, 2006; Yu *et al.*, 2017; Ramirez-Prado *et al.*, 2018). La PTI se caracteriza por un aumento rápido y drástico en la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) y eflujos rápidos de Cl^- , NO_3^- y K^+ , así como la entrada de H^+ a través de la membrana plasmática, lo que a menudo conduce a la despolarización de la membrana y la alcalinización extracelular. Dichos procesos, inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en apoplasto. Las ROS incluyen formas de oxígeno parcialmente reducidas, como superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que se producen a través de oxidasas de NADPH (RBOH), superóxido dismutasa y oxidasas de pared; se sabe que las ROS participan directamente como una barrera de toxinas contra los patógenos. Además, participa en procesos como el cierre estomático y el fortalecimiento de las paredes celulares mediante la reticulación oxidativa de polímeros, tales como la callosa β -1,3-glucano. Por otro lado, se sabe que algunas ROS, específicamente H_2O_2 , son moléculas de señalización versátiles que median la activación de genes de defensa y, pueden interactuar con otros actores importantes en la defensa. Por ejemplo, el H_2O_2 favorece la acumulación de ácido salicílico (SA), una hormona vegetal involucrada en respuestas de defensa (ver sección I.II.I Ácido salicílico en defensa) (Torres *et al.*, 2006; Ranf *et al.*, 2015; Couto y Zipfel, 2016; Desaki *et al.*, 2019).

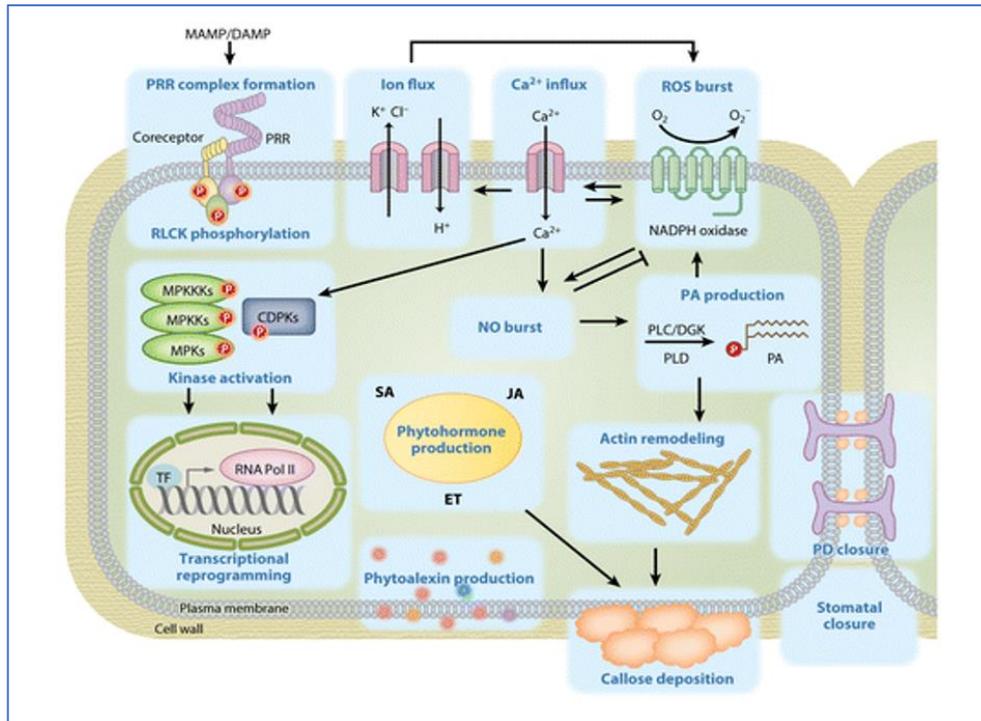


Figura 2. Respuestas celulares y fisiológicas desencadenadas por PTI. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) o patrones moleculares asociados a daños (DAMP) por los receptores de reconocimiento de patrones residentes en la superficie de las células vegetales (PRR) genera el reclutamiento de correceptores que da lugar a un complejo PRR que a su vez se acompaña de una rápida transfosforilación para una posterior fosforilación de las quinasas citoplasmáticas de tipo receptor (RLCK). Además, la activación de los complejos PRR activa las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y las proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPK), que regulan los cambios transcripcionales de genes y otras respuestas celulares. Las características distintivas de las respuestas de PTI incluyen la entrada de calcio, el flujo de iones, la remodelación del filamento de actina, los plasmodesmos (PD) y el cierre estomático, deposición de calosa y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), ácido fosfatídico (PA), fitoalexinas y fitohormonas. Colectivamente, estas respuestas contribuyen a la resistencia de la planta contra una variedad de patógenos. Las posibles conexiones entre las diferentes respuestas se indican con una línea de flecha para la regulación positiva y una línea en forma de T para la regulación negativa. Abreviaturas: DGK, diacilglicerol quinasa; ET, etileno; JA, ácido jasmónico; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; SA, ácido salicílico; TF, factor de transcripción (Tomado de Yu *et al.*, 2017).

Otro de los procesos que incluye la PTI y que se desencadena tras la activación de los complejos PRR es la activación de las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y las proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPK), cuya función es inducir cambios en los procesos metabólicos y la

expresión génica de un estado de crecimiento y desarrollo normal a un estado defensivo (Ranf *et al.*, 2015). Otras características distintivas de la PTI incluyen la remodelación de los filamentos de actina, y la producción de óxido nítrico (NO), ácido fosfatídico (PA), fitoalexinas y fitohormonas. Como resultado de la PTI, se previene la infección de la gran mayoría de los microbios y se restringe la de los patógenos adaptados durante la resistencia basal (Boller y Felix, 2009; Yu *et al.*, 2017; Saijo y Loo, 2020).

I.I.III Susceptibilidad desencadenada por el efector (ETS)

Desafortunadamente para las plantas, y a pesar de que la PTI es efectiva contra la mayoría de los microorganismos, existen algunos tipos de patógenos que se han adaptado a genotipos particulares de plantas y han desarrollado baterías de factores de virulencia conocidos como efectores; los cuales se administran en el espacio extracelular o directamente dentro de las células del huésped para favorecer procesos que benefician al patógeno, tales como: promover la fuga de nutrientes, estimular la dispersión del patógeno e inclusive interferir directamente con la PTI (Figura 3), en un evento conocido como susceptibilidad desencadenada por el efector (ETS). En el caso de patógenos exitosos, la ETS, les otorga una mayor virulencia, lo que a su vez conduce a una colonización eficiente y desencadena el proceso de enfermedad en la planta (Badel *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2015; Hake y Romeis, 2019, Lolle *et al.*, 2020).

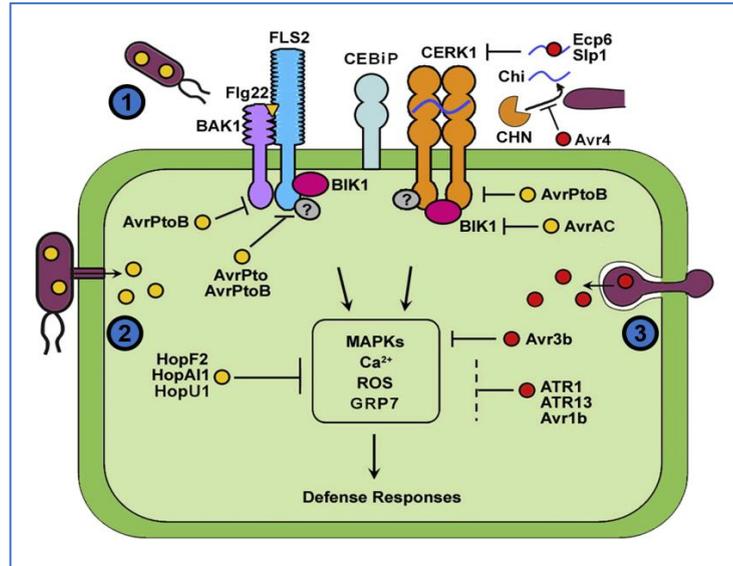


Figura 3. Supresión del sistema de PTI por efectores patógenos. La liberación de efectores en el espacio extracelular (1) o a nivel intracelular a través de complejos de secreción de tipo III bacterianos (2) o de haustorios de hongos (3) tiene como objetivo interferir con la PTI y amortiguar las defensas basales de la planta. Se observan ejemplos de efectores de bacterias (círculos amarillos) y hongos (círculos rojos). Los efectores alteran la respuesta de PTI a diferentes niveles. **Reconocimiento:** AvrPto y AvrPtoB de *P. syringae* bloquean PTI a través de la inhibición de la actividad quinasa de FLS2, EFR, BAK1 y CERK1. Por otro lado, AvrAC de *Xanthomonas campestris* bloquea la activación de BIK1. Mientras tanto, Ecp6 y Slp1 de *Cladosporium fulvum* se unen a quitina a modo de evitar que sea reconocida por CERK1. **Cascadas de señalización:** los efectores de *P. syringae*, HopAl1, HopF2 atacan directamente los componentes de las cascadas MAPK; en el caso de HopAl1 es una fosfotreonina liasa que desfosforila las MAP quinasa, mientras que HopF2 utiliza su actividad ADP-ribosiltransferasa para inhibir las MAP quinasa quinasa. Además, HopU1 es una potente ADP ribosiltransferasa que modifica específicamente las proteínas de unión a ARN GRP7 y GRP8, impidiendo así su función de unión a ARN e inhibiendo la inmunidad de la planta. **Respuesta de defensa:** el efector Avr4 de *C. fulvum* se une a la quitina a través de sus LysM y protege la pared celular fúngica de las quitinasas vegetales. Por otro lado, Avr3b de *Phytophthora sojae* inhibe la acumulación de ROS. Mientras que ATR1, ATR13 y Avr1b inhiben la muerte celular programada o HR (Tomado y modificado de Dou y Zhou, 2012).

I.I.IV Inmunidad mediada por efectores ETI

En respuesta a los patógenos exitosos, algunas variedades de plantas evolucionaron y desarrollaron un sistema de reconocimiento específico de efectores. Dicho sistema, se compone de receptores conocidos como proteínas de

resistencia (R); mientras que al efector reconocido, se le conoce tradicionalmente como proteína de avirulencia (Avr). Tras el reconocimiento (directo o indirecto), se forma el complejo Avr-R, que conduce a la ETI (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006; Cui *et al.*, 2009; Dou y Zhou, 2012). Lo anterior demuestra que la interacción específica Avr-R desencadena la resistencia en la planta, proceso que a nivel molecular refleja la presencia de genes *avr* en el patógeno con su correspondiente gen *R* en la planta, condición conocida como resistencia “gen por gen” (Flor, 1971).

En lo que respecta a las proteínas R, son (en su mayoría) receptores citoplasmáticos que contienen un sitio de unión a nucleótidos (NB), dominios LRR y un dominio N-terminal que los subdivide en dos grupos: Coiled-Coil (CC) y Toll-interleucine-1 (TIR). Ambos tipos de receptores se alternan entre un estado “desactivado” (autoinhibido) de ADP bajo condiciones normales de desarrollo y un estado “activado”, unido a ATP tras el reconocimiento del efector, a modo de prevenir la activación inadecuada del receptor y mantener el crecimiento y la aptitud de la planta. La vía de señalización establecida para cada uno de los receptores NB-LRR es diferente: para CNL es dependiente de NON RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1 (NDR1), mientras que ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) / PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) / SENESCENCE-ASSOCIATED CARBOXYLESTERASE 101 (SAG101) median la señalización TNL. Estos dos sistemas integran señales que conducen a la acumulación de SA, y posteriormente mediar la HR. Por todo lo anterior, estos receptores de patógenos actúan simultáneamente como sensor, interruptor y factor de respuesta (Takken y Govers, 2012). Algunos de los NB-LRR mejor caracterizados se muestran en la Figura 4.

A la fecha, se han descrito dos tipos de reconocimiento de efectores por parte de los receptores NB-LRR: directo e indirecto. En lo que respecta al reconocimiento directo, existe poca evidencia de que desencadene una respuesta de defensa efectiva, posiblemente porque las asociaciones de proteínas son transitorias o implican otros factores limitantes de la planta. Algunos ejemplos descritos son el TNL L6 de lino (*Linum marginale*), que reconoce directamente el efector AvrL567 de *Melampsora lini* durante la enfermedad roya del lino y el receptor RRS1-R de

Arabidopsis que se une directamente a la proteína efectora PopP2 de *Ralstonia solanacearum*. Ambos reconocimientos conducen a ETI (Tsuda y Katagiri, 2010; Cui *et al.*, 2015).

Por otra parte, en el reconocimiento indirecto, algunos receptores NB-LRR vigilan proteínas del huésped (“guardian”) que son objetivos críticos en la virulencia; por ende, no reconocen al efector en sí, sino sus efectos sobre las proteínas diana de la planta, en un proceso conocido como “hipótesis del guardián” (Jones y Dangl, 2006). Uno de los ejemplos más estudiados lo constituye RIN4, un “guardian” sumamente importante durante la patogénesis, ya que regula la abertura estomática, controlando así la entrada de patógenos bacterianos en la hoja. Por ende, RIN4 es una proteína objetivo de por lo menos tres efectores bacterianos diferentes. El efector AvrRpt2 promueve la degradación de RIN4, con la consecuente activación de RPS2. Los dos efectores restantes, AvrRpm1 y AvrB, interactúan e inducen la fosforilación de RIN4, proceso que es reconocido por RPM1. La activación de RPS2 y RPM1 desencadenan ETI (Mackey *et al.*, 2002; Axtell y Staskawicz, 2003; Tsuda y Katagiri, 2010).

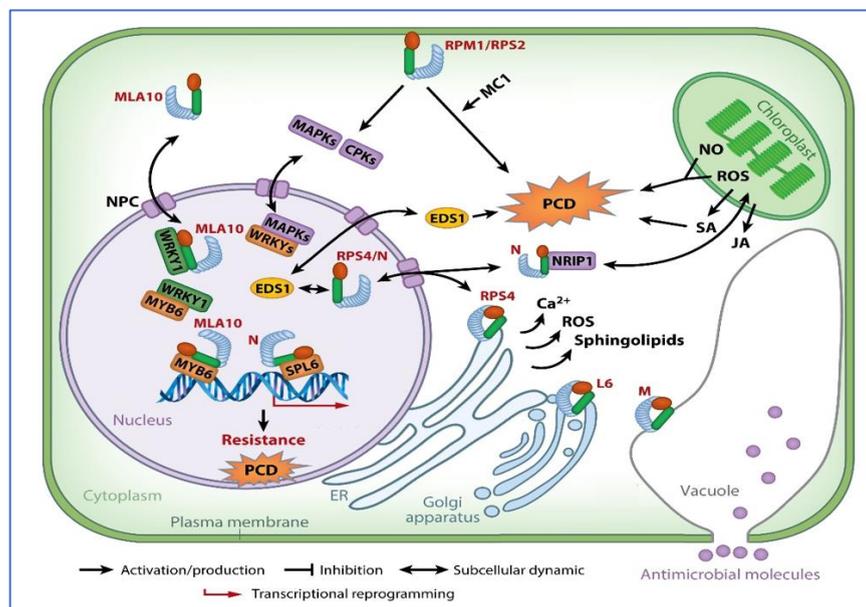


Figura 4. Dinámica de señalización intracelular de los receptores NB-LRR. Tras el reconocimiento del efector, los NB-LRR (etiquetas rojas en negrita) activan cascadas de proteínas quinasas dependientes de Ca²⁺ (CDPK) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), acumulación de las fitohormonas ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), liberación de esfingolípidos del retículo

endoplásmico (ER), reprogramación transcripcional de genes de defensa y muerte celular programada (PCD o HR). Dentro de esta señalización, cada receptor activado desencadena una respuesta específica. En este sentido, los receptores RPM1 y RPS2, de *Arabidopsis*, activan la señalización de MAPK y CDPK, que culmina en la activación del factor de transcripción WRKY33 que regula positivamente la reprogramación transcripcional de defensa y desencadena la PCD a través de metacaspasa de tipo I (MC1). Por otro lado, RPS4 de *Arabidopsis* ingresa al núcleo a través de complejos de poros nucleares (NPC) donde promueve, a través de EDS1, la PCD, la reprogramación transcripcional de defensa y la acumulación de SA. En la cebada, MLA10 muestra una mayor acumulación dentro de los núcleos, donde interactúa directamente sobre el represor transcripcional WRKY1, generando la liberación del activador transcripcional MYB6, lo que a su vez induce la expresión de genes que participan en la respuesta inmune. Asimismo, la proteína NRIP1 localizada en cloroplasto de tabaco es redirigida al citoplasma por el efector p50 del virus del mosaico del tabaco, donde activa el complejo N que se reubica desde el citoplasma al núcleo, donde interactúa con el factor de transcripción SPL6 que contribuye a la reprogramación transcripcional. Por otra parte, es necesario mencionar la importancia de la ubicación de las proteínas NB-LRR para el buen desempeño de su función; por ejemplo, los receptores L6 y M del lino se localizan en la membrana de Golgi y vacuolar respectivamente, su ubicación les permite estabilizarse para una mayor acumulación y fácil dimerización u oligomerización, siendo ambos procesos críticos en la señalización de defensa (Tomado de Cui *et al.*, 2015).

La evidencia experimental muestra que, a diferencia de los receptores PRR, la activación de NB-LRR se da en diferentes ubicaciones subcelulares (Figura 4). Sin embargo, a pesar de esta diferencia, ETI y PTI comparten ampliamente la maquinaria de señalización para reprogramar las células transcripcionalmente. En este sentido, ambos, estimulan la defensa mediante la producción de ROS, los picos de Ca^{2+} y la activación de MAPK, aunque en ETI la cinética de activación se amplifica y es de mayor duración que en PTI (Cui *et al.*, 2015). A la fecha, se han descrito dos mecanismos que pueden aumentar la robustez de la red de señalización inmune de la planta durante ETI. El primer mecanismo incluye la activación sostenida durante varias horas de MAPK3/6, lo que a su vez regula de manera independiente de SA genes sensibles a SA. Lo anterior, aunado a la señalización propia de SA induce la inhibición del crecimiento bacteriano y la respuesta de defensa de la planta (Tsuda *et al.*, 2013).

El segundo de los mecanismos incluye la activación sostenida de proteínas CPK. Dicho proceso, induce varios efectos, por ejemplo: CPK 4/5/6/11 fosforilan

constantemente a los factores de transcripción de tipo WRKY para regular la reprogramación transcripcional. Además, CPK1/2/4/11 fosforilan a las enzimas RBOH para la producción sostenida de ROS. Mientras que CPK1/2 controlan la muerte de la célula huésped en un proceso conocido como HR (Gao *et al.*, 2013). Ambos mecanismos conducen a un modelo en que la activación sostenida de vías particulares de la inmunidad contribuye a dar fuerza y robustez a ETI (Cui *et al.*, 2015).

I.I.V Respuesta hipersensible (HR)

Una estrategia de defensa empleada por la planta, tras la señalización de ETI, es la inducción de una muerte celular rápida en y alrededor del sitio de infección inicial, a modo de privar a los patógenos de un suministro de alimentos y restringir su propagación a las células no infectadas. Este fenómeno se conoce como respuesta hipersensible, y a menudo conduce a una necrosis tisular localizada que es macroscópicamente visible como un “moteado” de bordes definidos y color amarillo-marrón sobre el fondo verde de la hoja (Balint-Kurti, 2019; Noman *et al.*, 2020).

Se ha reportado que HR es un método eficiente para contener la propagación de patógenos biotróficos. Sin embargo, no protege a las plantas contra la infección causada por los patógenos necrotróficos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Por el contrario, *B. cinerea* se aprovecha de la maquinaria de HR de la planta para promover su virulencia, ya que el obtener células muertas en las que puede crecer, facilita la colonización de la planta (Govrin y Levine, 2000).

Por lo anterior, la muerte celular inducida por HR es un proceso que se encuentra bajo una estricta regulación, que requiere la acción concertada de diversas proteasas de plantas y mecanismos regulatorios para mantenerla eficiente pero confinada. Es importante, además, que se suprima completamente en condiciones sin enfermedad, ya que la activación inadecuada puede ser muy perjudicial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por el contrario, debe activarse rápidamente cuando sea necesario. Desafortunadamente, el conocimiento actual sobre las vías que regulan esta forma de muerte celular

programada sigue siendo incompleto (Balint-Kurti, 2019; Salguero-Linares y Coll, 2019).

En lo que respecta a la cadena de eventos que conducen a la HR, aún no está del todo clara. Se sabe que después del reconocimiento del efector a través de los receptores NB-LRR, las plantas huésped experimentan una respuesta de defensa que incluye flujo iónico, activación de cascadas de quinasas, un estallido de ROS, incrementos de Ca^{2+} , variaciones en los niveles fitohormonales, reprogramación transcripcional, entre otros. Sin embargo, no es fácil evaluar el papel individual de estos procesos en la activación de HR (Noman *et al.*, 2020).

La mayoría de los estudios referentes a HR, en *Arabidopsis*, refieren que el proceso se desencadena tras la activación de genes como *NDR1*, *EDS1-PAD4-SAG101*, *STG1b*, *RAR1* y la inactivación de otros, como *LSD1*. Lo anterior sucede a la par de la afluencia de Ca^{2+} al apoplasto, seguido de un estallido oxidativo dependiente de NO y ROS, lo que a su vez induce la peroxidación lipídica, el incremento en los niveles de SA y la activación de cistein, treonin y serin proteasas. Posteriormente, se da un incremento en la concentración de ROS mitocondrial y cloroplástico, que precede a la disminución en los niveles de ATP y el potencial de membrana. Finalmente, el conjunto de todas estas señales desencadena la HR (Mur *et al.*, 2008, Salguero-Linares y Coll, 2019).

Una vez activada, la HR conduce a una serie de eventos caracterizados durante la interacción de la planta *Vigna unguiculata* con el patógeno *Uromyces vignae*. En el primer evento, los filamentos citoplasmáticos se extendieron desde el núcleo del huésped hacia la hifa primaria del hongo, lo que permitió la migración del núcleo al sitio de penetración. A continuación, el flujo citoplasmático disminuyó o se detuvo. Más tarde, el citoplasma se volvió granular en apariencia y se agregó a lo largo de las paredes celulares. Posteriormente, se presentó movimiento browniano de partículas visibles en la vacuola, condensación del núcleo y desmantelamiento del protoplasto. Finalmente, el citoplasma se colapsó y terminó con la muerte de la célula infectada. Desafortunadamente, el estudio de eventos intermedios entre los procesos antes mencionados se ha vuelto difícil debido a la rapidez con la que se desencadena la HR en tejidos fijos (Chen y Heath, 1991; Noman *et al.*, 2020).

Afortunadamente, uno de los procesos que ha permitido incrementar el conocimiento sobre HR en plantas es la muerte celular programada (PCD) de mamíferos. Al respecto, se ha observado que algunos procesos de HR son similares a los que suceden durante la muerte celular apoptótica y/o autofágica (dos tipos de PCD) en los sistemas animales. Estos procesos incluyen el colapso citoplasmático, cese de la movilidad citoplasmática relacionado con la despolimerización del citoesqueleto, condensación de la cromatina, inflamación mitocondrial, considerable fuga de electrolitos e hinchazón de los orgánulos (Mur *et al.*, 2008). Además de estas características, la HR presenta disrupción del cloroplasto, vacuolización, activación de cisteína proteasas y formación de vesículas grandes dentro del citoplasma antes del colapso celular. Dichas vesículas, contienen restos cloroplásticos y material nuclear fragmentado (Coll *et al.*, 2011).

Finalmente, tras la HR se liberan componentes celulares y moléculas que inducen la muerte celular de las células vecinas. A modo de evitar que la muerte celular se propague a las células vecinas sanas, se ha propuesto que la planta utiliza el proceso de autofagia para mantener el tejido muerto aislado del tejido sano. Asimismo, se sugiere que el control de la autofagia esta mediado por SA, específicamente por la activación diferencial de los miembros de la familia multigénica *nonexpresser of PR genes (NPR)*. En este sentido, SA es percibido por dos grupos de receptores: NPR1 y NPR3 / NPR4, con una activación dependiente de los niveles de SA (ver sección I.II.I Ácido salicílico en defensa) y roles opuestos en la autofagia: mientras que NPR3/NPR4 promueven la autofagia, NPR1 tiene el efecto contrario (Wang *et al.*, 2016, Ding *et al.*, 2018). Desafortunadamente, el mecanismo preciso por el cual se da esta regulación diferencial sigue siendo esquivo.

Por otra parte, de manera simultánea al desarrollo de la HR, las reacciones de defensa se desencadenan en sitios tanto locales como distales de la infección primaria. Este fenómeno se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR)

I.I.VI Resistencia sistémica adquirida (SAR)

Tras el reconocimiento de patógenos, se inician respuestas intracelulares de defensa en el sitio de infección local. Esta respuesta local de “haber sido atacado” (cebado) se transmite a las partes distales de la planta, con la finalidad de establecer una memoria inmune de “estar preparado para defenderse de un ataque posterior” (Guerra *et al.*, 2020). Este proceso se conoce como resistencia sistémica adquirida, que es una forma de inmunidad sistémica que protege las partes distales ante una posible reinfección (Lim *et al.*, 2020). Durante SAR, las plantas cebadas exhiben una activación más rápida y fuerte de las reacciones inmunes a una infección secundaria incluso por patógenos no relacionados (Hake y Romeis, 2019).

La SAR implica la generación de una señal móvil en las hojas infectadas primarias, que cuando se transloca a las porciones distales no infectadas, activa las respuestas de defensa, lo que resulta en resistencia a enfermedades sistémicas. La producción de la señal móvil se lleva a cabo dentro de 3 a 6 h después de la inoculación del patógeno en las hojas primarias, lo que coincide con el tiempo en que las señales SAR son transportadas fuera de la hoja local, que ocurre dentro de las 4 a 6 horas posteriores a la infección por el patógeno. Por ende, para la inducción de SAR, la hoja inoculada debe permanecer unida a la planta durante al menos 4 h después de la inoculación, permitiendo el transporte de la señal móvil (Xia *et al.*, 2009; Chanda *et al.*, 2011).

Para el establecimiento de SAR, además de oscilaciones de ROS y Ca^{2+} , se han identificado varios inductores químicos (conocidos colectivamente como señal móvil), dentro de los que se incluyen: al ácido salicílico, el glicerol-3-fosfato (G3P) y los ácidos azelaico (AzA) y piperónico (Pip) (Shine *et al.*, 2019). Para llevar a cabo su efecto, la señal móvil debe viajar desde el tejido infectado hacia el resto de la planta. Dicha traslocación se da a través del floema, mientras que en el transporte intercelular participan diferentes vías (Figura 5): SA vía apoplasto, G3P y AzA por transporte simplástico, mientras que debido a las bajas concentraciones de Pip encontrado en exudados de peciolo, aún existe controversia en la vía de transporte, inclusive algunos autores consideran que no se transporta (Lim *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

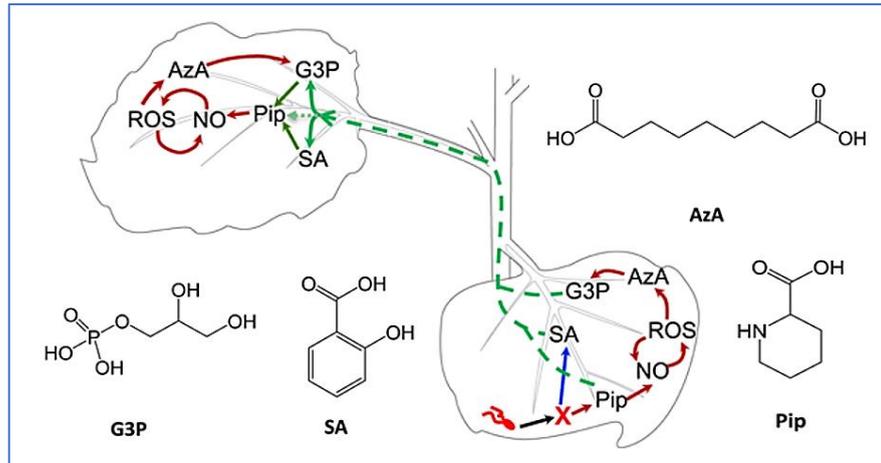


Figura 5. Importancia de la señalización local y distal para el desarrollo de SAR. La inoculación de patógenos desencadena eventos de señalización independientes que conducen a la acumulación de los ácidos salicílico (SA) y pipercolico (Pip) en las hojas locales. Pip induce la acumulación de óxido nítrico (NO), que a su vez desencadena la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS), que catalizan la oxidación de los ácidos grasos libres insaturados que se liberan de los lípidos de membrana. La oxidación de los ácidos grasos genera ácido azelaico (AzA), que desencadena la biosíntesis de glicerol-3-fostato (G3P) a través de la regulación positiva de los genes que codifican las enzimas biosintéticas de G3P. De estas, las señales químicas SA, G3P, AzA y Pip se detectan en el peciolo recolectado de las hojas inoculadas con el patógeno. Se requieren SA y G3P para la síntesis de Pip en las hojas distales. Se muestra la estructura química de los principales inductores de SAR. Las líneas verdes discontinuas indican el transporte de SA, G3P y Pip desde los tejidos locales a los distales. (Tomado de Klessig *et al.*, 2018 y Wang *et al.*, 2018).

Dentro de la señalización de la respuesta sistémica inmune, la mayoría de los reportes apuntan a dos metabolitos como requisito mínimo esencial para generar SAR: Pip y SA; ya que la ausencia de cualquier enzima que participe en su síntesis o del metabolito en sí, induce una pérdida de SAR. Por un lado, Pip es un aminoácido no proteínogénico, cuya síntesis ocurre después de la infección primaria a partir de L-Lys por la enzima AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1 (ALD1) y SAR-DEFICIENT 4 (SARD4). Aún más, no solo el Pip en sí mismo sino también el ácido N-hidroxipipercolico (NHP), un derivado de Pip que es formado por la enzima FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1 (FMO1), pueden inducir SAR (Hake y Romeis, 2019; Hartmann y Zeier, 2019). Mientras

tanto, SA es una fitohormona que participa en la respuesta inmune contra patógenos, en su acumulación participan las proteínas ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) y PHYTOALEXIN-DEFICIENT 4 (PAD4) que promueven la expresión de la enzima ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 (ICS1) que participa en la biosíntesis de SA (Rietz *et al.*, 2011; Hartmann y Zeier, 2019).

El proceso para establecer SAR se inicia tras la señalización inducida por la propagación de Ca^{2+} y ROS desde el sitio de infección hasta el resto de la planta. La propagación de Ca^{2+} y ROS es mediada por CPK5 y tiene funciones diferenciales a nivel local y sistémico. A nivel local, induce la acumulación de SA y Pip. Tras este hecho, Pip induce la acumulación de NO, lo que precede a la producción de ROS. Posteriormente, se establece un circuito de retroalimentación positiva entre NO-ROS, lo cual induce la oxidación de ácidos grasos (FA) libres insaturados, que trae como consecuencia la generación de AzA. Posteriormente, AzA regula positivamente los genes que codifican a las enzimas que participan en la síntesis de G3P. Finalmente, SA y G3P se transportan a las hojas distales donde en conjunto con CPK5 estimulan dos factores de transcripción importantes: *SAR-DEFICIENT 1 (SARD1)* y *Calmodulin-binding protein 60-A (CBP60)* que promueven la biosíntesis *de novo* de Pip y NHP a través de la estimulación de *ALD1* y *FMO1* y, por lo tanto, reactivan la cascada de NO, ROS y AzA que culminan en la biosíntesis *de novo* de G3P. Sorprendentemente, Pip y el complejo *SARD1-CBP60* median y hacen cumplir la biosíntesis de SA en el tejido vegetal sistémico en un bucle de alimentación positiva *ALD1 / FMO1 / ICS1* y, por lo tanto, mantener activa la SAR. Una parte importante de la regulación en la SAR se muestra en la Figura 6 (Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Hake y Romeis, 2019; Hartmann y Zeier, 2019; Guerra *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2020).

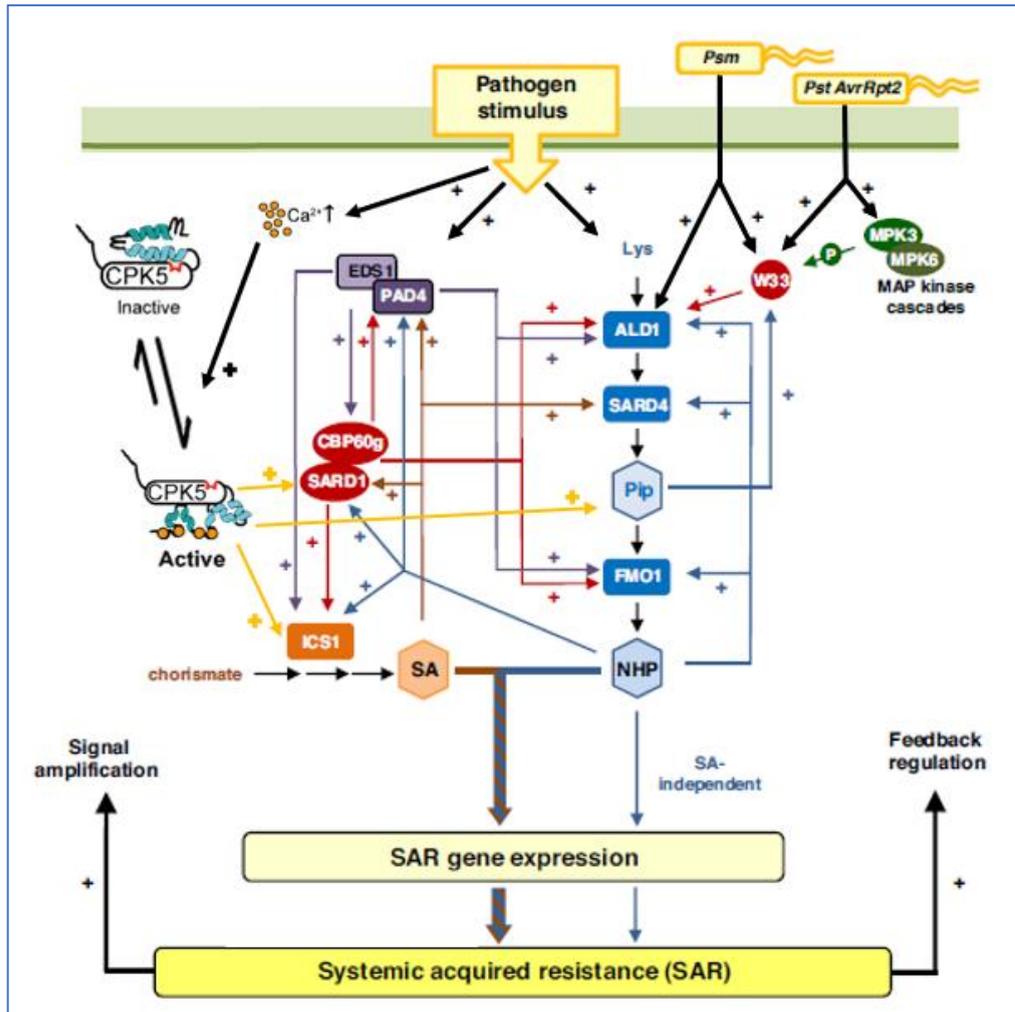


Figura 6. Regulación de las vías biosintéticas de los ácidos salicílico (SA) y n-hidroxipipecólico (NHP) durante el establecimiento de la SAR. Representación esquemática de la red reguladora durante el establecimiento de SAR inducida por patógenos, para lo cual las vías biosintéticas de NHP y SA son centrales. EDS1/PAD4, CBP60g/SARD1 y CPK5 son elementos reguladores comunes de la biosíntesis de SA y NHP. La red de señalización se caracteriza por la interacción positiva (+) y los circuitos de amplificación de retroalimentación entre varios elementos de señalización, tales como factores de transcripción, proteínas reguladoras y señales inmunes metabólicas. El NHP impulsa una ruta de inducción SAR predominante en concierto con SA, y una ruta menor independientemente de SA. Elementos de la figura: los cuadros azules indican las enzimas de las vías de NHP, los cuadros naranjas de las enzimas de la ruta SA. Los elipsoides rojos representan factores de transcripción, los cuadros morados comprenden las proteínas reguladoras EDS1 y PAD4. Las MAP quinasas MPK3/6 se muestran como elipsoides verdes. Las acciones reguladoras positivas de un elemento a otro se indican mediante flechas (la misma asignación de color que antes). SA: ácido salicílico, NHP: ácido n-hidroxipipecólico, Pip: ácido pipecólico, NO: óxido nítrico, ROS: especies reactivas de oxígeno, AzA: ácido azálico, G3P: glicerol-3-fostato, PEX: peciolo (Tomado y modificado de Hartmann y Zeier, 2019 y Guerra *et al.*, 2020).

Por último, la duración de SAR puede ser desde semanas hasta meses y proteger a una planta de una infección secundaria contra una amplia gama de patógenos. Sin embargo, el mecanismo preciso que permite que una planta "decida" cuándo un cambio al modo SAR es preferencial, y cuando no, aún no está claro y es muy importante ya que es una decisión que conlleva un costo en el desarrollo y un grave retraso del crecimiento de la planta (Hake & Romeis, 2019; Guerra *et al.*, 2020).

Como hemos visto hasta ahora, el proceso de defensa es altamente dinámico y depende de una fina regulación tanto en espacio como en tiempo para mantenerse eficiente y bajo control. Es por ello, que han surgido nuevos modelos para el estudio de la respuesta inmune vegetal que son más incluyentes y se adaptan mejor a los hallazgos recientes, tal es el caso del modelo de inmunidad espacial.

I.I.VII Modelo de inmunidad espacial

Hasta ahora, el modelo de zig-zag propuesto en 2006 es el más utilizado para describir la interacción planta-patógeno a nivel molecular. Sin embargo, los avances recientes en la investigación sobre las interacciones planta-microorganismo han puesto en duda la dicotomía entre patrones y efectores, evidenciando que no es muy clara y denotando que la clasificación de las respuestas como PTI o ETI podría llegar a ser inapropiada. A modo de resolver dichos inconvenientes y basados en el conocimiento actual, se ha propuesto un nuevo modelo donde la distinción entre los tipos de respuestas inmunitarias desencadenadas en las plantas se base en la ubicación donde se percibe el patrón inmunogénico, ya sea extracelular o intracelular. Usando esta partición espacial, se creó el "modelo de inmunidad espacial" (Figura 7). La principal ventaja de este modelo es que facilita una nomenclatura ampliamente inclusiva pero claramente distintiva para describir la señalización inmune en las interacciones de planta-microorganismo (van der Burgh y Joosten, 2019).

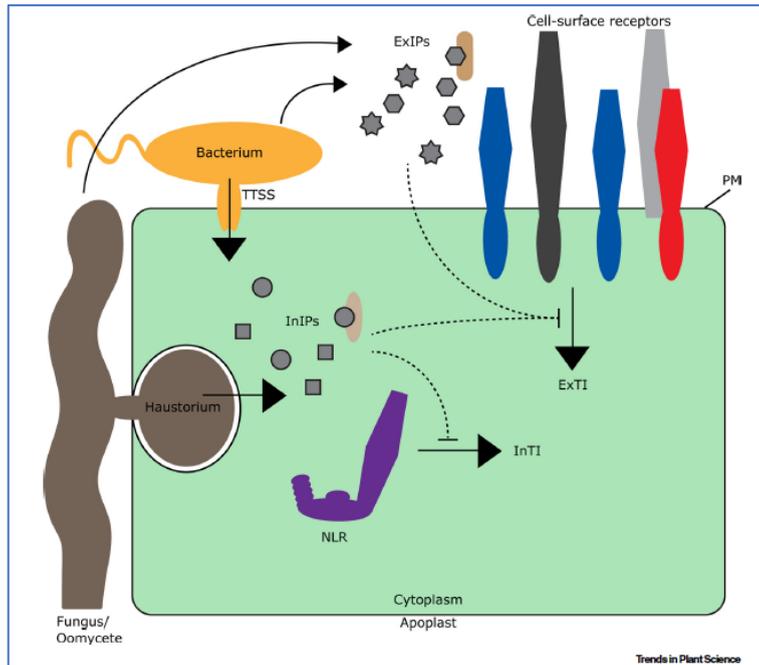


Figura 7. Modelo de inmunidad espacial. Los patrones inmunogénicos extracelulares (ExIP), que se acumulan en la planta tras la invasión por microorganismos o como resultado del daño celular, son detectados por los receptores de la superficie celular en la membrana plasmática (PM). Los ExIP son las llamadas señales de peligro, que pueden ser patrones y efectores derivados de patógenos o patrones moleculares asociados al daño derivados del huésped (que se muestran como estructuras grises fuera de la célula) y objetivos de virulencia derivados del huésped modificados por los efectores (VT) (estructura marrón). Los patrones inmunogénicos intracelulares (InIP) son señales de peligro que son detectadas por los receptores citoplasmáticos, en su mayoría receptores NB-LRR. Los InIP pueden ser moléculas derivadas de patógenos (que se muestran como estructuras grises dentro de la célula) o VT modificados (estructura marrón claro). Tanto el reconocimiento ExIP como InIP conducen a la activación de respuestas de defensa del huésped, denominadas inmunidad activada extracelular e intracelularmente (ExTI e InTI), respectivamente. Los ExIP pueden actuar como efectores y, por su acción en el espacio extracelular, pueden suprimir o eludir la activación de ExTI (línea de puntos desde el apoplasto al citoplasma). Los InIP también pueden actuar como efectores, con el potencial de suprimir la inmunidad desencadenada por la superficie celular, así como por los receptores citoplasmáticos (líneas de puntos en el citoplasma). Abreviatura: TTSS, sistema de secreción tipo tres. (Tomado de van der Burgh y Joosten, 2019).

El modelo de inmunidad espacial propone el uso de patrón inmunogénico extracelular (ExIP) y patrón inmunogénico intracelular (InIP), para diferenciar la ubicación de la señal de peligro como extracelular o intracelular, respectivamente. A su vez, el reconocimiento de los ExIP por cualquier receptor de la superficie celular conduce a respuestas desencadenadas extracelularmente (ExTR),

estableciendo el proceso de inmunidad desencadenada extracelularmente (ExTI). Por otro lado, cuando se reconocen InIP por receptores citoplasmáticos, se conduce a respuestas desencadenadas intracelularmente (InTR), induciendo la inmunidad desencadenada intracelularmente (InTI), lo que conduce a la resistencia de las plantas a los patógenos. En resumen, este modelo cubre mejor el concepto holístico de inmunidad del huésped, y permite clasificar de una manera más clara los nuevos hallazgos en la fitopatología molecular (van der Burgh y Joosten, 2019).

Independientemente del modelo utilizado para el estudio de la respuesta inmune, los mecanismos subyacentes al reconocimiento del patógeno no varían. Dentro de los componentes principales que modulan la respuesta de defensa se encuentran las hormonas ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y SA.

I.II PARTICIPACIÓN HORMONAL EN RESPUESTA A PATÓGENOS

Las hormonas vegetales, también conocidas como fitohormonas, son moléculas orgánicas pequeñas producidas de manera endógena en concentraciones muy bajas. En la planta, las fitohormonas, cumplen un papel importante en la regulación de una multitud de procesos celulares y de desarrollo. Además, su participación es trascendental durante la señalización de las respuestas de defensa e inmunitarias (Shigenaga y Argueso, 2016; Lalotra *et al.*, 2020).

Basado en evidencia experimental, se ha propuesto que el SA, el JA y el ET conforman la columna vertebral de las respuestas de defensa contra patógenos (Pieterse *et al.*, 2009). En este sentido, se sugiere que el SA media la resistencia a los patógenos biotróficos; mientras que el JA, en conjunto con el ET, activa la resistencia los patógenos necrotróficos. En general, se sugiere que las rutas SA y JA/ET son mutuamente antagónicas. Sin embargo, se han observado interacciones sinérgicas entre estas vías (Pieterse *et al.*, 2012).

Actualmente, se sabe de la participación de otras hormonas como las auxinas (AUX), el ácido abscísico (ABA), las citoquininas (CK), las giberelinas (GA) y los brasinoesteroides (BR) en la respuesta al estrés biótico. En general, estas hormonas regulan la respuesta inmune al inclinar el equilibrio hormonal hacia SA o JA/ET, es decir, modulan la columna vertebral de señalización SA-JA/ET (Klessig *et al.*, 2018). Esto refleja una red compleja de interacciones antagónicas y sinérgicas entre las diferentes vías de señalización hormonal (Figura 8), gracias a la cual, la planta tiene la capacidad de regular finamente su respuesta inmune y utilizar sus recursos de manera rentable (Pieterse *et al.*, 2012). Por ende, no es sorprendente que algunos patógenos generen estrategias para modular el equilibrio hormonal del huésped en su beneficio, regularmente al secuestrar la vía de la hormona opuesta en el antagonismo SA-JA/ET (Shigenaga y Argueso, 2016).

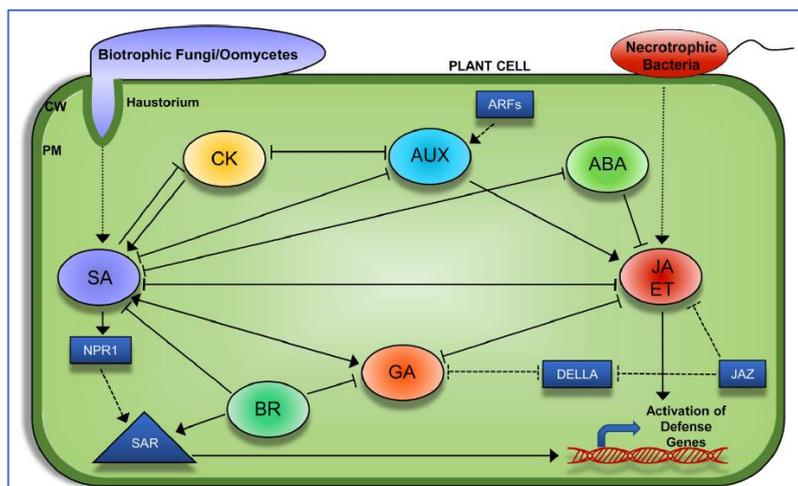


Figura 8. Representación esquemática de la diafonía de fitohormonas en la inmunidad de las plantas. En general, en respuesta a los patógenos biotróficos existe una acumulación de SA, mientras que en respuesta a los patógenos necrotrofos, el incremento es para las hormonas JA y ET. A modo de generar una señalización inmune robusta, incluso cuando varios sectores de señalización se ven afectados por efectores, la planta ha creado una red compleja con la participación de otras hormonas como: ABA, CK, AUX, GA y BR. Estas hormonas generalmente contribuyen a la inmunidad del huésped a través de la regulación positiva o negativa de las ramas SA o JA/ET. Las formas de color azul oscuro con fuente blanca representan puntos clave en la señalización hormonal. Las líneas continuas representan la regulación ascendente mediada por hormonas (flecha) o la inhibición (línea de punta roma). Las líneas discontinuas representan algunos factores o procesos de transcripción involucrados en la diafonía hormonal (Tomado de Shigenaga y Argueso, 2016).

En la presente tesis no se profundiza en la señalización de las hormonas que no conforman la estructura central de la respuesta inmune, es decir, no se abordarán las hormonas que no sean SA, JA o ET.

I.II.I Ácido salicílico en defensa

El SA es una hormona con múltiples funciones en plantas, en donde participa en procesos fisiológicos como la germinación de semillas, el crecimiento vegetativo, la fotosíntesis, la respiración, la termogénesis, la formación de flores, la producción de semillas y la senescencia. Sin embargo, el SA es conocido principalmente por

su papel en la inmunidad vegetal, donde participa en las respuestas de defensa local y sistémica (Hernández *et al.*, 2017).

La acumulación de SA se activa durante PTI y ETI. Durante PTI, el incremento en los niveles de Ca^{2+} inicia la señalización para la biosíntesis de SA. Posteriormente, las proteínas ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) y PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) promueven la biosíntesis de SA. Por otro lado, en ETI la acumulación de SA depende del tipo de NB-LRR activado: cuando es por TIR-NB-LRR, la biosíntesis de SA está mediada por EDS1 y PAD4, mientras que cuando es por CC-NB-LRR es mediante NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NDR1) (Pieterse *et al.*, 2012, Ding y Ding, 2020).

Independientemente de la vía que estimule la acumulación de SA durante el proceso de defensa, su síntesis se produce a través de la vía isocorismato. El proceso inicial de biosíntesis se da en cloroplasto, donde el metabolito corismato es convertido en isocorismato (IC) por la enzima ISOCHORISMATE SYNTHASE (ICS). Posteriormente, el IC es transportado al citosol por el transportador ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5 (EDS5). A continuación, se conjuga el IC y el glutamato para obtener el isocorismato-9-glutamato, con ayuda de la enzima *avrPphB* SUSCEPTIBLE 3 (PBS3). Finalmente, el isocorismato-9-glutamato en un proceso catalizado por la enzima ENHANCED PSEUDOMONAS SUSCEPTIBILITY 1 (EPS1) se convierte en SA (Bürger y Chory, 2019; Rekhter *et al.*, 2019).

La señalización río abajo del SA está mediada en gran medida por las proteínas NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPR1) y sus parálogos, NPR3 y NPR4 (Figura 9). Los cuales cumplen roles diferentes entre sí, por un lado, NPR1 funciona como un coactivador transcripcional de los genes que responden a SA, mientras que NPR3/NPR4 actúan como correpresores transcripcionales (Ding *et al.*, 2018). Se ha propuesto que la respuesta de las proteínas NPR esta mediada por los niveles de SA. El mecanismo propuesto señala que en condiciones normales la concentración de SA es baja, con lo que NPR3/4 inhiben la señalización dependiente de SA mediante interacciones directas con los factores de transcripción de unión al motivo TGACG (TGA), una especie de reguladores transcripcionales de dominio bZIP cuyos objetivos genómicos

incluyen genes relacionados con la patogénesis (PR) que están asociados con la defensa. Además de esta represión transcripcional, NPR1 se mantiene como un oligómero en el citosol, lo que constituye su forma inactiva (Johnson *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2018; Ding y Ding, 2020).

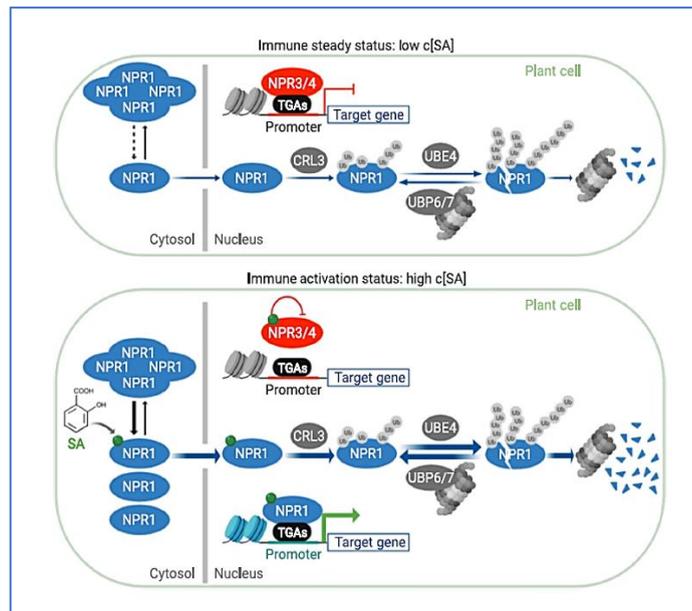


Figura 9. Regulaciones de genes dependientes de proteínas NPR por SA. La imagen superior muestra una célula vegetal que contiene una concentración relativamente baja de SA (c[SA]) o un nivel basal de acumulación de SA cuando no hay encuentro con patógenos. Cuando c[SA] es baja, NPR3 y NPR4 sirven como reguladores negativos para suprimir las expresiones génicas a través de sus interacciones directas con factores de transcripción de TGA específicos de la planta, mientras que la proteína NPR1 monomérica se mantiene en un nivel constante y relativamente bajo. La renovación de la proteína NPR1 está mediada por el complejo de proteasoma 26S a través de procesos de poliubiquitinación mediados por una ligasa de ubiquitina E3 como CRL3 y ligasa E4 UBE4, y también proceso de desubiquitinación por proteasas específicas de ubiquitina UBP6 y UBP7. La imagen inferior muestra una célula vegetal con una c[SA] más alta acumulada a través de la activación inmune desencadenada por patógenos vegetales. Un mayor nivel de SA puede inducir el proceso de monomerización de NPR1 e inducir la expresión génica dependiente de NPR1 a través de interacciones directas con factores de transcripción TGA. Mientras tanto, la unión directa con SA elimina la supresión de NPR3 y NPR4 en genes inducidos por SA, lo que potencia aún más la expresión del gen dependiente de NPR1 inducida por SA. Se requiere un recambio eficiente de proteínas NPR1 monoméricas en el núcleo para una expresión génica inducida por SA de velocidad limitada y esto también depende de la homeostasis de la ubiquitinación de NPR1, que es mantenida por las proteínas mencionadas en el panel superior (Tomado de Ding y Ding, 2020).

Por otro lado, tras el reconocimiento de un patógeno, se induce un incremento en la concentración de SA, lo que modifica el estado redox celular que genera monomerización de NPR1 con la consecuente translocación al núcleo a través de proteínas de poros nucleares. En el núcleo, NPR1 interactúan con miembros TGA, específicamente TGA3 y TGA6, induciendo su unión a la región promotora de genes sensibles a SA, lo que resulta en su activación. Asimismo, la unión de SA con NPR3/4 desactiva la regulación negativa de estos sobre los genes inducidos por SA, lo que potencia aún más su expresión (Ding *et al.*, 2018; Ding y Ding, 2020).

Otro proceso importante es la ubiquitinización y degradación, vía proteosoma 26S, de la proteína NPR1, mediada por las enzimas ubiquitinas ligasa E3 (como CRL3) o E4 (como UBE4). La eliminación de NPR1 se requiere para la inducción completa de los genes diana sensibles a SA, probablemente porque permite que los nuevos monómeros NPR1 reinicien el ciclo de transcripción. Además, esta degradación permite que los pocos monómeros NPR1 que se translocan al núcleo bajo condiciones normales sean eliminados, a modo de evitar la activación prematura de los genes diana de NPR1 (Shigenaga y Argueso, 2016; Ding y Ding, 2020).

La cascada de señalización inducida por SA culmina en la activación de genes importantes en la respuesta de defensa de la planta, entre los que se encuentran los genes *PATHOGENESIS-RELATED* (*PR*). Entre los varios genes *PR*, SA induce la activación de *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*, mismos que se usan como marcadores robustos y sensibles de la expresión génica regulada por SA. Sin embargo, estos tres genes son solo una mínima fracción del total de 9524 genes que muestran una expresión diferencial en respuesta a SA; de estos, los más estudiados son los genes involucrados en el metabolismo de SA (*ICS1*, *PBS3*, *EDS5*, *DRM6*, *CBP60* y *SARD1*), y algunos reguladores conocidos de la vía SA (*TGA1*, *TGA5*, *NPR4*, *NIMIN1*, *NIMIN2*, *WRKY18*, *WRKY51*, *WRKY54* y *WRKY70*). Además, se ha reportado que el SA genera el enriquecimiento de genes que participan procesos biológicos como: la respuesta de plegamiento de proteínas, la replicación del ADN y la regulación del ciclo celular (Hickman *et al.*, 2019).

Como respuesta final mediada por SA se establecen dos procesos de defensa en el huésped: el primero se activa en el sitio local de la infección y se caracteriza por una especie de muerte celular programada conocida como HR que puede reducir la penetración y propagación de patógenos (descrita en la sección I.I.V Respuesta hipersensible (HR)). Por otro lado, en el segundo proceso, se desencadena una respuesta de defensa en las partes distales de la planta para proteger los tejidos no dañados contra la posterior invasión de patógenos. Esta resistencia inducida de amplio espectro y larga duración se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Pieterse *et al.*, 2012; Bürger y Chory, 2019).

I.II.II Ácido jasmónico en defensa

El ácido jasmónico (JA) es una fitohormona de plantas superiores; inicialmente se identificó como una hormona relacionada con el estrés, aunque luego se encontró que también estaba involucrada en la regulación de importantes procesos de crecimiento y desarrollo. Por ejemplo, la maduración de la fruta, la supervivencia del polen, el crecimiento de las raíces, el volumen del tallo, la respuesta de la planta a las lesiones, la inhibición de la biosíntesis de RuBisCo, la disminución de la absorción de nitrógeno y fósforo y el transporte de materia orgánica como la glucosa (Jia *et al.*, 2016; Ruan *et al.*, 2019).

En lo que respecta al estrés, el JA participa eficazmente en algunas de las respuestas contra el estrés ambiental. Además, se ha reportado un incremento en los niveles de JA en respuesta a la infección por patógenos, lo que destaca claramente su participación en la respuesta de defensa de la planta durante el estrés biótico. Asimismo, la señalización mediada por el JA también desempeña un papel en la defensa de las plantas contra herbívoros, tales como orugas, ácaros, escarabajos, trips y chinches (Verma *et al.*, 2016). Sin embargo, en esta tesis únicamente nos centraremos en su participación en la respuesta contra microorganismos patógenos.

La acumulación de JA se produce, generalmente, durante la respuesta de defensa contra patógenos necrotróficos. El primer paso en la biosíntesis de JA es

la liberación de ácido α -linolénico (α -LA) de las membranas de cloroplasto por la fosfolipasa A1 cloroplástica DEFECTIVE ANther DEHISCENCE 1 (DAD1), seguido de la oxigenación por enzimas LIPOXYGENASE (LOX). La forma oxigenada se conoce como ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), y se convierte en JA en el peroxisoma. Finalmente, en citoplasma, el JA puede metabolizarse fácilmente a metil jasmonato (MeJA) mediante la actividad de JA CARBOXYL METHYLTRANSFERASE (JMT) o ser conjugado con aminoácidos tales como isoleucina a través de la enzima JA AMIDO SYNTHETASE (JAR1), que da como resultado jasmonoil-isoleucina (JA-Ile), un enantiómero biológicamente más activo que JA (Jia *et al.*, 2016; Shigenaga y Argueso, 2016; Ruan *et al.*, 2019).

La vía de señalización del JA, es dependiente de su acumulación. A niveles bajos de JA, en plantas sanas y sin estrés, las proteínas JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ) se asocian con las proteínas adaptadoras NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA) y el represor transcripcional general TOPLESS (TPL) para reprimir la expresión de genes dependientes de JA mediante remodelación de histonas. Adicionalmente, el complejo JAZ-NINJA-TPL se asocia directamente con reguladores transcripcionales positivos regulados por JA (MYC2, MYC3, MYC4), evitando que activen genes que responden a JA (Shigenaga y Argueso, 2016; Bürger y Chory, 2019).

Hasta ahora, una de las vías mejor caracterizadas acerca de la acumulación de JA se ha dado en *A. thaliana*. En este sentido, el daño celular causado por las enzimas del patógeno necrotrófico promueve la hidrólisis de la proteína precursora PROPEP1 (que consta de 92 aminoácidos) a AtPEP1 un polipéptido de 23 aminoácidos, que actúa como un patrón molecular asociados al daño reconocido por el receptor PEPR1 en la membrana plasmática, lo que induce la activación de la vía de síntesis de JA. La acumulación de JA es percibida por la proteína E3-ligase SCF F-box CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1). La unión JA-COI1 promueve fuertemente la unión de los represores JAZ a la proteína SCF^{COI1}, lo que induce la ubiquitinilación y posterior degradación, vía proteasoma 26S, de las proteínas JAZ. Esto da como resultado la liberación de factores de transcripción, que a su vez inducen la expresión génica sensible a JA (Zipfel, 2013; Shigenaga y Argueso, 2016; Bürger y Chory, 2019; Ruan *et al.*, 2019).

En la planta modelo, *A. thaliana*, se han reportado dos vías de señalización dependientes de JA en respuesta al estrés por patógenos. La primera vía, está controlada por factores de transcripción de tipo MYC como MYC2, MYC3 y MYC4, e induce la expresión del gen *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2 (VSP2)*, utilizado como marcador sensible a JA mediado por esta vía de señalización. La segunda vía, está regulada por miembros de la familia de factores de transcripción ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF), como ERF1 y OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS 59 (ORA59); ambos generan una regulación positiva del gen *PLANT DEFENSIN 1.2 (PDF1.2)*. Cabe mencionar que la activación de la vía ERF requiere señalización tanto de JA como de ET. Además, la base molecular del papel de COI1/JAZ en la regulación de esta vía, en contraste con la vía MYC, no se comprende bien. En general, la vía ERF está asociada con una mayor resistencia a los patógenos necrotróficos, mientras que la vía MYC se asocia con la respuesta a heridas y la defensa contra insectos y herbívoros, aunque MYC2 también desempeña un papel en el cebado para mejorar la defensa contra el patógeno (Pieterse *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2016; Ruan *et al.*, 2019).

Como se describió anteriormente, la vía de señalización de JA presenta dos vías: ERF y MYC. Se ha descrito que las hormonas ET y ABA determinan la dirección en la que se dirige la señalización de JA. La activación de la rama ERF incluye la expresión de los genes *PDF1.2* y *ORA59* y es mediada por la acumulación de ET, lo que a su vez resulta en una expresión reducida del gen marcador *VSC2* de la rama MYC. Mientras que el aumento de los niveles de ABA induce la expresión de *VSP2* a través de la activación de la vía MYC en conjunto con la represión de la vía ERF y el silenciamiento de *ORA59* y *PDF1.2* (Vos *et al.*, 2013).

I.II.III Etileno en defensa

El ET es una hormona gaseosa que participa en la regulación del crecimiento, desarrollo y senescencia de las plantas; así como en el proceso de maduración y abscisión de frutos climatéricos (Kim *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019). Además, la creciente evidencia indica que el ET, actúa en la activación y modulación de la respuesta inmune de la planta. Se ha demostrado que las vías de señalización de

ET y JA actúan de forma sinérgica, para brindar a las plantas una potente defensa contra el ataque de patógenos necrotróficos (Zheng *et al.*, 2019).

Como una hormona difusible, gaseosa y no degradable, la producción de ET debe controlarse estrictamente. En este sentido, la biosíntesis de ET, también conocida como ciclo de Yang, comienza con el aminoácido metionina, que es convertido en *S*-adenosilmetionina (SAM) por la enzima SAM SINTETASA. Posteriormente, SAM se convierte en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la enzima ACC SINTASE (ACS), en lo que se considera el paso limitante de la velocidad de biosíntesis de ET, debido a la estricta regulación de ACS. Por último, se produce ET a partir de ACC en una reacción catalizada por la enzima ACC OXIDASE (Shigenaga y Argueso, 2016; Li *et al.*, 2019).

Las plantas poseen un mecanismo complejo que regula la percepción de ET. Al igual que con SA y JA, las respuestas inducidas por ET dependen de su acumulación. A bajas concentraciones de ET, los receptores ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1), ETHYLENE RESPONSE 2 (ETR2), ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 (ERS1), ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2 (ERS2) y ETHYLENE INSENSITIVE 4 (EIN4) activan una Ser/Thr quinasa denominada CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) que fosforila al receptor ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2), una proteína localizada en retículo endoplásmico (RE). EIN2 se encuentra en un estado inactivo cuando es fosforilado por CTR1. Además, aunado a esta represión, las proteínas F-box EIN2 TARGETING PROTEIN 1 (ETP1) y ETP2 conducen a la degradación proteasómica de EIN2. Asimismo, se induce la degradación de ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3) y EIN3-LIKE 1 (EIL1), dos factores de transcripción críticos río abajo de EIN2. En conjunto, estos mecanismos reprimen la señalización mediada por ET (Kim *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2018).

Por otro lado, tras la interacción planta-patógeno se induce la acumulación de ET, mismo que es percibido por los receptores ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4, lo que conduce a la inactivación de CTR1 y, como resultado, la desfosforilación de EIN2 tras lo cual, su dominio C-terminal (CEND) se escinde para migrar al núcleo. Ahí, CEND estabiliza a los factores de transcripción EIN3/EIL1 que, posteriormente, se unen al elemento de secuencia de unión a EIN3 (EBS) en

la región promotora de varios genes diana, modulando así su expresión. Uno de estos genes, y quizá el más importante, es *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1* (*ERF1*), que es en sí mismo un factor de transcripción que puede unirse a la caja GCC y funciona positivamente activando las respuestas de etileno. Típicamente, *ERF1* activa la expresión de varios genes relacionados con la defensa, incluidos *PDF1.2* y *BASIC CHITINASE* (*ChiB*), lo que aumenta la resistencia de *Arabidopsis* a patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Plectosphaerella cucumerina*. Otro factor de transcripción activado es *OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF 59* (*ORA59*), que incrementa aún más la expresión de una amplia gama de otros elementos genéticos, incluidos los involucrados en la producción de otras fitohormonas. Además, la acumulación de ET induce la degradación de EBF1 y EBF2, mientras que CEND genera una represión transcripcional de los genes que codifican a estas proteínas, lo que en conjunto fortalece la respuesta mediada por ET (Huang *et al.*, 2016; Shigenaga y Argueso, 2016; Li *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019).

Otra función de los factores de transcripción EIN3 y EIL1 es la regulación positiva de la respuesta de PTI a nivel transcripcional, a través de la regulación *positiva* de *PROPEP1* y *PROPEP2* dos proteínas que al ser degradadas por las enzimas proteolíticas del patógeno necrotrófico funcionan como DAMP. Además, activan el gen *FLS2* que codifica al receptor FLS2 que se requiere para la unión del PAMP flagelina (Zipfel, 2013). Por el contrario, se ha reportado que inhiben la acumulación de SA, al regular negativamente la expresión del gen *SID2*, que codifica a la enzima ICS que se requiere para la biosíntesis de SA; lo que sugiere un mecanismo de comunicación cruzada mediada por EIN3 / EIL1 en la diafonía etileno- SA (Chen *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013).

Por otra parte, la primera evidencia de la acción sinérgica entre JA y ET en la inmunidad, fue la regulación de la expresión de *PDF1.2* tras la aplicación exógena de ET o JA. Posteriormente, se encontró que la aplicación concomitante de JA y ET induce la expresión de genes regulados por JA y ET a un nivel mucho más alto que la aplicación de cualquier hormona sola. Sin embargo, la base molecular de la coacción JA/ET y la interdependencia de señalización es en gran medida desconocida. Uno de los mecanismos propuestos tiene relación con las

proteínas JAZ, las cuales interactúan físicamente y reprimen EIN3 / EIL1. Además, las proteínas JAZ reclutan una histona desacetilasa de tipo RPD3 (HDA6) como un correpresor que modula la acetilación de histonas, lo que a su vez reprime la transcripción dependiente de EIN3/EIL1. La degradación de JAZ ante la percepción de JA libera la represión de EIN3/EIL1, lo que lleva a la activación de factores de transcripción regulados por ET, como *ERF1* y *ORA59*, y la activación sinérgica de genes regulados por ET-JA, incluido *PDF1.2* (Zhu et al., 2011; Shigenaga y Argueso, 2016).

I.II.IV Diafonía entre las vías SA y JA/ET

La mayoría de los reportes apuntan a interacciones antagónicas entre SA-JA/ET a través de redes complejas de señalización. Sin embargo, bajo circunstancias específicas, las vías de defensa mediadas por SA y JA/ET pueden interactuar de manera sinérgica o compensatoria. A la fecha se han reportado algunos casos de diafonía entre estas vías, ya sean negativas o positivas. En este sentido, se ha demostrado que la señalización de JA puede inhibir la acumulación de SA a través de la activación de la expresión, vía MYC2, de los factores de transcripción que contienen dominios ANAC (específicamente *ANAC019*, *ANAC055* y *ANAC072*); mismos que inhiben la expresión de *ICS1*, un gen que participa en la biosíntesis de SA al tiempo que desencadena la expresión de *BENZOIC ACID/SA CARBOXYL METHYLTRANSFERASE 1 (BSMT1)* como un gen de metilación de SA (Zheng et al., 2012; Yang et al., 2019). Del mismo modo, en general, ET actúa de forma antagónica a la señalización SA, al reprimir la expresión de *SID2* mediante los factores de transcripción EIN3 y EIL1 (Chen et al., 2009). Por otro lado, se requiere NPR1 citoplasmático para la supresión mediada por SA de la vía de señalización de JA. NPR1 puede interferir directamente con la señalización de JA al interferir con la función SCF^{COI1} o indirectamente a través de la activación transcripcional de los genes *WRKY* (*WRKY50*, *WRKY51* y *WRKY70*) y/o el gen de glutaredoxina *GRX480* (Ndamukong et al., 2007; Xiong et al., 2020). Por el contrario, NPR3 y NPR4 median la activación dependiente de bajas concentraciones de SA de la señalización y síntesis de JA, al inducir la degradación, vía proteasoma 26S, de varias proteínas

JAZ. Sin embargo, la acumulación de SA reprime una lista de genes de biosíntesis de JA, como *LOX2*, *AOS*, *AOC2* y *OPR3*. En conjunto con lo anterior, otro estudio indicó que la inhibición de CATALASE ISOZYME 2 (CAT2) mediada por SA, redujo la acumulación de JA al evitar que CAT2 interactúe y estimule, directamente, las actividades de dos enzimas biosintéticas de JA: ACYL-CoA OXIDASE 2 (ACX2) y ACX3 (Spoel y Dong, 2008; Vos *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

Si bien se han hecho grandes esfuerzos por elucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales las vías SA, JA, ET se modulan entre sí, aún no se comprende del todo el cómo estas interacciones activan las defensas para combatir diferentes tipos de patógenos. Por lo anterior se ha vuelto esencial el desarrollar estrategias experimentales que permitan una comprensión integral de la señalización inmune, dado que las respuestas de defensa son activadas por una intrincada red de señalización que además de fitohormonas incluye otros mediadores (Klessing *et al.*, 2018). Actualmente existe un auge importante en la investigación de uno de estos mediadores: las PAs (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014; Seifi y Shelp, 2019).

I.III PAs EN INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO

Las PAs son compuestos alifáticos que incluyen grupos amino (generalmente protonados a pH fisiológico) presentes de forma ubicua en todas las células vivas. Fisicoquímicamente, presentan bajo peso molecular, son solubles en agua y cuentan con valores de pK entre 8.3 y 10.9 (Coni *et al.*, 2019). En general, las PAs más abundantes son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y la tetraamina espermina (Spm); su estructura se muestra en la Figura 10. Otras PAs presentes en plantas son la cadaverina (Cad) y la termospermina (t-Spm), un isómero de la Spm (Wang *et al.*, 2019).

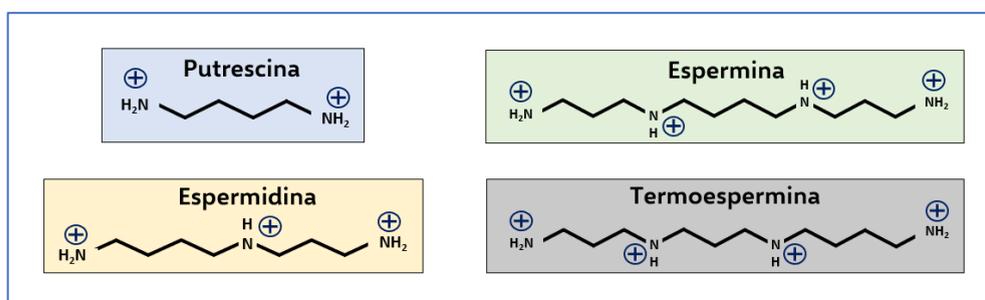


Figura 10. Estructura molecular de las principales PAs. Se muestra la estructura de la diamina putrescina, la triamina espermidina y las tetraaminas espermina y termoespermina. Modificado de Kusano *et al.*, 2008.

Por otro lado, se sugiere que bajo condiciones fisiológicas las PAs, debido a su carga positiva, pueden interactuar electrostáticamente con moléculas cargadas negativamente, incluidos el DNA, RNA, ATP, proteínas enriquecidas en Glu y Asp o fosfolípidos (Wang *et al.*, 2019; Takahashi, 2020). Asimismo, las PAs, participan en múltiples procesos fundamentales para la supervivencia celular como son: la división y diferenciación celular, la condensación de cromatina, la replicación y transcripción del DNA, el procesamiento de RNA, la síntesis y función de proteínas y la modificación postraduccional (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Kusano *et al.*, 2008; Masson *et al.*, 2017). Por lo anterior, es casi una regla universal que todos los organismos vivos requieran PAs para mantener su viabilidad. Bajo esta regla, las células vegetales no son la excepción.

En este sentido, las PAs participan en una variedad de procesos fisiológicos vegetales, principalmente en la estabilidad y la función de las proteínas y los ácidos nucleicos (Takahashi y Kakehi, 2010; Sayas *et al.*, 2019), mantener la integridad estructural de la pared celular (Walters, 2003), síntesis de ATP (Ioannidis *et al.*, 2006), regulación de transportadores iónicos (Pottosin *et al.*, 2014) y control del equilibrio nitrógeno / carbono (Moschou *et al.*, 2012). Además, están implicadas en modular una gran cantidad de procesos del desarrollo de la planta, dentro de los cuales se encuentran: la embriogénesis (Imai *et al.*, 2004), la organogénesis (Tavladoraki *et al.*, 2016), la germinación de semillas (Imai *et al.*, 2004), el desarrollo de hojas (Kusano *et al.*, 2008), la floración (Ahmed *et al.*, 2017), la polinización (Wu *et al.*, 2010), la lignificación de tejidos (Bala *et al.*, 2016), el desarrollo y maduración del fruto (Tsaniklidis *et al.*, 2016; Fortes y Agudelo-Romero, 2018) y la senescencia (Sobieszczuk-Nowicka, 2017). En definitiva, se requiere la participación de estas aminos para el desarrollo normal de la planta. Por otro lado, su participación no se limita exclusivamente al desarrollo y crecimiento normal de la planta, ya que se ha descrito su influencia directa en las respuestas orquestadas contra el estrés ambiental.

En relación con lo anterior, existe múltiple evidencia de la implicación de las PAs en las respuestas de la planta contra el estrés abiótico (Alcazár *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015), específicamente cuando el estrés desencadenado por salinidad (Yin *et al.*, 2019), sequía (Zhu *et al.*, 2020), estrés osmótico (Pál *et al.*, 2018), metales pesados (Soudek *et al.*, 2016) y temperaturas extremas (Shen *et al.*, 2016). Sin embargo, en esta tesis no ahondaremos en su estudio.

En lo que respecta al estrés biótico, se sabe que los niveles de PAs libres y conjugadas experimentan cambios profundos en los tejidos de las plantas durante la interacción con los microorganismos (Rodríguez-Kessler *et al.*, 2008). Curiosamente, algunas pruebas sugieren que estos cambios dependen de la naturaleza del microorganismo, un concepto que se deriva del hecho de que estas aminos intervienen en la activación de los mecanismos de defensa de las plantas. Varios estudios sugieren que este efecto, esta mediado inicialmente por la acumulación de PAs libres, que luego pueden ser conjugadas con ácidos orgánicos (principalmente ácido hidroxicinámico), o bien, catabolizarse con la consecuente

producción de H₂O₂, molécula crucial en las respuestas de defensa (Walters D, 2003; Muroi *et al.*, 2009; Hussain *et al.*; 2011; Jimenez-Bremont *et al.*, 2014; Jasso-Robles *et al.*, 2016; Corpas *et al.*, 2019; Seifi y Shelp, 2019). Sin embargo, aún queda por determinar cómo se modula el metabolismo de las PAs para permitirles activar los mecanismos de defensa de la planta (Rossi *et al.*, 2017).

Existe una cantidad considerable de información sobre la acumulación de PAs libres durante las interacciones de las plantas con patógenos. En este sentido, la mayoría de estos estudios apunta a la Spm como participe en la inducción y formación de respuestas de resistencia al estrés biótico. Por ejemplo, Mitsuya *et al.* (2009) reportaron que la Spm suprime de manera efectiva la multiplicación del virus del mosaico del pepino en *Arabidopsis*. Otra investigación en la misma planta indica que niveles elevados de Spm endógena están vinculados con una mayor tolerancia al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* y al oomiceto *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Marco *et al.*, 2014). De manera similar, en *Nicotiana benthamiana*, la aplicación exógena de Spm indujo la producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dos moléculas clave en la señalización asociada a la defensa, lo que finalmente lleva a la resistencia al patógeno bacteriano *Xanthomonas campestris* (Kim *et al.*, 2013). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la Spm es una molécula de señalización asociada al estrés biótico debido a que induce varios componentes de la respuesta de defensa de la planta, entre los que se incluyen: genes que codifican proteínas de resistencia (PR) (Gonzalez *et al.*, 2011); expresión del gen NHL10 que participa en la activación de HR (Zheng *et al.*, 2004), proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Takahashi *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2011); biosíntesis de fitoalexinas (Marco *et al.*, 2014); y la HR (Seifi y Shelp, 2019).

Por su parte, la conjugación de PAs con ácidos hidroxicinámicos, genera compuestos importantes en la respuesta de defensa de las plantas. Uno de estos compuestos es *p*-cumaroilputrescina, el cual se ha encontrado que se produce tras la HR en hojas de *Nicotiana tabacum var. Xanthi* e inhibe fuertemente la multiplicación del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Martin-Tanguy *et al.*, 1976). Además, se ha reportado su participación en la respuesta de defensa de *A. thaliana* contra el patógeno *Alternaria brassicicola*. En lo que respecta al mecanismo de acción de *p*-cumaroilputrescina, se ha sugerido que es producto de su deposición

en las paredes celulares vegetales para reforzarlas y de su actividad tóxica contra el patógeno (Muroi *et al.*, 2009).

Por último, el catabolismo de PAs se ha involucrado en la respuesta de defensa contra patógenos al afectar los niveles de ROS, específicamente de H₂O₂. Lo anterior se atribuye a las funciones del H₂O₂ durante los procesos de defensa vegetal, ya que, puede actuar directamente como un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento de patógenos o indirectamente en el reforzamiento de las paredes celulares y cierre de estomas. Asimismo, puede participar como segundo mensajero en la red de señalización que tiene como objetivo la expresión de genes de defensa (Moschou *et al.*, 2009; Corpas *et al.*, 2019).

Al respecto, se ha reportado que las alteraciones en las enzimas poliamina oxidasas (PAO), una clase de enzimas que participan en el catabolismo de PAs, afectan las respuestas de defensa de la planta. En este sentido, la línea mutante *Atpao1-1 x Atpao2-1* de *Arabidopsis* presenta niveles alterados de ROS, lo que a su vez induce la susceptibilidad ante el patógeno *P. syringae* (Jasso-Robles *et al.*, 2020). Por el contrario, la sobreexpresión de *ZmPAO* apoplástica en *Nicotiana tabacum Xanthi* mejoró la tolerancia contra la bacteria *P. syringae pv. tabaci* y el oomiceto *Phytophthora parasitica var nicotianae* (Moschou *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha reportado que el aumento en los niveles de PAs, ya sea mediante el uso de plantas transgénicas o la infiltración con PAs exógenas, y su posterior oxidación afecta las respuestas de defensa de la planta. En este sentido, la acumulación de Spm en *A. thaliana*, generó resistencia contra el patógeno biotrófico *P. viridiflava*. Sin embargo, este efecto fue parcialmente contrarrestado por la inhibición de la enzima PAO, lo que demuestra que una parte de la resistencia mediada por Spm depende de su oxidación (Gonzalez *et al.*, 2011). De manera similar, la acumulación y posterior oxidación de PAs en el apoplasto de las hojas de *Nicotiana tabacum 'Wisconsin W38'* afectó de manera diferencial las respuestas de defensa tras la infección por patógenos con estilo de vida contrastantes. Por un lado, la acumulación de Put y Spm en apoplasto y su posterior oxidación mejora la necrosis tisular provocada por el hongo necrotrofico *Sclerotinia sclerotiorum* lo que es perjudicial en la defensa de la planta. Mientras que, la acumulación y oxidación de Spm en el apoplasto restringe el crecimiento del patógeno biotrófico *P. viridiflava*,

favoreciendo la defensa. Lo anterior sugiere que el catabolismo de PAs favorece la respuesta inmune contra patógenos biotróficos, pero mejora la infección de patógenos necrotróficos (Marina *et al.*, 2008). Sin embargo, es importante mencionar que esta regla no es universal, ya que el catabolismo de PA no siempre perjudica a los patógenos biotróficos. Al respecto, Jasso-Robles *et al.* (2016) reportaron que el H₂O₂ producido a través del catabolismo de PAs por la enzima ZmPAO1 desempeña un papel importante en el desarrollo de tumores durante la interacción *Zea mays-Ustilago maydis*, favoreciendo la supervivencia del patógeno. En conjunto, estos datos sugieren que la participación del catabolismo de PAs en la contribución o afectación de la respuesta inmune es específica para el tipo de planta y patógeno que participe en la interacción.

La información antes presentada es un indicativo de que los cambios en los niveles de las PAs constituyen una respuesta adaptativa de la planta y que su modulación determina el desarrollo de la interacción planta-patógeno. El control de los niveles intra y extracelulares de PAs se logra mediante la regulación de su biosíntesis, catabolismo, conjugación y transporte (Fujita y Shinozaki, 2014, Alcazar *et al.*, 2020). Como se describió anteriormente, existe múltiple evidencia de la participación de la biosíntesis, la conjugación y el catabolismo de PAs en las interacciones planta-patógeno (Muroi *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2011, Jasso-Robles *et al.*, 2020). Sin embargo, a la fecha (junio de 2020) no existen reportes que impliquen directamente el transporte de PAs con la resistencia o susceptibilidad de la planta respecto a un patógeno. Adicional a lo anterior, existe poca información acerca del transporte de PAs en plantas (de su regulación, función biológica, impacto en desarrollo y estrés) respecto a otros organismos eucariotas.

I.IV TRANSPORTE DE PAs

Actualmente, algunos de los transportadores de PAs mejor caracterizados pertenecen a *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* (Figura 11). En *S. cerevisiae* los transportadores reportados son de importe (AGP2, DUR3, GAP1 y SAM3) y exporte (TPO1-TPO4). Además, posee el transportador intracelular UGA4 que importa tanto GABA (ácido γ -aminobutírico) como Put a la vacuola (Kashiwagi e Igharashi, 2011; Mulangi *et al.*, 2012). En lo que respecta a *E. coli*, se han identificado varios sistemas de transporte de PAs. Presenta dos sistemas de absorción de PAs: PotABCD y PotFGHI, preferencial para Spd y Put, respectivamente. Ambos, poseen casetes de unión a ATP. Además, de los transportadores antiporte de Put-ornitina y cadaverina-lisina, PotE y CadB, que son importantes para el crecimiento celular a pH ácido. Asimismo, un sistema exclusivo de excreción: MdtJI específico de Spd y un sistema de importe exclusivo de Put: PuuP (Igarashi y Kashiwagi, 2010).

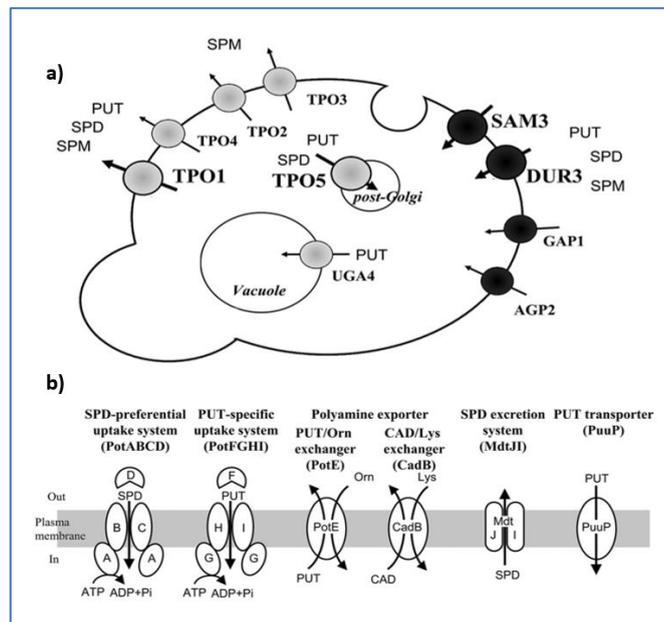


Figura 11. Transportadores de PAs en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*. a) Transportadores de PAs en *S. cerevisiae*. La absorción de PAs es dada por los transportadores AGP2, GAP1, DUR3 y SAM3. Mientras que en la excreción participan TPO1-TPO4 localizadas en la membrana plasmática y TPO5 en las vesículas secretoras post-Golgi. La absorción de Put en la vacuola es catalizada por UGA4. b) Transportadores de PAs en *E. coli*. Presenta dos sistemas de absorción de PAs que pertenecen a los transportadores de casete de unión a ATP (ABC). Estos son

el sistema de captación preferencial de Spd PotABCD, y un sistema de captación específico de Put PotFGHI. También posee los transportadores antiporte PotE de Put-ornitina y CadB de cadaverina-lisina. Además, MdtJl exportador específico de Spd. Por último, el transportador PpuP un importador de Put (Imagen tomada de Igarashi y Kashiwagi, 2010).

En lo que respecta al transporte de PAs en tejidos vegetales, uno de los primeros reportes que sugería el transporte de PAs a larga distancia surgió tras la detección de Put y Spd en exudados de xilema y floema de varias plantas (Friedman *et al.*, 1986). Posteriormente, se dio la primera descripción del transporte de PAs en protoplastos aislados de células de parénquima del floema de zanahoria, donde se encontró que la captación de Put y Spd es muy rápida y dependiente de Ca^{2+} (Pistocchi *et al.*, 1987). Además, se ha reportado que, en hojas jóvenes de *Ricinus communis L.*, hasta dos tercios de la Put y un tercio de las reservas de Spd se exportaron de la hoja diariamente (Antognoni *et al.*, 1998). En general, se sabe que el transporte de PAs se encuentra elevado en células de proliferación rápida.

A pesar de que la mayoría de los reportes antes mencionados fueron hechos en la década de los 90s, fue hasta 2012 que se da la primera caracterización del transportador vegetal de captación de PAs en arroz (OsPUT1), un importador preferencial de Spd que se expresa en todos los órganos de la planta exceptuando la raíz y las semillas maduras (Mulangi *et al.*, 2012a; 2012b). OsPUT1 al igual que el resto de los transportadores de absorción de PA caracterizados en plantas pertenecen a la familia de transportadores de aminoácidos de tipo L (LAT) que funcionan como transportadores de PAs / Paraquat (Fujita y Shinozaki, 2014; 2015). El paraquat (PAR) o metil viológeno es un herbicida que tiene, en su estructura, una distribución de carga similar a la Put y cadaverina, por ende, ya desde 1992 se sugería que ingresaba por el mismo transportador que las PAs, al encontrar una inhibición competitiva entre ambos compuestos por ingresar a las células vegetales (Hart *et al.*, 1992). Acorde con esto, se identificó que plantas de *A. thaliana* que presentaban resistencia al herbicida metil viológeno (Resistant Methyl Viologen, RMV) presentaban mutaciones en transportadores de tipo LAT (conocidos también como Polyamine Uptake Transporter, PUT): RMV1 / AtLAT1 / AtPUT3 (Fujita *et al.*, 2012) y PAR1 / AtLAT4 / AtPUT2 (Li *et al.*, 2013).

Actualmente, la familia AtPUT consta de cinco miembros, ubicados en diferentes compartimentos intracelulares (Figura 12a): retículo endoplásmico (AtPUT1 y AtPUT5), aparato de Golgi (AtPUT2), cloroplasto (AtPUT2 y AtPUT3) y en membrana plasmática (AtPUT3) (Fujita y Shinozaki, 2014; Ahmed et al., 2017). De entre todos, el transportador mejor estudiado es AtPUT3 (Figura 12b), con 12 dominios transmembrana predichos y colas citoplasmáticas N y C-terminales (Shen et al., 2016). Además de PA y paraquat, AtPUT3 participa en el transporte a larga distancia de tiamina (vitamina B1) en el floema (desde el brote hasta la raíz), clasificándolo como un transportador catiónico de alta afinidad poliespecífico (Martinis *et al.*, 2016). Asimismo, AtPUT3 está involucrado en la tolerancia al estrés por calor, a través de un mecanismo que involucra la absorción de PAs extracelulares, las cuales juegan un papel importante en la estabilidad del RNAm de los genes inducibles por calor (Shen *et al.*, 2016).

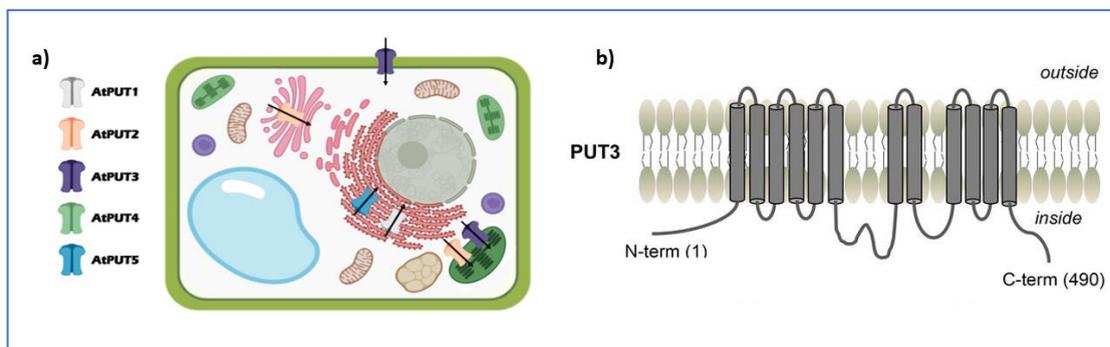


Figura 12. Localización subcelular de los transportadores de PAs en plantas y conformación estructural predicha de AtPUT3. a) Ilustración esquemática que muestra la localización intracelular de los transportadores de PAs en *A. thaliana*. b) Caricatura de la topología predicha de PUT3 según TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (Tomado de Martinis *et al.*, 2016).

La evidencia experimental indica que la alteración en la expresión de transportadores de PAs específicos resulta en cambios en la distribución tisular de estos metabolitos, lo que a su vez tiene consecuencias en el desarrollo de la planta, en comparación con el ecotipo silvestre. En este sentido, Martinis *et al.* reportaron que el mutante *Atput3* tiene una tasa más lenta de crecimiento radicular y un retraso en el tiempo de floración (Martinis *et al.*, 2016). Por otro lado, las plantas mutantes

de *Atput5* tienen hojas más pequeñas, tallos más delgados, floración prematura y produce pocas silicuas (Ahmed et al, 2017). Estos reportes postulan diferentes alteraciones en el desarrollo de la planta, un efecto posiblemente dado por la ubicación de cada uno de los transportadores, lo que refleja la importancia de una fina regulación en la distribución de PAs a nivel intracelular. Quedan por resolver los mecanismos moleculares de dicha regulación.

Por otro lado, debido a su función crucial en las células vegetales, la concentración intracelular de PAs debe estar estrictamente regulada. En mamíferos, esta regulación está dada por la proteína antizyme (Az). En este sentido, cuando existen concentraciones elevadas de PA intracelular, la Az favorece la degradación, vía proteosoma 26S, de la ornitina descarboxilasa, la primera enzima en la biosíntesis de PAs. Además, limita la absorción de PAs del ambiente extracelular al inhibir los transportadores de captación de PAs a través de un mecanismo aún no resuelto (Kahana, 2018).

Desafortunadamente, la proteína Az no se ha descrito en plantas, lo que ha limitado la comprensión de los mecanismos que regulan el transporte de PAs en plantas. Recientemente, se reportó que la activación de AtPUT3 está regulada positivamente por las proteínas SOS1 y SOS2 (Salt Overly Sensitive) a través de interacciones proteína-proteína y eventos de fosforilación (Chai et al, 2020). De acuerdo con lo anterior, las modificaciones postraduccionales de los transportadores de absorción de PAs podrían ser una característica importante en la señalización para la activación y regulación de estas proteínas bajo condiciones de desarrollo y estrés. Sin embargo, aún falta información sobre una posible regulación a nivel transcripcional con o sin estrés, así como otros procesos que regulen el transporte y los mecanismos que influyen en su activación/desactivación y finalmente el mecanismo mediante el cual estos transportadores realizan su función.

Hasta ahora, el papel específico de los transportadores de PAs de la planta durante la ontogenia de la planta y la respuesta al estrés sigue siendo escaso. A manera de contribuir en ampliar el conocimiento que se tiene de estas proteínas y basados en el antecedente que durante la respuesta de defensa de la planta incrementa el flujo de PAs hacia la zona de interacción (Vilas *et al.*, 2018), el

presente estudio hace uso de líneas mutantes de cada uno de los transportadores de la planta *Arabidopsis thaliana* (*Atput1-1* a *Atput5-2*) para con ello elucidar la participación e importancia de los transportadores en la homeostasis de las PAs en células vegetales durante el estrés biótico. Hasta ahora, lo que se sabe es que las PAs intervienen en la señalización hormonal de la respuesta ante el estrés biótico.

I.V PAs Y FITOHORMONAS DE DEFENSA.

Como respuesta a la activación de PTI o ETI, las hormonas vegetales SA, JA Y ET, actúan como actores centrales en el desencadenamiento de la red de señalización inmune de la planta (Ver sección I.II PARTICIPACIÓN HORMONAL EN RESPUESTA A PATÓGENOS) (Pieterse *et al.*, 2009). La correcta regulación en los niveles de estas hormonas le proporciona a la planta la capacidad de regular con precisión su respuesta inmune y así, utilizar sus recursos de manera rentable (Pieterse *et al.*, 2012). Para lograr este objetivo, la planta se vale de las interacciones antagónicas o sinérgicas que existe entre estas hormonas, así como la regulación mediada por otros metabolitos, como las PAs. A continuación, se enlistan algunos de los reportes que describen la interacción entre PAs y las fitohormonas SA, JA y ET.

Varios reportes señalan que la aplicación exógena de bajas concentraciones de SA puede inducir la acumulación de PAs libres en tomate (*Solanum lycopersicum*) y maíz (*Zea mays*) (Szepesi *et al.*, 2009; Németh *et al.*, 2002). Por el contrario, la acumulación de Spm genera una inhibición en la señalización de SA a través del incremento en los niveles de expresión de los genes *NPR3* y *NPR4*, que tiene como consecuencia la degradación de *NPR1*, (Anwar *et al.*, 2015). No obstante, también se ha reportado una correlación positiva entre los contenidos de Spd/Spm y el nivel de SA en la respuesta de defensa. Sin embargo, no está claro cómo los contenidos endógenos del SA y las PAs se influyen entre sí bajo esta condición (Pál *et al.*, 2013).

En lo que se refiere a la interacción JA-PAs, se reportó que, en explantes de tabaco, el MeJA induce la actividad de las enzimas arginina descarboxilasa (ADC), ornitina descarboxilasa (ODC) y SAM descarboxilasa (SAMDC), todas ellas implicadas en la biosíntesis de las PAs. Además, se observó un incremento en las PAs conjugadas y la actividad de la diamino oxidasa (DAO), una enzima que participa en el catabolismo de Put (Biondi *et al.*, 2001). Asimismo, el tratamiento con MeJa en hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) generó un incremento en Put, Spd y Spm libres y conjugadas (Walters *et al.*, 2002). Por otra parte, en *Arabidopsis*, los altos niveles de Spd/Spm incrementan los niveles de expresión del gen *LOX3*,

que codifica a una enzima que participa en la biosíntesis de JA (Marco *et al.*, 2011). Mientras que la acumulación de Put disminuye la expresión de varios genes LOX (Anwar *et al.*, 2015).

Por último, es importante mencionar que aún quedan por resolver los mecanismos que subyacen a la diafonía entre PAs y SA/JA, en los procesos de defensa de la planta. Para el estudio de esta interrogante y otras más relacionadas con los procesos de defensa de la planta, los investigadores hacen uso de patosistemas modelos.

I.VI *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. UN PATOSISTEMA MODELO.

Actualmente, *Arabidopsis thaliana* es una planta ampliamente utilizada como modelo para estudiar las interacciones planta-patógeno. Esto se basa, principalmente, en la disponibilidad de una gran cantidad de líneas mutantes homocigotas de casi todos los genes conocidos, incluidos los involucrados en el metabolismo de PAs (Rossi *et al.*, 2018). Por otro lado, *Pseudomonas syringae* es un organismo ampliamente utilizado para comprender la patogenicidad bacteriana, los mecanismos moleculares de las interacciones plantas-patógeno y la ecología microbiana y epidemiológica; lo que lo convierte en uno de los patógenos de plantas mejor estudiados (Xin *et al.*, 2018).

Al respecto, desde hace más tres décadas, se han utilizado varias cepas de *P. syringae* como modelos para comprender las interacciones entre plantas y bacterias. Sin embargo, fue hasta 1991 cuando se informó que la cepa *P. syringae* *patovar tomato* DC3000 (*Pst*), infectaba no solo a la planta de tomate, su huésped natural, sino también a la planta modelo *Arabidopsis thaliana*; un hallazgo que desencadenó un período de investigación altamente productiva que ha contribuido a dilucidar los mecanismos fascinantes que subyacen al reconocimiento de patógenos por parte de las plantas, las vías de transducción de señales que controlan las respuestas de defensa de las plantas, la susceptibilidad del huésped y los determinantes de virulencia y avirulencia de los patógenos. Lo anterior, convirtió al sistema *A. thaliana*-*Pst* en un modelo sumamente importante para entender el proceso de enfermedad desencadenado por patógenos en plantas (Katagiri *et al.*, 2002; Xin y He, 2013).

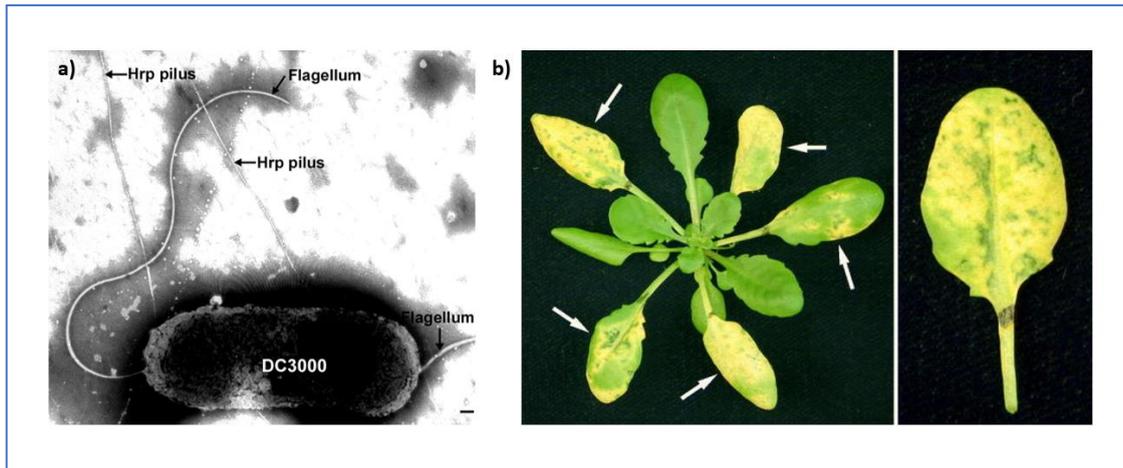


Figura 13. Morfología de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*). a) Imagen de microscopio electrónico de transmisión. *Pst* es una bacteria en forma de bastón con flagelos polares (15 nm de diámetro) y Hrp pili (6 a 8 nm de diámetro). Los flagelos y Hrp pili se indican con flechas. Los flagelos permiten a las bacterias nadar hacia o lejos de estímulos químicos específicos. Los complejos de secreción de tipo III (Hrp pilus) están implicados en la secreción de proteínas efectoras y de virulencia. b) Síntomas de la enfermedad en las hojas de *Arabidopsis* causadas por la infección de *Pst*. Las hojas (indicadas con flechas) se infiltraron con jeringa con 5×10^5 UFC/mL de *Pst* y se tomaron imágenes cuatro días después de la inoculación. Toda la planta se muestra en el panel izquierdo. Mientras que, en el panel derecho, se muestra un primer plano de una hoja enferma (Tomado de Katagiri *et al.*, 2002).

Pst es una bacteria gramnegativa, identificada como el agente causal de la mota bacteriana en las plantas de tomate. Morfológicamente, *Pst* es una bacteria en forma de bastón con flagelos polares (Figura 13a). Por su estilo de vida, se considera un patógeno hemibiotrófico que infecta, principalmente, porciones aéreas de plantas, como hojas y frutos. La infección a menudo es local, es decir, se encuentra dentro de unos pocos milímetros de los sitios de infección iniciales y no se propaga a otras partes de la planta (Katagiri *et al.*, 2002; Xin y He, 2013; Kang *et al.*, 2020). Previo al proceso infeccioso, *Pst* generalmente vive de forma epifítica, es decir, vive en la superficie de los tejidos vegetales, generalmente en las partes superiores, como las hojas, tallos, flores y frutos, conocidos colectivamente como filosfera (Xin *et al.*, 2018). Sin embargo, la superficie de las plantas se considera un ambiente hostil para los microorganismos, debido a la limitación de nutrientes y los rápidos cambios de temperatura, luz solar y humedad. Al respecto, varios estudios

sugieren que *Pst* es una epífita relativamente débil, ya que, de no ingresar a los tejidos de la planta, muere rápidamente (en menos de 48 h) (Xin *et al.*, 2013).

Para sobrevivir, *Pst* debe ingresar al tejido vegetal, específicamente al espacio apoplástico en un proceso conocido como fase endofítica. Para entrar al tejido del huésped, *Pst* se aprovecha de aberturas naturales como los estomas, o bien a través de heridas accidentales. Una vez en el apoplasto de plantas susceptibles y bajo condiciones ambientales favorables (fuertes lluvias, alta humedad, temperatura moderada), *Pst* se multiplica a altas densidades poblacionales generando la enfermedad. Las hojas infectadas muestran manchas con un aspecto acuoso, un síntoma producido por la liberación masiva de agua y, presumiblemente, nutrientes de la célula vegetal infectada. Estas manchas de aspecto acuoso se vuelven necróticas, y el tejido de la hoja circundante a la lesión muestra clorosis, dando la apariencia característica de una enfermedad 'moteada' (Figura 13b). Por el contrario, en plantas resistentes, *Pst* desencadena la HR (Ver sección I.I.V Respuesta hipersensible), una especie de muerte celular programada, asociada a la defensa de las células vegetales en contacto con el patógeno. En esta situación, *Pst* no alcanza densidades de población altas y no causa los síntomas de enfermedad (Katagiri *et al.*, 2002; Xin y He, 2013).

Por otro lado, varios estudios han reportado que aproximadamente el 5% del genoma de *Pst* codifica a genes relacionados con la virulencia. Sin embargo, del total de estos genes, únicamente la ausencia particular de algunos de ellos disminuye notoriamente la virulencia. Entre estos genes, tenemos los que codifican a toxinas y efectores, así como a los sistemas especializados en su secreción. Además, los genes que participan en codificar factores de fijación, flagelos y sideróforos (Figura 14). Asimismo, existen varios genes que son importantes para la supervivencia de *Pst*, como son los que codifican para transportadores de importe de azúcares y aminoácidos, transportadores de exporte de cationes y compuestos antimicrobianos y enzimas que detoxifican a la célula bacteriana de ROS y metales pesados (Xin y He, 2013). A continuación, se enfatizará en algunos de los factores de virulencia mejor caracterizados.

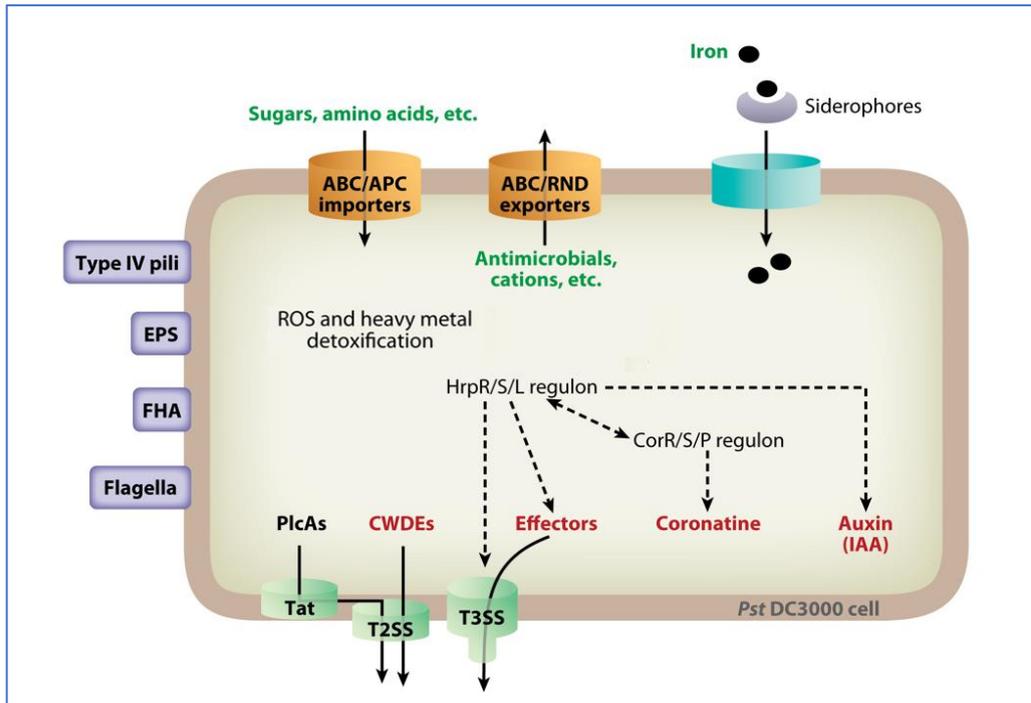


Figura 14 Diagrama de *Pst*, con rasgos clave de virulencia y aptitud física ilustrados. Los sideróforos median el transporte de hierro desde el entorno extracelular hacia la célula bacteriana. Aunque los sideróforos son generalmente importantes para el crecimiento bacteriano en condiciones limitantes de hierro, el papel de los sideróforos en la virulencia de las cepas de *Pseudomonas syringae* no está claro. *Pst* contiene 15 familias de transportadores de azúcar ABC (casete de unión a ATP) y cuatro familias de transportadores APC (aminoácido / poliamina / organocación) para importar aminoácidos y otros compuestos. Los sistemas de flujo de salida de tipo ABC y RND (división de células de nodulación de resistencia) exportan antimicrobianos o cationes. Los flagelos son una estructura indispensable para la movilidad bacteriana. Los factores de fijación son importantes para la virulencia, la formación de biopelículas y la protección de las células bacterianas del estrés ambiental. Los factores de fijación identificados en *Pst* incluyen pili tipo IV, exopolisacárido (EPS) y hemaglutinina filamentosa (FHA). El genoma de *Pst* contiene genes que codifican los sistemas de secreción de tipo II (T2SS) y tipo III (T3SS), así como el transportador de doble arginina (Tat), que son importantes factores de virulencia. Las isoformas de fosfolipasa C (PlcAs) se translocan al espacio extracelular mediante una vía de dos pasos (Tat y T2SS). Las enzimas que degradan la pared celular de las plantas (CWDE) también son probablemente sustratos de T2SS. Los genes que codifican los complejos de secreción de tipo III (T3SS) y los efectores tipo III están regulados por HrpR/S/L. Los genes biosintéticos de la coronatina están regulados por CorR/S/P. *Pst* produce auxina, dependiente de HrpL. El color rojo indica los factores de virulencia que actúan sobre las células vegetales, y el verde indica compuestos que se transportan a través de la membrana de *Pst* (Tomado de Xin y He, 2013).

I.VI.I Isla de patogenicidad tripartita y sistema de secreción de tipo III

Una vez en apoplasto, *Pst* cambia de móvil a sésil y comienza a secretar efectores inmunosupresores en las células huésped a través de un sistema de secreción tipo III (T3SS), un cambio de estilo de vida necesario para el desarrollo de la enfermedad (O'Malley *et al.*, 2020). En este sentido, el despliegue de T3SS, así como otros rasgos asociados con la virulencia, están regulados de manera coordinada por el *loci* de la isla de patogenicidad tripartita (T-PAI). Dicho *loci*, contiene los genes *hrp* (*respuesta hipersensible y patogenicidad*) y *hrc* (*genes hrp altamente conservados*) para el ensamblaje y la regulación de T3SS, flanqueados por los genes *CEL* y *EEL* que codifican para los efectores tipo 3 (T3Es). Tanto el T3SS como los efectores conservados son necesarios para que *Pst* establezca una infección exitosa, por lo que deben estar estrictamente regulados. Al respecto, los genes *hrp-hrc* codifican también a los reguladores HrpR y HrpS, que son necesarios para inducir la expresión de *HrpL*, el regulador maestro responsable de la expresión de todos los genes estructurales de T3SS y los genes que codifican T3Es (Alfano *et al.*, 2000; Xin *et al.*, 2018).

Por otro parte, en *Pst*, el locus *CEL* codifica dos efectores altamente conservados: hopM1 y avrE (ver sección I.VI.II Batería de efectores). Mientras que el locus *EEL*, codifica al efector HopB1 que inhibe el proceso de PTI. El mecanismo propuesto para tal efecto sugiere que HopB1 interactúa con FLS2 inactiva. Tras la activación por flg22, BAK1 se recluta en el complejo FLS2-HopB1 y se fosforila en Thr455. Posteriormente, la actividad proteasa de HopB1 escinde BAK1 activado, con la consecuente inhibición de su señalización (Li *et al.*, 2016; Xin *et al.*, 2018). En lo que respecta a T3SS, es un complejo de proteínas que media el contacto bacteriano con las células vegetales. El Hrp pilus actúa como un conducto de proteínas efectoras y de virulencia hacia el citoplasma de las células vegetales. Una vez que *Pst* ha inyectado los T3Es en las células vegetales, existen dos resultados probables, dependiendo de los genotipos de las plantas infectadas. Por un lado, los T3Es suprimen el sistema de defensa de la planta huésped modulando la transducción de señales o la actividad enzimática, lo que permite el desarrollo de la enfermedad, este proceso es conocido como respuesta susceptible. Sin embargo,

en una interacción incompatible, los efectores de tipo III provocan HR, lo que a su vez genera una respuesta de resistencia en la planta (Katagiri *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2020). Por último, la evidencia experimental sugiere que la inyección directa de proteínas de virulencia bacteriana en las células huésped a través del T3SS es un fenómeno generalizado en los patógenos bacterianos de plantas y animales, y se considera una adquisición evolutiva crítica en la virulencia de estos patógenos (O'Malley *et al.*, 2020).

I.VI.II Batería de efectores

La virulencia de *Pst* y muchos otros patógenos depende del repertorio de proteínas efectoras inyectadas en las células huésped por los T3SS. Es casi seguro que la función principal de los T3Es es suprimir las respuestas de defensa de la planta. Sin embargo, también se ha reportado su participación en el ingreso bacteriano al tejido vegetal al evitar el cierre estomático. A modo de evitar lo anterior, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para reducir la entrada de patógenos a través de los estomas. Tras el reconocimiento de los PAMP, se activa una cascada de señalización dependiente de SA para inducir el cierre del estoma como parte de la respuesta de PTI (Cunnac *et al.*, 2011; Xin *et al.*, 2018).

Para contrarrestar la estrategia de la planta, *Pst* ha desarrollado factores de virulencia, como la fitotoxina coronatina (ver sección I.VI.III Coronatina) y T3Es, para perjudicar la defensa estomática de la planta (Figura 15). En este sentido, se ha reportado que los efectores HopX1, HopZ1a, HopBB1, HopF2 y HopM1 suprimen el cierre estomático a través de diversos mecanismos, como son: la activación de la vía de señalización del JA, la fosforilación de la proteína RIN4 y la supresión del estallido oxidativo inducido por PAMP, durante la PTI (Xin *et al.*, 2018).

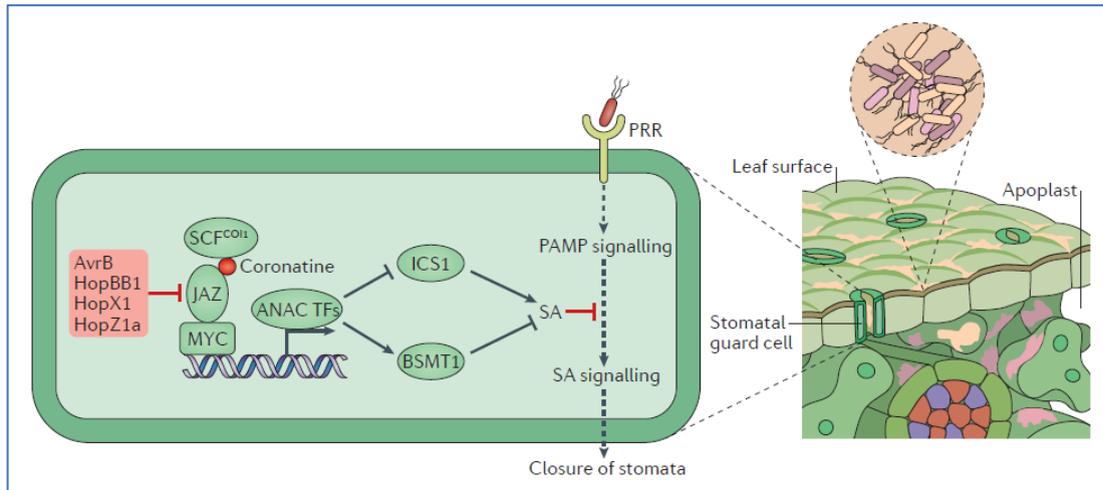


Figura 15. Entrada de *Pst* en las hojas y superación del cierre del estoma. La vía de entrada de *Pst* al tejido vegetal es, principalmente, a través de estomas que se abren naturalmente. Los PAMPs de *Pst* son detectados por PRR, desencadenando la señalización inmune en las células estomáticas, lo que conduce a la señalización del ácido salicílico (SA) y al cierre eventual del estoma. Para contrarrestar la señalización vegetal, el efector coronatina de *Pst* y los efectores del sistema de secreción de tipo III: AvrB, HopBB1, HopX1 y HopZ1a se dirigen al receptor de la proteína CORONATINE-INSENSITIVE PROTEIN 1 (COI1) o a los represores transcripcionales JASMONATE ZIM DOMAIN-CONTAINING (JAZ) para activar la señalización de jasmonato. Esto modula la expresión de los factores de transcripción ANAC19, ANAC55 y ANAC7, que actúan reprimiendo al gen *ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 (ICS1)* y promueven la expresión del gen *SALICYLATE / BENZOATE CARBOXYL METHYLTRANSFERASE 1 (BSMT1)*, que están involucrados en la biosíntesis y la inactivación de SA, respectivamente. Esta modulación en la expresión da como resultado niveles reducidos de SA e inhibición del cierre estomático desencadenado por PAMP. (Tomado de Xin *et al.*, 2018)

Los efectores antes mencionados, son parte de un total de 28 T3Es reportados en *Pst*. Desafortunadamente, el estudio de los roles funcionales de cada uno de ellos es complicado, ya que, la ausencia particular de uno solo de estos efectores resulta en poca o ninguna reducción en la virulencia bacteriana. Este hallazgo indica que los T3Es funcionan de manera "multifuncional, cooperativa y redundante". Lo anterior, plantea una pregunta importante: ¿cuál es el repertorio mínimo de T3Es que debe poseer *Pst* para convertirse en un patógeno virulento? La respuesta a esta interrogante fue proporcionada por Cunnac *et al.*, quienes identificaron un conjunto de 8 T3Es mínimos requeridos para mantener la virulencia de *Pst* (Cunnac *et al.*, 2011; Xin y He, 2013).

Se sabe que seis de estos efectores están involucrados en la supresión de las respuestas de inmunidad del huésped. En este sentido, AvrPtoB induce la degradación o la inhibición de la actividad quinasa de los receptores FLS2 y CERK1. HopG1 y HopE1 se dirigen a los filamentos de actina y microtúbulos, respectivamente, lo que contribuye a inhibir la deposición de callosa. HopAM1 induce hipersensibilidad al ácido abscísico (ABA) en la planta y aumenta la virulencia durante las condiciones de sequía. HopN1 suprime la producción de ROS y la deposición de callosa. Mientras que HopAA1-1 funciona sinérgicamente con los efectores anteriores. Por otro lado, HopM1 y AvrE, inducen la acumulación de líquido en el apoplasto para establecer un ambiente apoplástico acuoso. Dicho proceso, apoya potencialmente el crecimiento bacteriano a través de la accesibilidad a los nutrientes de la planta y la dilución de los compuestos antimicrobianos (Cunnac *et al.*, 2011; Xin y He, 2013).

Por último, es importante mencionar que independientemente de la actividad de los efectores de *Pst*, su finalidad es contribuir al crecimiento de la bacteria en el apoplasto de la planta; condición que se ve fortalecida por la actividad de la fitotoxina coronatina. Lo anterior, en conjunto con las condiciones ambientales adecuadas (por ejemplo, alta humedad), permiten el establecimiento de la enfermedad bacteriana (Xin *et al.*, 2018).

I.VI.III Coronatina

La coronatina (COR) es una imitación molecular del JA-Ile, que es la forma activa de la hormona vegetal jasmonato. De esta forma, la COR influye en el equilibrio hormonal de la planta, activa la vía de señalización del JA y suprime la defensa de PTI mediada por el SA a través de la interacción antagónica entre estas hormonas, con lo cual mejora la virulencia bacteriana. Para cumplir con este objetivo, al igual que sucede con JA-Ile, la COR facilita la formación del complejo SCF^{COR1}-JAZ, lo que a su vez induce la degradación, vía proteosoma 26S, de las proteínas JAZ. Tras la degradación de sus represores, los factores de transcripción MYC (*MYC2*, *MYC3* y *MYC4*) se liberan, conduciendo a la activación de la transcripción de genes que responden a JA, dentro de los cuales se encuentran los factores de

transcripción ANAC19, ANAC55 y ANAC72. Estos últimos son responsables de suprimir la acumulación de SA mediante la regulación del gen *ICS1* implicado en la biosíntesis de SA y del gen *BSMT1*, responsable de la modificación del SA a meSA. Además, los factores de transcripción de NAC son necesarios para la reapertura estomática inducida por COR (Zheng *et al.*, 2012; Geng *et al.*, 2014).

Otros de los procesos en los que participa COR son: contribuir al desarrollo de síntomas de la enfermedad clorótica, promover la susceptibilidad sistémica al mejorar la virulencia bacteriana, suprimir el depósito de callosa, perturbar la señalización de auxinas y ABA. También se ha reportado que la COR inhibe el cierre del estoma al suprimir la producción de ROS mediada por la NADPH oxidasa. Desafortunadamente, aún se desconoce en gran medida los componentes de señalización que conducen a estos diversos efectos (Zheng *et al.*, 2012; Geng *et al.*, 2014; Xin *et al.*, 2018).

II. ANTECEDENTES

II.I Base de datos BAR uToronto

Actualmente, diversos reportes experimentales postulan que los procesos de síntesis, catabolismo y conjugación de PAs cumplen roles esenciales en la modulación de la respuesta inmune de la planta (ver sección I.III PAs EN INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO). Por el contrario, no existen reportes sobre la participación del transporte de PAs en el proceso de defensa vegetal. Sin embargo, esto no implica que no contribuyan en dicho proceso. En este sentido, y a modo de establecer o descartar la intervención del transporte de PAs en la respuesta inmune de la planta, se realizó una búsqueda en la base de datos The Bio-Analytic Resource for Plant Biology de la Universidad de Toronto (BAR uToronto; <https://bar.utoronto.ca/eplant/>).

La base de datos BAR uToronto es una herramienta bioinformática que permite realizar múltiples funciones, por ejemplo, explorar la expresión génica bajo diversos estímulos y etapas de crecimiento vegetal, realizar análisis de promotores, examinar las interacciones proteína-proteína, entre otros. Los resultados obtenidos, de la base de datos, se pueden usar para el diseño de experimentos o bien, generar hipótesis *in silico*, que luego pueden ser validadas en el laboratorio (Waese y *et al.*, 2017). En nuestro caso, esta base de datos nos permitió conocer la modulación en los niveles de expresión de los cinco transportadores *AtPUT* de *A. thaliana* en respuesta al patógeno *P. syringae*.

Los resultados obtenidos de la base de datos se muestran en la Figura 16 y la Tabla 1. Tras el análisis de estos datos, se observó que los niveles de expresión de los genes *AtPUT4* y *AtPUT5* incrementan posterior a la infiltración con *Pst* o Mock (MgCl₂ 10 mM), es decir, el incremento es independiente del estímulo infiltrado, lo que sugiere que estos genes se activan en respuesta al daño mecánico inducido por la inoculación. Los niveles de expresión para *AtPUT3* a 24 hpi sugieren que este gen se reprime en respuesta al patógeno *Pst*. Además, la base de datos reporta un comportamiento similar tras la inoculación con *Botrytis cinerea* a 48 hpi

(datos no mostrados), queda por determinar si esta represión es parte de la respuesta de defensa de la planta, y como contribuye a la misma.

Por otra parte, de acuerdo con la información de la base de datos, los genes *AtPUT1* y *AtPUT2* son los únicos que incrementan su expresión en respuesta a *Pst*, siendo esta mayor a la observada para el Mock (Tabla 1); dicho resultado, sugiere la posible implicación de estos transportadores en la respuesta de defensa de la planta contra *Pst*.

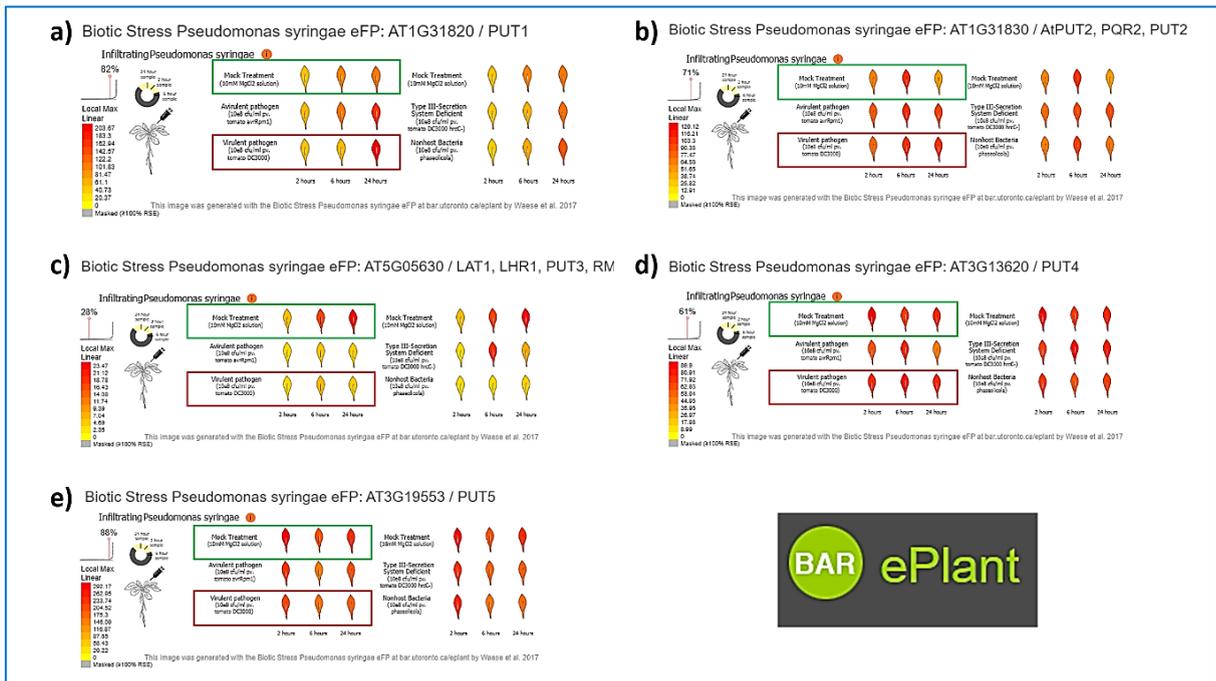


Figura 16. Niveles de expresión de los transportadores *AtPUT* en respuesta a *Pst* de acuerdo con la base de datos uBar Toronto. De acuerdo con lo reportado por la base de datos, el procedimiento para la obtención de estos resultados es el siguiente: se infiltraron plantas Col-0 de 5 semanas de edad con Mock o *Pseudomonas syringae*. Después, estas plantas, se procesaron a 2, 6 y 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) para extraer RNA, mismo que se hibridó con el ATH1 Genechip. Finalmente, se obtuvieron los resultados de los cambios en los niveles de expresión para los genes: a) *AtPUT1*, b) *AtPUT2*, c) *AtPUT3*, d) *AtPUT4* y e) *AtPUT5*. Se resaltan con rectángulos verde y rojo, los resultados para Mock (solución 10 mM $MgCl_2$) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, respectivamente (Tomado de <https://bar.utoronto.ca/epplant/>).

Tabla 1. Cambios en los niveles de expresión de los genes *AtPUT* tras la infiltración con una solución de MgCl₂ 10 mM (Mock) o *Pst*.

Tiempos (h)	AtPUT1		AtPUT2		AtPUT3		AtPUT4		AtPUT5	
	<i>Pst</i>	Mock	<i>Pst</i>	Mock	<i>Pst</i>	Mock	<i>Pst</i>	Mock	<i>Pst</i>	Mock
2	45.03	45.4	73.93	61.5	3.2	5.73	73.97	89.9	292.17	204.53
6	51.97	95.77	102.83	103.23	6.13	16.83	81.4	68.07	192.13	160.83
24	203.67	106.1	102.43	47.13	4.3	22.07	74.77	75.17	232.67	179.93

*En verde se resaltan los incrementos en la expresión de los genes *AtPUT1* y *AtPUT2* en respuesta a *Pst*.

En conjunto, los resultados obtenidos de la base de datos sugieren una regulación diferencial en la expresión de los genes *AtPUT* en respuesta a estímulos externos, bajo un proceso que depende, probablemente, del rol que desempeña cada transportador en la respuesta ante dichos estímulos.

II.II Niveles de expresión de los transportadores de PAs en la interacción *A. thaliana*-*Pst*.

Aunado a los resultados antes presentados, en el Laboratorio de Interacción Planta Microorganismo (LIPM) de la Facultad de Ciencias se obtuvieron resultados preliminares de la expresión de los genes *AtPUT* en plantas silvestres de *A. thaliana* tras la interacción con *Pst* (Figura 18). Los resultados obtenidos reflejan un incremento en la expresión de los genes que codifican para *AtPUT1*, *AtPUT2*, *AtPUT3* y *AtPUT5* a 24 hpi con una disminución a 48 y 72 hpi. En lo que respecta al gen *AtPUT4*, los resultados sugieren que su expresión es constitutiva, ya que no existe variación observable en ninguno de los tiempos analizados, este dato coincide con lo reportado por la base de datos.

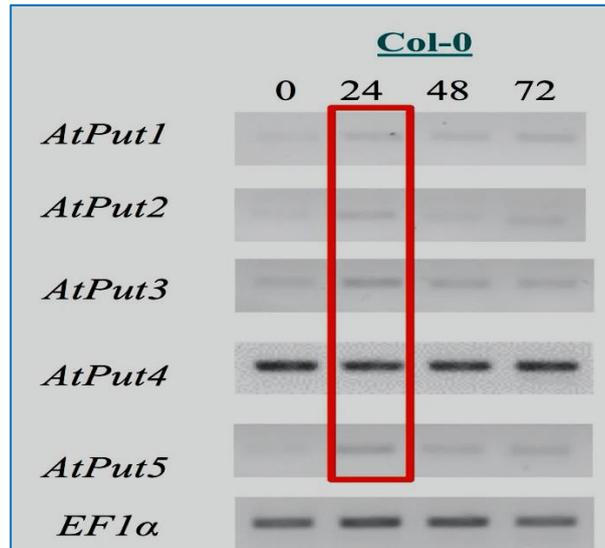


Figura 17. Niveles de expresión de los transportadores de *A. thaliana* en respuesta a *Pst* obtenidos en el LIPM. El procedimiento para la obtención de estos resultados es el siguiente: se inocularon hojas de plantas de *Arabidopsis* de 15 días de edad con 5 uL de una solución Mock ($MgCl_2$ 10mM pH 7.0) o *Pst* a una OD_{600} de 0.4. Tras 0, 24, 48 y 72 hpi se extrajo RNA, mismo que se convirtió a cDNA. Finalmente se realizó un PCR de punto final, con su respectivo gel, para visualizar los niveles de expresión de cada transportador. Se utilizó el gen *EF1α* como gen de referencia. Se resalta con un recuadro rojo el tiempo de 24 hpi, que fue, de los tiempos evaluados, en el cual la mayoría de los genes *AtPUT* incrementaron su expresión (*AtPUT1*, *AtPUT2*, *AtPUT3* y *AtPUT5*). Por otro lado, pareciera que *AtPUT4* presenta una expresión constitutiva, ya que no varió a lo largo de los tiempos evaluados (Rivera-Rodríguez, estancia verano de la ciencia 2017)

En conclusión, ambos resultados sugieren que la respuesta de defensa de *A. thaliana* contra *Pst*, incluye un incremento en los niveles de expresión de los genes *AtPUT*, vinculando al transporte de PAs con la interacción planta-patógeno. Queda por elucidar cómo contribuye este proceso al desarrollo de la respuesta inmune.

III. JUSTIFICACIÓN

A la fecha, se desconoce cómo contribuye el transporte de PAs en la respuesta de defensa de la planta, por lo que su estudio nos permitirá entender:

- Si existen transportadores de PAs con roles específicos en estrés biótico.
- La relevancia del transporte de PAs en la movilización de estas moléculas a sus sitios de catabolismo con la subsecuente producción de especies reactivas de oxígeno en plantas infectadas.

Finalmente, conjuntar este conocimiento con el reportado previamente nos permitirá tener una visión más amplia de la participación de las PAs en la defensa vegetal y a partir de aquí se podrían generar estrategias para el control de fitopatógenos.

IV. HIPÓTESIS

La alteración del transporte de PAs a través del silenciamiento de los genes *AtPUT* compromete la respuesta de defensa de la planta ante el ataque de patógenos y altera marcadores moleculares de señalización hormonal particularmente de los ácidos salicílico y jasmónico implicados en defensa.

V. OBJETIVOS

V.I Objetivo general

Evaluar la participación de los transportadores de PAs de *Arabidopsis thaliana* en respuesta al estrés biótico inducido por *Pseudomonas syringae*.

V.II Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtPUT1-5* en interacción con *Pseudomonas syringae* (*Pst*).
2. Determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno en las líneas mutantes *Atput* en interacción con *Pst*.
3. Evaluar genes marcadores de señalización hormonal en las líneas mutantes *Atput* en interacción con *Pst*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.I Material vegetal

En el presente trabajo se empleó la planta modelo *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia 0 (Col-0) como control de los experimentos realizados (indicada en adelante como WT). Además, se emplearon líneas mutantes insercionales de T-DNA para genes que codifican transportadores de importe de PAs de la familia AtPUT: *Atpu1-1* (GABi_890C10), *Atpu2-1* (SALK_119707C), *Atpu3-1* (SALK_206472C), *Atpu4-1* (SAIL_1275_C06), *Atpu5-1* (SALK_122097) y *Atpu5-2* (SALK_007135), las cuales fueron adquiridas a través del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (www.signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress). Todas las líneas presentan la inserción de T-DNA dentro de la región codificante, exceptuando la línea SAIL_1275_C06 en la cual el T-DNA cae dentro de un intrón (Figura 18).

VI.II Genotipificación y análisis de expresión de las líneas mutantes insercionales

La genotipificación de las líneas insercionales, para obtener líneas homocigotas a la inserción de T-DNA, se realizó por PCR de punto final en un termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems, Singapur). Los cebadores que flanquean el T-DNA y los específicos de la inserción se muestran en la Tabla suplementaria 1. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L empleado 1 μ g de gDNA como templado, 2.5 μ L de buffer de reacción 10X, 1.5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 0.5 μ L de dNTP's 5 mM, 1 μ L de la pareja de oligonucleótidos respectiva (ambos a una concentración de 10 pmol/ μ L), 0.5 μ L de enzima *Taq* DNA polimerasa casera y 18 μ L de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5 min a 95 °C (desnaturalización inicial) seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s (desnaturalización), 60 °C por 30 s (alineamiento) y 72 °C con un tiempo determinado por el tamaño del amplicón y la velocidad de síntesis de DNA de la enzima *Taq* DNA polimerasa utilizada (1 kb/minuto) (extensión). Por ultimo, 7 minutos de extensión final a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados por

electroforesis en un gel de agarosa 1.2 % a un voltaje de 70 mV durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, el gel, se visualizó en un trasiluminador de luz UV y se adquirió la imagen.

Los niveles de expresión de cada uno de los genes *AtPUT* se evaluó en las líneas mutantes de T-DNA respectivas, mediante qPCR (ver sección VI.VIII Análisis de expresión génica). El gen *AtEF1 α* (At5g60390) se utilizó como gen de referencia.

VI.III Condiciones de crecimiento

En lo que respecta a las semillas, se contaron en cantidad suficiente para el experimento respectivo y se colocaron en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL donde se desinfectaron superficialmente con 1 mL de etanol al 96 % y agitación a 1800 rpm por 2 minutos en un equipo MixMate (Eppendorf Hauppauge, USA), posteriormente se retiró el etanol y se sustituyó por una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) durante 7 minutos bajo las mismas condiciones de agitación. Finalmente, se lavó seis veces con agua destilada estéril. El proceso anteriormente descrito se llevó a cabo en una campana de flujo laminar modelo CFLH-12OE (Novatech, México) a temperatura ambiente.

Las semillas se vernalizaron en oscuridad durante 48 h a 4°C; transcurrido este tiempo se sembraron en placas con medio Murashige y Skoog (MS) 0.5X, pH 5.7 o en maceta con un sustrato comercial estéril compuesto por sunshine#3:vermiculita:perlita, en proporción 3:1:1 respectivamente. Para ambos casos el cultivo se realizó bajo condiciones controladas en cuarto de crecimiento con fotoperiodo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) y una temperatura de 21 \pm 2° C.

VI.IV Cepa bacteriana, inoculación de plantas y estimación de títulos bacterianos en planta

La cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) se cultivó en medio King B líquido suplementado con rifampicina (50 μ g/mL) a 28 °C con agitación constante en una incubadora modelo MaxQ4000 (Thermo Scientific, Alemania).

Para la inoculación de la planta, el cultivo bacteriano se centrifugó a 7 000 xg por dos minutos en microcentrífuga MiniSpin modelo 5452 (Eppendorf AG, Alemania), se eliminó el sobrenadante y se adicionó MgCl₂ 10 mM pH 7.0, en cantidad suficiente para obtener una suspensión bacteriana a una OD₆₀₀ de 0.05, que se determinó en un espectrofotómetro UV-Vis modelo 6135 (Eppendorf AG, Alemania). Las plantas de *A. thaliana* WT y mutantes (*Atput1-1* a *Atput5-2*) de cuatro semanas de edad fueron inoculadas mediante infiltración con jeringa (sin aguja, 1 mL de capacidad) en el envés de la hoja (tres hojas por planta) y se colectó muestra a 72 horas posteriores a la inoculación (hpi). Como controles se utilizaron plantas infiltradas con MgCl₂ 10 mM pH 7.0.

Para estimar los títulos bacterianos en la planta, se obtuvo un bocado de 0.5 cm de diámetro de cada una de las hojas inoculadas. Se colocaron los tres bocados de una misma planta (una réplica biológica) en un tubo tipo Eppendorf junto con 200 µL de MgCl₂ 10 mM pH 7.0 para posteriormente homogenizar el tejido con ayuda de un pistilo. De cada uno de los extractos, se hicieron diluciones seriadas desde 1:10 hasta 1:1x10⁹, posteriormente se sembraron 10 µL de cada dilución en medio agar King B sólido, suplementado con rifampicina (50 µg/mL). Finalmente, tras 24 h de incubación a 28 °C en una incubadora (Novatech, México), se estimaron el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para cada línea se analizaron seis réplicas biológicas.

VI.V Evaluación de la respuesta sistémica adquirida (SAR)

Para inducir SAR, se infiltraron con jeringa tres hojas inferiores (hojas 8-10) de plantas WT o mutantes *Atput1-1* a *Atput5-2* (de 6 semanas, crecidas bajo condiciones de día corto: 8 h luz / 16 h oscuridad en cámara de crecimiento modelo 800D RTOP) con una suspensión de *Pst* a una OD₆₀₀ de 0.02 o con MgCl₂ 10 mM, pH 7.0 como control. Transcurridas 48 hpi, se inocularon tres hojas superiores (hojas 12-14) de todas las plantas con una suspensión de *Pst* a una OD₆₀₀ de 0.05. Finalmente, tras 72 h posteriores a la segunda inoculación, se determinaron los títulos bacterianos en las hojas superiores infiltradas, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Es importante mencionar que para ambas

inoculaciones se utilizó la cepa virulenta *Pst*, ya que se ha demostrado que también puede inducir SAR (Macho y *et al.*, 2010). Se realizaron seis replicas biológicas por tratamiento (Chen y *et al.*, 2018; Rufián y *et al.*, 2019).

VI.VI Extracción de RNA

Para analizar los niveles de expresión de los genes de interés, se colectó y congeló (en nitrógeno líquido) tejido de plantas de 4 semanas de edad (aprox. 50 mg), con y sin interacción con *Pst*, a 24 hpi en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL previamente rotulados. Posteriormente, el tejido, se maceró con ayuda de un pistilo. Para la extracción de RNA total se hizo uso del método de TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Para lo cual se adicionaron 500 μ L del reactivo al tejido homogenizado, se mezcló por vortex modelo G560 (Scientific Industries, USA) durante 15 segundos y se dejó actuar por 5 min, posteriormente se adicionaron 100 μ L de cloroformo y se incubó por 7 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó por 15 min a 9 000 xg a 4°C en una centrifuga refrigerada modelo MicroCL 21R (Thermo Fisher, Alemania). El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo estéril nuevo junto con 500 μ L de isopropanol absoluto para precipitar el RNA, se mezcló por inversión y se dejó reposar 10 min en hielo. Enseguida se centrifugó a 10 000 xg por 10 min a 4°C, tras lo cual se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 75 %. A continuación, se centrifugó por 10 minutos a 10 000 xg , tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se invirtió el tubo en papel absorbente por 8 minutos para secar la pastilla. Finalmente, el RNA total se resuspendió en 30 μ L de agua DEPC al 0.1 %. El RNA obtenido se almacenó a una temperatura de -80°C en un ultracongelador modelo U410 -86 (New Brunswick Scientific, USA).

Para verificar la integridad del RNA, la muestra (2 μ L de RNA total) fue desnaturalizada por calor (5 minutos a 95 °C) empleando 6 μ L buffer de desnaturalización (formamida 50%); y separada en un gel de agarosa al 1% con un potencial de 70 mV durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se visualizó la integridad del RNA en un transiluminador de luz UV. La cuantificación del RNA total obtenido fue determinada en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA),

VI.VII Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis de cDNA, se partió de 1 µg del RNA total extraído previamente. Inicialmente se eliminó el DNA genómico de la muestra, mediante tratamiento con la enzima DNase I (Thermo Scientific) durante 40 minutos a 37 °C, posteriormente se adicionó 1 µL de EDTA 50 mM y se dejó reaccionar durante 10 minutos a 65 °C para detener la actividad de la enzima. Tras la eliminación del DNA, se procedió a la síntesis de cDNA mediante el kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción contenía 1 µg de RNA tratado, 1 µL de oligo-dT (50 mM), 2 µL de dNTP's (10 mM), 4 µL de buffer de reacción 5X, 1 µL de inhibidor de RNasa Ribolock (20 U/µL), 1 µL de transcriptasa reversa (200 U/µL) y 1 µL de agua DEPC al 0.1 %. La reacción se incubó 60 minutos a 42 °C. El cDNA se cuantificó en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se diluyó en una relación 1:5 con agua destilada estéril, para emplearlo como molde en los análisis de expresión por qPCR.

VI.VIII Análisis de expresión génica

Los niveles de expresión génica de cada uno de los genes *AtPUT* y los genes de la Tabla suplementaria 1 se estimaron mediante qPCR utilizando el protocolo Sso Advanced TM Universal SYBR Green Supermix (BioRad) en un termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad). Las condiciones del ciclo térmico de qPCR consistieron en 30 s a 95 °C (desnaturalización inicial) y 40 ciclos de PCR de 10 s a 95 °C (desnaturalización) y 30 s a 61 °C (extensión). Las curvas de fusión (melting curve) se realizaron a partir de 65 °C aumentando gradualmente la temperatura cada 0.5 °C hasta 95 °C. El cambio en la expresión génica en relación con las muestras control se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para cada muestra, se analizó una réplica biológica con sus réplicas técnicas respectivas. Se utilizó el gen *AtEF1α* (At5g60390) como gen de referencia.

VI.IX Análisis histoquímico de ROS

La detección histoquímica de las especies H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ se realizó en hojas de plantas de 15 días infiltradas con *Pst* o MgCl 10 mM pH 7.0 y que fueron colectadas 24 hpi. Para H_2O_2 , las hojas colectadas se infiltraron al vacío durante 1 minuto con 0.1 mg/mL de solución de 3,3-diaminobenzidina (DAB). Después de la infiltración, las plantas se incubaron en oscuridad 24 h a 25 ° C. Transcurrido ese tiempo, se sustituyó la solución de DAB por una solución etanol-glicerol (90 % - 10 %, respectivamente) y se calentó a 70 ° C en una placa de calentamiento modelo 1100 (Labnet International, USA) durante 10 minutos o hasta que la clorofila ya no fue visible (Hernández y *et al.*, 2001; Jasso-Robles y *et al.*, 2016).

Para la detección de $\text{O}_2^{\cdot-}$, el material vegetal se sumergió en una solución NBT 122 μM y se infiltró durante 1 min en una cámara de vacío. Después de la infiltración, las plantas se incubaron 2 h a 30°C en la oscuridad en un horno de hibridación modelo PRO1001204 (BOEKEL Scientific). Finalmente, la clorofila se eliminó del material vegetal como se describió anteriormente.

Para las observaciones microscópicas de la tinción de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$, el material vegetal se montó en un portaobjeto de vidrio en una solución de ácido láctico:fenol:agua 1:1:1 (v/v/v) con ayuda de un estereoscopio modelo GmbH 37081 (Carl Zeiss, Alemania). Finalmente, se tomaron fotografías con un celular y se seleccionaron imágenes representativas de cada línea y tratamiento (Rodríguez y Taleisnik, 2012; Jasso-Robles y *et al.*, 2016; 2020).

VI.X Análisis estadístico

Los resultados experimentales mostrados son producto del resultado de tres replicas biológicas representativas y, se muestran como medias \pm SE. Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) se determinaron mediante T de Student o ANOVA de una vía utilizando PRISM 5.0b (software GraphPad).

VII. RESULTADOS

VIII. CONCLUSIÓN

La alteración del transporte de PAs a través del silenciamiento de los genes *AtPUT*, perturba la respuesta de defensa de *Arabidopsis* ante el ataque de *Pst*.

X. ANEXOS

Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados para genotipificado y análisis de expresión

Propósito	Nombre	AGI codigo	Secuencia del cebador	Referencia
Genotipificar	T-DNA (Salk)	---	JMLB1 5'-GGC AAT CAG CTG TTG CCC GTC TCA CTG GTG-3'	Laringuet <i>et al.</i> , 2003.
	T-DNA (GABi)	---	8474: 5'-ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT-3'	Kleinboelting <i>et al.</i> , 2012
	T-DNA (Sail)	---	LB3 5'-TAG CAT CTG AAT TTC ATA ACC AAT CTC GAT- ACA C-3'	Sessions <i>et al.</i> , 2002
	<i>Atput1-1</i>	GABI-890C10	FW 5'- TAA TCA CTG CGG AGA TGA GTA CAA -3' RV 5'- ATA ACC AAA CAT ATC AGT ACA ATC GG -3'	Este trabajo
	<i>Atput2-1</i>	SALK_119707C	FW 5'- TCA GCA AGG TTG GAT GAA ATG GC -3' RV 5'- GAG TCT GCT GTT GAA GGT CCG -3'	Este trabajo
	<i>Atput3-1</i>	SALK_206472C	FW 5'- ATC TGC GAT TGT TTC TGG GTA TTC -3' RV 5'- AGC CAT TCC AAG TAG CTG AAA AGA -3'	Este trabajo
	<i>Atput4-1</i>	SAIL_1275_C06	FW 5'- TCT GTT CTG ATA CGA CCA ACC C -3' RV 5'- CGT TTT CCC ATC TGC TCT GAT C -3'	Este trabajo
	<i>Atput5-1</i>	SALK_007135	FW 5'- ATT TGA TTC CCC TCA TGG CAG G -3' RV 5'- GAA GCA GAG AAG ATG TCG AAG C -3'	Este trabajo

	<i>Atput5-2</i>	SALK_122097	FW 5'- GGA TCT CTT CAG CTT TTG GTC C -3' RV 5'- CCA AGA ACT ATG ATC ACA CCG C -3'	Este trabajo
qPCR	<i>EF1α</i>	At5g60390	FW 5'- TCC AGC TAA GGG TGC CGC -3' RV 5'- AAC GCC TGT CAA TCT TGG TCA A -3'	Jasso-Robles <i>et al.</i> , 2020
	<i>AtPUT1</i>	At1g31820	FW 5'- ATG GGT CAA ATT CTC AGT CTG TTC T -3' RV 5'- GTA AAA AAC GAG CAG AAA GAT ATA CAG -3'	Este trabajo
	<i>AtPUT2</i>	At1g31830	FW 5'- AGC TGC AGT GAG CAT TGT GAT GA -3' RV 5'- TAC AGA CTA TGA GAA ATT AAG CTT TTT TG -3'	Este trabajo
	<i>AtPUT3</i>	At5g05630	FW 5'- GGA TGG CTC AAG TTC TCA ACA AG -3' RV 5'- TCT GAT CCA AAA TCC AGA AGC AAT GA -3'	Este trabajo
	<i>AtPUT4</i>	At3g13620	FW 5'- GTC AAC GGA GAA CAT CCC AAA G -3' RV 5'- GTT ACA GAA GCA AGG AAC TTA CAT TG -3'	Este trabajo
	<i>AtPUT5</i>	At3g19553	FW 5'- ACC AGT TTC AGG AGT TTC ATC AGA -3' RV 5'- TGT ACA TGA CTT ACC ATG CGC TTT -3'	Este trabajo
	<i>AtPR1</i>	At2G14610	FW 5'- TAT GCT CGG AGC TAC GCA GAA - 3' FW 5'- TCG CTA ACC CAC ATG TTC ACG - 3'	Este trabajo

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S., Ariyaratne, M., Patel, J., Howard, A. E., Kalinoski, A., Phuntumart, V., & Morris, P. F. (2017). Altered expression of polyamine transporters reveals a role for spermidine in the timing of flowering and other developmental response pathways. *Plant Science*, 258, 146-155.
- Albert, I., Böhm, H., Albert, M., Feiler, C. E., Imkampe, J., Wallmeroth, N., Brancato, C., Raaymakers, T. M., Oome, S., Zhang, H., Krol, E., Grefen, C., Gust, A. A., Chai, J., Hedrich, R., Van den Ackerveken, G., & Nürnberger, T. (2015). An RLP23–SOBIR1–BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nature Plants*, 1(10), 1-9.
- Alcázar, R., Fortes, A. M., & Tiburcio, A. F. (2020). Polyamines in plant biotechnology, food nutrition, and human health. *Frontiers in Plant Science*, 11, 120-122.
- Alcázar, R., & Tiburcio, A. F. (2014). Plant polyamines in stress and development: an emerging area of research in plant sciences. *Frontiers in plant science*, 5, 319-321.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., & Altabella, T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology letters*, 28(23), 1867-1876.
- Antognoni, F., Fornalè, S., Grimmer, C., Komor, E., & Bagni, N. (1998). Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. *Plant*, 204(4), 520-527.
- Antognoni, F., Pistocchi, R., & Bagni, N. (1993). Uptake competition between polyamines and analogues in carrot protoplasts. *Plant physiology and biochemistry*, 31(5), 693-698.
- Anwar, R., Mattoo, A. K., & Handa, A. K. (2015). Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. In *Polyamines* (pp. 267-302). Springer, Tokyo.
- Axtell, M. J., & Staskawicz, B. J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell*, 112(3), 369-377.

- Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., & Collmer, A. (2002). A gene in the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Hrp pathogenicity island conserved effector locus, hopPtoA1, contributes to efficient formation of bacterial colonies in planta and is duplicated elsewhere in the genome. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(10), 1014-1024.
- Bagni, N., & Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids*, 20(3), 301-317.
- Bala, S., Asthir, B., & Bains, N. S. (2016). Syringaldazine peroxidase stimulates lignification by enhancing polyamine catabolism in wheat during heat and drought stress. *Cereal Research Communications*, 44(4), 561-571.
- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular plant pathology*, 20(8), 1163-1178.
- Biondi, S., Scaramagli, S., Capitani, F., Maddalena Altamura, M., & Torrigiani, P. (2001). Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. *Journal of Experimental Botany*, 52(355), 231-242.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406.
- Bürger, M., & Chory, J. (2019). Stressed out about hormones: how plants orchestrate immunity. *Cell host & microbe*, 26(2), 163-172.
- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., & Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 10-23.
- Chaouch, S., Queval, G., & Noctor, G. (2012). AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key factor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69(4), 613-627.
- Chai, H., Guo, J., Zhong, Y., Hsu, C. C., Zou, C., Wang, P., Zhu, J. K., & Shi, H. (2020). The plasma-membrane polyamine transporter PUT3 is regulated by the Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 and protein kinase SOS2. *New Phytologist*, 226(3), 785-797.

- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M. K., Yu, K., Sekine, K. T., Gao, Q. M., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature genetics*, 43(5), 421-427.
- Chávez-Martínez, A. I., Jasso-Robles, F. I., Rodríguez-Kessler, M., Sarvajeet, S., Becerra-Flora, A., & Jiménez-Bremont, J. F. (2018). Down-regulation of arginine decarboxylase gene-expression results in reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 506(4), 1071-1077.
- Chen, C. Y., & Heath, M. C. (1991). Cytological studies of the hypersensitive death of cowpea epidermal cells induced by basidiospore-derived infection by the cowpea rust fungus. *Canadian journal of botany*, 69 (6), 1199-1206.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., Guo, H. & Guo, H. (2009). ETHYLENE INSENSITIVE 3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(8), 2527-2540.
- Chen, Y. C., Holmes, E. C., Rajniak, J., Kim, J. G., Tang, S., Fischer, C. R., Mudgett, M. B., & Sattely, E. S. (2018). N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 4920-4929
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814.
- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, 18(8), 1247-1256.
- Coni, S., Di Magno, L., Serrao, S. M., Kanamori, Y., Agostinelli, E., & Canettieri, G. (2019). Polyamine Metabolism as a Therapeutic Target in Hedgehog-Driven Basal Cell Carcinoma and Medulloblastoma. *Cell*, 8(2), 150-162.
- Couto, D., & Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537-552.

- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual review of plant biology*, 66, 487-511.
- Cui, H., Xiang, T., & Zhou, J. M. (2009). Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cellular microbiology*, 11(10), 1453-1461.
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B. H., Russell, A. B., Martin, G. B., & Collmer, A. (2011). Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2975-2980.
- Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and cellular biochemistry*, 262(1-2), 127-133.
- Desaki, Y., Kohari, M., Shibuya, N., & Kaku, H. (2019). MAMP-triggered plant immunity mediated by the LysM-receptor kinase CERK1. *Journal of General Plant Pathology*, 85(1), 1-11.
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: A plant defense hormone. *Trends in Plant Science*. 25(6), 549-565.
- Ding, P., Rekhter, D., Ding, Y., Feussner, K., Busta, L., Haroth, S., Xu, S., Li, X., Jetter, R., Feussner, I., & Zhang, Y. (2016). Characterization of a pipercolic acid biosynthesis pathway required for systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 28(10), 2603-2615.
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*, 173(6), 1454-1467.
- Dou, D., & Zhou, J. M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell host & microbe*, 12(4), 484-495.
- Fariduddin, Q., Varshney, P., Yusuf, M., & Ahmad, A. (2013). Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. *Journal of Plant Interactions*, 8(1), 1-16.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296.

- Fortes, A. M., & Agudelo-Romero, P. (2018). Polyamine metabolism in climacteric and non-climacteric fruit ripening. In *Polyamines* (pp. 433-447). Humana Press, New York.
- Franceschetti, M., Perry, B., Thompson, B., Hanfrey, C., & Michael, A. J. (2004). Expression proteomics identifies biochemical adaptations and defense responses in transgenic plants with perturbed polyamine metabolism. *FEBS letters*, 576(3), 477-480.
- Friedman, R. A., Levin, N., & Altman, A. (1986). Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. *Plant physiology*, 82(4), 1154-1157.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual review of plant biology*, 64, 839-863.
- Fujita, M., & Shinozaki, K. (2014). Identification of polyamine transporters in plants: paraquat transport provides crucial clues. *Plant and Cell Physiology*, 55(5), 855-861.
- Fujita, M., & Shinozaki, K. (2015). Polyamine transport systems in plants. In *Polyamines* (pp. 179-185). Springer, Tokyo.
- Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2012). Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6343-6347.
- Gao, X., Chen, X., Lin, W., Chen, S., Lu, D., Niu, Y., Li, L., Cheng, C., McCormack, M., Sheen, J., He, P., & Shan, L. (2013). Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca²⁺-dependent protein kinases. *PLoS pathogens*, 9(1), 113-127.
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G., & Mackey, D. (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Plants*, 240(6), 1149-1165.
- Gonzalez, M. E., Marco, F., Minguet, E. G., Carrasco-Sorli, P., Blázquez, M. A., Carbonell, J., Ruiz, O., & Pieckenstain, F. L. (2011). Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the

- role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, 156(4), 2266-2277.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13), 751-757.
- Guerra, T., Schilling, S., Hake, K., Gorzolka, K., Sylvester, F. P., Conrads, B., Westermann, B., & Romeis, T. (2020). Calcium-dependent protein kinase 5 links calcium signaling with N-hydroxy-L-pipecolic acid-and SARD 1-dependent immune memory in systemic acquired resistance. *New Phytologist*, 225(1), 310-325.
- Hake, K., & Romeis, T. (2019). Protein kinase-mediated signalling in priming: Immune signal initiation, propagation, and establishment of long-term pathogen resistance in plants. *Plant, cell & environment*, 42(3), 904-917.
- Hanfrey, C., Franceschetti, M., Mayer, M. J., Illingworth, C., & Michael, A. J. (2002). Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44131-44139.
- Hart, J. J., DiTomaso, J. M., Linscott, D. L., & Kochian, L. V. (1992). Transport interactions between paraquat and polyamines in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiology*, 99(4), 1400-1405.
- Hartmann, M., & Zeier, J. (2019). N-Hydroxypipecolic acid and salicylic acid: A metabolic duo for systemic acquired resistance. *Current opinion in plant biology*, 50, 44-57.
- Hernández, J. A., Diaz-Vivancos, P., Barba-Espín, G., & Clemente-Moreno, M. J. (2017). On the role of salicylic acid in plant responses to environmental stresses. In *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone* (pp. 17-34). Springer, Singapore.
- Hickman, R., Mendes, M. P., Van Verk, M. C., Van Dijken, A. J., Di Sora, J., Denby, K., Pieterse, C., & Van Wees, S. C. (2019). Transcriptional Dynamics of the Salicylic Acid Response and its Interplay with the Jasmonic Acid Pathway. *bioRxiv*, 742-754.

- Huang, P. Y., Catinot, J., & Zimmerli, L. (2016). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *Journal of experimental botany*, 67(5), 1231-1241
- Hussain, S. S., Ali, M., Ahmad, M., & Siddique, K. H. (2011). Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology advances*, 29(3), 300-311.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(3), 559-564.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010a). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 506-512.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010b). Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(1), 39-51.
- Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., & Tabata, S. (2004). Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135(3), 1565-1573.
- Ioannidis, N. E., Sfichi, L., & Kotzabasis, K. (2006). Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(7), 821-828.
- Jasso-Robles, F. I., Jiménez-Bremont, J. F., Becerra-Flora, A., Juárez-Montiel, M., Gonzalez, M. E., Pieckenstain, F. L., García R. F., & Rodríguez-Kessler, M. (2016). Inhibition of polyamine oxidase activity affects tumor development during the maize-Ustilago maydis interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 102, 115-124.
- Jia, H., Zhang, C., Pervaiz, T., Zhao, P., Liu, Z., Wang, B., Wang, C., Zhang, L., Fang, J., & Qian, J. (2016). Jasmonic acid involves in grapefruit ripening and resistant against *Botrytis cinerea*. *Functional & integrative genomics*, 16(1), 79-94.
- Jiménez-Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-Gonzalez, M. D. L. L., Rossi, F. R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., Ruiz, O., & Gárriz, A. (2014). Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 95-104.

- Johnson, C., Boden, E., & Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(8), 1846-1858.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Kadota, Y., Shirasu, K., & Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1472-1480.
- Kahana, C. (2018). The antizyme family for regulating polyamines. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18730-18735.
- Kang, J. E., Jeon, B. J., Park, M. Y., Yang, H. J., Kwon, J., Lee, D. H., & Kim, B. S. (2020). Inhibition of the type III secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by resveratrol oligomers identified in *Vitis vinifera* L. *Pest Management Science*, 76(7), 2294-2303.
- Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2011). Identification and assays of polyamine transport systems in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. In *Polyamines* (pp. 295-308). Humana Press, New York.
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *The Arabidopsis Book*, 1, e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>.
- Kim, H. G., Kwon, S. J., Jang, Y. J., Nam, M. H., Chung, J. H., Na, Y. C., Guo, H., & Park, O. K. (2013). GDSL LIPASE1 modulates plant immunity through feedback regulation of ethylene signaling. *Plant physiology*, 163(4), 1776-1791
- Kim, M., Ahn, J. W., Jin, U. H., Choi, D., Paek, K. H., & Pai, H. S. (2003). Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19406-19415.
- Kim, S. H., Kim, S. H., Yoo, S. J., Min, K. H., Nam, S. H., Cho, B. H., & Yang, K. Y. (2013). Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 437(4), 502-508.
- Kim, W., Zeljković, S. Ć., Piskurewicz, U., Megies, C., Tarkowski, P., & Lopez-Molina, L. (2019). Polyamine uptake transporter 2 (PUT2) and decaying

- seeds enhance phyA-mediated germination by overcoming PIF1 repression of germination. *PLoS genetics*, 15(7), 82-92.
- Klessig, D. F., Choi, H. W., & Dempsey, D. M. A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Molecular plant-microbe interactions*, 31(9), 871-888.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Plants*, 228(3), 367-381.
- Li, J., Mu, J., Bai, J., Fu, F., Zou, T., An, F., Zhang, J., Jing, H., Wang, Q., Li, Z., Yang, S. & Zuo, J. (2013). Paraquat Resistant 1, a Golgi-localized putative transporter protein, is involved in intracellular transport of paraquat. *Plant physiology*, 162(1), 470-483.
- Li, L., Kim, P., Yu, L., Cai, G., Chen, S., Alfano, J. R., & Zhou, J. M. (2016). Activation-dependent destruction of a co-receptor by a *Pseudomonas syringae* effector dampens plant immunity. *Cell host & microbe*, 20(4), 504-514.
- Li, N., Han, X., Feng, D., Yuan, D., & Huang, L. J. (2019). Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? *International journal of molecular sciences*, 20(3), 671-686.
- Li, Z., Liu, H., Ding, Z., Yan, J., Yu, H., Pan, R., Hu, J., Guan, Y., & Hua, J. (2020). Low temperature enhances plant immunity via salicylic acid pathway genes that are repressed by ethylene. *Plant physiology*, 182(1), 626-639.
- Lim, G. H., Liu, H., Yu, K., Liu, R., Shine, M. B., Fernandez, J., Burch-Smith, T., Mobley, J., McLetchie, N., Kachroo, A. & Kachroo, P. (2020). The plant cuticle regulates apoplastic transport of salicylic acid during systemic acquired resistance. *Science Advances*, 6(19), 478-492.
- Lim, G. H., Shine, M. B., de Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, A. G., Lee, J. Y., Kachroo, A. & Kachroo, P. (2016). Plasmodesmata localizing proteins regulate transport and signaling during systemic acquired immunity in plants. *Cell host & microbe*, 19(4), 541-549.

- Lolle, S., Stevens, D., & Coaker, G. (2020). Plant NLR-triggered immunity: from receptor activation to downstream signaling. *Current Opinion in Immunology*, 62, 99-105.
- Macho, A. P., Guevara, C. M., Tornero, P., Ruiz-Albert, J., & Beuzón, C. R. (2010). The *Pseudomonas syringae* effector protein HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New phytologist*, 187(4), 1018-1033.
- Mackey, D., Holt III, B. F., Wiig, A., & Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell*, 108(6), 743-754.
- Marco, F., Alcázar, R., Tiburcio, A. F., & Carrasco, P. (2011). Interactions between polyamines and abiotic stress pathway responses unraveled by transcriptome analysis of polyamine overproducers. *Omics: a journal of integrative biology*, 15(11), 775-781.
- Marco, F., Busó, E., & Carrasco, P. (2014). Overexpression of SAMDC1 gene in *Arabidopsis thaliana* increases expression of defense-related genes as well as resistance to *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Frontiers in plant science*, 5, 115-124.
- Martinis, J., Gas-Pascual, E., Szydlowski, N., Crèvecoeur, M., Gisler, A., Bürkle, L., & Fitzpatrick, T. B. (2016). Long-distance transport of thiamine (vitamin B1) is concomitant with that of polyamines. *Plant Physiology*, 171(1), 542-553.
- Martin-Tanguy, J., Martin, C., Gallet, M., & Vernoy, R. (1976). Potent natural inhibitors of tobacco mosaic virus multiplication. *Sciences naturelles*, 282(24), 2231-2234.
- Masson, P. H., Takahashi, T., & Angelini, R. (2017). Molecular mechanisms underlying polyamine functions in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 14-17.
- Mattoo, A. K., Chung, S. H., Goyal, R. K., Fatima, T., Solomos, T., Srivastava, A., & Handa, A. K. (2007). Overaccumulation of higher polyamines in ripening transgenic tomato fruit revives metabolic memory, upregulates anabolism-related genes, and positively impacts nutritional quality. *Journal of AOAC International*, 90(5), 1456-1464.
- Moschou, P. N., Sarris, P. F., Skandalis, N., Andriopoulou, A. H., Paschalidis, K. A., Panopoulos, N. J., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2009). Engineered

- polyamine catabolism preinduces tolerance of tobacco to bacteria and oomycetes. *Plant Physiology*, 149(4), 1970-1981.
- Moschou, P. N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2012). The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of experimental botany*, 63(14), 5003-5015.
- Mulangi, V., Chibucos, M. C., Phuntumart, V., & Morris, P. F. (2012a). Kinetic and phylogenetic analysis of plant polyamine uptake transporters. *Plants*, 236(4), 1261-1273
- Mulangi, V., Phuntumart, V., Aouida, M., Ramotar, D., & Morris, P. (2012b). Functional analysis of OsPUT1, a rice polyamine uptake transporter. *Plants*, 235(1), 1-11.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of experimental Botany*, 59(3), 501-520.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., & Nishioka, T. (2009). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 230(3), 517-527.
- Nascimento, F. X., Rossi, M. J., & Glick, B. R. (2018). Ethylene and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in plant–bacterial interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 114-131.
- Németh, M., Janda, T., Horváth, E., Páldi, E., & Szalai, G. (2002). Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science*, 162(4), 569-574.
- Ndamukong, I., Abdallat, A. A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., & Gatz, C. (2007). SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. *The Plant Journal*, 50(1), 128-139.
- Noman, A., Aqeel, M., Qari, S. H., Al Surhane, A. A., Yasin, G., Hashem, M., & Al-Saadi, A. (2020). Plant hypersensitive response vs pathogen ingress: Death of few gives life to others. *Microbial Pathogenesis*, 145, 104-124.

- Oome, S., Raaymakers, T. M., Cabral, A., Samwel, S., Böhm, H., Albert, I., Nürnberger T & Van den Ackerveken, G. (2014). Nep1-like proteins from three kingdoms of life act as a microbe-associated molecular pattern in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16955-16960.
- Pagán, I., & García-Arenal, F. (2018). Tolerance to plant pathogens: Theory and experimental evidence. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 810-827.
- Pál, M., Kovács, V., Vida, G., Szalai, G., & Janda, T. (2013). Changes induced by powdery mildew in the salicylic acid and polyamine contents and the antioxidant enzyme activities of wheat lines. *European journal of plant pathology*, 135(1), 35-47.
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., Peeva, V., Végh, B., & Janda, T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), 308-316.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 489-521.
- Pistocchi, R., Bagni, N., & Creus, J. A. (1987). Polyamine uptake in carrot cell cultures. *Plant physiology*, 84(2), 374-380.
- Podlešáková, K., Ugena, L., Spíchal, L., Doležal, K., & De Diego, N. (2018). Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway. *New biotechnology*. 25 (48), 53-65.
- Pottosin, I., Velarde-Buendía, A. M., Bose, J., Fuglsang, A. T., & Shabala, S. (2014). Polyamines cause plasma membrane depolarization activate Ca²⁺ and modulate H⁺-ATPase pump activity in pea roots. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2463-2472.

- Prasad, A., Sedlářová, M., Balukova, A., Rác, M., & Pospíšil, P. (2019). Reactive oxygen species as a response to wounding: in vivo imaging in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1660-1670.
- Purayannur, S., Kumar, K., & Verma, P. K. (2017). Genetic engineering to improve biotic stress tolerance in plants. In *Plant Biotechnology: Principles and Applications* (pp. 207-232). Springer, Singapore.
- Qi, C. H., Zhao, X. Y., Jiang, H., Liu, H. T., Wang, Y. X., Hu, D. G., & Hao, Y. J. (2018). Molecular cloning and functional identification of an apple flagellin receptor MdFLS2 gene. *Journal of integrative agriculture*, 17(12), 2694-2703.
- Qi, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2011). Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. *Molecular plant pathology*, 12(7), 702-708.
- Ramirez-Prado, J. S., Abulfaraj, A. A., Rayapuram, N., Benhamed, M., & Hirt, H. (2018). Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. *Trends in plant science*, 23(9), 833-844.
- Ranf, S. (2017). Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Current opinion in plant biology*, 38, 68-77.
- Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y. A., Sanchez-Carballo, P. M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J., & Scheel, D. (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature immunology*, 16(4), 426-433.
- Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Lipka, V., Wiermer, M., Zhang, Y., & Feussner, I. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science*, 365(6452), 498-502.
- Rietz, S., Stamm, A., Malonek, S., Wagner, S., Becker, D., Medina-Escobar, N., Vlot, A. K., Feys, B. J., Niefind K., & Parker, J. E. (2011). Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in *Arabidopsis* immunity. *New Phytologist*, 191(1), 107-119.
- Rodríguez, A. A. & Taleisnik E. L. (2012). Determination of Reactive Oxygen Species in Salt-Stressed Plant Tissues. *Methods in Molecular Biology* 913, 225-236.

- Rodríguez-Kessler, M., Ruiz, O. A., Maiale, S., Ruiz-Herrera, J., & Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(8-9), 805-814.
- Rossi, F. R., Romero, F. M., Ruíz, O. A., Marina, M., & Gárriz, A. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of mutant plants in polyamine metabolism genes during pathogenic interactions. In *Polyamines* (pp. 405-416). Humana Press, New York.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Chen, J. & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2479-2492.
- Rufián, J. S., Rueda-Blanco, J., Beuzón, C. R., & Ruiz-Albert, J. (2019). Protocol: an improved method to quantify activation of systemic acquired resistance (SAR). *Plant methods*, 15(1), 16-24.
- Saijo, Y., & Loo, E. P. I. (2020). Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist*, 225(1), 87-104.
- Salguero-Linares, J., & Coll, N. S. (2019). Plant proteases in the control of the hypersensitive response. *Journal of Experimental Botany*, 70(7), 2087-2095.
- Sayas, E., Pérez-Benavente, B., Manzano, C., Farras, R., Alejandro, S., del Pozo, J. C., Ferrando, A. & Serrano, R. (2019). Polyamines interfere with protein ubiquitylation and cause depletion of intracellular amino acids: a possible mechanism for cell growth inhibition. *FEBS letters*, 593(2), 209-218.
- Schulze, E. D., Beck, E., Buchmann, N., Clemens, S., Müller-Hohenstein, K., & Scherer-Lorenzen, M. (2019). *Biotic Stress*. *Plant Ecology*, 257-299.
- Seifi, H. S., & Shelp, B. J. (2019). Spermine differentially refines plant defense responses against biotic and abiotic stresses. *Frontiers in plant science*, 10, 117-125.
- Shen, Y., Ruan, Q., Chai, H., Yuan, Y., Yang, W., Chen, J., Xin, Z. & Shi, H. (2016). The *Arabidopsis* polyamine transporter LHR 1/PUT 3 modulates heat responsive gene expression by enhancing mRNA stability. *The Plant Journal*, 88(6), 1006-1021.
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun Y & Zuo, J. (2007). Involvement of sphingoid bases in

- mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell research*, 17(12), 1030-1040.
- Shigenaga, A. M., & Argueso, C. T. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *In Seminars in Cell & Developmental Biology*, 56, 174-189.
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2019). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant science*, 279, 81-86.
- Sobieszczuk-Nowicka, E. (2017). Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino Acids*, 49(1), 49-56.
- Soudek, P., Ursu, M., Petrová, Š., & Vaněk, T. (2016). Improving crop tolerance to heavy metal stress by polyamine application. *Food chemistry*, 213, 223-229.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell host & microbe*, 3(6), 348-351.
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, M. L., & Tari, I. (2009). Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology*, 166(9), 914-925.
- Takahashi, T., & Kakehi, J. I. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of botany*, 105(1), 1-6.
- Takahashi, Y., Berberich, T., Miyazaki, A., Seo, S., Ohashi, Y., & Kusano, T. (2003). Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *The Plant Journal*, 36(6), 820-829.
- Takken, F. L., & Govere, A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current opinion in plant biology*, 15(4), 375-384.
- Tavladoraki, P., Cona, A., & Angelini, R. (2016). Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Frontiers in plant science*, 7, 824-835.

- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics*, 37(10), 1130-1134.
- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology*, 141(2), 373-378.
- Tsaniklidis, G., Kotsiras, A., Tsafouros, A., Roussos, P. A., Aivalakis, G., Katinakis, P., & Delis, C. (2016). Spatial and temporal distribution of genes involved in polyamine metabolism during tomato fruit development. *Plant physiology and biochemistry*, 100, 27-36.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, 13(4), 459-465.
- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C. J., Tsuda, Y., Glazebrook, J., Sato, M. & Katagiri, F. (2013). Dual regulation of gene expression mediated by extended MAPK activation and salicylic acid contributes to robust innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*, 9(12), 1004-1015.
- van der Burgh, A. M., & Joosten, M. H. (2019). Plant immunity: thinking outside and inside the box. *Trends in plant science*. 24 (7), 587-601.
- Velásquez, A. C., Oney, M., Huot, B., Xu, S., & He, S. Y. (2017). Diverse mechanisms of resistance to *Pseudomonas syringae* in a thousand natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 214(4), 1673-1687.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16(1), 86-96.
- Vilas, J. M., Romero, F. M., Rossi, F. R., Marina, M., Maiale, S. J., Calzadilla, P. I., Pieckenstein, F. L., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2018). Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and *Pseudomonas syringae*. *Journal of plant physiology*, 231, 281-290.
- Vos, I. A., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. C. (2013). Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathology*, 62, 43-55.

- Vurro, M., Bonciani, B., & Vannacci, G. (2010). Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food Security*, 2(2), 113-132.
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., Cumming, M., Kelley, L., Sternberg, M., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller J., Town, C., Stuerzlinger, W. & Provart, N. (2017). ePlant: visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *The Plant Cell*, 29(8), 1806-1821.
- Walters, D. (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64(1), 97-107.
- Walters, D., Cowley, T., & Mitchell, A. (2002). Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 53(369), 747-756.
- Wang, C., Liu, R., Lim, G. H., de Lorenzo, L., Yu, K., Zhang, K., Hunt, A. G., Kachroo, A. & Kachroo, P. (2018). Pipecolic acid confers systemic immunity by regulating free radicals. *Science advances*, 4(5), 4509-4520.
- Wang, W., Paschalidis, K., Feng, J. C., Song, J., & Liu, J. H. (2019). Polyamine catabolism in plants: A universal process with diverse functions. *Frontiers in plant science*, 10, 561-574.
- Wang, X., Gao, Y., Yan, Q., & Chen, W. (2016). Salicylic acid promotes autophagy via NPR3 and NPR4 in *Arabidopsis* senescence and innate immune response. *Acta physiologiae plantarum*, 38(10), 241-253.
- Wu, J., Shang, Z., Wu, J., Jiang, X., Moschou, P. N., Sun, W., Roubelakis-Angelakis, K. A., & Zhang, S. (2010). Spermidine oxidase-derived H₂O₂ regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels and pollen tube growth. *The Plant Journal*, 63(6), 1042-1053.
- Xia, Y., Gao, Q. M., Yu, K., Lapchyk, L., Navarre, D., Hildebrand, D., Kachroo, A. & Kachroo, P. (2009). An intact cuticle in distal tissues is essential for the induction of systemic acquired resistance in plants. *Cell Host & Microbe*, 5(2), 151-165.

- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual review of phytopathology*, 51, 473-498.
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316-328.
- Xiong, X. P., Sun, S. C., Zhang, X. Y., Li, Y. J., Liu, F., Zhu, Q. H., Xue, F., & Sun, J. (2020). GhWRKY70D13 Regulates Resistance to *Verticillium dahliae* in Cotton Through the Ethylene and Jasmonic Acid Signaling Pathways. *Frontiers in Plant Science*, 11, 69-84.
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in plant science*, 10, 1349-1361.
- Yin, J., Jia, J., Lian, Z., Hu, Y., Guo, J., Huo, H., Zhu, Y., & Gong, H. (2019). Silicon enhances the salt tolerance of cucumber through increasing polyamine accumulation and decreasing oxidative damage. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 8-17.
- Yu, X., Feng, B., He, P., & Shan, L. (2017). From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual review of phytopathology*, 55, 109-137.
- Zheng, M. S., Takahashi, H., Miyazaki, A., Hamamoto, H., Shah, J., Yamaguchi, I., & Kusano, T. (2004). Up-regulation of *Arabidopsis thaliana* NHL10 in the hypersensitive response to *Cucumber mosaic virus* infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement. *Plants*, 218(5), 740-750.
- Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., Él, S. Y., & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell host & microbe*, 11(6), 587-596.
- Zheng, X., Xing, J., Zhang, K., Pang, X., Zhao, Y., Wang, G., Zang, J., Huang, R., & Dong, J. (2019). Ethylene response factor ERF11 activates BT4

- transcription to regulate immunity to *Pseudomonas syringae*. *Plant physiology*, 180(2), 1132-1151.
- Zhu, M. D., Zhang, M., Gao, D. J., Zhou, K., Tang, S. J., Zhou, B., & Lv, Y. M. (2020). Rice OsHSFA3 Gene Improves Drought Tolerance by Modulating Polyamine Biosynthesis Depending on Abscisic Acid and ROS Levels. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1857-1873.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., Mu, A., Jiang, Z., Kim, J. M., To, T. K., Li, W., Zhang, X., Yu, Q., Dong, Z., Chen, W. Q., Seki, M., Zhou, J. M., & Guo, H. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), 12539-12544.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 414-420.
- Zipfel, C. (2013). Combined roles of ethylene and endogenous peptides in regulating plant immunity and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5748-5749.