



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE SAN LUIS POTOSÍ

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



UASLP  
Posgrado  
Ciencias de la Vida

## POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación de la producción espacio-temporal de  
ROS, respuesta sistémica y expresión diferencial de  
genes en plantas de *Arabidopsis* afectadas en el  
catabolismo citoplasmático de espermina**

### T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**Maestría en Ciencias de la Vida**

PRESENTA

**BIOL. PAULINA ALVARADO GUITRON**

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ KESSLER

DR. LUIS CÁRDENAS TORRES

SAN LUIS POTOSÍ; S. L. P. A 28 DE AGOSTO DEL 2024



Evaluación de la producción espacio-temporal de ROS, respuesta sistémica y expresión diferencial de genes en plantas de Arabidopsis afectadas en el catabolismo de espermina. ©

2024 by Paulina Alvarado Guitron is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Interacción Planta Microorganismo (TL-101) de la Facultad de Ciencias en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, con el financiamiento del Proyecto Ciencia de Frontera “Metabolismo de poliaminas, especies reactivas de oxígeno y fitohormonas en la encrucijada de respuestas locales y sistémicas al estrés biótico en *Arabidopsis thaliana*: un enfoque fenotípico, funcional y metabólico” con número de convenio FORDECYT-PRONACES/1564453/2020 y con apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), No CVU 1177830.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. Poliaminas .....	13
1.2. Inmunidad vegetal .....	14
1.3. Respuesta hipersensible (HR).....	16
1.4. Resistencia sistémica adquirida (SAR).....	17
1.5. Vía dependiente de Ácido Salicílico.....	18
1.6. Vía de SAR dependiente de Ácido Pipecólico .....	19
1.7. SA y Pip: señales interconectadas en SAR.....	20
1.8. Importancia de las Especies Reactivas de Oxígeno en HR y SAR.....	22
1.9. Sensores <i>HyPer</i> para la detección de ROS .....	23
II. ANTECEDENTES .....	25
2.1. Elementos involucrados en la resistencia sistémica adquirida (SAR).....	25
2.2. Genes marcadores de HR y SAR .....	26
2.3. Participación del gen <i>AtPAO1</i> durante un estrés biótico.....	27
III. JUSTIFICACIÓN .....	29
IV. HIPÓTESIS .....	30
V. OBJETIVOS .....	31
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	31
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
VI. METODOLOGÍA.....	32
6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	32
6.2. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> .....	32
6.3. Establecimiento de la respuesta hipersensible (HR) .....	33
6.4. Tinción con azul de Evans para evaluación de la muerte celular.....	33
6.5. Cuantificación de la muerte celular por ensayos de fuga de electrolitos.....	33
6.6. Ensayos de resistencia sistémica adquirida (SAR).....	34
6.7. Extracción de RNA .....	34
6.8. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	35
6.9. Análisis de la expresión génica .....	36
6.10. Detección histoquímica de ROS .....	36
6.11. Transformación por inmersión floral para la obtención de la línea reportera de ROS en el fondo mutante <i>Atpao1-1</i> .....	37
6.12. Detección de las transformantes.....	38

6.13. Dinámica de producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
6.14. Preparación y esterilización de placas de Petri con fondo de cristal para el cultivo de <i>A. thaliana</i> .....	38
6.15. Adquisición y procesamiento de imágenes .....	39
6.16. Análisis estadístico.....	40
VII. RESULTADOS .....	41
7.1. Respuesta hipersensible (HR) .....	41
7.2. Resistencia sistémica adquirida (SAR) .....	47
7.3. Expresión de genes implicados en el establecimiento de HR y SAR.....	48
7.4. Detección histoquímica de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ensayos SAR.....	53
7.5. Cambios intracelulares de ROS en respuesta a PAs.....	57
VIII. DISCUSIÓN .....	69
IX. CONCLUSIONES.....	77
X. PERSPECTIVAS .....	79
XI. ANEXOS .....	80
XII. BIBLIOGRAFÍA .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Rutas de biosíntesis del SA y el NHP.....	20
Figura 2. Mecanismos moleculares implicados en la resistencia sistémica adquirida (SAR).....	21
Figura 3. Esquema representativo de los principales elementos involucrados en el establecimiento de la SAR. ....	23
Figura 4. Progresión de la muerte celular en las líneas Col-0, <i>Atpao1-1</i> y <i>35S::AtPAOI-L9</i> empleando la cepa avirulenta de <i>P. syringae AvrRpt2</i> . ....	43
Figura 5. Detección histoquímica de muerte celular empleando azul de Evans en plantas del ecotipo silvestre Col-0, <i>Atpao1-1</i> y <i>35S::AtPAOI-L9</i> sometidos a ensayos de HR. ....	44
Figura 6. Análisis de la pérdida de iones en plantas infiltradas con MgCl <sub>2</sub> o la cepa avirulenta de <i>P. syringae AvrRpt2</i> . ....	45
Figura 7. Análisis de la pérdida de iones en plantas infiltradas con la cepa avirulenta de <i>P. syringae AvrRpt2</i> . ....	46
Figura 8. Resistencia sistémica adquirida (SAR) en la interacción <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>Pseudomonas syringae</i> . ....	48
Figura 9. Evaluación de genes marcadores de HR a las 6 hpi. ....	49
Figura 10. Evaluación de genes marcadores de HR a las 24 hpi. ....	50
Figura 11. Evaluación de genes marcadores de SAR a las 6 hpi. ....	51
Figura 12. Evaluación de genes marcadores de SAR a las 24 hpi. ....	52
Figura 13. Detección histoquímica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con 3,3-diaminobenzidina (DAB) en plantas del ecotipo silvestre Col-0 y <i>Atpao1-1</i> sometidas a ensayos SAR. ....	55
Figura 14. Detección histoquímica de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> con nitroazul de tetrazolio (NBT) en plantas del ecotipo silvestre Col-0, <i>Atpao1-1</i> y <i>35S::AtPAOI-L9</i> sometidas a ensayos de SAR. ....	57
Figura 15. Plantas de <i>A. thaliana</i> ecotipo silvestre Col-0 transformadas con <i>35S::HyPer1</i> de 7 días de edad. ....	61
Figura 16. Cambios espacio-temporal en el contenido de ROS en respuesta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno. ....	59
Figura 17. Cambios intracelulares en el contenido de ROS en respuesta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno. ....	60
Figura 18. Cambios espacio-temporal de los niveles de ROS en raíz de plantas de Col-0- <i>HyPer1</i> en respuesta a Put 30 μM. ....	61
Figura 19. Cambios intracelulares en los niveles de ROS en raíz de plantas de Col-0- <i>HyPer1</i> en respuesta a Put 30 μM. ....	62
Figura 20. Dinámica espacio-temporal de ROS en hoja de plantas de Col-0- <i>HyPer1</i> en respuesta a Spd 30 μM. ....	65

Figura 21. Cambios intracelulares en los niveles de ROS en hoja de plantas de Col-0- <i>HyPer1</i> en respuesta a Spd 30 $\mu$ M. ....	66
Figura 22. Imagen representativa de los cambios en la dinámica de ROS en raíces de Col-0- <i>HyPer1</i> bajo el tratamiento de Spm 30 $\mu$ M.....	70
Figura 23. Cambios intracelulares en los niveles de ROS en raíz de plantas de Col-0- <i>HyPer1</i> en respuesta a Spm 30 $\mu$ M. ....	68
Figura 24. Modelo de participación del <i>AtPAO1</i> en HR y SAR.....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Oligos empleados para el análisis de la expresión de genes vinculados a la HR a través de qPCR.....	80
Tabla 2: Oligos empleados para el análisis de la expresión de genes vinculados a la SAR a través de qPCR.....	80
Tabla 3: Oligos empleados tipificación de la línea <i>Atpaol-1</i> y para el sensor <i>HyPer1</i> a través de qPCR.....	80



## GLOSARIO

- ⇒ **ALD1**: alanina deshidrogenasa 1
- ⇒ **Avr**: avirulencia
- ⇒ **AzA**: ácido azaleico
- ⇒ **CBP60g**: proteína 60g de unión a calmodulina
- ⇒ **CNLs**: coiled-coil
- ⇒ **CPK5**: Proteína quinasa dependiente de calcio
- ⇒ **DA**: dehidrobetinal
- ⇒ **DAOs**: diamino oxidasas
- ⇒ **EDS5**: mayor susceptibilidad a enfermedades 1
- ⇒ **ETI**: inmunidad mediada por efectores
- ⇒ **ETS**: susceptibilidad mediada por efectores
- ⇒ **FAD**: dependientes de flavina
- ⇒ **FMO1**:monooxigenasa dimetilalanina que contiene flavina
- ⇒ **G3P**: glicerol-3-fosfato
- ⇒ **HR**: respuesta hipersensible
- ⇒ **ICS1**: isocorismato sintasa 1
- ⇒ **JA**: ácido jasmónico
- ⇒ **MeSA**: salicilato de metilo
- ⇒ **NHP**: N-hidroxi-pipecólico
- ⇒ **NLRs**: receptores con repetidos de leucina y de unión a nucleótidos
- ⇒ **NO**: óxido nítrico
- ⇒ **NPRs**: genes relacionados con la patogenicia
- ⇒ **PAL**: fenilalanina amoniaco-liasa
- ⇒ **PAMPs**: patrones moleculares asociados a patógenos
- ⇒ **PAOs**: poliaminas oxidasas
- ⇒ **PAs**: poliaminas
- ⇒ **Pip**: ácido pipecólico
- ⇒ **PRRs**: receptores de respuesta a patógenos

- ⇒ **PRs**: proteínas relacionadas a patogénesis
- ⇒ **Pst**: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato 3000*
- ⇒ **PTI**: inmunidad mediada por patrones
- ⇒ **Put**: putrescina
- ⇒ **RBOH**: homólogo de la oxidasa de explosión respiratoria
- ⇒ **RNS**: especies reactivas del nitrógeno
- ⇒ **ROS**: especies reactivas del oxígeno
- ⇒ **SA**: ácido salicílico
- ⇒ **SAR**: resistencia sistémica adquirida
- ⇒ **SARD1**: deficiente de SAR 1
- ⇒ **SARD4**: deficiente de SAR 4
- ⇒ **Spd**: espermidina
- ⇒ **Spm**: espermina
- ⇒ **TNLs**: Toll/interleukin-like
- ⇒ **tSpm**: termoespermina

## RESUMEN

El proceso evolutivo en las plantas les ha permitido desarrollar diferentes mecanismos y estrategias de defensa en contra de patógenos, estableciendo una respuesta inmune de manera eficiente e inclusive promoviendo una inmunidad a largo plazo para futuras infecciones. Uno de los mecanismos de defensa es la respuesta hipersensible (HR), un tipo de muerte celular que se induce como el resultado de la detección de un elicitador en el sitio de infección. La HR se caracteriza por la limitación de los nutrientes al patógeno, así como la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y ácido salicílico (SA). La resistencia sistémica adquirida (SAR) es considerada un tipo de resistencia en contra de futuras infecciones. Como resultado de una infección primaria, una serie de señales son sintetizadas y transmitidas al tejido no infectado promoviendo una inmunidad a largo plazo. Las poliaminas (PAs) son moléculas alifáticas de bajo peso molecular implicadas en diferentes procesos fisiológicos y en la defensa vegetal. El catabolismo de PAs es mediado por diferentes enzimas como la poliamina oxidasas (PAOs) que contribuyen en la formación del  $H_2O_2$ . El objetivo de este trabajo fue conocer la importancia del gen *AtPAOI* de *Arabidopsis thaliana*, implicada en el catabolismo citoplasmático de PAs en el establecimiento de la HR y la SAR en respuesta a *Pseudomonas syringae*. Plantas *Atpao1-1* infectadas con la cepa avirulenta tuvieron una menor muerte celular y pérdida de iones, indicando una activación temprana de genes vinculados al establecimiento de la HR en comparación a Col-0. Plantas del ecotipo silvestre Col-0 establecieron una SAR como resultado de un priming mientras que la mutante *Atpao1-1* y la sobreexpresora *35S::AtPAOI-L9* tuvieron títulos bacterianos reducidos previo a un priming con *Pst*; ambas líneas presentaron una SAR y una menor cantidad de UFC con respecto a Col-0. Una de las señales móviles implicadas en el establecimiento de la SAR son las ROS. La acumulación del  $H_2O_2$  y del  $O_2^-$  fue evidente en los sitios de infección y en tejido distal. El uso de plantas sensoras Col-0-*HyPer* demostraron que cada una de las PAs aplicadas de manera exógena tiene un tipo particular de respuesta. Estos resultados indican que el catabolismo de PAs mediado por el gen *AtPAOI* contribuye al establecimiento eficiente de respuestas inmunes a corto y largo plazo como la HR y la SAR.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*, especies reactivas del oxígeno, poliamina oxidasa, *Pseudomonas syringae*, resistencia sistémica adquirida, respuesta hipersensible.

## ABSTRACT

The evolutionary process of plants has allowed them to develop different defense mechanisms and strategies against pathogens, establishing an efficient immune response and even promoting long-term immunity for future infections. One type of defense is the hypersensitive response (HR), a type of cell death induced by detecting an elicitor at the site of infection. The HR is characterized by nutrient limitation to the pathogen, and the production of reactive oxygen species (ROS) and salicylic acid (SA). The systemic acquired response (SAR) is a resistance against future infections. As a result of a primary infection, a series of signals are synthesized and transmitted to uninfected tissue promoting long-term immunity. Polyamines (PAs) are low molecular weight aliphatic molecules involved in different physiological processes and plant defense. PAs catabolism is mediated by various enzymes such as polyamine oxidases (PAOs) that contribute to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. This work aims to know the importance of the *AtPAOI* gene of *Arabidopsis thaliana*, involved in the cytoplasmic catabolism of PAs in the establishment of HR and SAR in response to *Pseudomonas syringae*. Plants of the wild-type Col-0 ecotype established a SAR because of priming while the *Atpao1-1* mutant and the *35S::AtPAOI-L9* overexpression had reduced bacterial titers prior to priming with *Pst*; both lines had a SAR and a lower CFU count relative to Col-0. One of the mobile signals involved in SAR establishment is reactive oxygen species (ROS). The accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> was evident at infection sites and in distal tissue. *Atpao1-1* plants infected with the avirulent strain had lower cell death and ion loss, indicating earlier activation of genes linked to HR establishment compared to Col-0. Using Col-0-*HyPer* sensing plants demonstrated that each of the exogenously applied PAs has a particular type of response. Our results indicate that *AtPAOI* gene-mediated catabolism is an important contributor to establishing of short- and long-term immune responses such as HR and SAR.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, hypersensitive response, polyamine oxidase, *Pseudomonas syringae*, reactive species of oxygen, systemic acquired response.

---

# **Evaluación espacio temporal de ROS, respuesta sistémica adquirida y expresión diferencial de genes en plantas de *Arabidopsis* afectadas en el catabolismo citoplasmático de espermina**

## **I.INTRODUCCIÓN**

Las plantas son organismos sésiles que se encuentran sometidos constantemente a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico. Esto trae como consecuencia afectaciones en el crecimiento, desarrollo e inclusive en la productividad (Verma et al., 2016). Para mitigar el estrés, las plantas han desarrollado sofisticados sistemas de respuesta que permiten defenderse del ataque ocasionado por diversos patógenos o bien resistir condiciones desfavorables. Esto se lleva a cabo a través de un control transcripcional y traduccional, el cual es regulado bajo condiciones de estrés. Dicho control implica la producción y acumulación de metabolitos que desempeñan funciones esenciales y complejas promoviendo respuestas de defensa eficaces (Nehela & Killiny, 2020; Lanna-Filho, 2023). Entre estos se encuentran los aminoácidos, las poliaminas (PAs), los ácidos orgánicos, los ácidos grasos y las fitohormonas (Nehela & Killiny, 2020).

### **1.1. Poliaminas**

Las PAs son compuestos policatiónicos nitrogenados presentes en los organismos procariotas y eucariotas, las cuales presentan una cadena hidrocarbonada alifática con dos o más grupos aminos.

A un pH fisiológico, las PAs tienen una o más cargas positivas que les permite interactuar con macromoléculas de carga negativa; protegen la estructura del DNA de la degradación por enzimas, radicales libres, calor e inclusive de los rayos X y gamma bajo condiciones de estrés (Tiburcio et al., 2014; Nehela & Killiny, 2020).

En plantas superiores, las principales PAs son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y las tetraminas espermina (Spm) y termoespermina (tSpm). La

homeostasis de PAs se encuentra modulada por cuatro procesos: la biosíntesis, el catabolismo, la conjugación y el transporte (Tiburcio et al., 2014). Esencialmente, el catabolismo de PAs es mediado por dos familias de enzimas, las diamino oxidasas (DAOs, E.C. 1.4.3.22) dependientes de cobre, que realizan el catabolismo terminal de la Put generando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), 4-aminobutanal y  $NH_3$  mientras que las poliaminas oxidasas (PAOs, E.C. 1.5.3.14) dependientes de flavina (FAD), catabolizan a las PAs superiores Spd, Spm y tSpm por medio del catabolismo terminal o por retroconversión. El catabolismo terminal de Spd y Spm promueve la formación de aminoaldehídos, 1,3-diaminopropano y  $H_2O_2$ , mientras que el catabolismo por retroconversión oxida a las PAs superiores a PAs de cadena más corta, así como la producción de 3-aminopropanal y  $H_2O_2$  (Fincato et al., 2011; Tiburcio et al., 2014; Nehela & Killiny, 2020).

El organismo modelo *Arabidopsis thaliana* muestra de manera predominante un catabolismo por retroconversión de las PAs (Moschou et al., 2008); dentro de su genoma se encuentran codificados cinco genes *AtPAO*. Las enzimas *AtPAO1* (At5g13700) y *AtPAO5* (At4g29720) se encuentran localizadas en el citoplasma, mientras que *AtPAO2* (At2g43020), *AtPAO3* (At3g59050) y *AtPAO4* (At1g65840) son peroxisomales. Cada enzima tiene un sustrato preferencial, *AtPAO1* y *AtPAO2* oxidan principalmente a la Spm, *AtPAO3* y *AtPAO4* a la Spd y *AtPAO5* a la tSpm (Fincato et al., 2011).

## **1.2. Inmunidad vegetal**

La defensa vegetal ha desarrollado diferentes estrategias, permitiendo generar respuestas ante los diferentes ataques de patógenos con diferentes estilos de vida ocasionando una respuesta inmune eficaz de manera inmediata y promoviendo una inmunidad en contra de futuras infecciones (Jones & Dangl, 2006; Shine et al., 2019; Lukan & Coll, 2022; Lanna-Filho, 2023). La inmunidad vegetal se encuentra conformada por un sistema constitutivo y un sistema inducible. El primero se caracteriza por todos aquellos elementos que impiden físicamente el ingreso del patógeno a las células vegetales (ej. la cutícula), mientras que en el sistema inducible involucra una regulación a nivel transcripcional, como lo es la

producción de diferentes metabolitos asociados a una respuesta ante un tipo de estrés (Kamle et al., 2020).

Dentro del sistema inducible, se encuentra la inmunidad innata o inmunidad mediada por patrones moleculares (PTI, Pattern Triggered Immunity), donde se presenta el reconocimiento de los PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) extracelulares a través de receptores de la superficie celular (PRRs, Pattern Recognition Receptors). Como consecuencia se promueve la expresión de genes de respuesta a patógenos, la producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species), así como la síntesis de elementos involucrados en las rutas de señalización hormonal como el ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA).

Las proteínas efectoras producidas por los patógenos son considerados moduladores de la inmunidad vegetal, generando plantas susceptibles a enfermedades. A esto se le conoce como una susceptibilidad activada por efectores (ETS, Effector-triggered susceptibility) (Jacob et al., 2023). Algunos efectores se encuentran codificados dentro de los genes de avirulencia (*avr*). Los genes *avr* pueden ser contrarrestados por los receptores del huésped ricos en leucina (NLR, Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) llamados genes de resistencia *R*. Los NLR se clasifican de acuerdo con sus dominios de señalización en el amino-terminal entre los que se encuentran; por ejemplo, los coiled-coil (CC) NLRs (CNLs), los Toll/Interleukin-like Resistance genes (TIR)-NLRs (TNLs) y los CC-RPW8 NLRs (RNLs). Los RNLs y CNLs funcionan como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que los TNLs forman enzimas que ayudan a la degradación de  $\text{NAD}^+$  ocasionando de manera indirecta un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático después de la activación de los receptores RNLs y CNLs. Aquellos genes que muestran un dominio TIR se encuentran regulados de manera positiva a nivel transcripcional en etapas tempranas de la PTI (Cortleven et al., 2022; Jacob et al., 2023).

Tras el reconocimiento de los efectores se puede desencadenar una inmunidad mediada por efectores (ETI, Effector-Triggered Immunity) (Jones & Dangl, 2006; Cortleven et al., 2022; Lukan & Coll, 2022). El éxito de la ETI trae como consecuencia un tipo de defensa denominada “resistencia gen por gen”. Este tipo de resistencia se presenta cuando un patógeno tiene inductores (genes *avr*) y la planta huésped contiene un gen *R* correspondiente

a cada uno de los inductores lo que promueve una resistencia a enfermedades denominada respuesta hipersensible (HR, Hypersensitive Response) (Katagiri et al., 2004).

### **1.3. Respuesta hipersensible (HR)**

Cuando una planta muestra una resistencia ante un patógeno de tipo avirulento, se le considera una interacción incompatible promoviendo la activación de mecanismos de defensa como lo es la HR. Este respuesta es considerado un tipo de muerte celular vegetal, localizada en el sitio de infección como resultado de la detección de metabolitos y/o la presencia del patógeno, ocasionando una pérdida de electrolitos asociada a un daño en la membrana plasmática (Balint-Kurti, 2019).

Por un lado, la HR limita la propagación del patógeno privándolo de nutrientes, promoviendo la producción y acumulación de la hormona SA, de ROS e inclusive la expresión temprana de genes *PR* (Chen et al., 2004; Mandal et al., 2019). Por otro lado, si la planta es susceptible a la infección se le considera una interacción compatible, es decir, se desarrolla una enfermedad debido a la presencia de un patógeno virulento (Katagiri et al., 2004; Jones & Dangl, 2006).

El establecimiento de la HR surge tras la identificación del elicitor, promoviendo la expresión de genes implicados en la defensa de las células aledañas al sitio de infección. Como consecuencia a esta interacción las células que no están en contacto directo con el patógeno mostrarán niveles elevados de expresión del gen *PRI* (Pathogenesis-related 1 proteins) (Mandal et al., 2019; Jacob et al., 2023). Sugiriendo que las células que se encuentran en contacto directo con el patógeno son responsables de la activación de la inmunidad en las células espectadoras, es decir, en células no infectadas aledañas al sitio de infección (Jacob et al., 2023).

Existen genes que se inducen transcripcionalmente en células donde se estableció una HR. La familia de los genes *HIR* (Hypersensitive induced reaction) codifican a un de proteínas que contienen un dominio estomatina/flotillina/HflK/prohibitina, localizadas en las membranas celulares como la membrana plasmática, aparato de Golgi, retículo endoplásmico



y mitocondrias. Entre sus diferentes funciones se encuentra la regulación de canales iónicos, conexión de la membrana con el citoesqueleto e inclusive el tráfico vesicular. En *A. thaliana*, existen 4 genes *HIR* (*AtHIR1-AtHIR4*) los cuales se inducen en presencia de un patógeno para el establecimiento de la HR como resultado de la asociación física con la proteína R llamada RPS2 (Qi et al., 2011; Qi et al., 2012; Li et al., 2022).

#### **1.4. Resistencia sistémica adquirida (SAR)**

Seguido de la inducción de respuestas de defensa a nivel local durante la PTI y la ETI, se puede establecer un tipo de defensa en el tejido distal como resultado de la transmisión de señales de amplio espectro denominada Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, Systemic Acquired Resistance) (Lim, 2023).

La SAR implica una serie de mecanismos de defensa que promueven la resistencia ante futuras infecciones en contra de microorganismos con diferentes estilos de vida (Chen et al., 2004). Tras una infección primaria (en el tejido local) causada por patógenos microbianos, se promueve una fuerte resistencia en tejidos distales, asociada a la síntesis rápida y eficiente de señales “móviles” producidas en el sitio primario de infección para ser transportadas al tejido distal a través del floema (Shine et al., 2019; Kachroo et al., 2020). Es decir, la planta se prepara para generar una respuesta más robusta ante futuras infecciones por patógenos relacionados o no relacionados (Gao et al., 2021), provocando cambios en los perfiles de expresión génica en el tejido distal que contribuyen al desarrollo y establecimiento de la SAR (Kumar et al., 2020).

Existe una gran diversidad de metabolitos inductores, incluidos las ROS (ej. radical hidroxilo, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y las RNS (las especies reactivas del nitrógeno, “Reactive Nitrogen Species”, por sus siglas en inglés; ej. óxido nítrico, NO), el glicerol-3-fosfato (G3P), el ácido azaleico (AZA), el ácido pipercolico (Pip), el dehidroabetalinal (DA), derivados de ácidos grasos (galactolípidos), hormonas [SA y salicilato de metilo (MeSA)], diversas proteínas (ej. DIR1-Defective in Induced Resistance 1 y, AZI1-Azalaic acid Induced 1) y monoterpenos ( $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno) (Kachroo et al., 2020; Kamle et al., 2020; Gao et al., 2021). En

particular para el establecimiento de la SAR se han descrito dos vías paralelas e interconectadas, la vía dependiente de SA y la dependiente del ácido pipecólico (Pip).

### 1.5. Vía dependiente de Ácido Salicílico

En plantas superiores, el SA es considerado una señal móvil que además de acumularse en sitios locales, puede llegar a tejidos distales vía apoplasto, almacenarse y desencadenar la SAR (Vlot et al., 2021).

La biosíntesis de SA depende de dos rutas diferentes, por un lado, se encuentra la vía mediada por la enzima isocorismato sintasa 1 (ICS1, Isochorismate Synthase 1) y la segunda por la enzima fenilalanina amoniaco-liasa (PAL, phenylalanine ammonia lyase) (Lim 2023; Zou et al., 2024). Esencialmente, la vía dependiente de ICS1 es inducida por un estrés y es dependiente de los factores de transcripción SARD1 (SAR-Deficient 1)/CBP60g (Calmodulin Binding Protein 60g) (Lim, 2023) donde el corismato, sustrato de la enzima ICS1, forma isocorismato dentro de los cloroplastos, donde posteriormente es transportado al citoplasma a través de la membrana por EDS5 (enhanced disease susceptibility 5) (Zou et al., 2024). Por otro lado, la ruta dependiente de PAL se activa de manera inducible y constitutiva. A pesar de ello, ambas rutas son esenciales para el desarrollo y establecimiento de SAR (Lim, 2023) (Figura 1).

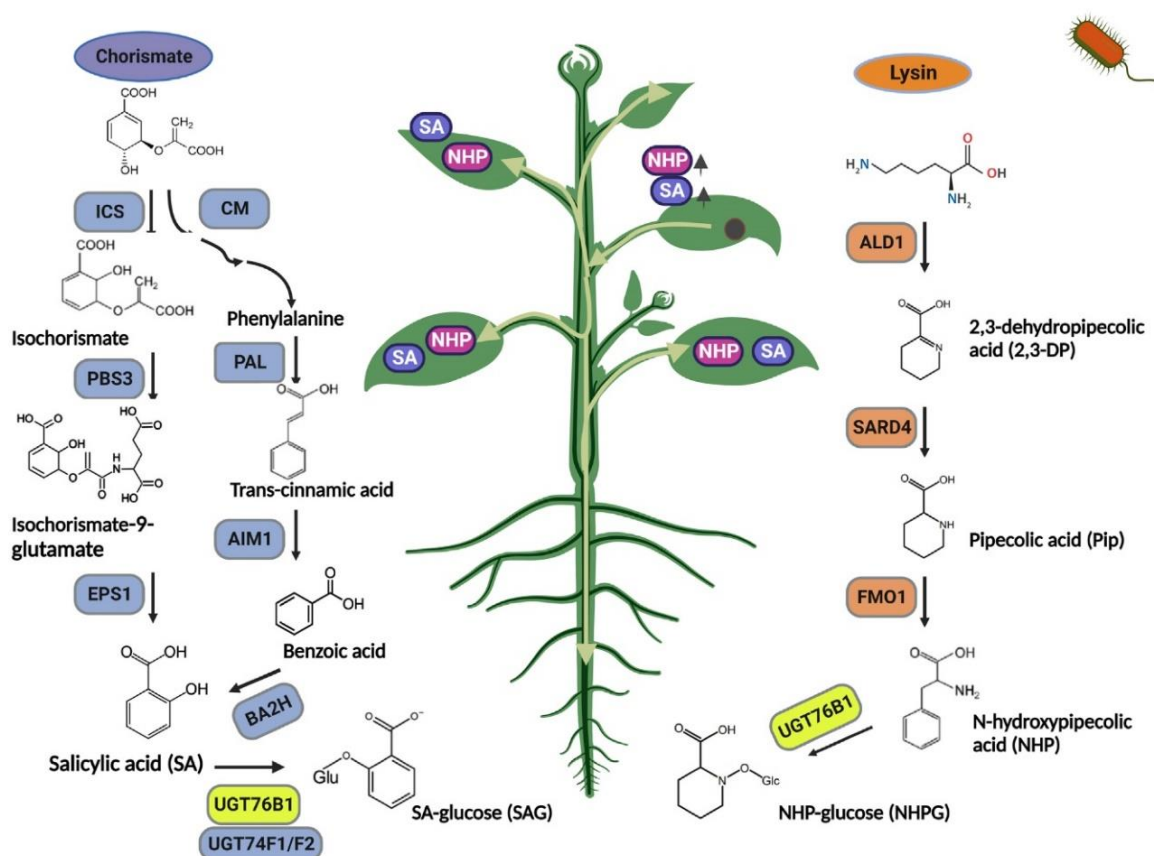
El SA es detectado por dos tipos de receptores: NPR1 (Nonexpressor of PR genes 1) y NPR3/NPR4 (NPR1-Like Protein 3/4). La familia NPR es un grupo de proteínas que carecen de dominios de unión al DNA. Sin embargo, NPR1 actúa como un activador transcripcional donde la unión del SA induce su actividad (Liu et al., 2020). Además, es considerado un regulador clave en el establecimiento de SAR y se ha demostrado que mutantes para el gen *NRPI* no inducen la expresión de genes *PR* por lo que la SAR se encuentra comprometida (Kamle et al., 2020).

NPR3 y NPR4 son considerados represores transcripcionales de genes que responden a SA en ausencia a una infección por patógenos. Cuando el SA se asocia a NPR3 o NPR4 la

actividad represora es inhibida, ocasionando la pérdida de la represión transcripcional y dando origen a una respuesta de defensa (Liu et al., 2020).

## 1.6. Vía de SAR dependiente de Ácido Pipecólico

En *Arabidopsis* existen tres genes implicados en la síntesis del ácido N-hidroxi-pipecólico. Tras la detección de un patógeno, se lleva a cabo la síntesis de Pip en los cloroplastos donde la lisina (Lys), sustrato de la enzima alanina deshidrogenasa 1 (ALD1, ADG2-Like Defense Response Protein1) produce el ácido 2,3-deshidro-pipecólico a partir del cual, la enzima reductasa SARD4 (SAR-deficient4) se encarga de formar el ácido pipecólico. Finalmente, la enzima FMO1 (Flavin-Dependent Monooxygenase1) localizada en el citosol da origen al N-hidroxi-pipecólico (Vlot et al., 2021; Lim G., 2023). Mutantes de estas enzimas muestran una SAR comprometida (Figura 1).

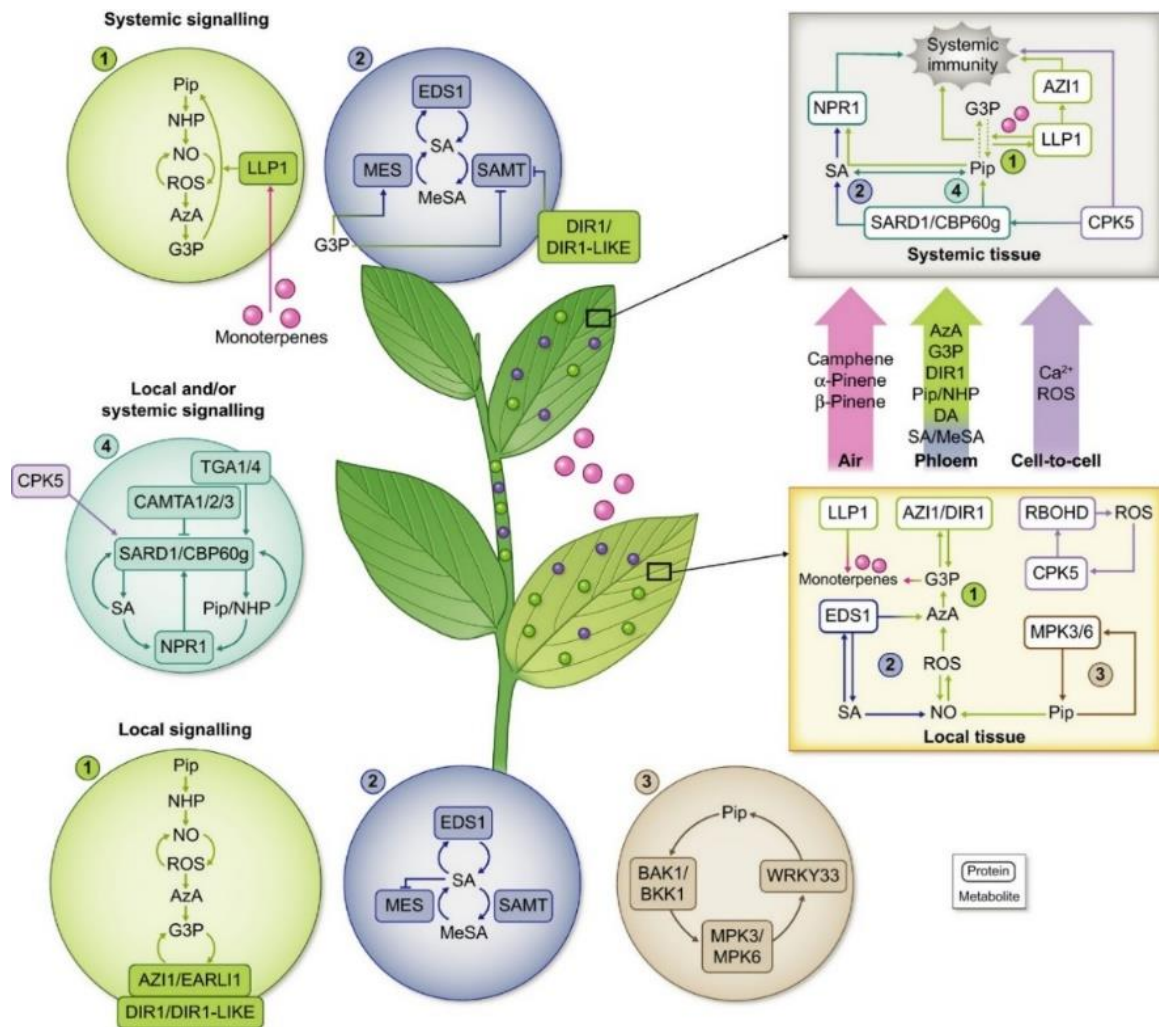


**Figura 1: Rutas de biosíntesis del SA y el NHP.** Abreviaturas: isocorismato sintasa (ICS), *avrPphB* susceptible 3 (PBS3), corismato mutasa EPS1 (CM), fenilalanina amoníaco liasa (PAL) meristemo de inflorescencia anormal 1 (AIM1), ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H), monooxigenasa 1 dependiente de flavina (FMO1) y UDP-glicosiltransferasa 76B1 (UGT76B1) y deficiente en SAR 4 (SARD4). Imagen tomada y modificada Lim et al., 2023.

## 1.7. SA y Pip: señales interconectadas en SAR

Se han descrito factores de transcripción vinculados en la regulación de genes implicados a las rutas de biosíntesis de SA y NHP. Los factores de transcripción SARD1 y CBP60g promueven la transcripción de enzimas vinculadas a la biosíntesis de NHP como lo son la enzima ALD1, SARD4 y FMO1 (Liu et al., 2020) (Figura 2). Por otro lado, un aumento en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  produce la activación de CPK5 (Calcium-dependent Protein Kinase 5) ocasionando la fosforilación de la enzima RBOH, que a su vez contribuye al incremento en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  apoplástico. CPK5 y RBOH trabajan en conjunto para promover el establecimiento de SAR a través de una comunicación célula-célula basado en la producción de ROS (Liu et al., 2020).

Otro punto importante es que el incremento de las ROS ocasiona que los lípidos de membrana C18 sufran una fragmentación, contribuyendo a la acumulación de ácido azaleico (Aza). La resistencia inducida por Aza depende del contenido de G3P, considerado un intermediario importante en el metabolismo de lípidos de membrana (Vlot et al., 2021). Ambos son transportados vía simplasto a través de plasmodesmos (Lim, 2023)



**Figura 2. Mecanismos moleculares implicados en la resistencia sistémica adquirida (SAR).** Las diferentes rutas de señalización desencadenadas en el tejido local se presentan en el cuadro amarillo, mientras que para el tejido distal se engloban en el recuadro gris. Los círculos muestran de manera más detallada las rutas de señalización implicadas a nivel local y sistémico. Abreviaturas: AzA, azelaic acid; AZI1, Azelaic acid Induced 1; BAK1, BRI1-Associated Receptor Kinase; BKK1, BAK1-LIKE 1; CAMTA, Calmodulin Binding Transcription Factor; CBP60g, Calmodulin Binding Protein 60g; CPK5, Calcium-dependent Protein Kinase 5; DA, Dehydroabietinal; DIR1, Defective in Induced Resistance 1; EARLI1, Early Arabidopsis Aluminum Induced 1; EDS1, Enhanced Disease Susceptibility 1; G3P, glycerol-3-phosphate; LLP1, Legume Lectin-like Protein 1; MES, Methyl Esterase; MeSA, Methyl Salicylate; MPK, Mitogen-activated Protein Kinase; NHP, *N*-hydroxy-pipecolic acid; NO, nitric oxide; NPR1, Non-expressor of PR genes 1; Pip, pipecolic acid; RBOHD, Respiratory Burst Oxidase Homolog D; ROS, Reactive Oxygen Species; SA, Salicylic Acid; SAMT, SA Methyltransferase; SARD1, SAR-Deficient 1; TGA, TGACG Sequence-Specific Binding Protein. Imagen tomada de Volt et al., 2021.

## 1.8. Importancia de las Especies Reactivas de Oxígeno en HR y SAR

La adaptabilidad y las estrategias de coevolución de las plantas que adquirieron a lo largo del tiempo, han permitido la adaptación y la supervivencia ante las diferentes condiciones adversas. Las diferentes vías de señalización y de reconocimiento entre el patógeno y huésped son clave importante para determinar si la planta es susceptible o resistente. Tras el reconocimiento del patógeno por el huésped se produce una cascada de señalización que involucra la producción de ROS, fitoalexinas, así como compuestos antimicrobianos (Mansoor et al., 2022).

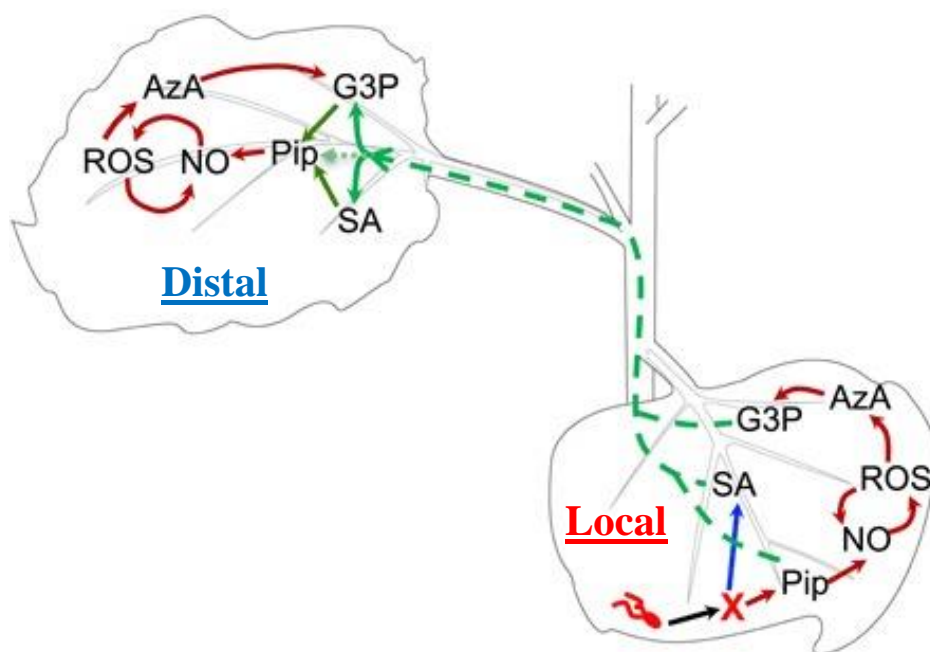
Las ROS [peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ )] son moléculas implicadas en la regulación de vías de señalización durante el desarrollo vegetal, fisiología estomática, así como en la inmunidad vegetal. Sin embargo, cuando la planta se encuentra sometida a un estrés se generan incrementos de las ROS que trae como consecuencia un estrés oxidativo, es por ello, que las plantas deben de alcanzar una homeostasis redox donde el sistema antioxidante juega un rol importante. Hasta lo que se sabe, el SA participa en la homeostasis redox promoviendo el establecimiento de HR y SAR (Saleem et al., 2021).

El  $H_2O_2$  y el NO son moléculas de señalización que se producen en el sitio inicial de infección. Las señales se propagan a tejidos distantes a través del floema desencadenando el establecimiento de la inmunidad consecuencia de una segunda infección ocasionada por patógenos. Se sabe que, durante la respuesta de defensa a nivel local, la producción de NO genera la acumulación de ROS al bloquear la actividad antioxidante, mientras que el  $H_2O_2$  induce la producción de NO dependiente de  $Ca^{2+}$  en el floema (Gaupels et al., 2017).

En las plantas, la cadena de transporte de electrones, la fotorrespiración peroxisomal, genes *RBOH* (Respiratory Burst Oxidase Homolog) así como genes *PAO* contribuyen de manera importante en la producción de ROS (Mansoor et al., 2022).

En resumen, existe una relación entre el SA, G3P y Pip en los tejidos locales y sistémicos. Tras la llegada de un patógeno, se induce la acumulación del Pip en el tejido infectado, el NO es sintetizando, lo que provoca un incremento en la producción de ROS. Como resultado del aumento del contenido de las ROS y RNS se genera la oxidación de los

ácidos grasos C18 y por ende la formación del AzA encargado de la activación de la ruta de biosíntesis del G3P. Especialmente, el SA y G3P son transportados al tejido distal donde se realiza la biosíntesis de *novo* del Pip ocasionando la activación de la cascada de señalización que involucra la síntesis de NO, ROS y AzA (Wang et al., 2018) (Figura 3).



**Figura 3. Esquema representativo de los principales elementos involucrados en el establecimiento de la SAR.** Se puede observar los diferentes componentes implicados en las vías de señalización dependientes de ácido salicílico y piperónico y como estas juegan un importante papel con las ROS para el establecimiento de una resistencia sistémica. La síntesis de estos componentes se desencadena como resultado de una primera infección en el tejido local que posteriormente son enviadas al tejido distal. Abreviaturas: Aza, ácido azelaico; G3P, glicerol 3-fosfato; NO, óxido nítrico; Pip, ácido piperónico; ROS, especies reactivas del oxígeno; SA, ácido salicílico. Imagen tomada y modificada de Wang et al., 2018.

### 1.9. Sensores *HyPer* para la detección de ROS

Las ROS producen respuestas específicas acorde al tipo de estímulo o estrés; los cambios en el contenido de ROS son considerados firmas específicas de la propia planta. Se han empleado diferentes ensayos histoquímicos para detectar a las ROS, entre las que podemos encontrar

al marcador para  $H_2O_2$ , DAB (3,3-diaminobenzidina) y al de  $O_2^{\bullet-}$ , NBT (Nitro azul tetrazolio). A pesar de ello, ambos compuestos pueden ocasionar la muerte celular por lo que, sólo son empleados para una detección rápida *in situ*, pero no para la evaluación de la dinámica de ROS *in vivo*. Adicional a esto, existen sondas empleadas para evaluar en tiempo real los cambios en el contenido de ROS como lo son la dihidroclorofluoresceína ( $H_2DCF-DA$ ), no obstante, esta es considerada una sonda inestable e irreversible (Swanson et al., 2011).

Las bacterias son organismos capaces de desarrollar mecanismos sensoriales para asegurar una respuesta de defensa eficiente en contra de un estrés de tipo oxidativo. Existen factores de transcripción (SoxR, OxyR y PerR) que muestran una sensibilidad a  $H_2O_2$ . A partir del dominio regulador (RD, aminoácido 80 al 310) del factor de transcripción OxyR se obtuvo el biosensor genéticamente modificado llamado *HyPer* (Hydrogen Peroxide), el cual consiste en una construcción quimérica a partir de una proteína amarilla fluorescente permutada (cYFP) insertada en el RD entre el aminoácido 205 y 206. El  $H_2O_2$  provoca una oxidación de RD, ocasionando que los aminoácidos cisteína 199 y 208 formen un enlace disulfuro lo que permite detectar cambios en el contenido de ROS mediante la fluorescencia (Belousov et al., 2006; Marchetti et al., 2023).



## II. ANTECEDENTES

En este apartado encontraremos algunos trabajos implicados en la contribución del catabolismo de PAs durante un estrés biótico, la participación de las ROS en la defensa de la planta y la importancia de la SAR durante la interacción planta-patógeno.

### 2.1. Elementos involucrados en la resistencia sistémica adquirida (SAR)

RBOHD es la enzima implicada en la síntesis de ROS en la respuesta de defensa en contra de bacterias y hongos patógenos como *Pseudomonas syringae* y *Peronospora parasítica*. Se sabe que las líneas mutantes *rbohD* y *rbohD/F*, tienen una reducción en la producción de ROS inducida por patógenos en células oclusivas, generando una reducción en la resistencia basal (Morales et al., 2016). Asimismo, el uso de difenil yodonio (DPI), un inhibidor de la actividad RBOH evita la generación de ROS. El efecto de este inhibidor ocasiona niveles bajos de transcritos implicados en la defensa vegetal a nivel distal como consecuencia de la inhibición de la síntesis de ROS (Lee et al., 2005).

Con la finalidad de determinar la importancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la inducción de SAR, Wang y colaboradores se preinfiltraron hojas de *A. thaliana* del ecotipo silvestre Col-0 con agua o con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μM, 50 μM, 500 μM o 1.5 mM). Posteriormente, se infectaron con una suspensión de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) (10<sup>5</sup>UFC/mL) y se determinó el crecimiento bacteriano a los 0 y 3 días posteriores a la inoculación (dpi). Las plantas sometidas al tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM, 500 μM o 1.5 mM) mostraron una reducción en el crecimiento bacteriano, sugiriendo que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un factor importante en la inducción de SAR. Asimismo, se emplearon las líneas mutantes *rbohD* y *rbohF* que muestran una SAR comprometida; para demostrar que este fenotipo está asociado a una deficiencia en la producción de ROS, los radicales libres se cuantificaron por espectrometría de resonancia de espín electrónico (ESRS) a través de la sonda POBN. Se observó que líneas mutantes *rbohD* no acumularon el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) en los tejidos locales ni en los distales, mostrando niveles significativamente reducidos de ROS (Wang et al., 2014).

Bajo condiciones de estrés biótico los genes *RBOH* son considerados elementos clave para la producción de las ROS que serán transmitidas a tejido sistémico durante el establecimiento de SAR. Para comprobar que las ROS producidas por los genes *RBOH* son responsables de las respuestas sistémicas rápidas, Miller y colaboradores se evaluaron dos líneas reporteras: *Zat12::Luc* (en el fondo silvestre) y la línea mutante *rbohD* (*Zat12::Luc/rbohD*). En estas líneas, el gen reportero de la luciferasa (*Luc*) e fue fusionado al promotor del gen *ZAT12*, un gen que incrementa su respuesta en consecuencia al estrés abiótico o al daño mecánico. Como se esperaba, la línea *Zat12::Luc* mostró una respuesta rápida ante una herida a nivel local y distal, mientras que la línea *Zat12::Luc/rbohD* tuvo una respuesta retardada, con una mayor señal en el tejido local. Por lo anterior, se concluyó que la enzima RBOHD es requerida para una producción eficiente de ROS a nivel local y sistémico en respuesta a heridas; asimismo la rápida propagación de la señal sistémica requiere de la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de RBOHD (Miller et al., 2009).

Para el estudio *in vivo* de las ROS a nivel sistémico se puede emplear una sonda fluorescente para su detección, como por ejemplo la 2',7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA). Fichman y colaboradores, inocularon en tejido local de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo silvestre Col-0 con *P. syringae* a una OD<sub>600</sub> 0.2. Ellos determinaron que las hojas distales acumularon una mayor cantidad de ROS en comparación a la hoja local tratada. Por lo que demostraron la existencia de señales de ROS a nivel sistémico, y qué, la rápida acumulación de las ROS a nivel distal podría inducirse en respuesta a estímulos abióticos y bióticos que incluyen al estrés luminoso, lesiones mecánicas e inclusive la infección por patógenos (Fichman et al., 2019).

## 2.2. Genes marcadores de HR y SAR

Qi y colaboradores (2011) evaluaron los genes *AtHIR* (Hypersensitive Induced Resistance) en respuesta a flg22 y *Ps* DC3000 *hrcC* en plantas del ecotipo silvestre Col-0 de 5 semanas de edad. Como resultado, se demostró una mayor expresión de los genes *AtHIR1* y *AtHIR2* bajo el tratamiento de flg22 o *hrcC*, *AtHIR3* sólo mostró altos niveles de expresión con flg22 mientras que *AtHIR4* no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto al

control. En plantas mutantes de *Arabidopsis* (*ald1*, *sard4* y *fmo1*) infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 (*Psm*) fue evaluada la acumulación del NHP 6y Pip. Para la mutante *fmo1* únicamente acumuló Pip, pero no NHP, *ald1* y *sard4* no acumularon Pip. Los que sugiere que estas enzimas son clave para la síntesis de las señales implicadas en el establecimiento de SAR como lo son el Pip y NHP. Además, en el fondo silvestre de *Arabidopsis* la acumulación de SA fue significativamente mayor y constante a partir de las 10 hpi hasta las 48 hpi en tejido local mientras que, en el tejido distal, el aumento en su contenido se aprecia hasta las 48 hpi. Para el caso particular del contenido de Pip, el tejido local muestra una mayor contenido a las 10 hpi, sin embargo, el Pip incrementa de manera constante teniendo su punto más alto a las 48 hpi; el tejido distal muestra una mayor abundancia hasta las 48 y 72 hpi (Hartmann et al., 2018).

### **2.3. Participación del gen *AtPAOI* durante un estrés biótico**

Estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo demostraron, la importancia de las PAOs en la defensa de la planta. Durante la interacción *A. thaliana*-*Pst*, se encontró un incremento en los niveles de expresión de los genes *AtPAOI* y *AtPAO2* en plantas infectadas. Para comprender mejor su importancia, se evaluaron líneas mutantes sencillas (*Atpao1-1* y *Atpao2-1*) y dobles (*Atpao1-1 x Atpao2-1*). De manera interesante, la línea mutante *Atpao1-1* presentó títulos bacterianos menores con respecto al ecotipo silvestre, obteniendo un fenotipo de resistencia. Asimismo, mostró una menor actividad de oxidación de Spm, un incremento en los niveles de ROS ( $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ ) y en la actividad RBOH (Jasso-Robles et al., 2020).

Al emplear las líneas de sobreexpresión del gen *AtPAOI*, se obtuvo un fenotipo de susceptibilidad con un incremento en títulos bacterianos, niveles reducidos de ROS y una baja actividad RBOH (Jasso-Robles et al., datos no publicados). De manera interesante, las líneas mutantes *Atpao1-1* mostraron principalmente un catabolismo por retroconversión, mientras que las líneas de sobreexpresión *35S::AtPAOI* un catabolismo terminal. Estos datos son muy interesantes ya que los subproductos del catabolismo que pueden estar vinculados a la resistencia a patógenos, así como las diferencias en la producción de ROS. Por los datos

anteriormente encontrados, hacemos la siguiente suposición en donde los cambios mostrados podrían ser principalmente a nivel de citoplasma en plantas silvestres mientras que en la línea mutante *Atpao1-1* deriva del peroxisoma.

### III. JUSTIFICACIÓN

La participación del gen *AtPAOI* en la interacción *Arabidopsis-Pst* fue demostrada por Jasso-Robles y colaboradores (2020). Para ello, emplearon líneas mutantes y de sobreexpresión, presentando diferencias significativas en el contenido de ROS. A partir de los cambios observados en los niveles de ROS se busca evaluar el establecimiento de la HR y la SAR, requeridos para la defensa de la planta a nivel local y distal.

En diversos estudios se ha demostrado la importancia de la transmisión de señales a los tejidos distales para la obtención de una respuesta rápida tras una reinfección, donde las ROS, son elementos involucrados en los mecanismos de señalización que regulan la expresión de genes. En este sentido, es importante determinar si el fenotipo de resistencia observado a nivel local en la mutante *Atpao1-1* es consecuencia de la activación de HR. Además, es relevante analizar a qué nivel se encuentran alterados los niveles de ROS en las líneas mutantes y de sobreexpresión del gen *AtPAOI*, por lo que, se determinará si los cambios dependen de ROS intra o extracelular, así como los posibles efectos en la dinámica de producción de ROS por diversos estímulos. Por último, la evaluación de transcritos específicos implicados en el establecimiento de HR y SAR entre las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI* en interacción con *Pst* nos permitirá una caracterización detallada de su fenotipo.

Tomando en cuenta la importancia de ROS en diferentes procesos biológicos como la resistencia sistémica adquirida y la expresión diferencial de genes, en este trabajo se busca evaluar más acerca de la participación de la oxidación citoplasmática de Spm a través del gen *AtPAOI*, las respuestas de defensa vegetal y su relación con la regulación de los niveles de ROS en el patosistema *A. thaliana-Pst*.

## IV. HIPÓTESIS

La expresión diferencial del gen *AtPAO1* en líneas mutantes y de sobreexpresión afecta tanto el contenido de ROS a nivel local y sistémico, así como la inducción de la HR y SAR. Estas respuestas son debidas a cambios en los perfiles de expresión de genes de respuesta hipersensible y sistémica.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del gen *AtPAOI* en la producción local y sistémica de ROS, la inducción de HR y SAR en respuesta a *Pseudomonas syringae*.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si el gen *AtPAOI* es requerido para la inducción de la respuesta hipersensible evaluando el fenotipo de las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI* inoculadas con la cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae*.
2. Demostrar el establecimiento de la SAR en las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI* inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.
3. Determinar si los cambios en la expresión del gen *AtPAOI* en las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI* afecta la expresión de genes que participan en la inducción de HR y SAR en respuesta a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.
4. Identificar en ensayos SAR, los sitios de producción de ROS en las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI*.
5. Evaluar el efecto de las PAs sobre los sitios y dinámicas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empleando la línea sensora Col-0-*HyPer1*.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para este estudio se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia (Col-0), la línea mutante insercional de T-DNA *Atpao1-1* (SALK\_013026.56.00.x) y una línea de sobreexpresión del gen *AtPAO1* (*35S::AtPAO1-L9*).

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con 200  $\mu$ L de etanol al 96% durante 2 min con una agitación constante de 1, 800 rpm. Seguido de esto, el etanol fue retirado y se agregaron 200  $\mu$ L de hipoclorito de sodio (NaClO) al 30% bajo las mismas condiciones de agitación por 8 min. Finalmente, se descartó el NaClO y se adicionaron 200  $\mu$ L de agua destilada estéril. Se realizaron seis lavados de 2 min cada uno bajo las mismas condiciones de agitación. Las semillas fueron sincronizadas durante dos días a 4 °C en oscuridad. Después fueron sembradas en placas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) 0.5X (sacarosa 1.5%, agar 1.0%, MES 0.05% ) ajustado a pH de 5.7 con KOH 1 M. Tras cumplir una edad de 15 días se transfirieron a una maceta con un sustrato comercial de shunshine:vermiculita:perlita, en proporción 3:1:1, respectivamente. Los experimentos se realizaron bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento con un fotoperiodo corto (8 h luz/ 16 h oscuridad) a  $21 \pm 2$  °C hasta alcanzar las seis semanas de edad.

### 6.2. Crecimiento de *Pseudomonas syringae*

Se usó una cepa bacteriana virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, (*Pst*) y una cepa avirulenta de *P. syringae* que expresa el efector *AvrRpt2*. Previo a los ensayos de infección las cepas se cultivaron durante 24 y 48 h, respectivamente en un medio King B (KB) suplementado con rifampicina (50  $\mu$ g/mL) a 28 °C.



### **6.3. Establecimiento de la respuesta hipersensible (HR)**

Las líneas de estudio fueron infiltradas con la cepa avirulenta *AvrRpt2* de *P. syringae* empleando una OD<sub>600</sub> 0.2 según lo descrito por Yuan et al., 2021. El progreso de la infección en las hojas locales fue fotografiado utilizando un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Tm Stemi TM Dv4 a las 24, 48 y 72. A partir de las imágenes obtenidas se midió la propagación de la infección empleando el programa Image-Pro-Plus V4.0.

### **6.4. Tinción con azul de Evans para evaluación de la muerte celular**

Las hojas infiltradas ( $MgCl_2$  o *AvrRpt2*) se colocaron en tubos tipo Falcón donde se cubrió el tejido con la solución de azul de Evans (0.25 g de azul de Evans por cada 100 mL  $CaCl_2$  0.1 M, pH 6.0) durante 20 min. Se eliminó la solución de azul de Evans y se realizaron 5 lavados con agua destilada para remover el colorante en su totalidad (Vijayaraghavareddy et al., 2017). Se obtuvieron imágenes representativas de 18 hojas locales e independientes utilizando un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Tm Stemi TM Dv4 a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la primera inoculación (hpi).

### **6.5. Cuantificación de la muerte celular por ensayos de fuga de electrolitos**

A partir de hojas previamente infectadas con la cepa *AvrRpt2* se cortaron 15 discos de 0.5 cm de diámetro. Estos fueron colocados en tubos Falcón con 10 mL agua Milli-Q y permanecieron incubados durante 30 min a 90 rpm, cuya finalidad fue eliminar los iones liberados como consecuencia del daño mecánico. El agua Milli-Q fue decantada y se agregaron nuevamente 10 mL. Solo 6 mL del volumen inicial fueron transferidos a tubos Falcón nuevos por cada muestra donde la conductividad fue medida empleando el potenciómetro (HANNA instruments HI 2550). La conductividad electrolítica fue expresada en  $\mu S/cm$ , relacionándose con una pérdida de iones en las células muertas a lo largo del tiempo. Es importante regresar el volumen de agua muestreada al tubo Falcón original para

mantener el volumen constante de 10 mL a lo largo del experimento. Los tiempos de medición fueron en intervalos de 2 h (Imanifard et al., 2018).

## **6.6. Ensayos de resistencia sistémica adquirida (SAR)**

La cepa de *P. syringae* (*Pst*) previamente cultivada en medio sólido KB fue lavada con 2 mL de MgCl<sub>2</sub> (10 mM, pH 7.0), se recolectó 1 mL de la masa bacteriana y se realizaron las diluciones para la obtención de la OD<sub>600</sub> de interés. Se siguió el protocolo de Rufián et al., 2019 con algunas modificaciones, la inoculaciones se realizaron infiltrando el envés de la hoja con ayuda de una jeringa sin aguja. La primera infiltración se generó en el tejido local (hoja 8, 9 y 10 de la roseta) con una suspensión bacteriana OD<sub>600</sub> 0.005 o con MgCl<sub>2</sub> (10 mM, pH 7.0) para el control. Tras 48 h, se realizó la segunda infiltración del tejido distal (hojas 13, 14 y 15) con una suspensión bacteriana de *Pst* OD<sub>600</sub> 0.0005. Los títulos bacterianos fueron obtenidos 72 h posteriores a la segunda inoculación, a partir de las hojas distales. Se obtuvieron 2 discos de 0.5 cm por cada hoja los cuales fueron colocados en tubos tipo Eppendorf con 200 µL de MgCl<sub>2</sub> para su posterior homogenización. En cada uno de los extractos se realizaron diluciones seriadas desde 1: 1x10<sup>1</sup> hasta 1: 1x10<sup>6</sup>. De cada dilución se sembraron 10 µL en placas de Petri que contenían medio KB suplementado con rifampicina (50 µg/mL); Se incubó a 28 °C por 24 h. Finalmente, se realizó el conteo del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) representadas como (UFC/cm<sup>2</sup>). Se analizaron 5 réplicas biológicas por líneas.

## **6.7. Extracción de RNA**

Para determinar los niveles de expresión de genes de interés, se homogeneizo el tejido vegetal en nitrógeno líquido con ayuda de un pistilo. Se colocaron 500 µL del reactivo TRI Reagent (Sigma-Aldrich) a cada una de las muestras, se mezcló con ayuda de un vórtex por 15 s y se incubó durante 7 min a temperatura ambiente (TA). Enseguida se adicionaron 100 µL de cloroformo, se mezcló con ayuda de un vórtex y las muestras fueron incubadas por 6 min a TA. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm a 4 °C. El sobrenadante

obtenido se transfirió a un tubo tipo Eppendorf y se adicionó 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto frío, se mezcló por inversión para finalmente dejarlo en hielo por 10 min. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min a 4 °C, esto nos permitió obtener el RNA precipitado en forma de gel. El sobrenadante, fue decantado, la pastilla se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 75% frío y se centrifugó por 7 500 rpm por 5 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla y finalmente, el RNA fue resuspendido en 30  $\mu\text{L}$  de agua DEPC al 0.1% y se almacenó a -80 °C para su posterior uso. Para verificar la presencia e integridad del RNA, se realizó un análisis por electroforesis. Para ello, se desnaturizó la muestra colocando 2  $\mu\text{L}$  de RNA total en 6  $\mu\text{L}$  de formamida al 50%, y se calentó a 95 °C por 5 min para su desnaturalización. Para su separación se utilizó un gel de agarosa al 1.0% a 70 mV por 30 min. Finalmente, la presencia e integridad del RNA fue visualizada en un fotodocumentador.

## **6.8. Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

La cuantificación del RNA se realizó en un Nanodrop. Posteriormente, se realizó un tratamiento para eliminar el DNA genómico presente en la muestra, empleando el kit TURBO DNA-free<sup>TM</sup>. Para cada muestra se le adicionó 2.2  $\mu\text{L}$  de 10X TURBO DNase<sup>TM</sup> - Buffer, RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  TURBO DNase y nuclease-free water 59 (incluida en el kit) hasta alcanzar un volumen total de 22  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, las muestras fueron colocadas a 37°C por 40 min, se mezcló a la mitad de tiempo. Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de DNase inactivation reagent y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min. La resina permitió la inactivación de la DNasa. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 90 s, en la parte inferior quedó la enzima DNasa inactivada junto con la resina. El sobrenadante fue colocado un tubo de PCR nuevo y estéril y fue almacenado a -80 °C. Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se utilizó el kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). En tubos de PCR nuevos y estériles se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de RNA (1  $\mu\text{g}$  RNA total tratado con DNasa), 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT (stock 50  $\mu\text{g}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O DEPC (0.1%), para obtener un volumen total de 12  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó a 65 °C por 5 min y se pasó a hielo. Seguido de esto se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de 5X reaction Buffer for DNA, 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  de Ribolock y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima RevertAid para obtener un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

La reacción de síntesis de cDNA se llevó a cabo a 42 °C por 60 min, seguido de la inactivación de la enzima a 70 °C por 5 min. El cDNA se cuantificó en un Nanodrop y fue diluido en una relación 1:5 con agua destilada estéril, para emplearlo en análisis de expresión génica por qPCR.

## 6.9. Análisis de la expresión génica

Los niveles de expresión génica fueron determinados en hojas locales y distales de plantas de 6 semanas de edad sometidas a ensayos de SAR a las 6 y 24 h posteriores a la primera (hppi) y segunda inoculación (hpsi). Para ello, se usó el protocolo de Maxima SYBER Green (BioRad). Las condiciones para la qPCR consistían en una desnaturalización inicial de 95 °C por 2 m y 40 ciclos de PCR de 95 °C por 15 s (desnaturalización) y de 61 °C por 30 s para alineamiento/extensión. Las curvas de fusión (melting curve) se realizaron a partir de 65 °C aumentando gradualmente la temperatura cada 0.5 °C hasta alcanzar los 95 °C. Para la expresión génica se realizó una comparación entre la muestra control con respecto a la muestra de interés, a partir del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El gen de referencia empleado fue *AtEF1 $\alpha$*  (*elongation factor 1 alpha*, ID At1g07940) de *A. thaliana*. Cada una de las mediciones se realizaron por triplicado.

## 6.10. Detección histoquímica de ROS

Para la identificación de sitios de producción de ROS a nivel local y distal en plantas sometidas a ensayos SAR, se realizaron las siguientes tinciones histoquímicas.

Para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se empleó 3,3,-diaminobenzidina (DAB) siguiendo el protocolo de Hernández et al., 2021. La solución fue preparada con TRIS-acetato 50 mM ajustada a un pH de 5.0 con ácido acético glacial. El DAB fue empleado a una concentración de 10 mM. El tejido local y distal fue colocado en tubos tipo Falcón (con aluminio) y cubierto completamente con la solución DAB 0.1 mg/mL e infiltrados al vacío durante 1 min. En seguida, el tejido permaneció en oscuridad durante 24 h a 25 °C.

Para la detección de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se utilizó nitroazul de tetrazolio (NBT) empleando el protocolo descrito por Rodríguez & Taleisnik (2012). Se colocó una pastilla de NBT (10 mg)

por cada 100 mL de agua destilada. Posteriormente, el tejido vegetal fue cubierto completamente con la solución de NBT y se infiltró durante 1 min. Finalmente, el tejido se incubó a 30 °C en oscuridad por 2 h.

Para ambas tinciones histoquímicas, la solución de DAB o NBT fue sustituida por una solución etanol-glicerol (90 % y 10 %, respectivamente) dejándolo a 70 °C por 10 min o hasta perder completamente la clorofila de tejido vegetal. El tejido fue montado en portaobjetos donde se añadió una solución de ácido láctico:fenol:agua (1:1:1) permitiendo mantener el tejido hidratado, y una mejor manipulación. El tejido fue observado en un estereoscopio y se tomaron fotografías por cada una de las diferentes líneas de estudio. Los tiempos analizados fueron a las 0, 24, 48 y 72 h posteriores a la primera inoculación para el tejido local y distal.

### **6.11. Transformación por inmersión floral para la obtención de la línea reportera de ROS en el fondo mutante *Atpao1-1***

Plantas de *A. thaliana* del ecotipo silvestre Col-0 y de la línea mutante insercional de T-DNA *Atpao1-1* se cultivaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones de día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad) a 22 °C durante 1 mes.

Para la transformación se empleó un cultivo de *Rhizobium radiobacter 35S::Hyper3* crecido en medio Luria Bertani (LB) suplementado con rifampicina (50 µg/mL) y espectinomomicina (200 µg/mL). Tras 24 h, el cultivo se transfirió a tubos Falcón, los cuales fueron centrifugados a 4 000 rpm por 10 min. Se decantó el medio LB y las células fueron resuspendidas con 1 mL de sacarosa 5%.

Previo a la inmersión floral con *R. radiobacter* se cortaron las silicuas y flores abiertas donde únicamente los botones florales cerrados de la planta fueron invertidos en una solución que contenía *R. radiobacter 35S::HyPer3* con 5% de sacarosa y Silwet L-77 0.05% por 8 min. Posteriormente, se secó el exceso de la solución, se cubrió con plástico para mantener la humedad y fueron colocadas en la oscuridad por 20 h. El plástico fue retirado y las plantas

volvieron a las condiciones de crecimiento iniciales. Una vez secas las silicuas, se recolectaron las semillas ( $T_0$ ).

### **6.12. Detección de las transformantes**

Las semillas fueron esterilizadas y cultivadas en un medio MS 0.5X (Sacarosa 1.5%, MES 0.05% y agar bacteriológico 1.0%), pH 5.7 suplementado con kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las plántulas transformadas que mostraron una resistencia a kanamicina ( $T_1$ ) y una fluorescencia fueron colocadas en el sustrato comercial a los 10 días de edad. Obteniendo semillas de la generación  $T_1$  para *Col-0-pH*, *Col-0-HyPer3* y *Atpaol-1-HyPer3*.

### **6.13. Dinámica de producción de $\text{H}_2\text{O}_2$**

Se detectó la producción de ROS en respuesta a un estímulo local en hoja y raíz inducido por las PAs (Spm, Spd o Put 30  $\mu\text{M}$ ) en plantas *Col-0* de *A. thaliana* que expresan el sensor *HyPer1* de 8, 11 o 14 días de edad.

### **6.14. Preparación y esterilización de placas de Petri con fondo de cristal para el cultivo de *A. thaliana***

En el centro de las cajas de Petri se trazó un rectángulo de 66 x 48 mm, el cual fue cortado con un cortador caliente. Los bordes fueron pulidos y se les colocó silicón para adherir el cubreobjetos. Posteriormente, se dejaron secar durante la noche.

Para esterilización de las placas de fondo de cristal se empleó el método de fase de vapor. Las placas fueron colocadas en una cámara de plástico junto a un vaso de precipitado que contenía 100 mL de cloro y se añadieron 3 mL de ácido clorhídrico (HCl) 37% durante 3 h, se neutralizó la reacción con NaOH 10 M durante 30 min y finalmente las cajas con fondo de cristal estuvieron en UV durante 45 min.

Las cajas de Petri de fondo de cristal estériles contenían un medio basal Linsmaier & Skoog 0.5X (sacarosa 1.5%, agar 0.8%), pH 5.7 (ajustado con KOH 1 M). Las semillas previamente esterilizadas y estratificadas (segundo lo descrito en el apartado 6.1) fueron colocadas de la siguiente manera: con un bisturí estéril se realizó un corte en el medio de cultivo, tomando como guía el lado más largo del cubreobjetos, 3 mm a la izquierda del primer corte, se realizó un segundo corte en diagonal en el medio de cultivo. Posteriormente, se retiró el medio que se encontraba entre ambos cortes previamente realizados. Se colocaron 4 semillas por placa en la parte inferior del sitio donde se generó el corte en diagonal, cada una de las semillas se colocó a 1 cm de distancia respecto a otra. Las placas fueron selladas y colocadas de manera vertical a 21 °C en un fotoperiodo largo (16 h luz/ 8 h oscuridad) (Lara-Rojas et al., 2023).

### **6.15. Adquisición y procesamiento de imágenes**

Las imágenes se obtuvieron empleando un microscopio invertido Nikon TE300 con un objetivo 10x acoplado a una fuente de iluminación xenón (DG-4, Sutter Instruments) y a un conmutador de longitud de onda que fue estimulado por un galvanómetro. El sistema fue operado por el software MetaMorph/MetaFluor (Universal Imaging, Molecular Devices).

Las cajas de Petri modificadas que contenían las plántulas de interés fueron colocadas en la platina del microscopio. Dentro del software Methafluor se abrieron tres ventanas: para la ventana 1 se seleccionó la longitud de onda de excitación de 495 nm y la de emisión fue de 530 nm (paso de banda 20); la segunda ventana se seleccionó una longitud de excitación de 420 nm y la de emisión de 530 nm (paso de banda 20) y por última para la tercera ventana se seleccionó la fuente de iluminación transmitida. Esto permitió adquirir la imagen que se transmitió (Lara-Rojas et al., 2023).

## 6.16. Análisis estadístico

Para los datos obtenidos se les realizó una prueba de distribución normal de Shapiro-Wilk. Los datos que cumplieron con el supuesto de normalidad fueron sometidos a una prueba de ANOVA de 1 vía o 2 vías y una prueba post-hoc de Tukey o Dunnett para determinar las diferencias significativas. Los asteriscos representan:  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*),  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Los resultados presentados son un producto de medias  $\pm$  SEM, se emplearon de 3 a 18 réplicas biológicas dependiendo del tipo de experimento. Los análisis fueron determinados utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 para Windows.



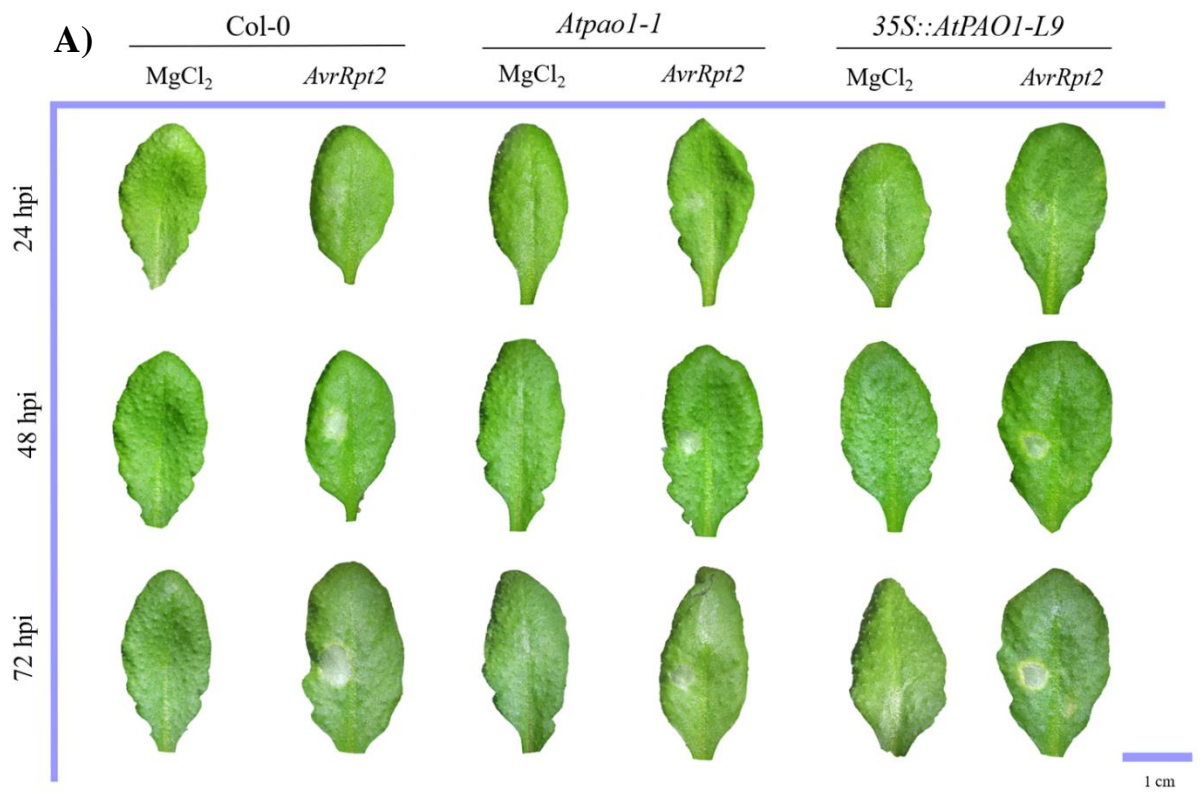
## VII. RESULTADOS

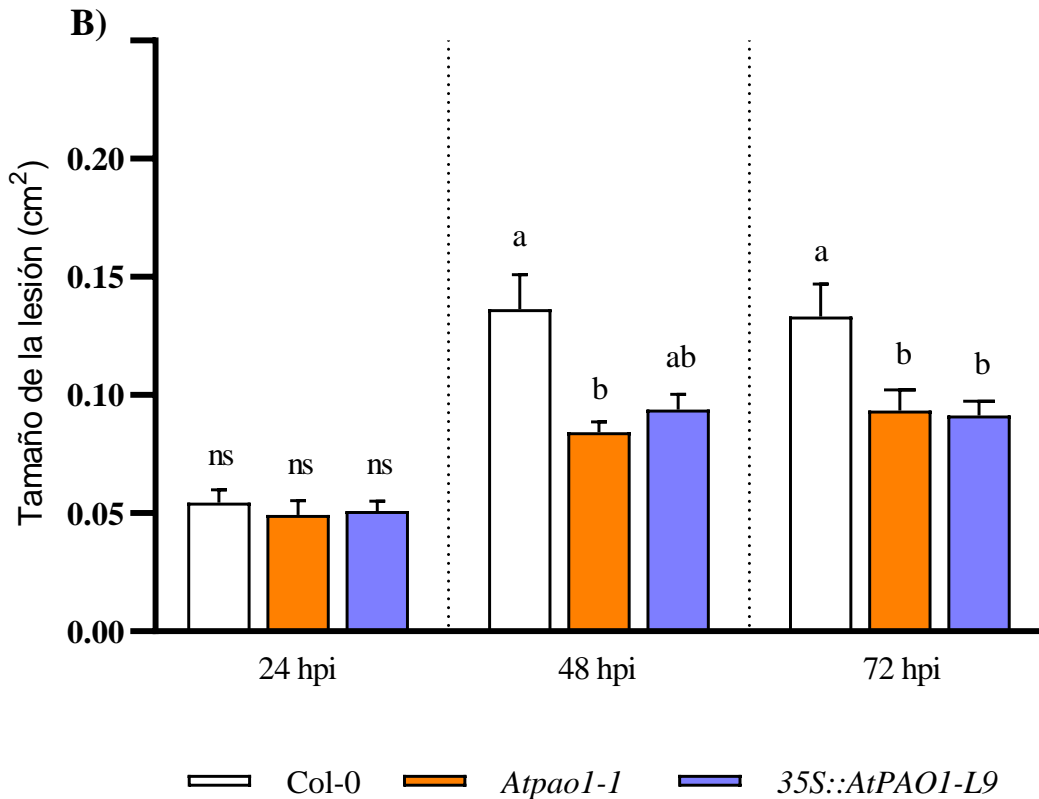
### 7.1. Respuesta hipersensible (HR)

La HR es un tipo de muerte celular resultado de la activación de la ETI. Como primer punto, fue importante determinar si el fenotipo de resistencia que presenta la línea insercional de T-DNA *Atpao1-1* es consecuencia de la activación de este mecanismo de defensa. Para ello, se realizó una infiltración empleando la cepa avirulenta *P. syringae* que expresa el efector *AvrRpt2* infectando solo el área que abarca la jeringa sin aguja.

A continuación, se presenta una evaluación del progreso de muerte celular a las 24, 48 y 72 hpi donde se aprecia una pérdida de la clorofila desde las 24 h, la cual va incrementando a través del tiempo. A pesar de ello, se puede notar que en la línea *Atpao1-1*, la infección se encuentra más localizada y delimitada a partir de las 48 hpi en comparación a la WT (Figura 4A).

Un análisis interesante fue poder determinar de una manera cuantitativa la inducción de la HR. Empleando el programa de Image Pro-Plus se midió la progresión de la infección en los diferentes tiempos. Es importante recordar que este ensayo emplea una cepa avirulenta, por lo que en las 3 líneas se indujo una HR consecuencia del reconocimiento del efector *AvrRpt2*; sin embargo, de manera interesante, podemos notar que a partir de las 48 hpi la progresión de la infección se detiene. Esto lo podemos concluir ya que a las 72 h la propagación de la infección no muestra un incremento significativo. Una diferencia importante para destacar es que la línea *Atpao1-1* y la línea sobreexpresora *35S::AtPAO1-L9* tienen una menor progresión de la infección, por lo que podemos intuir que se presentó una activación temprana de genes implicados en este mecanismo de defensa en comparación a Col-0 (Figura 4B).

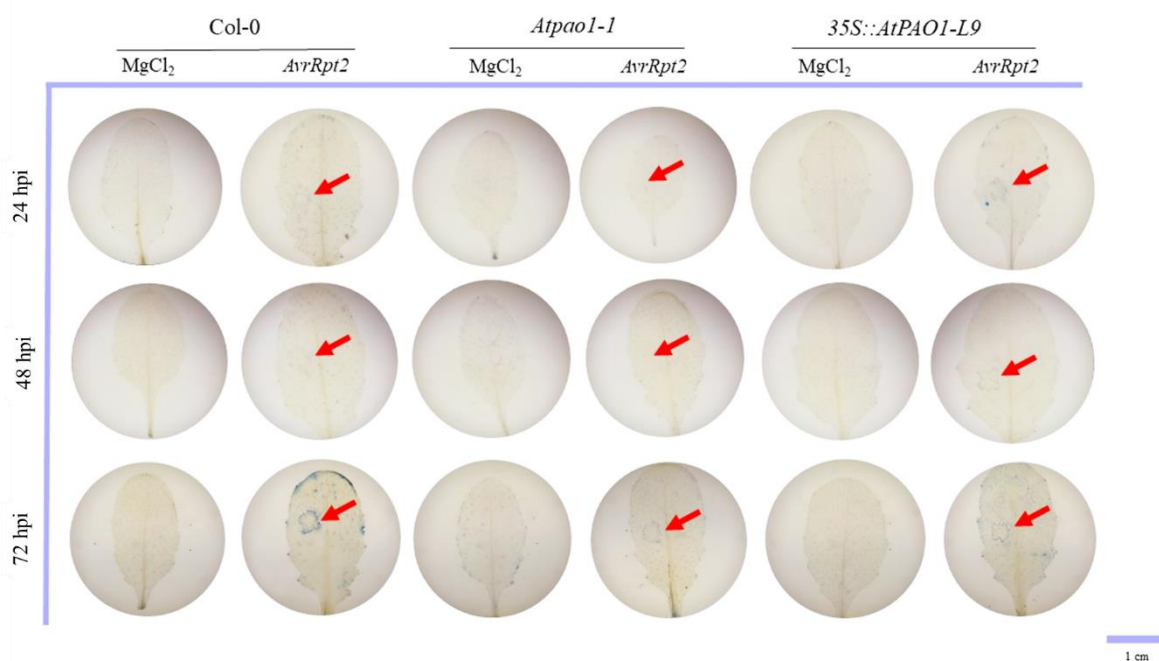




**Figura 4. Progresión de la muerte celular en las líneas Col-0, *Atpao1-1* y *35S::AtPAO1-L9* empleando la cepa avirulenta de *P. syringae AvrRpt2*.** La muerte celular fue evaluada a las 24, 48 y 72 hpi en hojas infectadas con la cepa avirulenta *P. syringae AvrRpt2* a una OD<sub>600</sub> 0.2. **A)** imágenes representativas de hojas infectadas. Barra de escala 1 cm. **B)** Progresión de la infección causada por la cepa avirulenta *AvrRpt2*. Los datos fueron sometidos a una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. El estadístico empleado fue una prueba de ANOVA de 1 vía y un post-hoc de Tukey  $\pm$ SEM. n= 18.

Asimismo, se realizó una tinción histoquímica con azul de Evans para evaluar la muerte celular ocasionada por la infección con la cepa avirulenta *P. syringae AvrRpt2*. A las 24 hpi, se pueden observar algunas células teñidas con azul de Evans localizadas en la periferia del sitio donde se generó la inoculación. A través del tiempo, es notable un incremento en el número de células que sufrieron una muerte celular. A las 72 hpi se destaca que Col-0 es la línea que tiene una mayor muerte celular seguido de la sobreexpresora *35S::AtPAO1-L9* y por último a la línea mutante *Atpao1-1* (Figura 5). Es importante

mencionar que la infiltración con jeringa no provoca un daño o muerte celular del tejido vegetal y esto se comprueba en las hojas control ( $MgCl_2$ ) que no muestran daño alguno.

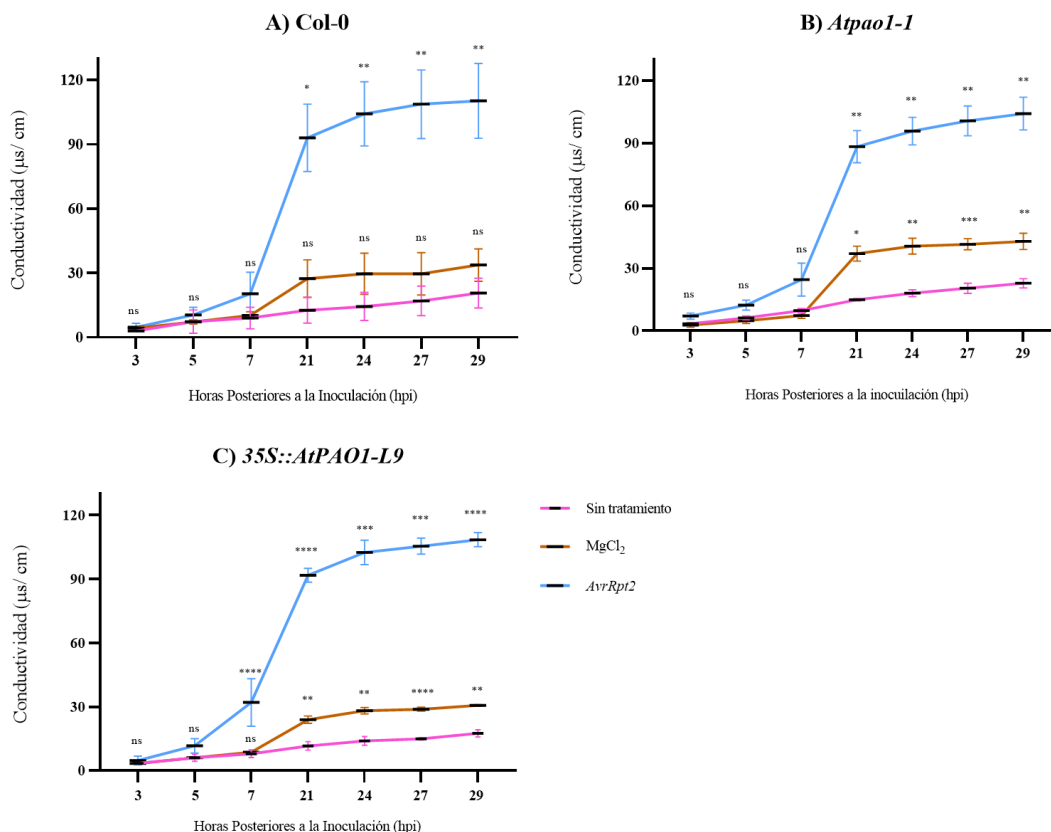


**Figura 5. Detección histoquímica de muerte celular empleando azul de Evans en plantas del ecotipo silvestre Col-0, *Atpao1-1* y *35S::AtPAO1-L9* sometidos a ensayos de HR.** Las hojas fueron infiltradas con *P. syringae AvrRpt2* a una  $OD_{600}$  0.2. Los resultados obtenidos son imágenes representativas de  $n=18$  por línea para cada uno de los tratamientos a las 24, 48 o 72 hpi. Flecha roja indica el sitio de inoculación. Barra de estala = 1 cm.

El ensayo de conductividad tiene una correlación positiva con la muerte celular. Para corroborar los datos obtenidos de la tinción histoquímica azul de Evans (Figura 5), se evaluó la conductividad electrolítica, permitiéndonos conocer la pérdida de iones de las células sometidas a un estrés por el patógeno *Pst*.

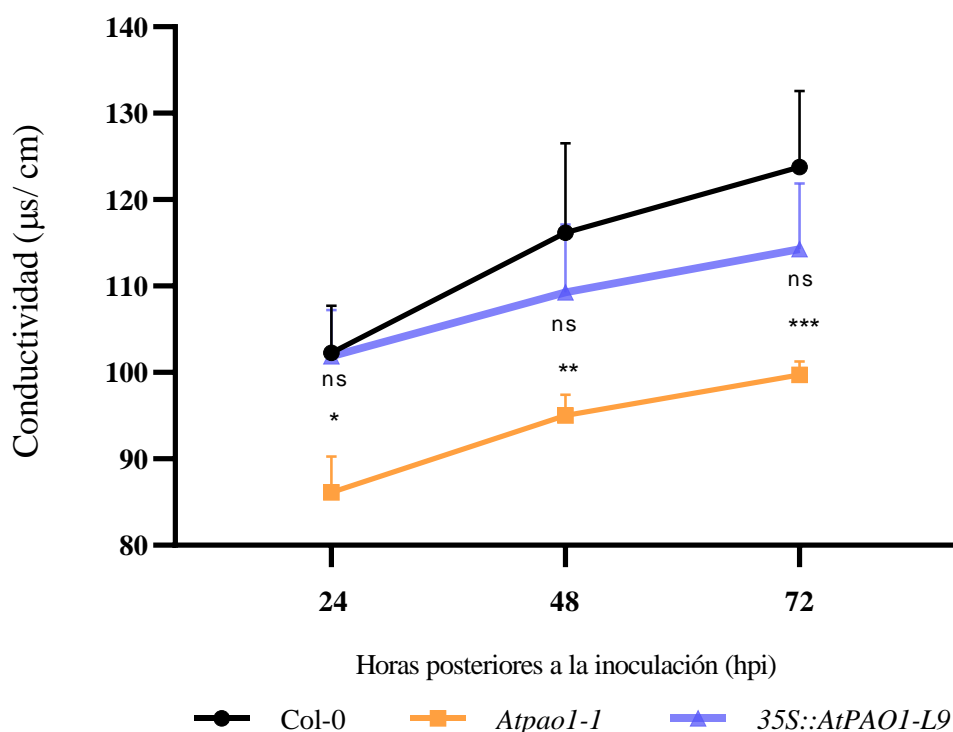
Se cortaron discos de hojas a partir de plantas sometidas a tres condiciones diferentes, en la primera los discos no tenían ningún tratamiento, en la segunda los discos se cortaron a partir de hojas infiltradas con  $MgCl_2$  y en la tercera los discos se obtuvieron de hojas infiltradas con *P. syringae AvrRpt2* ( $OD_{600}$  0.2). En las diferentes líneas, las condiciones: sin

tratamiento y  $MgCl_2$  tuvieron una pérdida de iones menor con respecto al tratamiento con la cepa avirulenta *AvrRpt2*, teniendo una tendencia constante a lo largo del tiempo. Tras la infección con *P. syringae AvrRpt2*, se percibe un incremento en la conductividad electrolítica relacionada con una inducción de la muerte celular (Figura 6A, B, C).



**Figura 6. Análisis de la pérdida de iones en plantas infiltradas con  $MgCl_2$  o la cepa avirulenta de *P. syringae AvrRpt2*.** La conductividad ( $\mu s/cm$ ) fue medida en intervalos de 2 h bajo tres condiciones (sin tratamiento,  $MgCl_2$  o *AvrRpt2* (cepa avirulenta de *P. syringae*,  $OD_{600}$  0.2). **A)** Conductividad del ecotipo silvestre (Col-0), **B)** Conductividad de la línea mutante *Atpao1-1*, **C)** Conductividad de la línea de sobreexpresión *35S::AtPAO1-L9*. Los valores obtenidos son la media de 3 réplicas biológicas. La normalidad de los datos fue determinada con la prueba de Shapiro-Wilk. El análisis estadístico empleado fue un ANOVA de dos vías con un post-hoc de Dunnett  $\pm$  SEM, realizando una comparación entre las condiciones  $MgCl_2$  y *AvrRpt2* con respecto a “sin tratamiento” para cada hora. Las diferencias estadísticas se muestran empleando asteriscos  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*),  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*), ns= diferencias no significativas.

A partir de los resultados obtenidos en la figura 6 se buscó evaluar la conductividad electrolítica a las 24, 48 y 72 h con la finalidad de obtener datos que nos permitan relacionarse con los previamente obtenidos. Se puede observar que la línea mutante *Atpao1-1* muestra diferencias estadísticamente significativas en pérdida de iones con respecto a Col-0 a lo largo del tiempo, lo cual se podría correlacionar con un menor muerte celular (Figura 5). Para el caso particular de la línea de sobreexpresión *35S::AtPAOI-L9* existe una tendencia a una menor pérdida de iones con respecto a Col-0; sin embargo, no hay suficiente evidencia que demuestre que existen diferencias para los diferentes tiempos analizados (Figura 7).

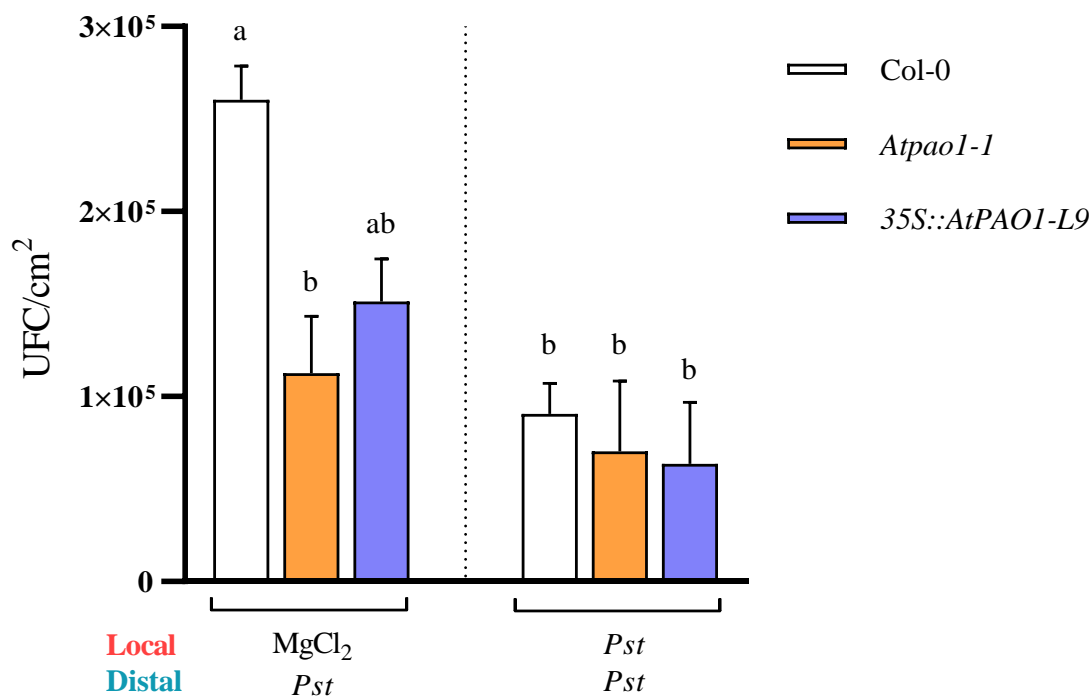


**Figura 7. Análisis de la pérdida de iones en plantas infiltradas con la cepa avirulenta de *P. syringae AvrRpt2*.** Conductividad electrolítica de las 24, 48 y 72 hpi para las líneas Col-0, *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI-L9* empleando la cepa avirulenta *AvrRpt2* OD<sub>600</sub> 0.2. Los valores obtenidos son la media de 4 réplicas biológicas. Los datos fueron sometidos a una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. El análisis estadístico empleado fue una ANOVA de dos vías con un post-hoc de Dunnett ± SEM, realizando una comparación entre *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI-L9* con respecto a Col-0 para cada tiempo. Las diferencias estadísticas se muestran empleando asteriscos  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*).

## 7.2. Resistencia sistémica adquirida (SAR)

En base a los datos anteriores, la línea mutante *Atpao1-1* se caracterizó por presentar una mayor resistencia a nivel local bajo una infección con la cepa avirulenta de *P. syringae*. A partir de ello, se buscó conocer si las diferentes líneas de estudio podrían establecer una respuesta a nivel sistémico en contra de futuras infecciones. Para evaluar el establecimiento de SAR se empleó al patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*).

Las diferentes líneas evaluadas fueron sometidas a una primera infiltración en tejido local (hojas 8, 9 y 10) con  $MgCl_2$  o *Pst*, 48 hpi se realizó una segunda infiltración en el tejido distal (hojas 13, 14 y 15) únicamente usando *Pst*. Por un lado, en la figura 8, se observa que las plantas de Col-0 inoculada a nivel local con *Pst* (priming) mostró una menor cantidad de títulos bacterianos (UFC/cm<sup>2</sup>) en el tejido distal en comparación con el control sin priming ( $MgCl_2$ ). Esto indica que la infección primaria con *Pst* en el tejido local promovió la inmunidad (SAR) al tejido distal que tras una segunda infección mostró una reducción en los títulos bacterianos. Por otro lado, la línea mutante *Atpao1-1* tuvo títulos bacterianos reducidos en el tejido distal en comparación a Col-0, esto es independiente de qué a nivel local sea inoculado con  $MgCl_2$  o con *Pst*. Lo anterior sugiere que en la línea mutante el sistema de defensa se encuentra pre-activado, otorgando una resistencia sistémica a pesar de no existir un priming a nivel local. De igual forma, la línea de sobreexpresión *35S::AtPAOI-L9* muestra títulos bacterianos reducidos consecuencia de un priming nivel local. Estos resultados, señalan que las alteraciones en *AtPAOI* modifican las respuestas de defensa de la planta.



**Figura 8. Resistencia sistémica adquirida (SAR) en la interacción *Arabidopsis thaliana* con *Pseudomonas syringae*.** Las UFC fueron determinadas a las 72 h posteriores a la segunda inoculación en hojas distales. Se empleó la cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (tejido local OD<sub>600</sub> 0.005). Los valores obtenidos son la media de 5 réplicas biológicas  $\pm$  SEM y son representados en UFC/cm<sup>2</sup>. Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los estadísticos empleados para ensayos SAR con *Pst* fue un ANOVA de 1 vía y una prueba post-hoc de Tukey.

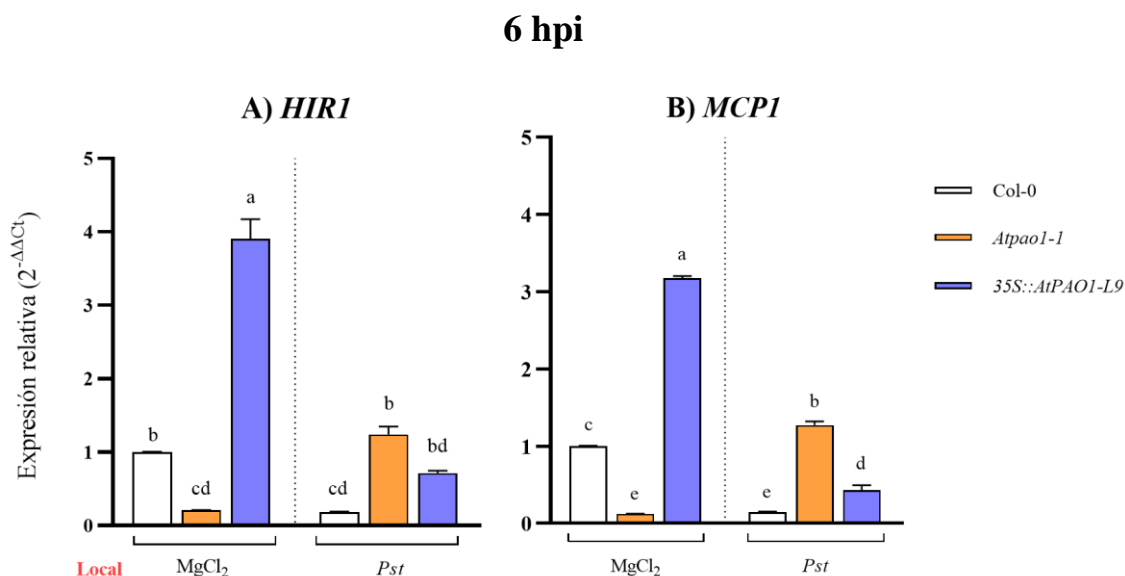
### 7.3. Expresión de genes implicados en el establecimiento de HR y SAR

Para comprobar la inducción de la HR en las líneas de estudio, se evaluaron algunos genes marcadores de la familia *AtHIR* (*AtHIR1* y *AtHIR2*) y *AtMCP1* en tejido local infectado por *Pst* a las 6 y 24 hpi.

Tras la infección con *Pst* (6 hpi), la línea Col-0 mostró una disminución en la expresión del gen *AtHIR1* en comparación con el mock. La línea *Atpao1-1* mostró un incremento en la expresión de *AtHIR1* con *Pst* en comparación a plantas no inoculadas; sin embargo, este incremento fue similar a los niveles de expresión observados en la Col-0-



MgCl<sub>2</sub>. Un patrón similar fue observado para la *AtMPC1* bajo una infección con *Pst* en la *Atpao1-1*. De manera interesante, la línea de sobreexpresora se caracterizó por tener altos niveles de expresión de los genes *AtHIR1* y *MCP1* en condiciones control, los cuales disminuyeron posterior a la inoculación con el patógeno (Figura 9).

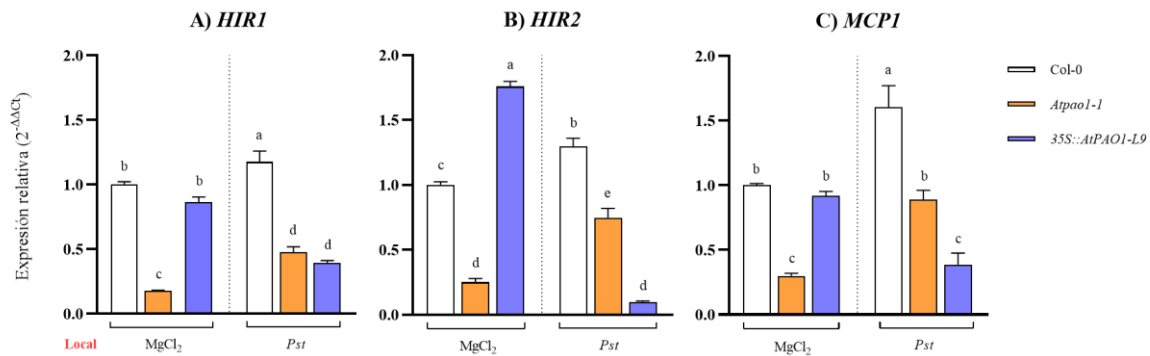


**Figura 9. Evaluación de genes marcadores de HR a las 6 hpi.** Genes marcadores de HR fueron evaluados en tejido local a las 6 hpi. **A) *HIR1*, B) *MCP1*.** Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al gen de referencia *AtEF1α* usando el método de 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Los valores son las medias ±SEM de 3 réplicas. Los resultados fueron sometidos a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Las diferencias se obtuvieron a partir de una prueba de ANOVA de 1 vía y post-hoc Tukey.

A las 24 hpi, la línea Col-0 infectado con *Pst* mostró un incremento en la expresión de los genes *AtHIR1*, *AtHIR2* y *AtMCP1* en comparación con su mock; la mutante *Atpao1-1* mostró un comportamiento similar donde los mayores niveles de expresión se obtuvieron bajo la interacción del patógeno, sin embargo, estos fueron iguales o menores con respecto al Col-0-mock. Por otro lado, la línea sobreexpresora (MgCl<sub>2</sub>) únicamente mostró niveles de expresión elevados para el gen *AtHIR2*, mientras que para los genes *AtHIR1* y *AtMCP1* los niveles fueron semejantes a los observados para Col-0; bajo una infección se puede observar que los niveles de expresión no cambian entre las 6 y 24 hpi (Figura 10). Los genes implicados en una HR mostraron una reducción en sus niveles de expresión a las 24 hpi, esto

nos indica que los genes vinculados en el establecimiento de una HR podrían ser activados en etapas tempranas de la infección por *Pst*.

## 24 hpi

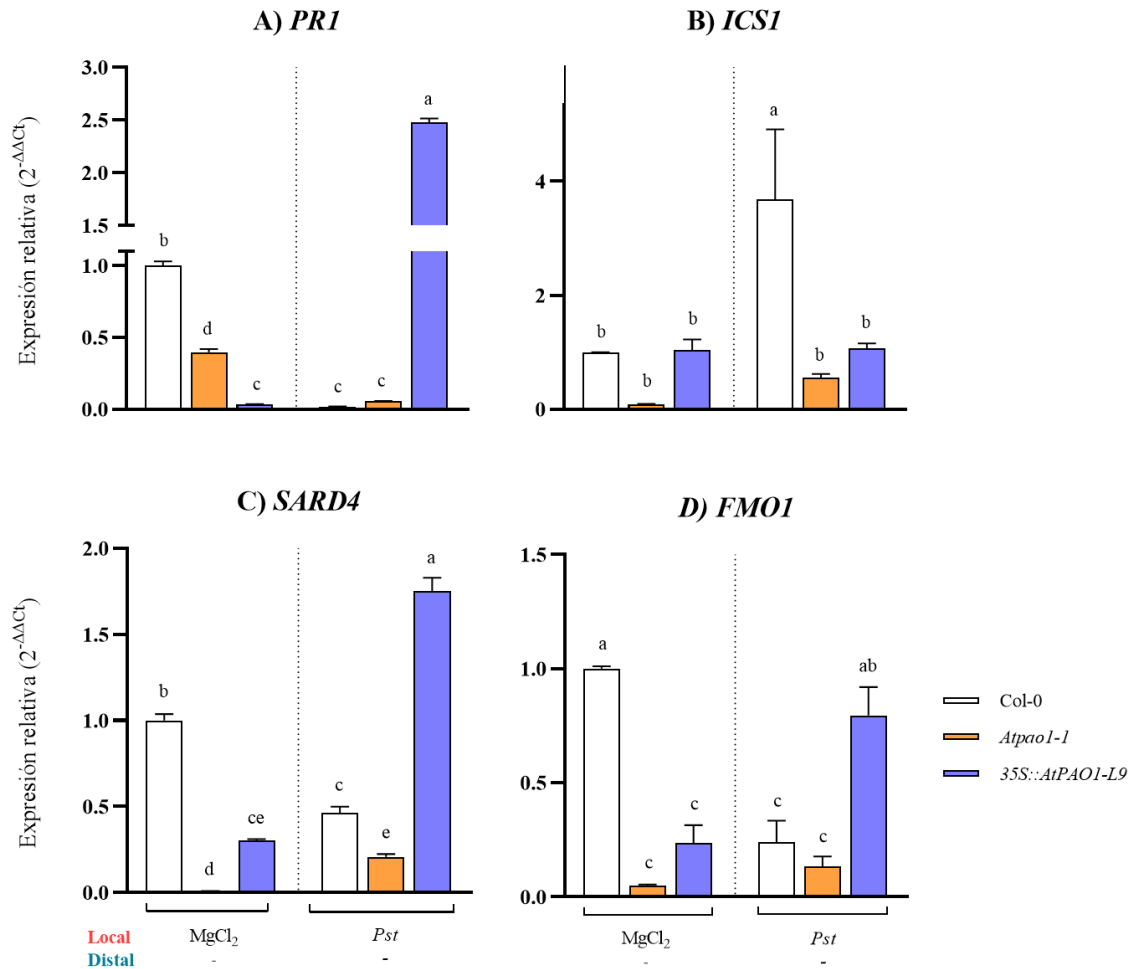


**Figura 10. Evaluación de genes marcadores de HR a las 24 hpi.** En los ensayos tipo SAR se evaluaron genes marcadores para HR a partir de tejido local a las 24 hpi. **A) *HIR1*, B) *HIR2*, C) *MCP1*.** Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al gen de referencia *AtEF1α* usando el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los valores son las medias  $\pm$ SEM de 3 réplicas. Los resultados fueron sometidos a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Las diferencias se obtuvieron a partir de una prueba de ANOVA de 1 vía y post-hoc Tukey.

De igual manera, se evaluaron algunos genes marcadores vinculados con el establecimiento de SAR en tejido distal. A las 6 hpi solo la línea *35S::AtPAO1-L9* tuvo un incremento importante en la expresión de los genes *PRI* y *SARD4*. En cambio, para las líneas Col-0 y *Atpao1-1*, los niveles de expresión para los diferentes genes marcadores se mostraron a la baja (Figura 11).

La línea WT infectada con *Pst* mostró un incremento para la *ICSI*, mientras que los genes *PRI*, *SARD4* y *FMO1* tuvieron una reducción en su expresión en comparación a Col-0 control. Los niveles de expresión que mostró la mutante *Atpao1-1* (mock) fueron menores con respecto a Col-0 (mock), a pesar de ello, *SARD4* tuvo un incremento en infección con *Pst*, pero no mayor al obtenido por Col-0 MgCl<sub>2</sub>. Finalmente, la línea de sobreexpresión mostró una mayor expresión para los genes *PRI* y *SARD4* con *Pst* e inclusive podemos notar que para *ICSI* y *FMO1* los niveles son semejantes a los mostrados en la línea WT (mock) (Figura 11).

## 6 hpi

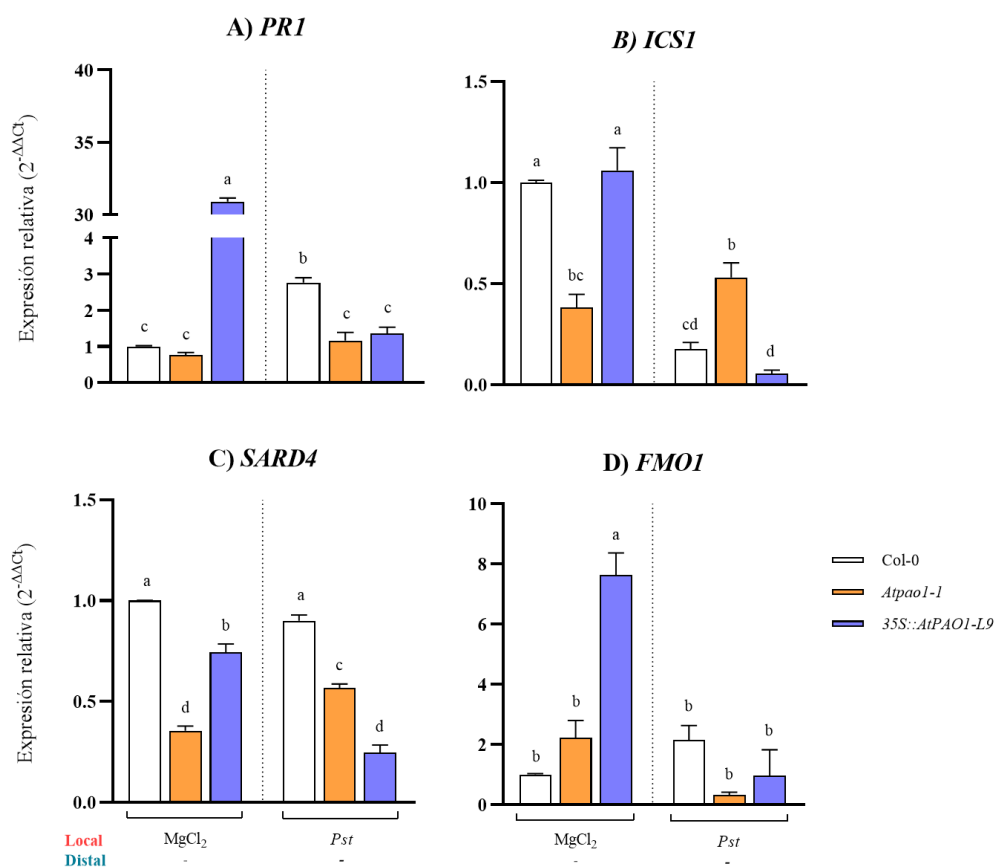


**Figura 11. Evaluación de genes marcadores de SAR a las 6 hpi.** En ensayos tipo SAR se evaluaron los genes marcadores A) *PR1*, B) *ICSI*, C) *SARD4* y D) *FMO1* a partir del tejido distal a las 6 hpi. Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al gen de referencia *AtEF1a* usando el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los valores son las medias  $\pm$ SEM de 3 réplicas. Los resultados fueron sometidos a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Las diferencias se obtuvieron a partir de una prueba de ANOVA de 1 vía y post-hoc Tukey.

La línea Col-0 sólo tuvo un cambio importante en la expresión de *PR1* cuando existe un priming previo con *Pst* a las 24 hpi. No obstante, la expresión del gen *ICSI* implicado en la síntesis de SA infectado con *Pst* se redujo notablemente. En el caso de los genes *SARD4* y *FMO1* no hubo diferencias entre ambos tratamientos. Para el caso particular de la línea mutante *Atpao1-1* (*Pst*) los genes *ICSI* y *SARD4* mostraron una reducción en su expresión

en comparación a Col-0 (mock) pero para *PRI* y *FMO1* los niveles fueron similares a Col-0 (mock). A pesar de ello, no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos para la línea mutante a excepción del gen *SARD4* que tuvo un aumento significativo bajo una infección con *Pst*. En cambio, para la línea *35S::AtPAO1-L9* solo tuvo un incremento en la expresión de *PRI* y *FMO1* sin una infección en comparación a Col-0 (control) aunque para los genes *ICSI* y *SARD4* su expresión fue igual o menor que el control de Col-0. Tras una infección, los 4 genes evaluados redujeron notablemente su expresión en comparación a su propio control (Figura 12).

## 24 hpi

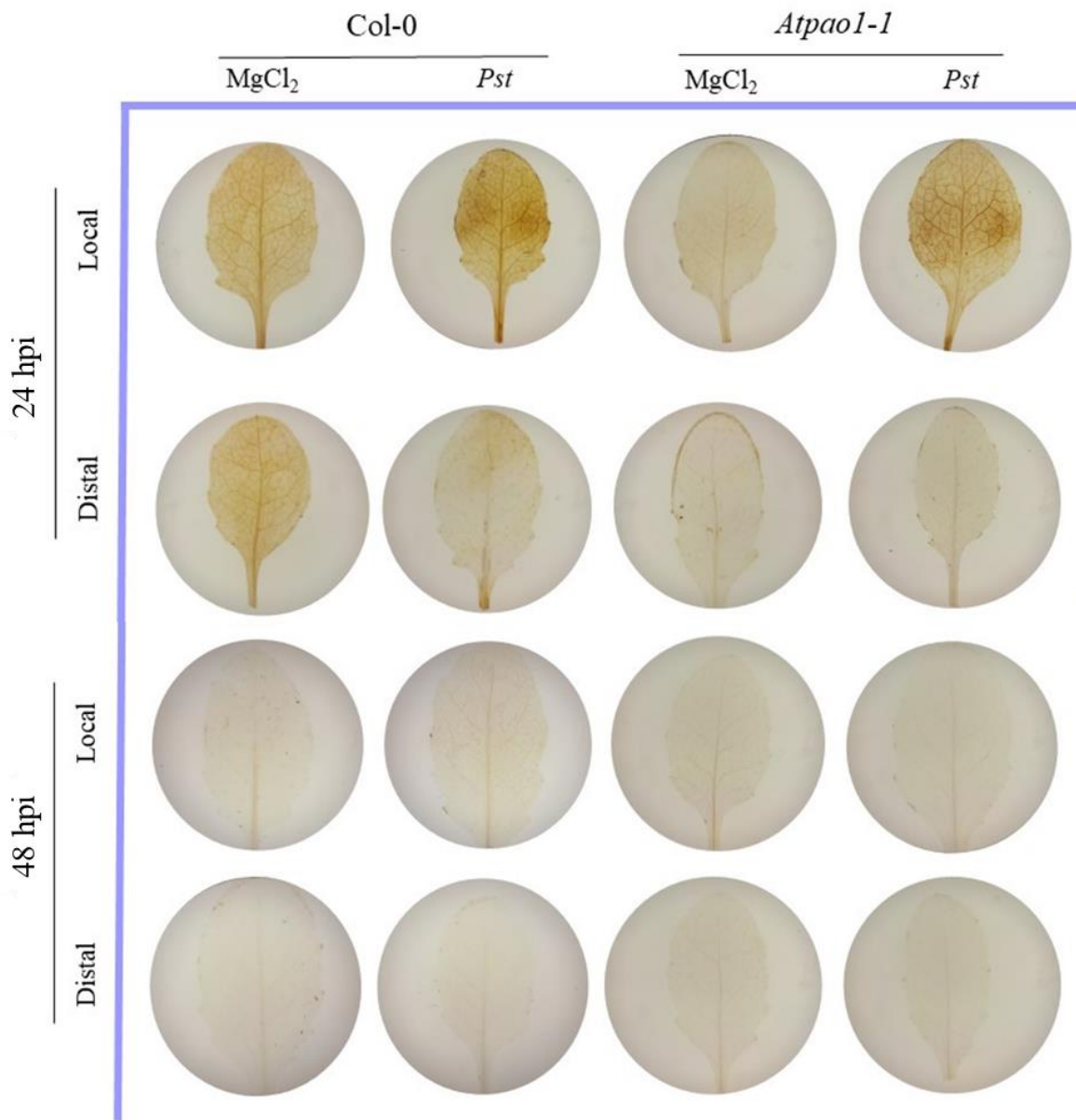


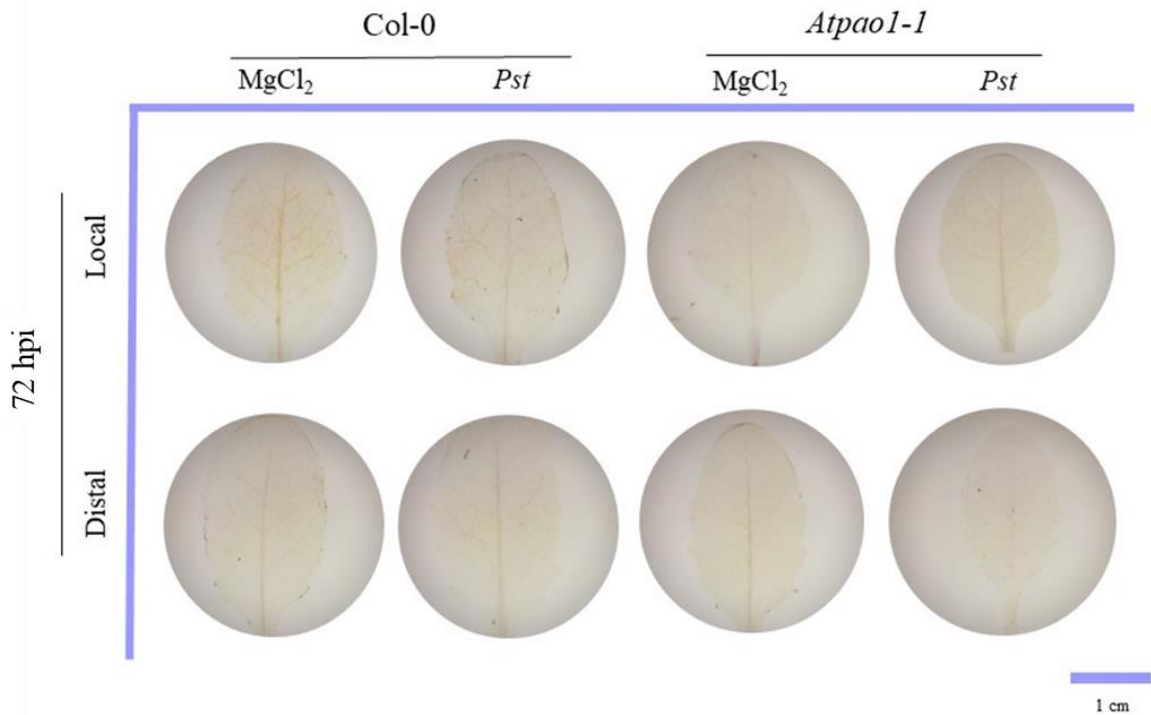
**Figura 12. Evaluación de genes marcadores de SAR a las 24 hpi.** En ensayos tipo SAR se evaluaron los genes marcadores A) *PRI*, B) *ICSI*, C) *SARD4* y D) *FMO1* a partir del tejido distal a las 24 hpi. Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al gen de referencia *AtEF1a* usando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los valores son las medias  $\pm$ SEM de 3 réplicas. Los resultados fueron sometidos a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Las diferencias se obtuvieron a partir de una prueba de ANOVA de 1 vía y post-hoc Tukey.

#### **7.4. Detección histoquímica de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ensayos SAR**

Una de las moléculas señal implicadas en el establecimiento de SAR es el  $H_2O_2$ . Para determinar en qué sitios se lleva a cabo la producción de  $H_2O_2$  se empleó la tinción histoquímica DAB en hojas infiltradas (en ambos lados con respecto al haz de la hoja) con  $MgCl_2$  o *Pst*.

A las 24 h posteriores a la infiltración con  $MgCl_2$  (mock), no se observó una diferencia en el contenido de  $H_2O_2$  entre la hoja local y distal de WT (Col-0); sin embargo, las zonas infectadas con *Pst* presentaron un incremento en la señal  $H_2O_2$  a nivel local, la cual se redujo en el tejido distal. En la línea mutante *Atpao1-1* inoculada con el mock, se observó un menor contenido de  $H_2O_2$  en ambas hojas local y distal en comparación con la WT; sin embargo, tras una inoculación con *Pst* es evidente el incremento en la señal de  $H_2O_2$  a lo largo de la hoja local y principalmente en los sitios donde se infiltró la bacteria. En la hoja distal no se observaron cambios con respecto al mock. A las 48 y 72 hpi la señal de  $H_2O_2$  en la hoja local y distal de la WT y la mutante *Atpao1-1* disminuye, no se encontraron diferencias entre las líneas analizadas (Figura 13).

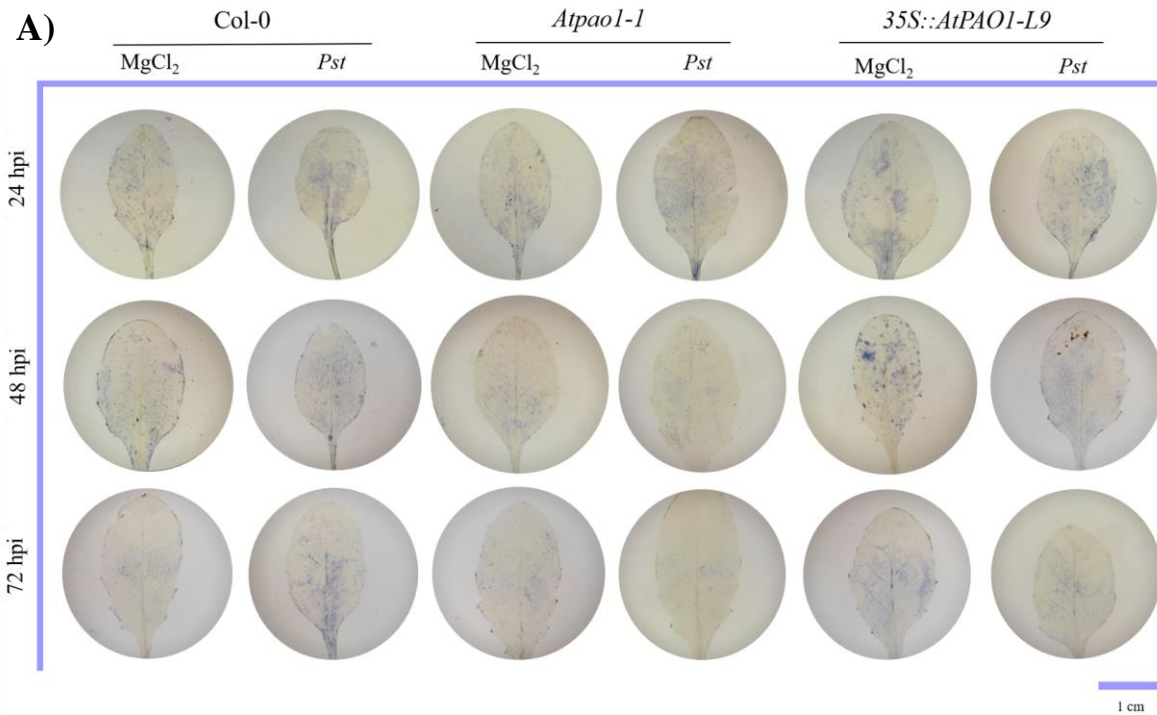




**Figura 13. Detección histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 3,3-diaminobenzidina (DAB) en plantas del ecotipo silvestre Col-0 y *Atpao1-1* sometidas a ensayos SAR.** Las hojas locales de seis semanas de edad fueron infiltradas con OD<sub>600</sub> 0.005 de *Pst* mientras que para las hojas distales fue de OD<sub>600</sub> 0.0005 de *Pst*. Los resultados obtenidos son imágenes representativas de n=9 por línea para cada tratamiento a las 24, 48 o 72 hpi. Barra de estala = 1 cm.

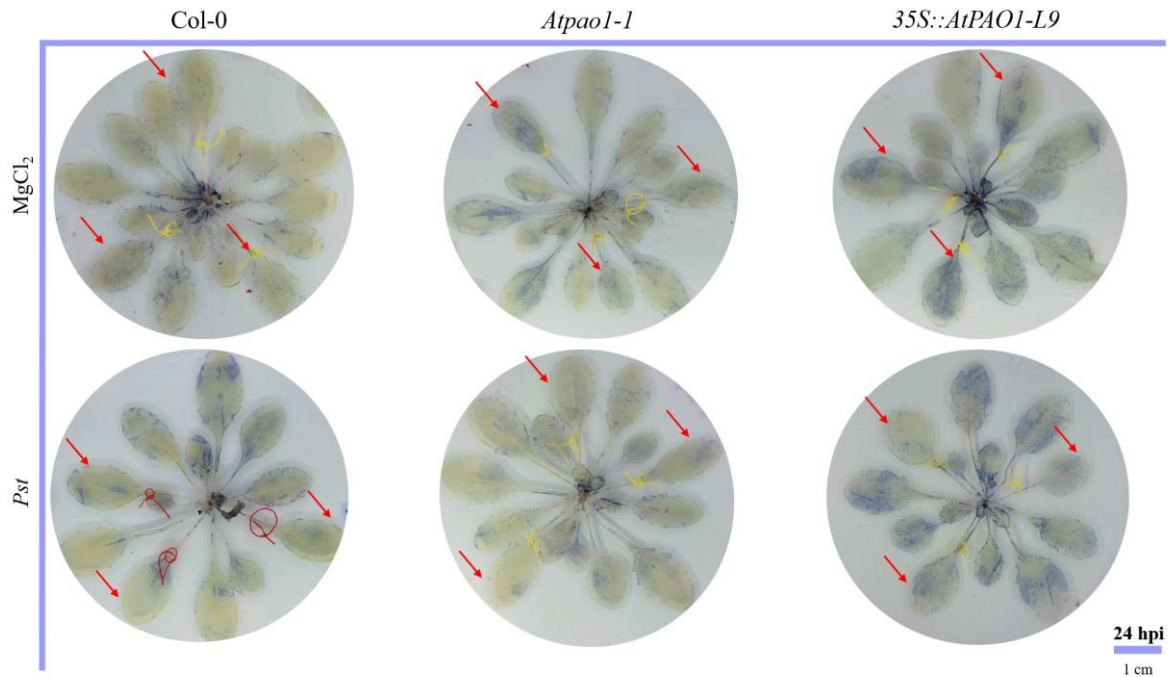
Así mismo, se evaluó la producción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> en hojas locales y en roseta completa inoculadas con MgCl<sub>2</sub> o *Pst* (Figura 14). En este ensayo se evaluó la mutante *Atpao1-1* y la sobreexpresora *35S::AtPAOI-L9*, debido a los antecedentes de nuestro grupo de investigación que vinculan al gen *AtPAOI* con la modulación de la actividad RBOHD (Jasso-Robles et al., 2020). En las hojas inoculadas con el mock, se observa una mayor señal de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en hojas de las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAOI-L9*, en comparación al control; Se puede apreciar que en todas las muestras existe una tendencia a un incremento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en el sitio de infiltración (Figura 14A). En plantas inoculadas con *Pst* es notable el incremento en el contenido de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La señal se mantiene hasta las 72 hpi en la WT y la *35S::AtPAOI-L9*; mientras que en la línea mutante *Atpao1-1* la mayor acumulación se observó a las 24 hpi.

Dentro de un panorama general, la evaluación de la roseta completa nos permitió conocer como era la señal y la distribución del  $O_2^-$  en las diferentes hojas que la conforman. Para este ensayo histoquímico la línea de sobreexpresión *35S::AtPAO1-L9* presentó una mayor señal en comparación a la WT (Col-0) y la mutante *Atpao1-1* en condiciones control (mock). Es interesante percibir el incremento en la señal tras una infección por *Pst*, esta no solo se aprecia en las hojas locales (infiltradas, señaladas con flecha roja) si no también en las hojas distales, por lo que podemos asumir que la señal se propagó desde un sitio primario hasta un sitio secundario. El incremento se observó en todas las líneas analizadas, siendo más evidente la señal para la sobreexpresora *35S::AtPAO1-L9* (Figura 14B).





**B)**



**Figura 14. Detección histoquímica de  $O_2^-$  con nitroazul de tetrazolio (NBT) en plantas del ecotipo silvestre Col-0, *Atpao1-1* y *35S::AtPAO1-L9* sometidas a ensayos de SAR. Hojas locales de plantas de 6 semanas de edad fueron infiltradas con  $MgCl_2$  ó *Pst* ( $OD_{600}$  0.005). Los resultados mostrados, A) hojas locales a las 24, 48 y 72 hpi (n=9), B) roseta completa (n=4), a las 24 hpi. Las flechas rojas señalan a las hojas locales infiltradas. Barra de estala = 1 cm.**

### 7.5. Cambios intracelulares de ROS en respuesta a PAs.

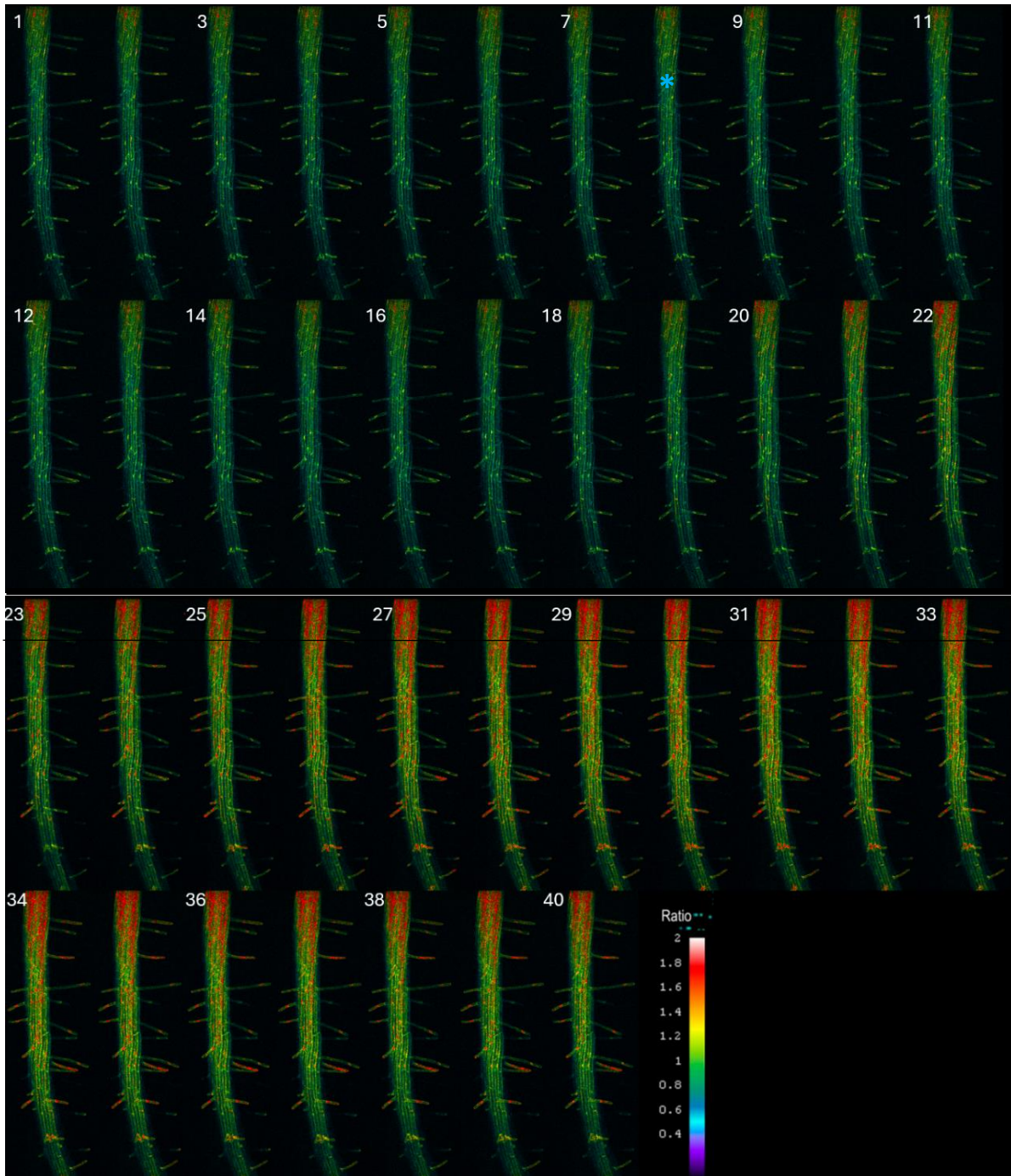
Para determinar cuáles son los cambios en los niveles de ROS ante diferentes estímulos se emplearon plantas de Col-0 que expresan el sensor *HyPer1* bajo el promotor *35S*, permitiéndonos evaluar diferentes zonas de la planta en respuesta a diferentes elicitores *in vivo*. La señal del sensor se aprecia con una fluorescencia verde en la raíz, mientras que en la parte aérea se observa una autofluorescencia de la clorofila (Figura 15).



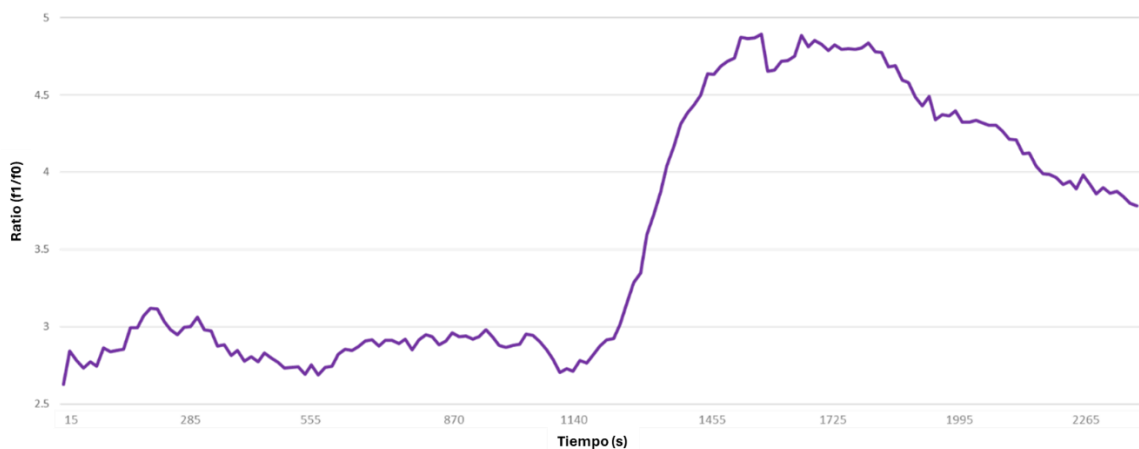
**Figura 15. Plantas de *A. thaliana* ecotipo silvestre Col-0 transformadas con 35S::HyPer1 de 7 días de edad.** La señal de fluorescencia verde se observa en raíz, la señal observada para la parte aérea es la autofluorescencia de la clorofila. Objetivo 4x. Barra de escala 1 cm.

Para demostrar que las plantas de Col-0 que expresan el sensor *HyPer1* responden a la presencia de  $H_2O_2$  exógeno, se realizó un tratamiento en la raíz con 20  $\mu$ L de  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) el cual fue colocado a los 10 min (600 s) posteriores al inicio del ensayo. En la zona de elongación de la raíz, se aprecia un incremento de la señal de  $H_2O_2$  aproximadamente a los 20 min, la cual se sostiene a lo largo del tiempo. Asimismo, la señal detectada por el sensor es evidente a lo largo de los pelos radiculares (Figura 16).

A partir de una planta transformada con el sensor *HyPer* se eligió una área de interés dentro de la zona de elongación de la raíz empleando el software SideBook (Figura 17), a partir de ello se recopilaban los datos en intervalos de 15 s durante 40 min, permitiéndonos conocer la dinámica de ROS a través del tiempo. Como se puede observar, el área seleccionada presenta un incremento en el contenido intracelular de ROS a los 9 min (1 140 s) posteriores a la adición del tratamiento donde el ratio es la relación entre la intensidad de la fluorescencia observada ( $f_1$ ) y la intensidad de la fluorescencia inicial ( $f_0$ ). Estos resultados indican que las plantas transformantes con el sensor *HyPer1* generan una respuesta como resultado de la presencia de  $H_2O_2$ .



**Figura 16. Cambios espacio-temporales en el contenido de ROS en respuesta a  $H_2O_2$  exógeno.** Plantas de Col-0-*HyPer1* de 8 días de edad fueron sometidas a un tratamiento con  $100 \mu M$  de  $H_2O_2$  (minuto 10 \*). Los datos representan cambios espacio-temporales cada 60 s durante un periodo de 40 min (2 400 s). Los números presentes en la imagen representan un valor en minutos a través del tiempo. Objetivo 10x.

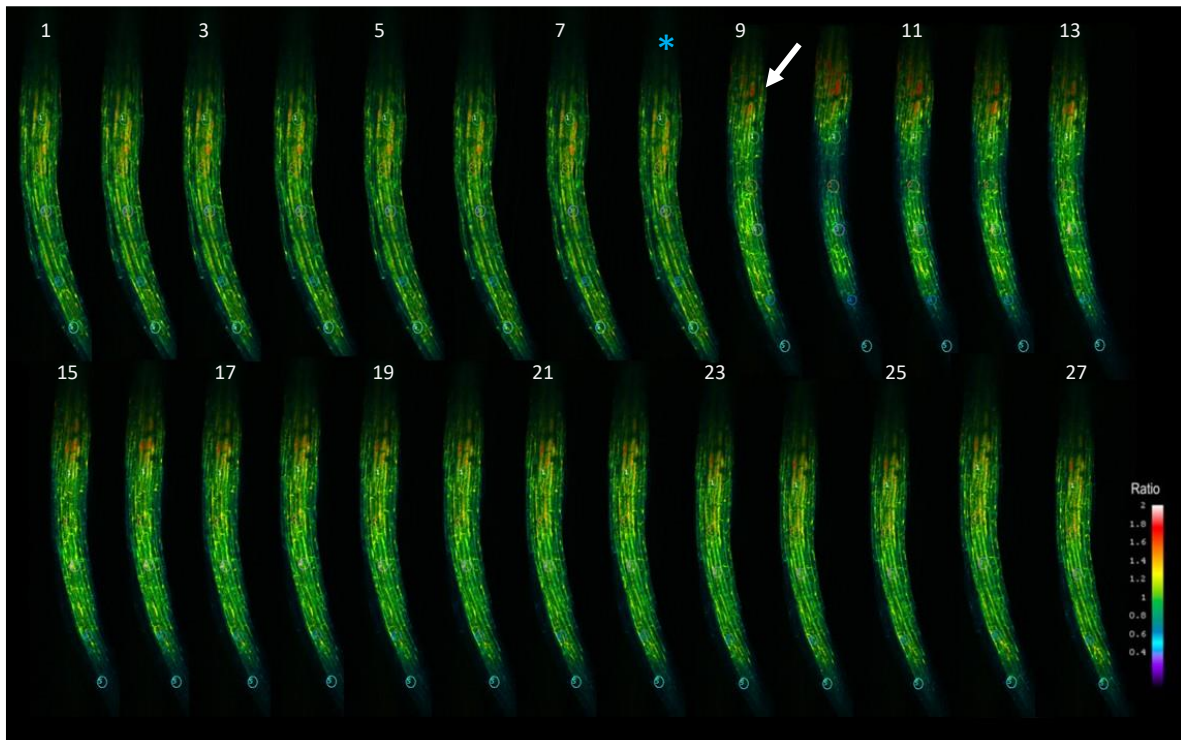


**Figura 17. Cambios intracelulares en el contenido de ROS en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno.** Plantas de Col-0-*HyPer1* de 8 días de edad fueron sometidas a un tratamiento con 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos fueron obtenidos en intervalos de 15 s durante un periodo de 40 min (2 400 s).

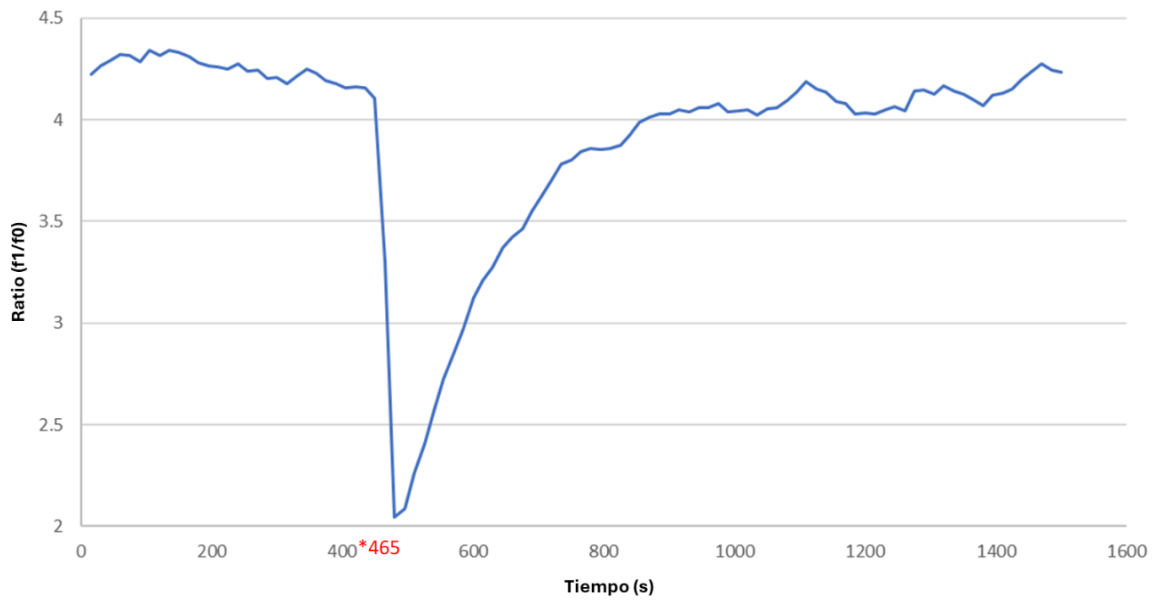
A partir de ello, se evaluó el efecto de las PAs (Put, Spd y Spm) a una concentración de 30 μM lo que nos permitió conocer si existe un cambio en los niveles de ROS dependiente del tipo de PA.

Las figura 18 y 19 representan la dinámica de ROS bajo el tratamiento de Put 30 μM en plantas de 11 días de edad. Las mediciones se realizaron cada 15 s durante un lapso de 25 min. Dentro de los primeros minutos de la cinética podemos observar los niveles de ROS detectados por el sensor *HyPer1* en condiciones control; en el minuto 7.75 (465 s) se adicionó 100 μL del tratamiento Put 30 μM distribuido en 3 pozos cercanos a la raíz principal.

A nivel espacio-temporal después de la adición del elicitador Put, en la raíz se puede observar un ligero incremento de la señal de ROS, la cual es perceptible a partir del minuto 9 (señalado por una flecha blanca) (Figura 18). Esto se puede corroborar en la figura 19 donde se detecta una caída pronunciada en la señal de ROS que de manera inmediata muestra un incremento en la señal de ROS en respuesta a la Put seguido de pequeñas fluctuaciones a través del tiempo.



**Figura 18. Cambios espacio-temporal de los niveles de ROS en raíz de plantas de Col-0-*HyPer1* en respuesta a Put 30  $\mu$ M.** Los cambios en la dinámica de ROS espacio-temporal fueron detectados en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el sensor *HyPer1* de 11 días de edad. El tratamiento con Put 30  $\mu$ M fue colocado a los 465 s (7.75 min \*). Los números presentes en la figura representan cambios espacio-temporales cada minuto durante un periodo de 27 min (1 620 s). Objetivo 10x.

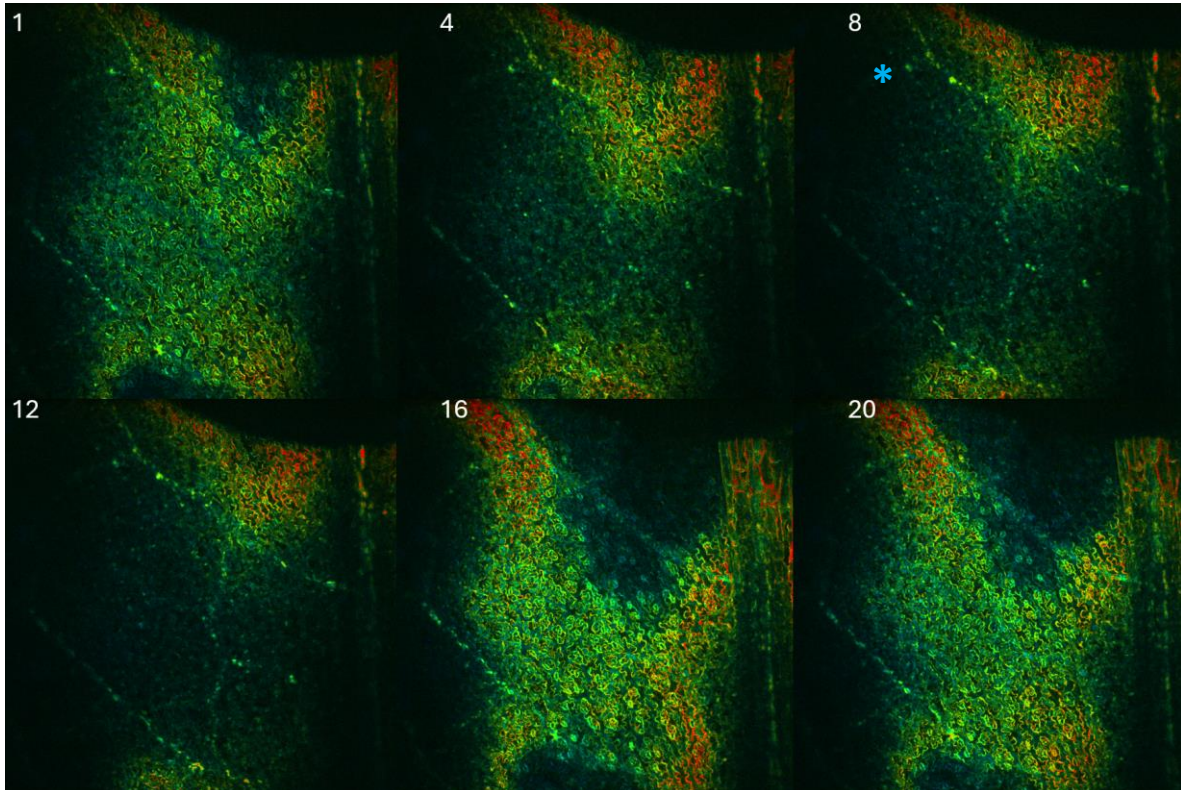


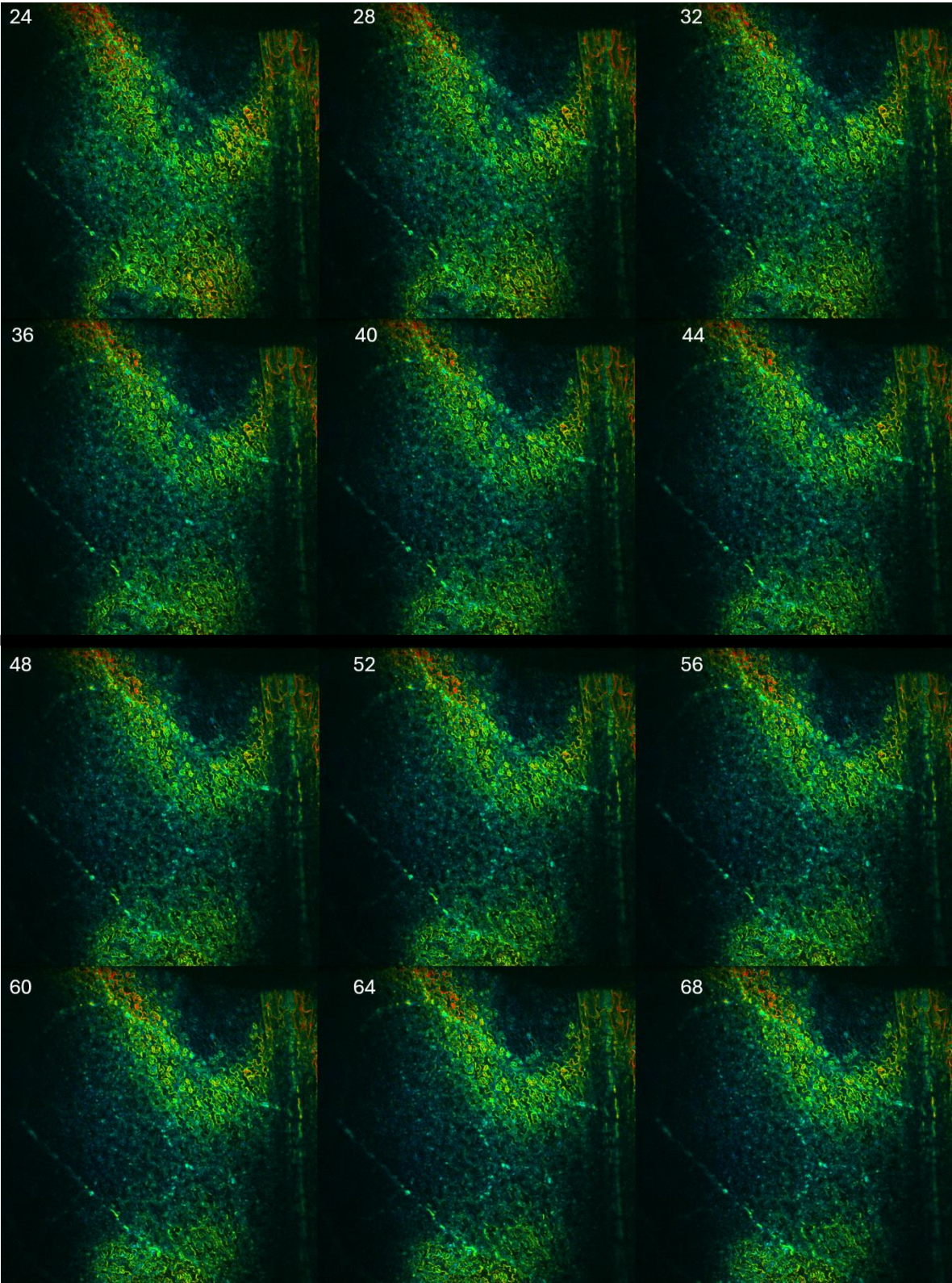
**Figura 19. Cambios intracelulares en los niveles de ROS en raíz de plantas de Col-0-*HyPer1* en respuesta a Put 30  $\mu\text{M}$ .** Los cambios intracelulares de ROS fueron detectados en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el sensor *HyPer1* de 11 días de edad en intervalos de 15 s durante 25 min (1 500 s).

Posteriormente, se analizó la respuesta generada por la Spd (Figura 20 y 21). Plantas de 14 días de edad fueron sometidas a un tratamiento con Spd 30  $\mu\text{M}$ . Los datos fueron adquiridos a partir de la epidermis vegetal en intervalos de 15 s durante 1 h 40 min en la hoja.

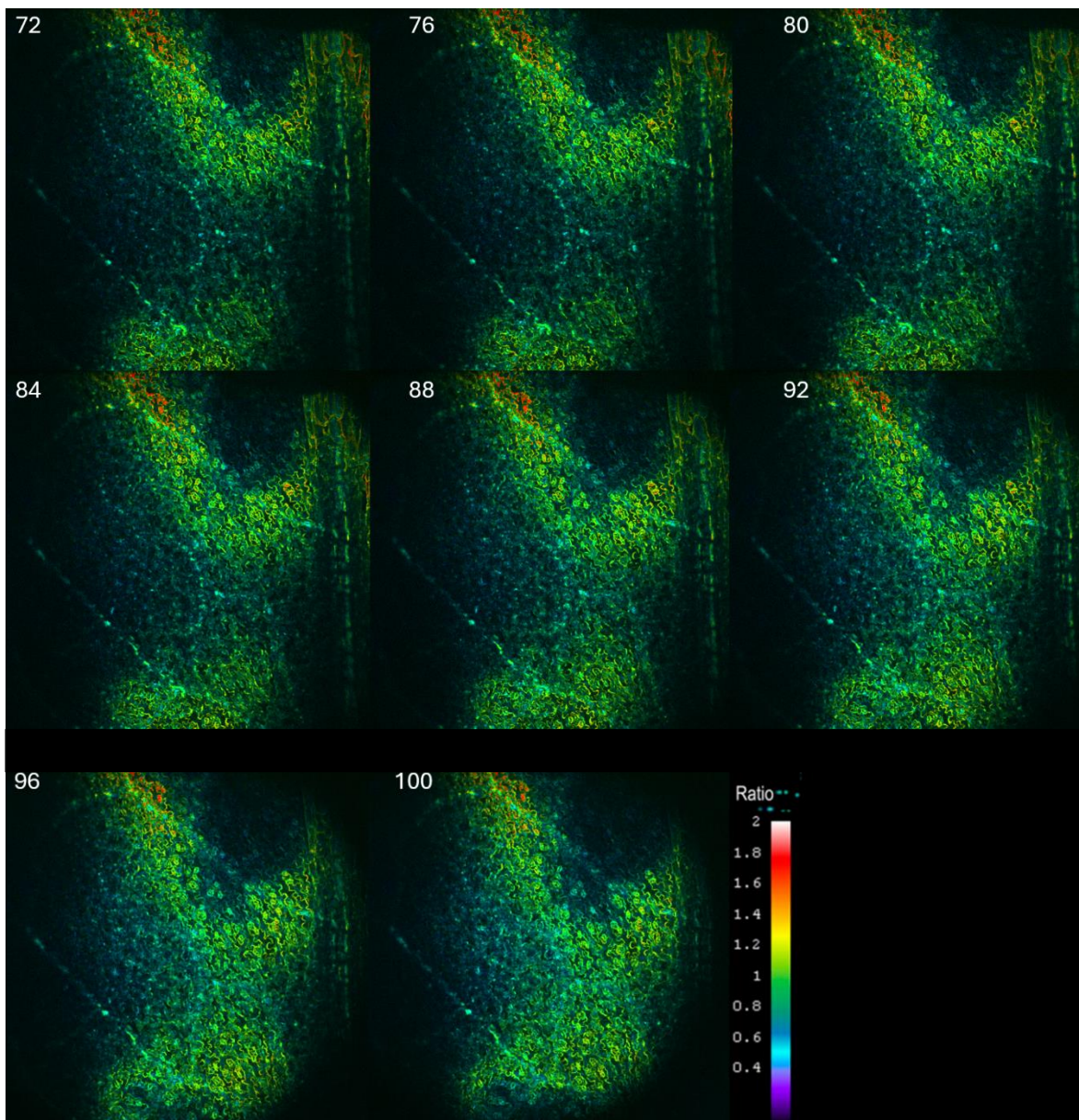
Para este ensayo, los datos control fueron tomados durante los primeros 7.98 min (479 s) cuya finalidad era conocer cuál era la dinámica intracelular de ROS sin un estímulo. A partir del minuto 8 (480 s) se muestran los datos obtenidos tras la adición de 100  $\mu\text{L}$  de Spd 30  $\mu\text{M}$  distribuidos equitativamente en tres pozos cercanos a la raíz principal. Sin embargo, se buscó conocer cuál era el efecto a nivel de epidermis. La dinámica espacio-temporal de ROS fue determinada en una sección de la hoja de plantas de Col-0-*HyPer1* en respuesta al Spd 30  $\mu\text{M}$  (Figura 20).

En la figura 21, se observa la respuesta en células de la epidermis, durante los primeros minutos donde la señal de ROS se encuentra elevada y esta va disminuyendo a lo largo del tiempo; tras la adición del elicitador (minuto 8\*) se muestra una reducción de la fluorescencia, seguido de un incremento constante de la señal de ROS. Adicional a esto, se percibe un incremento de la fluorescencia en los estomas (células oclusivas) en respuesta a Spd 30  $\mu$ M.





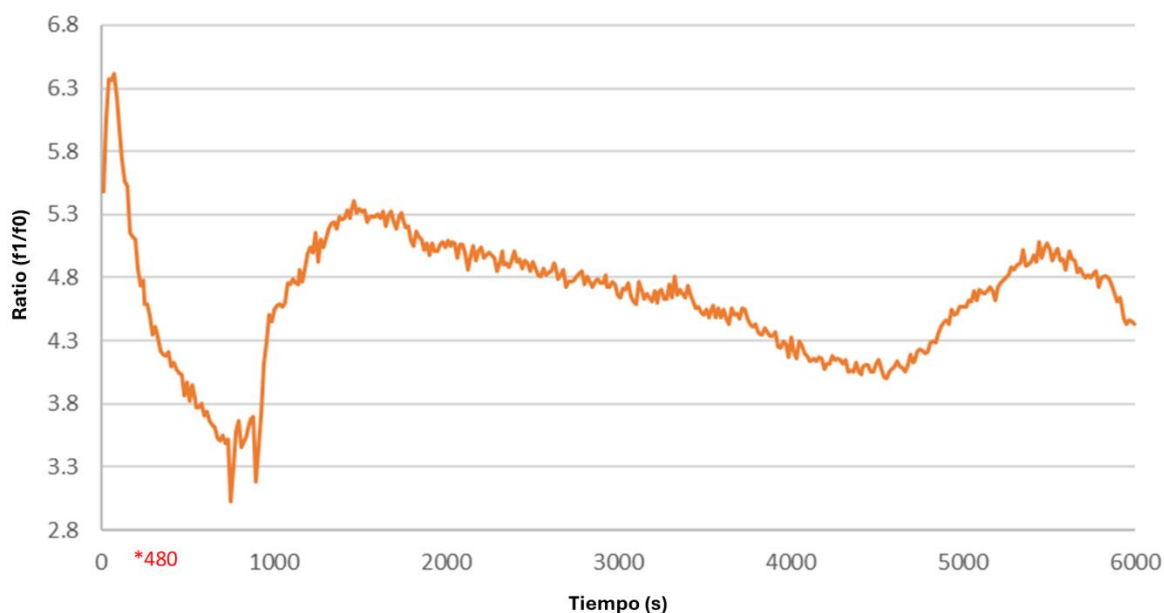




**Figura 20. Dinámica espacio-temporal de ROS en hoja de plantas de Col-0-*HyPer1* en respuesta a Spd 30  $\mu\text{M}$ .** Los cambios de ROS fueron detectados en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el sensor *HyPer1* de 14 días de edad. El tratamiento con Spd 30  $\mu\text{M}$  fue colocado a los 480 s (8 min \*). Los números presentes en la figura representan cambios espacio-temporales cada 60 segundos durante un periodo de 18 min (1 080 s). Objetivo 10x.

Por otro lado, se logró percibir que seguido de una reducción de ROS en el minuto 16.66 (1 000 s) hay un incremento de la señal teniendo el punto más alto durante a los 25 min

(1 500 s). A pesar de ello, la señal muestra una ligera disminución para el minuto 75 (4 500 s) para finalmente mostrar un segundo incremento al min 91.66 (5 500 s) (Figura 21).

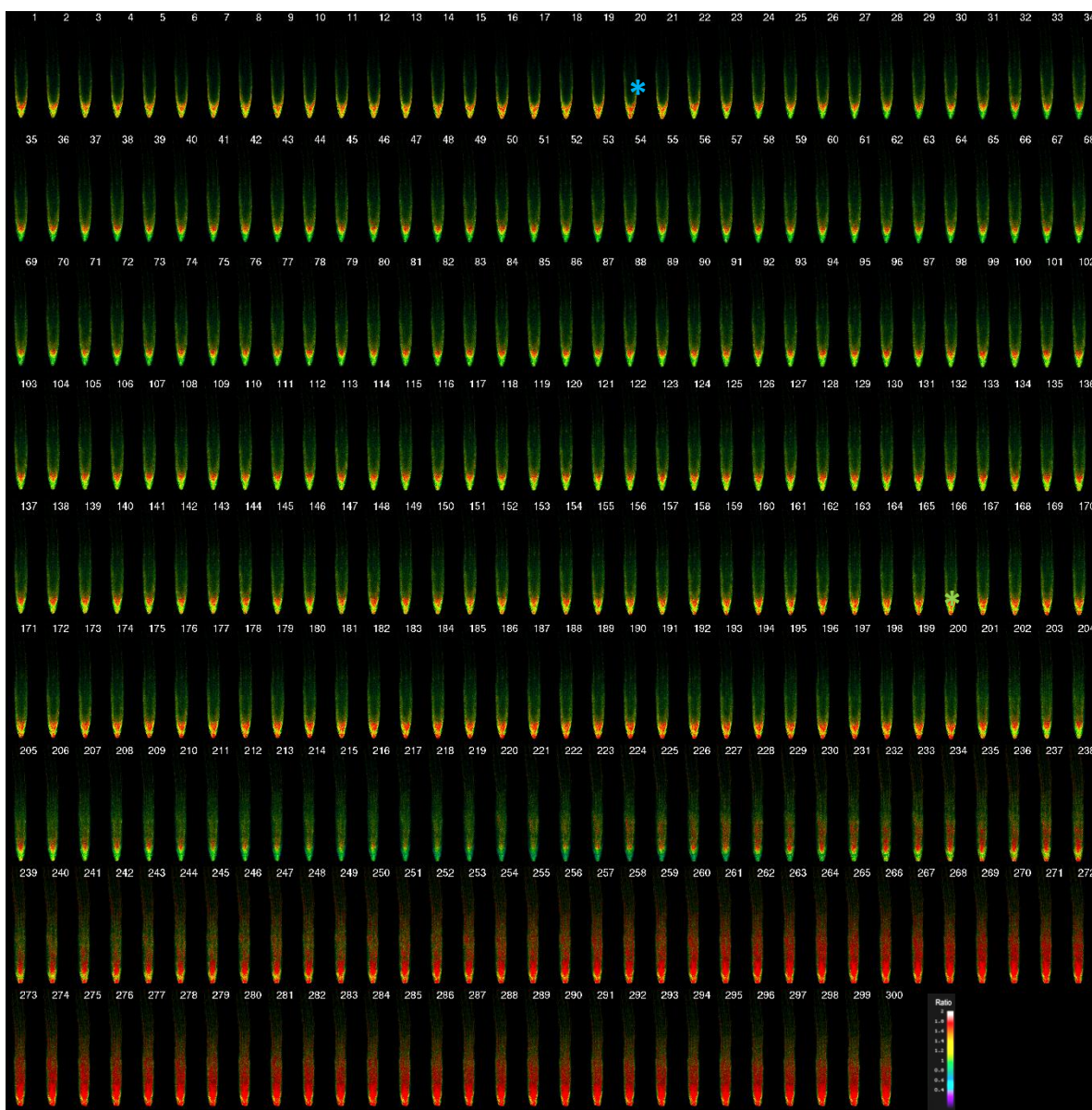


**Figura 21. Cambios intracelulares en los niveles de ROS en hoja de plantas de Col-0-HyPer1 en respuesta a Spd 30  $\mu$ M.** Los cambios intracelulares de ROS fueron detectados en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el sensor *HyPer1* de 14 días de edad en intervalos de 15 s durante 100 min (6 000 s).

Posteriormente, se realizó la evaluación de la Spm en raíces de plantas de 8 días de edad (Figura 22 y 23). Los datos mostrados fueron tomados en intervalos de 15 s durante un periodo de 75 min (4 500 s).

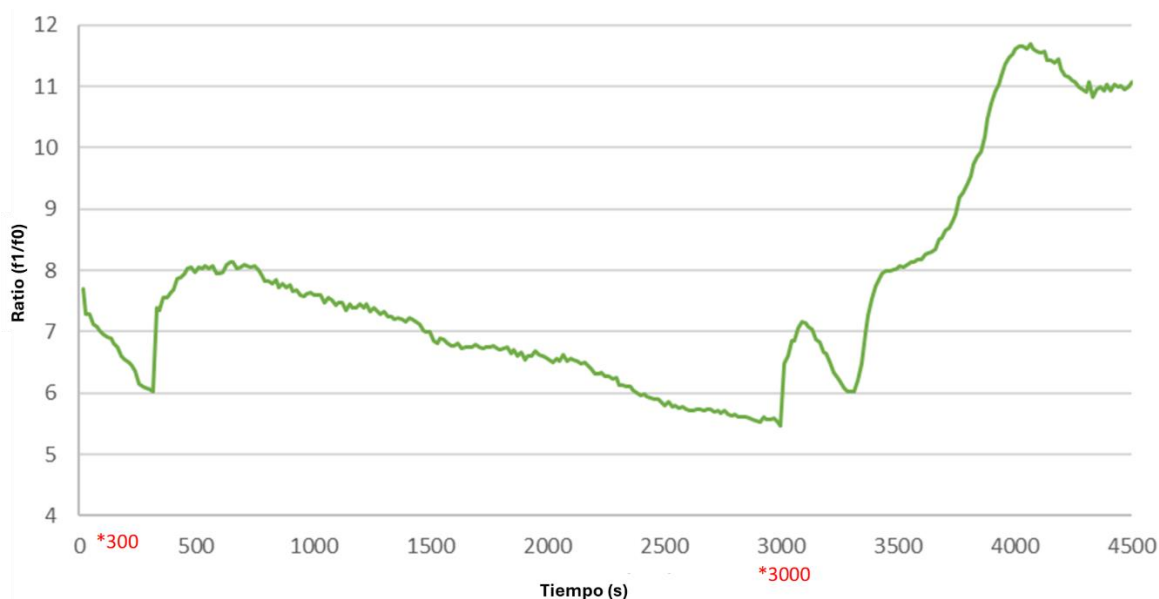
A continuación, se presenta la figura 22 donde raíz sometida al tratamiento Spm 30  $\mu$ M. Los cambios visualizados se presentaron en intervalos de 15 s dentro de un periodo de 70 min. Dentro de la raíz, la zona donde se percibe una mayor acumulación de la señal de ROS (color rojo) se encuentra en el ápice. Tras la adición del elicitador Spm al minuto 5 se presenta una caída de la señal (mostrada en color verde) en la parte apical de la raíz seguido de un incremento en la acumulación de la señal. La incorporación del  $H_2O_2$  al minuto 50

(imagen 200) permitió observar la señal de ROS en el ápice, zona de diferenciación y la zona de elongación de la raíz (Figura 22).



**Figura 22.** Imagen representativa de los cambios en la dinámica de ROS en raíces de *Col-0-HyPer1* bajo el tratamiento de Spm 30  $\mu$ M. Plantas de 8 días de edad fueron tratadas con Spm 30  $\mu$ M en la raíz (Imagen 21 \*) seguido de un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Imagen 200\*). Los valores presentes en la figura indican el número de imágenes tomadas en intervalos de 15 s de un tiempo total de 4 500 s (75 min). Objetivo 10x.

Dentro de los primeros 5 min (300 s) fueron capturados los datos bajo condiciones control, seguido de la adición de la Spm 30  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{L}$ ) se presenta una caída de la señal de ROS. Al minuto 6.66 (400 s) hay un incremento de la señal como consecuencia del tratamiento. Finalmente, a partir del minuto 50 (300 s) se muestra la respuesta tras la adición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 23).



**Figura 23. Cambios intracelulares en los niveles de ROS en raíz de plantas de Col-0-*HyPer1* en respuesta a Spm 30  $\mu\text{M}$ .** Los cambios intracelulares de ROS fueron detectados en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el sensor *HyPer1* de 8 días de edad en intervalos de 15 s durante 75 min (4 500 s).

Como se puede observar en las figuras 19, 21y 23, cada PA (Put, Spd, y Spm) genera una señal de ROS particular, lo que sugiere que los blancos o los mecanismos de acción son diferentes para cada PA. Para poder comprender los cambios en ROS en la mutante *Atpaol-1*, se obtuvieron las líneas Col-0-*ph* (T0), Col-0-*HyPer3* (T0), *Atpaol-1-ph* (T1) y *Atpaol-1-HyPer3* (T0). Estas líneas fueron transformaron con la versión 3 de la sonda *HyPer* que muestra un mayor grado de sensibilidad, y con la sonda que detecta cambios en pH. Estas líneas nos darían pauta a realizar otros experimentos en respuesta a PAs y *Pst*.

## VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la importancia del gen *AtPAOI* durante el establecimiento de la HR y SAR, así como en la producción de las ROS durante la interacción *A. thaliana*-*P. syringae*.

Las enzimas PAO son responsables del catabolismo de PAs y se ha demostrado que participan en diferentes procesos fisiológicos y en respuesta a un estrés biótico, así como un rol importante en la homeostasis de ROS (Liu et al., 2015, Jasso-Robles et al., 2020). Se ha caracterizado que la tasa de propagación del patógeno a nivel sistémico, la inducción de la muerte celular y la respuesta a nivel transcripcional dependerá de los cambios en los niveles de ROS y SA, promoviendo una resistencia o susceptibilidad de la planta (Lukan & Coll, 2022).

Los datos obtenidos por Jasso-Robles en nuestro grupo de trabajo demostraron que la línea mutante *Atpao1-1* presenta niveles elevados de ROS y de actividad RBOH (Jasso-Robles et al., 2020) mientras que la línea de sobreexpresión *35S::AtPAOI-L9* contiene niveles disminuidos de ROS y una menor actividad RBOH (Jasso-Robles, datos no publicados) en plantas de 15 días de edad. A partir de estos datos es importante esclarecer si los cambios ocurridos por las alteraciones en el catabolismo citoplasmático de PAs mediado por el gen *AtPAOI* generan un impacto en el establecimiento de la HR y la SAR.

Acorde a la literatura se realizaron diferentes ensayos con la finalidad de determinar cuál era la participación del gen *AtPAOI* en el establecimiento de una HR. Es importante destacar que el uso de la cepa avirulenta que tiene el efector *AvrRpt2* va a inducir una HR en todas las líneas de estudio, asociado al reconocimiento del efector por el receptor RPS2. Como primer punto, se buscó conocer como era la progresión de la infección generada por la cepa avirulenta *AvrRpt2* en las diferentes líneas de estudio. De manera interesante, logramos observar que la progresión de la muerte celular para la línea mutante *Atpao1-1* fue significativamente menor en comparación a la WT, inclusive se pudo observar que la infección causada es retenida y mantiene una forma circular. La línea de sobreexpresión mostró un fenotipo intermedio entre la WT y la mutante *Atpao1-1* (Figura 4A).

Posteriormente, se evaluó la muerte celular y la conductividad electrolítica ocasionada como resultado del establecimiento de la HR. Durante la tinción histoquímica

con azul de Evans se encontró una detección temprana (24 hpi) de la muerte celular, destacando que plantas del ecotipo silvestre Col-0 y de la línea *35S::AtPAOI-L9* tuvieron una mayor muerte celular. Al finalizar el tiempo de evaluación (72 hpi) la línea mutante *Atpao1-1* mostró una menor cantidad de células teñidas en comparación a Col-0 (Figura 5) lo cual se relaciona de manera importante con una menor conductividad electrolítica (Figura 7), ya que se conoce que existe una correlación positiva entre ensayos. Por otro lado, la línea *35S::AtPAOI-L9* se caracterizó por presentar una mayor muerte celular y conductividad en comparación a la línea mutante; sin embargo, no presentó diferencias significativas con la WT (Figura 5 y 7). Estos datos sugieren una activación temprana de genes vinculados al establecimiento de HR en la línea mutante en comparación con la WT.

Una vez que se demostró el establecimiento de la HR en el tejido local, se buscó evaluar el establecimiento de la SAR (Figura 8). Las plantas de *A. thaliana* del ecotipo silvestre Col-0 inoculadas en hojas locales con la cepa virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) o bien la cepa avirulenta *P. syringae AvrRpt2* genera un priming que resulta en una disminución de los títulos bacterianos tras una segunda inoculación en comparación con las plantas inoculadas a nivel local con MgCl<sub>2</sub> (Rufián et al., 2019). Sin embargo, líneas mutantes *rbohD*, afectadas en la producción de ROS, no desencadenan una SAR, ya que el priming a nivel local con *Pst* o *AvrRpt2* no resulta en una reducción de los títulos bacterianos tras una segunda inoculación (Yuan et al., 2021). En este trabajo se estandarizaron las condiciones para estudiar SAR, observando la respuesta clásica de plantas WT, en las que el priming desencadena la SAR. Para el caso de la línea mutante *Atpao1-1* resultó ser resistente a la inoculación local de *Pst*, mostrando títulos bacterianos bajos en tejido local, y en hojas sistémicas tras una segunda inoculación, en comparación a la WT. El fenotipo observado a nivel local sugiere que la pérdida de la función de *AtPAOI*, resulta en respuestas de defensa pre-activadas. Esto puede estar asociado a lo reportado en el trabajo de Tesis de Licenciatura de Barrios-Capuchino (2023) donde se observó que las plantas de la línea mutante *Atpao1-1* (de 15 días de edad bajo condiciones control), mostraron un incremento en la expresión de genes marcadores de la vía del ácido salicílico, como *PAD4*, *EDS5*, *ICS1* y *PR1* (6 hpi). Posiblemente estos cambios transcripcionales se pueden vincular al fenotipo de resistencia observado a nivel local. La reducción en los títulos bacterianos en tejido distal seguido de un priming sugiere la inducción de SAR en la línea *Atpao1-1*; sin

embargo, no se descarta que esta respuesta también sea resultado de la pre-activación del sistema de defensa en esta línea. Por último, la línea *35S::AtPAOI-L9* fue resistente a *Pst* a nivel distal, lo anterior se relacionan con trabajos previos que demuestran que plantas sobreexpresoras de genes *PAO* contribuyen de manera importante a la defensa vegetal. Dentro de la literatura se ha descrito que plantas sobreexpresoras de algodón (*Gossypium hirsutum*) para el gen *GhPAOI* tienen un fenotipo de resistencia al patógeno fúngico hemibiotrófico *Verticillium dahliae* como consecuencia de un incremento en los niveles de las PAs (Put, Spd, Spm) provenientes del catabolismo por retroconversión de Spm y Spd (Mo et al., 2015) mientras que las plantas de soja (*Glycine max*) sobreexpresoras del gen *GmPAO* infectadas con *Phytophthora sojae* presentaron también una mayor acumulación de Spm y Spd, así como del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desencadenando una resistencia (Yang et al., 2022).

A partir de los datos obtenidos en los ensayos de HR y SAR se evaluaron genes marcadores moleculares implicados en estos mecanismos de defensa. Existe evidencia que la *AtMCP1* tiene un rol importante como regulador positivo de la HR como resultado de la activación de los receptores NLR (Coll et al., 2014). Se han identificado a los genes *AtHIR1* y *AtHIR2* como componentes importantes en la formación de un complejo con RPS2 en *A. thaliana* y *N. benthamiana*. Las líneas sobreexpresoras para estos genes contribuyen a un mejoramiento en la resistencia a *Pto* DC3000 (Qi et al., 2011). Para evaluar si los genes del grupo *HIR* se inducen en *Arabidopsis*, en un estudio se infectaron plantas Col-0 con diferentes cepas de *P. syringae* (*Pto* DC3000 *AvrRpm1*, *Pto* DC3000 *AvrRpt2*, *Pto* DC3000 y *Pto* DC3000 *hrcC*). En las cepas con factores de avirulencia (*Pto* DC3000 *AvrRpm1*, *Pto* DC3000 *AvrRpt2*) se observa una inducción temprana de la HR dentro de las 6 a 24 hpi. De manera interesante, las dos cepas mostraron una inducción predominante de los genes *HIR* a las 24 hpi (Qi et al., 2011). En plantas de café (*Cafeto arabica*) sometidas a una infección con los hongos *Hemileia vastatrix* o *Uromyces vignae*, se encontró que el gen *HIR1* tiene una mayor expresión a las 9 hpi con ambos patógenos, con una subsecuente reducción hasta las 24 hpi. El gen *HIR2-1* mostró su mayor expresión a las 9 hpi, seguido de una disminución a las 12 hpi la cual permaneció constantemente hasta las 24 hpi en interacción con *Hemileia vastatrix* (Tavares et al., 2023).

Debido a la importancia en la expresión de los genes *HIR* y *MCPI* en el establecimiento de una HR y a los resultados obtenidos en la figura 4, 5 y 7, se evaluaron genes marcadores vinculados a este tipo de defensa en el tejido local infectado con *Pst* acorde a los tiempos sugeridos en la literatura (6 y 24 hpi). A 6 hpi, la mutante *Atpao1-1* infectada con *Pst* tuvo un incremento importante en la expresión de genes *AtHIR1* y *AtMCPI* vinculados a la HR. Este incremento no fue observado en la WT, lo que puede dar un indicio que la cepa virulenta (*Pst*) puede ser reconocida como una cepa de tipo avirulenta y generar una HR en la línea *Atpao1-1*. En este punto sería importante realizar pruebas de conductividad electrolítica, evaluación de la muerte celular y progresión de la enfermedad para comprobar que sucede dicho fenómeno en la mutante *Atpao1-1*. Para el caso particular del ecotipo WT y la línea sobreexpresora, tras la llegada del patógeno, la expresión de los genes *AtHIR1* y *AtMCPI* disminuye drásticamente (Figura 9). A las 24 hpi en el tejido local se observó una menor expresión de los genes *AtHIR1* y *AtMCPI* en la línea *35S::AtPAOI-L9* (mock) en comparación con las 6 hpi. Por otro lado, la línea mutante mostró un perfil de expresión similar de los genes *AtHIR1* y *AtMCPI* en respuesta a una infección tanto a 6 h como a 24 hpi. En la WT se encontró un ligero incremento en la expresión de los genes *HIR* y *MCPI* en respuesta a *Pst* a las 24 hpi (Figura 10).

Se evaluaron diferentes genes implicados en la síntesis de SA (*ICS1*), Pip (*SARD4*), NHP (*FMO1*) y de respuesta a patógenos (*PRI*) en tejido distal a las 6 y 24 hpi, los cuales son marcadores moleculares para determinar el establecimiento de una inmunidad a nivel sistémico. En primer lugar, se evaluó al gen *PRI*, por su relevancia en la inmunidad vegetal (Ali et al., 2018). Este gen junto con *SARD4* únicamente se indujo a las 6 hpi en la línea *35S::AtPAOI-L9* infectada con *Pst*. Por otro lado, los genes *FMO1* e *ICS1* no mostraron incrementos significativos en su expresión en las diferentes líneas infectadas con *Pst* (Figura 11), la excepción fue la línea sobreexpresora *35S::AtPAOI-L9* a las 24 h sin infección (Figura 12). A pesar de ello, este resultado no significa que las líneas de estudio no establezcan una SAR, es probable que los genes marcadores se expresan en tiempos no evaluados por lo que sería importante realizar una cinética que permita evaluar su comportamiento a lo largo del tiempo junto a los diferentes marcadores moleculares evaluados en este trabajo permitiendo realizar una adecuada comparativa entre las líneas.



Plantas transgénicas sobreexpresoras de tabaco (*NtPAO*) mostraron que algunos genes implicados en la defensa fueron inducidos previo a una infección entre los que se encuentran a *PR-1a*, *Pr-5db*, *PrxNI* y dos MPK y que posterior a una infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* su expresión se vio reducida o nula. (Moschou et al., 2009). Este dato es importante ya que en este trabajo se identificó que la línea de sobreexpresión *35S::AtPAOI-L9* mostró una reducción de los títulos bacterianos, y por ende el establecimiento de SAR (Figura 8), adicional a ello, se presentó un incremento en la producción de ROS ( $O_2^-$ ), en los sitios infectados a nivel local, así como la transmisión de la señal a tejidos no infectados (Figura 14) y por último, una incremento significativo de la expresión para los genes *PR1* y *SARD4* (Figura 11) vinculados a la SAR, estos datos nos permiten indicar con un mayor grado de certeza que dicha línea establece una inmunidad sistémica. Por otro lado, se demostró que la mutante *Atpao1-1* mostró un incremento en la resistencia basal a *Pst*; sin embargo, no es clara si la resistencia sistémica es debido a la inducción de SAR o la preactivación de los mecanismos de defensa que conlleva a una resistencia basal (Figura 8). Adicionalmente, en respuesta a una infección local la línea tuvo un incremento drástico en el contenido de  $H_2O_2$  siendo mayor en los sitios de infección (Figura 13). Tras realizar los ensayos para determinar la inducción de HR empleando la cepa avirulenta, dicha línea se caracterizó por responder de manera más temprana la inducción de una HR, lo que generó una menor muerte celular (Figura 6) y una reducción en la conductividad electrolítica (Figura 7).

Para comprender los cambios en los niveles de ROS en las líneas mutantes y de sobreexpresión del gen *AtPAOI*, se realizaron ensayos histoquímicos para la detección de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  en respuesta a *Pst* y en ensayos SAR, ya que uno de los principales mecanismos vinculados en su establecimiento es la señalización mediada por las ROS (Gao et al., 2021). Se ha logrado determinar que la acumulación sistémica de ROS en respuesta a una infección por un patógeno a nivel local es consecuencia de la transmisión de señales en respuesta a estímulos bióticos de manera eficiente a tejido sistémico. La acumulación eficaz de ROS puede ser el resultado de una respuesta a estímulos de tipo abiótico y biótico entre los que se encuentran el estrés por luminosidad (luz intensa: 2 min bajo  $1700 \mu\text{mol}$  de fotones  $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), lesiones mecánicas o infecciones por algún patógeno como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Fichman et al., 2019).

Uno de los aspectos importantes a destacar es que la línea *Atpao1-1* de 6 semanas de edad presenta menores niveles de  $H_2O_2$  que la WT, pero tras una infección con *Pst* hay un incremento en el contenido de  $H_2O_2$  a las 24 hpi, principalmente en el sitio de inoculación. Dado que la señal de esta ROS es baja a las 48 y 72 hpi en todas las líneas analizadas, se observa que la respuesta mediada por  $H_2O_2$  ocurre particularmente durante las primeras 24 hpi (Figura 13). Acorde a los antecedentes de la línea mutante *Atpao1-1* (15 días de edad) cuya actividad RBOH se mostró elevada, también se buscó determinar los sitios de producción para  $O_2^{\cdot-}$  en ensayos SAR. Es evidente el incremento en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en los sitios de inoculación, y un incremento general en el contenido de esta especie reactiva en la línea *Atpao1-1*, corroborando los resultados previos de Jasso-Robles et al., 2020 (Figura 14A). Probablemente, este incremento observado también está relacionado al fenotipo de resistencia de la línea mutante. Adicional a ello, es importante destacar que dentro de las primeras 24 hpi, las hojas no inoculadas de la roseta presentaron una señal para  $O_2^{\cdot-}$ , lo cual nos está indicando que la presencia de esta molécula señal se localiza en el sitio de infección primaria y en tejido distal (no infectado) sugiriendo que existe una transmisión a otros sitios de la planta (Figura 14B).

Después de una infección se genera la producción de ROS a nivel apoplasto tras la activación postraducciona de enzimas RBOH atribuida a una PTI. Como consecuencia, se promueve la producción del  $O_2^{\cdot-}$ , el cual es convertido por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a  $H_2O_2$  que ingresará a la célula por difusión facilitada. La producción de ROS a partir de los diferentes compartimientos celulares como las mitocondrias, peroxisomas, cloroplastos e inclusive el apoplasto, es de gran amplitud y sostenida, promoviendo una HR como resultado de la activación transcripcional de los genes *RBOH* (Lukan & Coll, 2022).

Yoda et al., 2009 y Carviel et al., 2014 evidenciaron la importancia del SA y el  $H_2O_2$  en el establecimiento de una HR. En el caso particular de la interacción de *N. benthamiana*–*P. cichorii* se demostró que el  $H_2O_2$  proveniente del catabolismo de PAs es fundamental para el establecimiento de la HR, la cual fue evidente a las 24 hpi. La infección causada por *P. cichorii* en plantas de tipo silvestre promovió la acumulación de  $H_2O_2$  y la inducción de una HR mientras que plantas de tabaco silenciadas en el gen *poliamina oxidasa* (*NbPAO*) no mostraron producción de  $H_2O_2$  y por ende no se indujo una HR (Yoda et al., 2009). En otro

trabajo, plantas mutantes *iap1-1* que son deficientes en la producción de SA mostraron una ETI comprometida. A las 20 hpi la conductancia iónica en plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 inoculadas con *AvrRpt2* alcanzó una meseta mientras que la conductancia en la línea *iap1-1* incrementó a las 20 hpi. Estos datos sugieren la importancia del SA para el establecimiento de la HR (Carviel et al., 2014), de esta manera, sabemos qué tanto la producción de SA como las ROS producidas en el sitio de infección son importantes para el establecimiento de la inmunidad vegetal.

Algo interesante por realizar, es determinar el contenido de diferentes metabolitos (hormonas, aminoácidos, PAs entre otros) involucrados en el proceso de señalización de la SAR en las diferentes líneas de estudio mediante una cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masa (LC/MS). Lo anterior, permitirá decir con un mayor grado de certeza en que tiempos los metabolitos son sintetizados, acumulados y transmitidos a nivel sistémico.

Las plantas de *Arabidopsis* que expresan el sensor *HyPer1* fueron sometidas a ensayos de dosis -respuesta de  $H_2O_2$ , corroborando que un cambio en la fluorescencia es dependiente de la concentración de  $H_2O_2$  (Costa et al., 2010). En nuestro estudio, la línea Col-0-*HyPer1* tuvo un incremento en los niveles de fluorescencia asociado con la incorporación de  $H_2O_2$ , demostrando ser una línea sensible a los cambios de ROS (Figura 16 y 17).

Las enzimas PAOs y RBOHs participan en diferentes procesos celulares de manera correlacionada o convergente entre sí. Shen y colaboradores (2000) evaluaron la respuesta de plantas de pepino (*Cucumis sativus*) tratadas con Spd. De manera interesante, observaron una disminución en la actividad RBOH y en la producción de  $H_2O_2$  (Shen et al., 2000). Por otro lado, Cuevas y colaboradores (2004) demostraron que la aplicación exógena de Spd o Spm en plantas de trébol de hoja ancha (*Lotus glaber Mill.*) tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad RBOH en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  (Cuevas et al., 2004). Nuestros resultados presentados en las figuras 18, 19, 20, 21, 22 y 23 indicaron que la aplicación exógena de las PAs (Put, Spd y Spm) provocan una reducción inmediata en el contenido de  $H_2O_2$ , sugiriendo que las PAs pueden tener un efecto directo y negativo sobre la actividad de las enzimas RBOHs, como lo sugirió Jasso-Robles et al., (2020).

Argurla y colaboradores (2018) evaluaron la respuesta de la aplicación exógena de las PAs (Put, Spd y Spm, 0.5 mM respectivamente) generando una acumulación de ROS y NO durante el cierre de los estomas en las células oclusivas, mientras que, el uso de inhibidores de la actividad RBOH (difenilyodonio, DPI), DAOs (2-bromoetilamina, BEA) y PAOs (1,12 diaminododecano, DADD) revierte el fenotipo generado por las PAs, surgiendo que el cierre estomático se encuentra controlado por la actividad de enzimas PAOs y RBOHs (Agurla et al., 2018).

Estos trabajos nos sugieren que la adición de PAs pueden afectar de manera directa la actividad RBOH, provocando una reducción en la acumulación de las ROS, lo que podríamos relacionar con la caída de la señal de fluorescencia tras la adición de las diferentes PAs. Para poder demostrar que está reducción se asocia a un efecto inhibitorio de las PAs en la actividad RBOH, sería interesante conocer el comportamiento de la señal de ROS empleando diferentes inhibidores de enzimas RBOH o PAOs para determinar con mayor certeza el fenómeno observado.

Por otro lado, se conoce que bajo condiciones de estrés biótico se pueden presentar incrementos en el contenido de ROS intracelular afectando el estado redox. Plantas de *A. thaliana* afectadas por el pulgón verde del melocotón (*Myzuz persicae*) acumulan ROS dentro de los primeros 3 min, dichos niveles permanecieron elevados y constantes durante un periodo de 30 min después de haberse colocado los áfidos en el tejido vegetal (Xu et al., 2021).

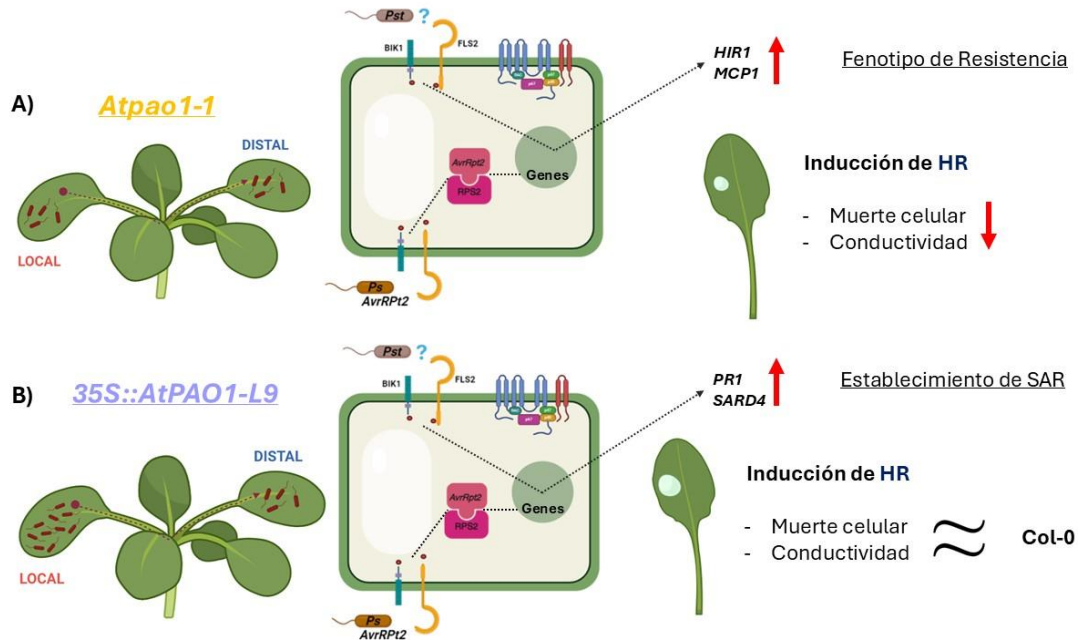
Antecedentes de Agurla y colaboradores (2018) demuestran que plantas sometidas a un estrés de tipo abiótico o biótico, así como la aplicación exógena de PAs promueve la formación de ROS que contribuyen de manera importante a: transmitir señales a tejidos distales permitiendo un “priming” previo ante un posible estrés o bien, contribuyendo al cierre estomático, abertura natural por el cual podrían ingresar los patógenos como es el caso de *P. syringae*.

## IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado la relevancia del catabolismo de Spm mediado por la enzima citoplasmática *AtPAO1* en la defensa vegetal en el patosistema *A. thaliana*- *P. syringae*.

De manera particular, se evaluó si el gen *AtPAO1* participa en el establecimiento de HR. Por un lado, la línea mutante *Atpao1-1* estableció HR tras la inoculación con la cepa avirulenta *P. syringae* AvrRpt2, desencadenando una señalización que resultó en una menor muerte celular y conductividad electrolítica en comparación a la WT. Además, mostró títulos bacterianos reducidos con y sin un priming con *Pst*, donde genes marcadores de HR (*AtHIR1* y *AtMCPI*) se encontraron inducidos a las 6 hpi (Figura 24A).

Por otro lado, la línea sobreexpresora mostró un establecimiento de HR; sin embargo, la muerte celular y la conductividad electrolítica fue similar a lo observado en la WT. Una de las características principales, es que los títulos bacterianos se redujeron como consecuencia a un priming con *Pst*. Adicional a ello, algunos genes (*PR1* y *SARD4*) vinculados al establecimiento de SAR se indujeron a las 6 hpi (Figura 24B).



**Figura 24. Modelo de participación de AtPAO1 en HR y SAR.**  
**A)** La línea mutante *Atpao1-1* presenta una resistencia basal a *Pst* con incremento en la expresión de genes de HR (*AtHIR1* y *AtMCP1*) así como una menor muerte y conductividad electrolítica **B)** La línea de sobreexpresión *35S::AtPAO1-L9* muestra una reducción en los títulos bacterianos y un incremento en la expresión de los genes *AtPR1* y *AtSARD4* como resultado del establecimiento de SAR.

## X. PERSPECTIVAS

- Confirmar el establecimiento de la SAR empleando la cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* *AvrRpt2* para las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAO1-L9*.
- Evaluar la muerte celular y la conductividad electrolítica empleando la cepa virulenta *Pst* en las líneas *Atpao1-1* y *35S::AtPAO1-L9*.
- Realizar un análisis de time-lapse en para la detección de ROS en presencia de PAMPs y PAs en plantas que contengan en sensor *HyPer3*.
- Determinar la actividad RBOH en ensayos SAR.

## XI. ANEXOS

**Tabla 1: Oligos empleados para el análisis de la expresión de genes vinculados a la HR a través de qPCR.**

Nombre	Código	Oligonucleótido
<i>AtHIR1</i>	At1g69840	<i>FW:5'-CTG AGA AAC AGC GTC CTC GC-3'</i> <i>RV:5'-TGA AGC AAT GTC CCT AAC AGC G-3'</i>
<i>AtHIR2</i>	At3g01290	<i>FW:5'-GGT GAA GCA GAG TCA AAG TAC C-3'</i> <i>RV:5'-ATG TCC AAC ACA TCC TTC GCT G-3'</i>
<i>AtMCI</i>	At1g02170	<i>FW:5'-TGT CGA AGA TCA CGT CTA CGG-3'</i> <i>RV:5'-TCA CAA CTC CAC CAC TAC CAC-3'</i>

**Tabla 2: Oligos empleados para el análisis de la expresión de genes vinculados a la SAR a través de qPCR**

Nombre	Código	Oligonucleótido
<i>AtICS1</i>	At1g74710	<i>FW:5'-TAT ATT CTC AAT TGG CAG GGA GAC-3'</i> <i>RV:5'-AAA GCC TTG CTT CTT CTG CTG G-3'</i>
<i>AtPRI</i>	At2g14610	<i>FW 5'-TAT GCT CGG AGC TAC GCA GAA - 3'</i> <i>FW 5'-TCG CTA ACC CAC ATG TTC ACG - 3'</i>
<i>AtSARD4</i>	At5g52810	<i>FW:5'-GAT AGA AGC AGG AGA GCT CGC -3'</i> <i>RV:5'-CCC GAA CCG ACG GAC TTA AAC -3'</i>
<i>AtFMO1</i>	At1g19250.1	<i>FW:5'-GAA CCT TTC CGA ACT TGG CTT G -3'</i> <i>RV:5'-CAT GGG CAA TGC AGA CAA CGC-3'</i>

**Tabla 3: Oligos empleados tipificación de la línea *Atpao1-1* y para el sensor *HyPer1* a través de qPCR.**

Nombre	Código	Oligonucleótido
<i>HyPer</i>	-	<i>FW:5'-CACCATGGAGATGGCAAGCCAGCA-3'</i> <i>RV:5'-ATTAAACCGCCTGTTTTAAACTTTATCGAAATGG-3'</i>
<i>Atpao1-1</i>	At5g13700	<i>FW 5'-TAT GCT CGG AGC TAC GCA GAA - 3'</i> <i>FW 5'-TCG CTA ACC CAC ATG TTC ACG - 3'</i>



## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Agurla, S., Gayatri, G., & Raghavendra, A. S. (2018). Polyamines increase nitric oxide and reactive oxygen species in guard cells of *Arabidopsis thaliana* during stomatal closure. *Protoplasma*, 255, 153-162.
2. Ali, S., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Chandrashekar, N., Yadav, P., ... & Grover, A. (2018). Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene PR1 and its promoter from *Brassica juncea*. *3 Biotech*, 8, 1-14.
3. Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular plant pathology*, 20(8), 1163-1178.
4. Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., & Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature methods*, 3(4), 281-286.
5. Carviel, J. L., Wilson, D. C., Isaacs, M., Carella, P., Catana, V., Golding, B., ... & Cameron, R. K. (2014). Investigation of intercellular salicylic acid accumulation during compatible and incompatible *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interactions using a fast neutron-generated mutant allele of EDS5 identified by genetic mapping and whole-genome sequencing. *PloS one*, 9(3), e88608.
6. Chen, Z., Kloek, A. P., Cuzick, A., Moeder, W., Tang, D., Innes, R. W., ... & Kunkel, B. N. (2004). The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 functions downstream or independently of SA to promote virulence on *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 37(4), 494-504.
7. Coll, N. S., Smidler, A., Puigvert, M., Popa, C., Valls, M., & Dangl, J. L. (2014). The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: functional linkage with autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 21(9), 1399-1408.
8. Cortleven, A., Roeber, V. M., Frank, M., Bertels, J., Lortzing, V., Beemster, G. T., & Schmülling, T. (2022). Photoperiod stress in *Arabidopsis thaliana* induces a transcriptional response resembling that of pathogen infection. *Frontiers in Plant Science*, 13, 838284.

9. Costa, A., Drago, I., Behera, S., Zottini, M., Pizzo, P., Schroeder, J. I., ... & Schiavo, F. L. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plant peroxisomes: an in vivo analysis uncovers a Ca<sup>2+</sup>-dependent scavenging system. *The Plant Journal*, 62(5), 760-772.
10. Cuevas, J. C., Sánchez, D. H., Marina, M., & Ruiz, O. A. (2004). Do polyamines modulate the *Lotus glaber* NADPH oxidation activity induced by the herbicide methyl viologen?. *Functional Plant Biology*, 31(9), 921-928.
11. Fichman, Y., Miller, G., & Mittler, R. (2019). Whole-plant live imaging of reactive oxygen species. *Molecular Plant*, 12(9), 1203-1210.
12. Gao, H., Guo, M., Song, J., Ma, Y., & Xu, Z. (2021). Signals in systemic acquired resistance of plants against microbial pathogens. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3747-3759.
13. Gaupels, F., Durner, J., & Kogel, K. H. (2017). Production, amplification and systemic propagation of redox messengers in plants? The phloem can do it all!. *New Phytologist*, 214(2), 554-560.
14. Hartmann, M., Zeier, T., Bernsdorff, F., Reichel-Deland, V., Kim, D., Hohmann, M., ... & Zeier, J. (2018). Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity. *Cell*, 173(2), 456-469.
15. Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Barceló, A. R., & Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant physiology*, 127(3), 817-831.
16. Imanifard, Z., Vandelle, E., & Bellin, D. (2018). Measurement of hypersensitive cell death triggered by avirulent bacterial pathogens in *Arabidopsis*. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 39-50). Humana Press, New York, NY.
17. Jasso-Robles, F. I., Gonzalez, M. E., Pieckenstain, F. L., Ramírez-García, J. M., de la Luz Guerrero-González, M., Jiménez-Bremont, J. F., & Rodríguez-Kessler, M. (2020). Decrease of *Arabidopsis* PAO activity entails increased RBOH activity, ROS content and altered responses to *Pseudomonas*. *Plant Science*, 292, 110372.
18. Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.

19. Kachroo, A., & Kachroo, P. (2020). Mobile signals in systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 58, 41-47.
20. Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A. K., Singh, R. K., & Kumar, P. (2020). Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens. *Fungal biotechnology and bioengineering*, 457-470.
21. Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The Arabidopsis thaliana-Pseudomonas syringae interaction. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists, 1.
22. Kumar, R., Barua, P., Chakraborty, N., & Nandi, A. K. (2020). Systemic acquired resistance specific proteome of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Reports*, 39(11), 1549-1563.
23. Lanna-Filho, R. (2023). An overview of plant resistance to plant-pathogenic bacteria. *Tropical Plant Pathology*, 1-17.
24. Lara-Rojas, F., Juárez-Verdayes, M. A., Wu, H. M., Cheung, A. Y., Montiel, J., Pascual-Morales, E., ... & Cardenas, L. (2023). Using Hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: An updated method. In *Methods in Enzymology* (Vol. 683, pp. 265-289). Academic Press.
25. Lee, S. C., & Hwang, B. K. (2005). Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta*, 221(6), 790-800.
26. Li, M., Tang, Y., Yu, M., Fan, Y., Khan, S. U., Chang, W., ... & Lu, K. (2022). Systematic characterization of Brassica napus HIR gene family reveals a positive role of BnHIR2. 7 in Sclerotinia sclerotiorum resistance. *Horticulturae*, 8(10), 874.
27. Lim, G. H. (2023). Regulation of Salicylic Acid and N-Hydroxy-Pipecolic Acid in Systemic Acquired Resistance. *The Plant Pathology Journal*, 39(1), 21.
28. Liu, J. H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., & Moriguchi, T. (2015). Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in plant science*, 6, 827.

29. Liu, Y., Sun, T., Sun, Y., Zhang, Y., Radojčić, A., Ding, Y., ... & Zhang, Y. (2020). Diverse roles of the salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in plant immunity. *The Plant Cell*, 32(12), 4002-4016.
30. Lukan, T., & Coll, A. (2022). Intertwined roles of reactive oxygen species and salicylic acid signaling are crucial for the plant response to biotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5568.
31. Mandal, S., Rajarammohan, S., & Kaur, J. (2019). ROS accumulation and associated cell death mediates susceptibility to *Alternaria brassicae* in *Arabidopsis* accessions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 107, 51-59.
32. Marchetti, M., Ronda, L., Cozzi, M., Bettati, S., & Bruno, S. (2023). Genetically Encoded Biosensors for the Fluorescence Detection of O<sub>2</sub> and Reactive O<sub>2</sub> Species. *Sensors*, 23(20), 8517.
33. Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., ... & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling*, 2(84), ra45-ra45.
34. Mo, H., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, G., Zhang, J., & Ma, Z. (2015). Cotton polyamine oxidase is required for spermine and camalexin signalling in the defence response to *Verticillium dahliae*. *The Plant Journal*, 83(6), 962-975
35. Moschou, P. N., Sanmartin, M., Andriopoulou, A. H., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J. J., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147(4), 1845-1857
36. 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.
37. Nehela, Y., & Killiny, N. (2020). The unknown soldier in citrus plants: polyamines-based defensive mechanisms against biotic and abiotic stresses and their relationship with other stress-associated metabolites. *Plant Signaling & Behavior*, 15(6), 1761080.

38. Qi, Y., & Katagiri, F. (2012). Membrane microdomain may be a platform for immune signaling. *Plant signaling & behavior*, 7(4), 454-456.
39. Qi, Y., Tsuda, K., Nguyen, L. V., Wang, X., Lin, J., Murphy, A. S., ... & Katagiri, F. (2011). Physical association of Arabidopsis hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31297-31307.
40. Rodríguez, A. A., & Taleisnik, E. L. (2012). Determination of reactive oxygen species in salt-stressed plant tissues. *Plant Salt Tolerance: Methods and Protocols*, 225-236.
41. 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, 1-8.
42. Saleem, M., Fariduddin, Q., & Castroverde, C. D. M. (2021). Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 168, 381-397.
43. Shen, W., Nada, K. y Tachibana, S. (2000). Implicación de las poliaminas en la tolerancia al frío de cultivares de pepino. *Fisiología vegetal*, 124 (1), 431-440.
44. Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2019). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant science*, 279, 81-86.
45. Swanson, S. J., Choi, W. G., Chanoca, A., & Gilroy, S. (2011). In vivo imaging of Ca<sup>2+</sup>, pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants. *Annual review of plant biology*, 62, 273-297.
46. Tavares, S., Azinheira, H., Valverde, J., Pajares, A. J. M., Talhinhos, P., & Silva, M. D. C. (2023). Identification of HIR, EDS1 and PAD4 Genes Reveals Differences between Coffea Species That May Impact Disease Resistance. *Agronomy*, 13(4), 992.
47. Tiburcio, A. F., Altabella, T., Bitrián, M., & Alcázar, R. (2014). The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta*, 240(1), 1-18.
48. Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16(1), 1-10.

49. Vijayaraghavareddy, P., Adhinarayanreddy, V., Vemanna, R. S., Sreeman, S., & Makarla, U. (2017). Quantification of membrane damage/cell death using Evan's blue staining technique. *Bio-protocol*, 7(16), e2519-e2519.
50. Vlot, A. C., Sales, J. H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., ... & Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*, 229(3), 1234-1250.
51. Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M. B., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., ... & Kachroo, P. (2014). Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Reports*, 7(2), 348-355.
52. Wang, C., Liu, R., Lim, G. H., de Lorenzo, L., Yu, K., Zhang, K., ... & Kachroo, P. (2018). Pipecolic acid confers systemic immunity by regulating free radicals. *Science advances*, 4(5), eaar4509.
53. Xu, J., Padilla, CS, Li, J., Wickramanayake, J., Fischer, HD y Goggin, FL (2021). Respuestas redox de Arabidopsis thaliana al pulgón verde del melocotón, Myzus persicae. *Patología vegetal molecular* , 22 (6), 727-736.
54. Yang, K., Yan, Q., Wang, Y., Peng, H., Jing, M., & Dou, D. (2022). GmPAO-mediated polyamine catabolism enhances soybean Phytophthora resistance without growth penalty. *Phytopathology Research*, 4(1), 35.
55. Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., ... & Xin, X. F. (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature*, 592(7852), 105-109.
56. Zou, Z., Fan, Q., Zhou, X., Fu, X., Jia, Y., Li, H., & Liao, Y. (2024). Biochemical Pathways of Salicylic Acid Derived from l-Phenylalanine in Plants with Different Basal SA Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.