



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocessos

Contribución del transporte de poliaminas a la respuesta de defensa vegetal contra *Botrytis cinerea*.

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias en Bioprocessos.

Presenta:

Peña Lucio, Erick Maurilio

Director de Tesis: **Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler.**
Codirector de Tesis: **Dr. Fernando Luis Pieckenstain.**

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: Enero, 2026

**UASLP-Sistema de Bibliotecas****Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso****DERECHOS RESERVADOS****PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Contribución del transporte de poliaminas a la respuesta de defensa vegetal contra Botrytis cinerea © 2026 por Erick Maurilio Peña Lucio se distribuye bajo una licencia de Creative Commons Attribution-NonCommercial-No derivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo adscrito a la Facultad de Ciencias de la U.A.S.L.P, en el periodo comprendido entre enero de 2020 y agosto de 2025, bajo la dirección de la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y el Dr. Fernando L. Pieckenstain y fue apoyado por los proyectos: SECIHTI (Ciencia de frontera 2019, FORDECYT PRONACES/1564453/2020), COPOCYT (fideicomiso 23871, multas electorales, FME/2023/SE-05/13), PICT 2019-03857 y PICT aplicado 2021-92 (Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, Argentina) y PIP 11220200103017CO (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina).

El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocessos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) de SECIHTI, registro 000590, en el nivel Consolidado. Número de la beca otorgada por SECIHTI: 786830. Número de CVU 924123.

Los datos del trabajo titulado: Contribución del transporte de poliaminas a la respuesta de defensa contra el patógeno Botrytis cinerea se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UASLP
POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS
DOCTORADO

San Luis Potosí, 20 de mayo del 2021

Comité Académico
Posgrado en Ciencias en Bioprocessos
Presente

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de título de tesis de Doctorado en Ciencias en Bioprocessos de la siguiente manera:

Contribución del transporte de poliaminas a la defensa e inmunidad vegetal contra *Botrytis cinerea*.

que desarrollará el (la) estudiante: **Erick Maurilio Peña Lucio**

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará **el manejo y/o generación de plantas de *Arabidopsis* genéticamente modificadas** y por lo tanto, si requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

- Sí debido a que: trabajará con líneas mutantes y de sobreexpresión de *Arabidopsis thaliana***
 No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

Atentamente,

Co-directores de Tesis

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez K.
Nombre y firma del Director de Tesis

Dr. Fernando L. Pieckenstain
Nombre y firma del Co-Director de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Posgrado en Ciencias en Bioprocessos

Contribución del transporte de poliaminas a la respuesta de defensa vegetal contra *Botrytis cinerea*.

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias en Bioprocessos

Presenta:
Peña Lucio, Erick Maurilio

SINODALES

PRESIDENTE:

DRA. MARÍA DE LA LUZ GUERRERO GONZÁLEZ _____

SECRETARIO:

DRA. LUZ MARÍA TERESITA PAZ MALDONADO _____

VOCAL:

DR. FERNANDO L. PIECKENSTAIN _____

VOCAL:

DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ KESSLER _____

VOCAL:

DR. JUAN FRANCISCO JIMÉNEZ BREMONT _____

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: Enero, 2026

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dra. María de la Luz Guerrero González. Presidente. Adscrita al Posgrado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado. Secretario. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Fernando L. Pieckenstain. Sinodal Vocal. Profesor Invitado al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P. Adscrito al Instituto Tecnológico de Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler. Sinodal Vocal. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont. Sinodal Vocal. Adscrito al Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

Dra. Ruth Elena Soria Guerra. Sinodal Suplente. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a enero/ 30 /2026

En la ciudad de San Luis Potosí el día 30 del mes de enero del año 2026. El que suscribe Erick Maurilio Peña Lucio alumno del programa de posgrado Ciencias en Bioprocessos adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y Dr. Fernando L. Pieckenstain y cede los derechos del trabajo titulado “Contribución del gen transporte de poliaminas a la respuesta de defensa vegetal contra *Botrytis cinerea*” a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo sin el permiso expreso del ó los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección margarita.rodriguezydominguez@uaslp.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Erick Maurilio Peña Lucio

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 08/ 01 /2026

L.B. Reyna Nayeli Ortiz Quintero
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada “CONTRIBUCIÓN DEL TRANSPORTE DE POLIAMINAS A LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL CONTRA BOTRYTIS CINEREA.” presentada por el autor ERICK MAURILIO PEÑA LUCIO. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias en Bioprocessos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 08% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dr. Jaime David Pérez Martínez

Coordinador Académico

Posgrado en Ciencias en Bioprocessos

Agradecimientos

Resumen

El estrés biótico modula la biosíntesis, la conjugación y el catabolismo de las poliaminas, lo que puede inducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la activación de genes de defensa. A la fecha, la contribución del transporte de poliaminas a través de membranas en la respuesta al estrés ha sido poco estudiada. En el presente trabajo se estudió la familia génica *PUT/LAT*, que codifica proteínas de importe de poliaminas, con el objetivo de determinar su función en la defensa vegetal. El estudio se llevó a cabo utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, ya que se cuenta con plantas mutantes de los genes *PUT/LAT*. Además, se utilizó la cepa fúngica de *B. cinerea*, debido a su importancia en el sector agronómico y por ser considerado un hongo fitopatógeno. Se observó que los cinco genes *PUT/LAT* (*PUT1* a *PUT5*) incrementan su expresión en respuesta a *B. cinerea*. El análisis de mutantes insercionales de T-DNA de los cinco genes *PUT* de *Arabidopsis* en interacción con *B. cinerea* reveló que *put2-1* y *put5-1*, así como la doble mutante *put2-1 put5-1*, son más susceptibles al hongo, lo que se refleja en un incremento del tamaño de la lesión. Aunque la suplementación con espermidina incrementa la resistencia en plantas silvestres, este tratamiento tuvo poco o nulo efecto en las mutantes *put*. En contraste, en líneas de sobreexpresión 35S::*PUT2*, la suplementación con espermidina incrementó significativamente la resistencia, lo que confirma que el transporte de esta poliamina contribuye a la defensa de la planta. En plantas silvestres, el contenido endógeno de espermidina se incrementó mediante la suplementación con espermidina, mientras que en las mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1*, la suplementación con espermidina tuvo poco impacto en el contenido endógeno de esta amina. Asimismo, la actividad de enzimas antioxidantes y la de PAO se incrementaron en plantas silvestres infectadas con *B. cinerea*, pero no se observaron cambios relevantes en las líneas mutantes *put*. Además, algunos genes marcadores de las vías del ácido salicílico y del etileno mostraron alteraciones en sus perfiles de expresión en la línea *put2-1* en interacción con *B. cinerea*, lo que podría contribuir a su mayor susceptibilidad. En conjunto, estos resultados demuestran que el transporte de poliaminas mediado por *PUT2* y *PUT5* es clave en la respuesta de defensa de la planta frente a *B. cinerea*.

Palabras clave: patosistema *Arabidopsis thaliana* - *Botrytis cinerea*, transportadores de aminoácidos tipo-L, “Polyamine Uptake transporters”, respuesta de defensa de la planta, espermidina.

Abstract

Biotic stress modulates polyamine biosynthesis, conjugation, and catabolism, which induces reactive oxygen species accumulation and the activation of defense genes. Up to now, the contribution of polyamine transport across membranes in the biotic stress response has been scarcely studied. In this work, we examined the *PUT/LAT* gene family, which encodes polyamine import proteins, to determine its role in plant defense using the *Arabidopsis*-*Botrytis* pathosystem. The study was conducted using the model plant *Arabidopsis thaliana*, as mutant plants of the *PUT/LAT* genes are available. Additionally, the fungal strain *B. cinerea* was used due to its importance in the agricultural sector and its classification as a phytopathogenic fungus. It was found that the expression of the five *PUT/LAT* genes (*PUT1* to *PUT5*) increased in response to *B. cinerea*. Analysis of T-DNA insertional mutants of the five *Arabidopsis* *PUT* genes revealed increased susceptibility to *B. cinerea* in the *put2-1* and *put5-1* mutants, as well as in the double mutant *put2-1 put5-1*, with increased lesion size. Although spermidine supplementation increases resistance in WT plants, this treatment had little or no effect on the *put* mutants. Conversely, in 35S::*PUT2* overexpression lines, spermidine supplementation increased resistance, confirming that the transport of this polyamine contributes to plant defense. Spermidine supplementation increased endogenous spermidine levels in the WT; however, the supplementation of spermidine in the *put2-1*, *put5-1*, and the double mutant had less effect on the endogenous content of this amine. Similarly, the activity of antioxidant enzymes and PAO activity augmented in WT plants infected with *B. cinerea*, whereas in the *put* mutants, no relevant changes were detected. Besides, in the *put2-1* mutant line infected with *B. cinerea*, some marker genes of the salicylic acid and ethylene pathways showed alterations in their expression profiles, which could contribute to increased susceptibility to *B. cinerea*. In summary, this research highlights the importance of polyamine transport mediated by *PUT2* and *PUT5* in plant defense against *B. cinerea*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana* - *Botrytis cinerea* pathosystem, L-type amino acid transporters, polyamine uptake transporters, plant defense response, spermidine.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	20
2. ANTECEDENTES	26
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	27
2.3. Mecanismos de respuesta al estrés biótico en plantas	29
2.4. Participación de las fitohormonas en la defensa vegetal	33
2.5. Generalidades de las poliaminas	38
2.6. Metabolismo de las poliaminas	39
2.7. Catabolismo de las poliaminas	41
2.8. Clasificación de los transportadores de aminoácidos	42
2.9. Transporte de poliaminas	43
2.10. Importancia del metabolismo de poliaminas frente al ataque de patógenos	47
3. JUSTIFICACIÓN	50
4. HIPÓTESIS	51
5. OBJETIVOS	52
6. METODOLOGÍA	53
6.1 Material biológico	53
6.2 Condiciones de crecimiento de la planta e inoculación fúngica	55
6.3 Ensayo de suplementación con poliaminas	56
6.3. Extracción de ácidos nucleicos	56
6.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA) y análisis de la expresión génica	58
6.5. Determinación de los niveles de poliaminas libres	59
6.5. Actividad poliamina oxidasa	59

6.6. Determinación de los niveles de H ₂ O ₂	60
6.7. Actividad catalasa.....	60
6.8. Actividad Ascorbato peroxidasa	61
6.9. Análisis histoquímico	61
6.10. Análisis estadístico.....	63
7. RESULTADOS	64
7.1 Participación de la familia de genes <i>PUT/LAT</i> durante la respuesta de defensa vegetal de <i>A. thaliana</i> contra <i>B. cinerea</i>	64
7.2. Las líneas mutantes <i>put2-1</i> y <i>put5-1</i> son más susceptibles a la infección por <i>B. cinerea</i>	65
7.3. La presencia de muerte celular se detecta de forma localizada en el sitio de infección, siendo más intensa la señal en las líneas mutantes <i>put2-1</i> y <i>put5-1</i> que en la WT.....	68
7.4. La sobreexpresión del gen <i>PUT2</i> genera resistencia a <i>B. cinerea</i>	70
7.5. El efecto de protección contra <i>B. cinerea</i> conferido por la suplementación con poliaminas se ve atenuado en las mutantes <i>put2-1</i> y <i>put5-1</i>	71
7.6. La suplementación con Spd en las líneas de sobreexpresión 35S:: <i>PUT2</i> confiere mayor resistencia contra <i>B. cinerea</i> comparado con plantas silvestres	75
7.7- Análisis de los perfiles de poliaminas en plantas WT y en las líneas mutantes <i>put</i>	76
7.8- La actividad poliamina oxidasa permanece atenuada en las líneas mutantes <i>put</i> infectadas con <i>B. cinerea</i>	83
7.9- Las líneas mutantes <i>put</i> presentan alteraciones en el contenido de H ₂ O ₂ y en los patrones de acumulación de H ₂ O ₂ y O ₂ ⁻ en respuesta a la infección por <i>B. cinerea</i>	85
7.10. Determinación de la actividad catalasa y ascorbato peroxidasa	88
7.12. La expresión del gen <i>PUT2</i> se observa predominantemente alrededor del sitio de infección del hongo <i>B. cinerea</i>	92
8. DISCUSIÓN.....	94
9. CONCLUSIONES	101
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
11. REPORTE DE SIMILITUD	119

12. ANEXOS.....	120
13. PORTADA DE ARTÍCULO CON DOI.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del hongo <i>B. cinerea</i> causante de la enfermedad del moho gris en plantas y frutos.....	26
Figura 2. Modelo de defensa Zig-Zag en plantas. Amplitud de la respuesta en diferentes etapas de la infección.....	27
Figura 3. Modelo de inmunidad espacial de la respuesta inmune vegetal.....	33
Figura 4. Rutas de señalización hormonal durante la respuesta de defensa contra patógenos: SA, JA y Et	37
Figura 5. Estructura química de las poliaminas más abundantes en las plantas. Put, Spd, Spm y tSpm	36
Figura 6. Ruta directa e indirecta de biosíntesis de poliaminas en plantas.....	40
Figura 7. Mecanismo de transporte de diferentes tipos de proteínas acarreadoras.....	43
Figura 8. Representación gráfica de la localización intracelular de transportadores PUT en <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
Figura 9. Análisis de la expresión de los genes <i>PUT</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> WT inoculadas con <i>B. cinerea</i>	62
Figura 10. Severidad de la infección por <i>B. cinerea</i> en hojas de plantas de <i>A. thaliana</i> WT y líneas mutantes <i>put</i>	64
Figura 11. Severidad de la infección por <i>B. cinerea</i> en hojas de plantas de <i>A. thaliana</i> WT y líneas mutantes <i>put2-1</i> , <i>put5-1</i> y <i>put2-1 put5-1</i>	65
Figura 12- Detección histoquímica de muerte celular mediante la tinción de Azul de Evans en plantas	66
Figura 13. Severidad de la infección causada por <i>B. cinerea</i> en hojas de plantas de <i>A. thaliana</i> WT y las líneas de sobreexpresión 35S:: <i>PUT2</i>	67

Figura 14. Efecto de la suplementación con Spd en el desarrollo de lesiones en plantas de <i>A. thaliana</i> WT y las líneas mutantes <i>put2-1</i> , <i>put5-1</i> , y <i>put2-1 put5-1</i> infectadas con <i>B. cinerea</i>	69
Figura 15. Efecto de la suplementación con Spm en el desarrollo de lesiones en plantas de <i>A. thaliana</i> WT y las líneas mutantes <i>put2-1</i> , <i>put5-1</i> , y <i>put2-1 put5-1</i> infectadas con <i>B. cinerea</i>	70
Figura 16. Efecto de la suplementación con Put en el desarrollo de lesiones en plantas de <i>A. thaliana</i> WT y las líneas mutantes <i>put2-1</i> , <i>put5-1</i> , y <i>put2-1 put5-1</i> infectadas con <i>B. cinerea</i>	71
Figura 17. Severidad de la infección causada por <i>B. cinerea</i> en hojas de plantas de <i>A. thaliana</i> WT y las líneas de sobreexpresión 35S:: <i>PUT2</i> suplementadas con Spd (200 μ M).	72
Figura 18. Determinación del contenido de poliaminas libres en hojas de plantas WT.....	74
Figura 19. Contenido de poliaminas libres en hojas de plantas WT y líneas mutantes <i>put</i> en respuesta a la suplementación con poliaminas y la infección con <i>B. cinerea</i>	76
Figura 20. Contenido de poliaminas libres en hojas de plantas WT y líneas mutantes <i>put</i> en respuesta a la suplementación con poliaminas y la infección con <i>B. cinerea</i> a las 48 hpi.....	79
Figura 21. Estimación de la actividad de la PAO en hojas de plantas WT y las líneas mutantes <i>put</i> infectados por <i>B. cinerea</i>	81
Figura 22. Contenido de H_2O_2 en hojas de plantas WT y las líneas mutantes <i>put2-1</i> , <i>put5-1</i> y <i>put2-1 put5-1</i> infectadas por <i>B. cinerea</i>	83
Figura 23. Detección histoquímica de H_2O_2 mediante tinción de 3,3-diaminobenzidina (DAB)	84
Figura 24. Detección histoquímica de O_2^- mediante tinción de NBT.....	87
Figura 25. Niveles de actividad enzimática catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX)	89
Figura 26. Análisis de la expresión de genes marcadores de las vías de señalización hormonal del ET/JA y SA	90
Figura 27. Expresión de la línea reportera <i>pPUT2::GUS-2</i> en hojas infectadas por <i>B. cinerea</i>	91

ABREVIATURAS

3-AP: 3-aminopropanal

ADC: arginina descarboxilasa

APX: ascorbato peroxidasa

B. cinerea: *Botrytis cinerea*

BIK1: “*botrytis induced kinase 1*”

CAT: catalasa

CDPK: proteína quinasa dependiente de calcio

CDIPs: “Cell Death Inducing Proteins”

DAB: 3,3-diaminobencidina

DAP: 1,3-diaminopropano

DAMP: "Damage-Associated Molecular Patterns"

DAO: diamina oxidasa

DNA: "Deoxyribonucleic acid"

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

ET: etileno

ETI: “Effector-Triggered Immunity”

EDS1: “Enhanced Disease Susceptibility 1”

ETS: Effector-Triggered Susceptibility”

ExTi: “Extracellularly Triggered Immunity”.

ExIP: “Extracellular Immunogenic Pattern”

FAD: flavina adenín dinucleótido

HR: “Hypersensitive Response”

InTi: “Intracellularly Triggered Immunity”.

InIP: “Intracellularly Immunogenic Pattern”

JA: ácido jasmónico

MAMP: “Microbial Associated Molecular Patterns”

MAPKs: “Mitogen Activated Protein Kinases”

NLR: “Nucleotide-Binding Leucine Rich Repeat”

ODC: ornitina descarboxilasa

PAD4: “Phytoalexin Deficient 4”

PAMP: “Pathogen-Associated Molecular Patterns”

PAO: poliamina oxidasa

PCR: “Polymerase Chain Reaction”

PCD: “Programmed Cell Death”

PR: “Pathogenesis-Related Proteins”

PTI: “Pattern Triggered Immunity”

Put: putrescina

PUT: “Polyamine Uptake Transporters”

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA: “Ribonucleic acid”

RBOH: “Respiratory burst oxidase homolog”

SAR: “Systemic acquired resistance”

SA: ácido salicílico

SOD: superóxido dismutasa

Spd: espermidina

Spm: espermina

tSpm: termoespermina

“Tipo-LAT”: Transportadores de aminoácidos de tipo

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, las plantas han sido blanco de diversas plagas y enfermedades, generando una drástica disminución de las cosechas y pérdidas económicas consecuentes (FAO, 2024). Esta amenaza constante impulsa la necesidad de investigar a fondo los mecanismos de defensa vegetal. El establecimiento de la respuesta de defensa vegetal se lleva a cabo en diferentes etapas. Para explicar estas etapas se ha propuesto el modelo Zig-Zag (Jones & J.L., 2006), el cual comienza con el reconocimiento de patrones moleculares asociadas a patógenos PAMPs (“Pathogen Associated Molecular Patterns”, por sus siglas en inglés) o patrones moleculares asociados a daño DAMPs (“Damage Associated Molecular Patterns”, por sus siglas en inglés) los cuales son identificados por receptores vegetales específicos, llamados PRRs (“Pattern Recognition Receptors”, por sus siglas en inglés) (Ngou et al., 2022). Después del reconocimiento del patógeno se activa la inmunidad desencadenada por patrones o PTI (“Pattern Triggered Immunity”, por sus siglas en inglés) este reconocimiento resulta en la liberación de iones de calcio (Ca^{2+}) en la célula, formación de depósitos de callos y la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Torres et al., 2002) tales como el anión radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, se produce la activación de proteínas quinasas, como las MAPKs (“Mitogen-Activated Protein Kinases”, por sus siglas en inglés) (Asai et al., 2002), que participan en diferentes eventos de señalización, así como en la inducción de genes de defensa y en la activación de vías de señalización hormonal (Pieterse et al., 2012). Algunos patógenos han desarrollado mecanismos para suprimir la respuesta inmune PTI mediante la producción de moléculas efectoras; sin embargo, las plantas han evolucionado y desarrollado estrategias para su reconocimiento (Jones & J.L., 2006); El reconocimiento de los efectores se lleva a cabo mediante receptores intracelulares NLRs (“Nucleotide-Binding Leucine Rich receptors”, por sus siglas en inglés), lo cual induce la inmunidad ETI (“Effector-Triggered Immunity”, por sus siglas en inglés) (Jones & J.L., 2006).

El modelo Zig-Zag ha sido utilizado durante años para explicar de manera general los mecanismos de activación de la respuesta de defensa vegetal (Jones &

J.L., 2006); sin embargo, este modelo no permite diferenciar dónde se desencadena la respuesta inmunitaria. Recientemente se ha propuesto una adaptación de este que permite diferenciar los distintos tipos de respuesta inmune en la planta, basada en la ubicación de los eventos de señalización inmunitaria (Van der Burgh & Joosten, 2019). De esta manera, se ha introducido el término “inmunidad espacial”, el cual hace referencia a que la respuesta inmune se desencadena dependiendo de la ubicación en la que se reconocen los patrones inmunogénicos (Van der Burgh & Joosten, 2019). Este modelo indica que la inmunidad puede establecerse ya sea extracelularmente ExTi (“Extracellularly Triggered Immunity”, por sus siglas en inglés) o intracelularmente InTi (“Intracellularly Triggered Immunity”, por sus siglas en inglés) (Van der Burgh & Joosten, 2019).

Las principales fitohormonas que participan en el establecimiento de la respuesta de defensa son el ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (Et) (Pieterse et al., 2012). Generalmente, la vía de señalización del SA es activada después del reconocimiento de patógenos biotróficos; por otro lado, la vía de señalización del JA/Et está más asociada con la respuesta de defensa contra patógenos necrotróficos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que estas vías pueden activarse simultáneamente y actuar en conjunto para detener el avance de los patógenos (Pieterse et al., 2012).

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno causante de la enfermedad del moho gris en más de 1000 especies de plantas (Veloso & van Kan, 2018). *B. cinerea* es uno de los patógenos más destructivos, caracterizado por su crecimiento filamentoso, que conlleva al desarrollo de la enfermedad del moho gris en diferentes cultivos, generando grandes pérdidas económicas (Veloso & van Kan, 2018). Tradicionalmente, *B. cinerea* se describe como un patógeno necrotrófico; sin embargo, recientemente se ha descrito que este hongo puede presentar una etapa biotrófica (durante las primeras horas de la infección) (Veloso & van Kan, 2018). Posteriormente, *B. cinerea* se comporta como necrótrofo provocando pudrición de hojas, flores y frutos (Veloso & van Kan, 2018). *B. cinerea* secreta un tipo de proteínas conocidas como CDIPs (“Cell Death Inducing Proteins”, por sus siglas en inglés), las cuales son reconocidas por receptores RLKS (“Plant Receptors Like

Kinases", por sus siglas en inglés) o RLPs (por sus siglas en inglés "Receptor Like Proteins") (Bi et al., 2023) y son consideradas como PAMPs (Bi et al., 2023). Las CDIPs permiten al hongo manipular la maquinaria RCD ("Regulated Cell Death", por sus siglas en inglés) de la planta e inducir la muerte celular localizada del hospedero (Bi et al., 2023).

B. cinerea puede inducir un estallido oxidativo en las plantas, en consecuencia, el hospedero promueve la acumulación de EROs, tales como, O_2^- y H_2O_2 , lo que desencadena la activación de otras respuestas de defensa como la respuesta hipersensible (HR, "Hypersensitive Response", por sus siglas en inglés) (Rossi et al., 2020). Adicionalmente, *B. cinerea* secreta compuestos fitotóxicos, tales como botrianos (Collado et al., 2000) y botcininas (Tani et al., 2006) los cuales pueden inducir la activación de la HR y el desarrollo de lesiones necróticas en el hospedero (Rossi et al., 2020). La muerte celular que se presenta en la planta facilita la colonización del hongo, que produce la podredumbre de las hojas, flores y frutos (Govrin & Levine, 2000). El diseño de estrategias para combatir a los microorganismos patógenos ha cobrado gran relevancia debido al interés en reducir el impacto negativo que ejercen sobre cultivos de importancia agrícola, así como en disminuir el impacto económico que estos generan. Adicionalmente, el estudio de la participación de los metabolitos asociados a la respuesta de defensa vegetal permite comprender que factores son críticos para el establecimiento óptimo de la respuesta inmune de la planta. Dentro de estos metabolitos, se encuentran las poliaminas, las cuales son moléculas poliacid它们 de bajo peso molecular. Debido a su naturaleza química, estas moléculas pueden unirse con macromoléculas con carga negativa como el DNA ("Deoxyribonucleic acid" por sus siglas en inglés) y RNA ("Ribonucleic acid" por sus siglas en inglés) y regular su expresión (Igarashi & Kashiwagi, 2000). En plantas superiores, las más abundantes son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd), y la tetramina espermina (Spm) (Blázquez, 2024). Las poliaminas están asociadas con la regulación de la división, elongación y diferenciación celular, así como diferentes procesos fisiológicos y de desarrollo, tales como embriogénesis, desarrollo de órganos, maduración de frutos, senescencia y respuesta al estrés (Fortes & Agudelo-Romero, 2018; Miller-Fleming et al., 2015; Sobieszczuk-Nowicka, 2017; Vondráková et al., 2015; Tavladoraki et

al., 2016; Jasso-Robles et al., 2020). Bajo condiciones de estrés biótico, se pueden presentar cambios en el metabolismo de las poliaminas, en este sentido, durante el ataque de patógenos se produce un aumento en la concentración de poliaminas libres y conjugadas en las plantas y generalmente este aumento incrementa la resistencia contra el patógeno (Gonzalez et al., 2021; Jasso-Robles et al., 2015; Jiménez-Bremont et al., 2014; Walters, 2003). En la literatura se encuentran varios trabajos que describen cambios en el metabolismo de las poliaminas en respuesta a patógenos y resaltan su importancia en la defensa vegetal. Por ejemplo, plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infectadas con el virus TMV (Tobacco Mosaic Virus) incrementan el contenido de poliaminas libres y conjugadas en el sitio de la lesión necrótica (Torrigiani et al., 1997). De igual manera, en el aplopasto de hojas de *N. tabacum* se reportó un incremento en los niveles de Put y Spm durante la infección por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Marina et al., 2008). En otro estudio, se observó que plantas de maíz (*Zea mays*) resistentes al hongo *Aspergillus flavus* acumulan Spd y Spm, en comparación con plantas susceptibles al patógeno (Majumdar et al., 2019). Por otro lado, en *Arabidopsis thaliana* la adición exógena de Put incrementó la resistencia frente a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 (Kim et al., 2013). Además, la sobreexpresión del gen *Arginasa 2* (ARGOE) incrementó el contenido de Put, lo que generó una mayor resistencia a la infección causada por *B. cinerea* (Brauc et al., 2012). También se observó que pretratamientos foliares con Put (10 μ M) promueven la resistencia de *A. thaliana* contra *B. cinerea* (Chávez Martínez et al., 2020). En semillas de maíz, el pretratamiento con Put (0.5 mM) mostró un efecto positivo contra el hongo *Fusarium verticillioides* (Kovács et al., 2023). En otro trabajo, la suplementación con Spm (0.5 mM) en plantas de *Solanum lycopersicum* y *Phaseolus vulgaris* redujo en un 75 % el progreso de la enfermedad del moho gris causada por *B. cinerea* (Seifi et al., 2019). Además, la aplicación exógena de Spd y Spm (100 y 500 μ M) promovió la resistencia de *A. thaliana* contra *B. cinerea* (van Rensburg & Van den Ende, 2021). En otro estudio se reportó un incremento en la resistencia de plantas de la soja (*Glycine max*) contra el oomiceto *Phytophtora sojae*, mediante la sobreexpresión de su gen nativo *PAO1* (*Polyamine Oxidase 1*). Adicionalmente, se observó que estas líneas sobreexpresoras presentaron una mayor actividad PAO y un

incremento en el contenido de H_2O_2 en comparación con la WT tras la infección por *P. sojae* (Yang et al., 2022). Los estudios mencionados previamente resaltan la importancia del metabolismo de las poliaminas durante la respuesta de defensa contra patógenos (Blázquez, 2024); sin embargo, aún se desconoce la contribución y el rol del transporte de las poliaminas en eventos de estrés biótico en general, y en particular durante la respuesta de defensa contra *B. cinerea*.

En *A. thaliana* se conocen cinco transportadores de poliaminas, que se clasifican como “Polyamine Uptake Transporters” (PUTs) y pertenecen a la familia de transportadores tipo-LAT (“transportadores de aminoácidos de tipo L”) (Fujita & Shinozaki, 2015; Mulangi et al., 2012). Se ha descrito que los transportadores PUT también pueden movilizar aminoácidos, como la leucina, y otras moléculas, como la vitamina B1, e incluso el herbicida paraquat (PQ) (Begam et al., 2020; Fujita et al., 2012a; Fujita & Shinozaki, 2014; Li et al., 2013). Estos transportadores se localizan en diferentes compartimentos celulares; por ejemplo, PUT1 se localizan en el retículo endoplásmico, PUT2 en el aparato de Golgi y cloroplasto (Ahmed et al., 2017), PUT3 en la membrana plasmática y cloroplasto (Fujita & Shinozaki, 2015), PUT4 en membrana plasmática (Méndez-Iberri et al., 2017; Tesis de Licenciatura) y PUT5 en retículo endoplásmico (Begam & Good, 2017). Los transportadores PUT son proteínas integrales de membrana con dominios carboxilo (C-) y amino (N-) orientados hacia la región citoplásmica (Begam et al., 2020; Shen et al., 2016). Estos transportadores se activan en respuesta al estrés abiótico. Particularmente, SOS1, SOS2, y PUT3/LAT1 forman un complejo que participa en la modulación del transporte de sodio y de poliaminas en condiciones de estrés salino (Chai et al., 2020). SOS1 es una proteína integral de membrana, mientras que SOS2 es una quinasa (Chai et al., 2020). Adicionalmente, se ha descrito que PUT3/LAT1 participa en la absorción de poliaminas extracelulares durante condiciones de estrés por calor, mediante la estabilización de RNA mensajeros que codifican genes de respuesta al estrés por calor (Shen et al., 2016).

El presente trabajo presenta información novedosa sobre la implicación de los transportadores de poliaminas *PUT2/LAT4* y *PUT5/LAT5* en el establecimiento de la respuesta de defensa vegetal frente al hongo necrotrófico *B. cinerea*. El

análisis de mutantes insercionales de T-DNA *put*, mostró mayor susceptibilidad a la infección inducida por el hongo en las mutantes *put2-1* y *put5-1*, así como en la línea doble mutante *put2-1 put5-1*. Además, la sobreexpresión del gen *PUT2*, en las líneas 35S::*PUT2*, mostró una mayor resistencia al patógeno en comparación con el ecotipo silvestre (WT). Este resultado resalta la importancia del transporte de poliaminas mediado por *PUT2* en la respuesta de defensa vegetal. Por otro lado, el contenido de poliaminas se vio afectado en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* principalmente durante la interacción con el hongo. Generalmente, tras la infección por un patógeno, la actividad PAO puede incrementarse en las plantas (Hatmi et al., 2015; Jasso-Robles et al., 2020). En este sentido, tras inocular con *B. cinerea*, se observó un incremento de la actividad PAO en las plantas WT, principalmente 24 horas posteriores a la inoculación (hpi). Sin embargo, este cambio no se observó en las líneas mutantes *put*, lo que sugiere que la oxidación de poliaminas está atenuada en estas mutantes, principalmente durante la respuesta de defensa contra el patógeno.

Adicionalmente, los ensayos de actividad antioxidante (actividad catalasa y ascorbato peroxidasa) y los niveles de H₂O₂ mostraron un perfil distinto en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* en comparación con la WT. Estos resultados sugieren una posible alteración en el metabolismo de las EROs y la respuesta redox en estas líneas mutantes. Por otro lado, se realizaron análisis de expresión de algunos genes marcadores de vías de señalización hormonal, tales como *PDF1.2*, *PR1*, *PR3* y *ACS2*. Resultó interesante encontrar que estos genes mostraron cambios en sus niveles de expresión en las líneas mutantes *put*, lo cual, fue más evidente en la línea *put2-1*. En general, nuestro trabajo de investigación resalta la importancia del transporte de poliaminas durante la respuesta de defensa contra *B. cinerea*; en específico, se observó que los genes *PUT2/LAT4* y *PUT5/LAT5* son requeridos para restringir la infección por *B. cinerea*, contribuyendo a la resistencia de la planta contra el hongo.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana pertenece a la familia de las crucíferas (Brassicaceae), a la que pertenecen unas 4 mil especies de plantas, es una de las plantas más estudiadas globalmente a nivel genético y fisiológico (Bergelson & Roux, 2010), consta de 5 características principales por las cuales es ampliamente utilizada como organismo modelo: su tamaño pequeño, su tiempo corto de generación, autopolinización, alta producción de semillas y su número reducido de cromosomas (Bergelson & Roux, 2010). En el año 2000 el genoma completo de *A. thaliana* fue secuenciado con un número estimado de 25,000 genes, codificando para más de 11,000 familias de proteínas (The *Arabidopsis* Genome Initiative, [AGI], 2000). También se describió la dinámica y arquitectura de los cromosomas, la distribución de elementos transposables, así como, la comparación con otras especies de plantas (AGI, 2000).

Los estudios con líneas mutantes de *A. thaliana* han contribuido a la comprensión de las funciones de diversas proteínas y metabolitos presentes en las plantas (AGI, 2000). Dentro de la diversidad de metabolitos que se han estudiado se encuentran las poliaminas, compuestos de gran importancia para diferentes procesos de desarrollo, crecimiento, maduración y para la respuesta al estrés biótico y abiótico en plantas (Blázquez, 2024). Con el objetivo de comprender el rol de las poliaminas en la interacción patógeno-planta, se han utilizado diferentes líneas genéticamente modificadas de *A. thaliana* como líneas mutantes, de sobreexpresión y reporteras. Por ejemplo, la sobreexpresión del gen *SPMS* incrementó el contenido de Spm generando un fenotipo de resistencia frente a *Pseudomonas viridiflava* (Gonzalez et al., 2011). En otro estudio se sobreexpresó una PAO extracelular de maíz en plantas de tabaco y se observó un incremento en la expresión de genes relacionados con la SAR (“Systemic Acquired Resistance”, por sus siglas en inglés) (Moschou et al., 2009). Adicionalmente, se estudió la implicación de los genes *PAO* durante la respuesta de defensa vegetal contra *Pst* DC3000; en este reporte se obtuvieron líneas mutantes de los genes *pao1* y *pao2* y se determinó que estas líneas mutantes presentaron una respuesta de defensa alterada (Jasso-Robles et al., 2020). También se han generado líneas reporteras

de genes relacionados con el transporte de poliaminas para analizar su expresión tejido-específica (Begam & Good, 2017). Particularmente, haciendo uso de una línea reportera en la que se fusionó el promotor del gen *LAT5/PUT5* con el ORF que codifica a la enzima... (GUS), se verificó la expresión de *LAT5/PUT5* en el floema, así como en raíces principales y laterales (Begam & Good, 2017).

En el presente trabajo de investigación se utilizaron líneas mutantes, reporteras y sobreexpresoras de genes relacionados con el transporte de poliaminas para estudiar su participación en la respuesta de defensa vegetal frente a *B. cinerea*.

2.2 *Botrytis cinerea*

Clasificación taxonómica: Pertenece al reino: Fungi, filo: Ascomycota, subfilo: Pezizomycotina, clase: Leotiomycetes, orden: Helotiales, familia: Sclerotiniaceae, género: *Botrytis*. La palabra *Botrytis* proviene del griego "botryose" debido a los racimos característicos que genera la enfermedad que produce este hongo (Agrios, 1997). *B. cinerea* es un hongo necrotrófico causante de la enfermedad del moho gris en más de 1000 especies de plantas, incluidos cultivos de importancia agronómica. Este hongo puede atacar hortalizas, frutales y ornamentales, por ejemplo, plantas de tomate, lechuga, pepino, fresa, uva, manzana, rosa, clavel, begonia, dalia, entre otras (Agrios, 1997). Este patógeno es el causante de la enfermedad del tizón de la flor, así como, de la podredumbre en bulbos y manzanas y de la enfermedad del moho gris en fresas (**Fig. 1A**).

B. cinerea se caracteriza por generar podredumbre en todas las partes aéreas de la planta, así como en flores, frutas y verduras; además, produce conidióforos grises prolíficos y macroconidias típicas (Veloso & van Kan, 2018). Puede presentar conidióforos septados, grandes y gruesos (10 μM de diámetro) con ápices hinchados y pequeños, esterigmas productores de conidios lisos, unicelulares (Veloso & van Kan, 2018). Adicionalmente, se ha reportado que puede producir enzimas y toxinas que degradan la pared celular (Veloso & van Kan, 2018). Aunado a la liberación de algunas enzimas, este hongo puede generar dos grupos de compuestos, algunos provenientes de la familia de los sesquiterpenoides; por

ejemplo, botrianos y otros derivados de la familia de policétidos, tales como botcininas. La infección por *B. cinerea* puede inducir la HR en los tejidos, y como consecuencia, se presenta la acumulación de O_2^- y H_2O_2 . *B. cinerea* promueve la HR para su propio beneficio; esta respuesta se produce de forma temprana y genera la acumulación de EROs extracelulares, las cuales, son producidas mediante la activación de enzimas como RBOH y peroxidasa de la pared celular (Marina et al., 2008; Moschou et al., 2012). La muerte celular programada o PCD (“Programmed Cell Death”, por sus siglas en inglés) desencadenada como parte de la HR facilita la colonización del hongo sobre el tejido (Govrin & Levine, 2000).

B. cinerea se reproduce mediante conidios (fase asexual) (**Fig. 1A**), pero también presenta una fase sexual, conocida como *Botryotinia fuckeliana*. Durante esta fase el hongo genera un ascocarpo del tipo apotecio (**Fig. 1B**), el cual contiene ascosporas (esporas sexuales) que se liberan de estructuras en forma de sacos llamadas ascos (Caiza, 2013). El ciclo de la enfermedad del moho gris inicia si las esporas caen en las flores y germinan; el conidio germinado penetra e invade el tejido; las células infectadas colapsan y se desintegran; el tejido se vuelve blando y se pudre; la espora puede reproducirse en la fruta enferma y repetir el ciclo de infección (**Fig. 1B**).

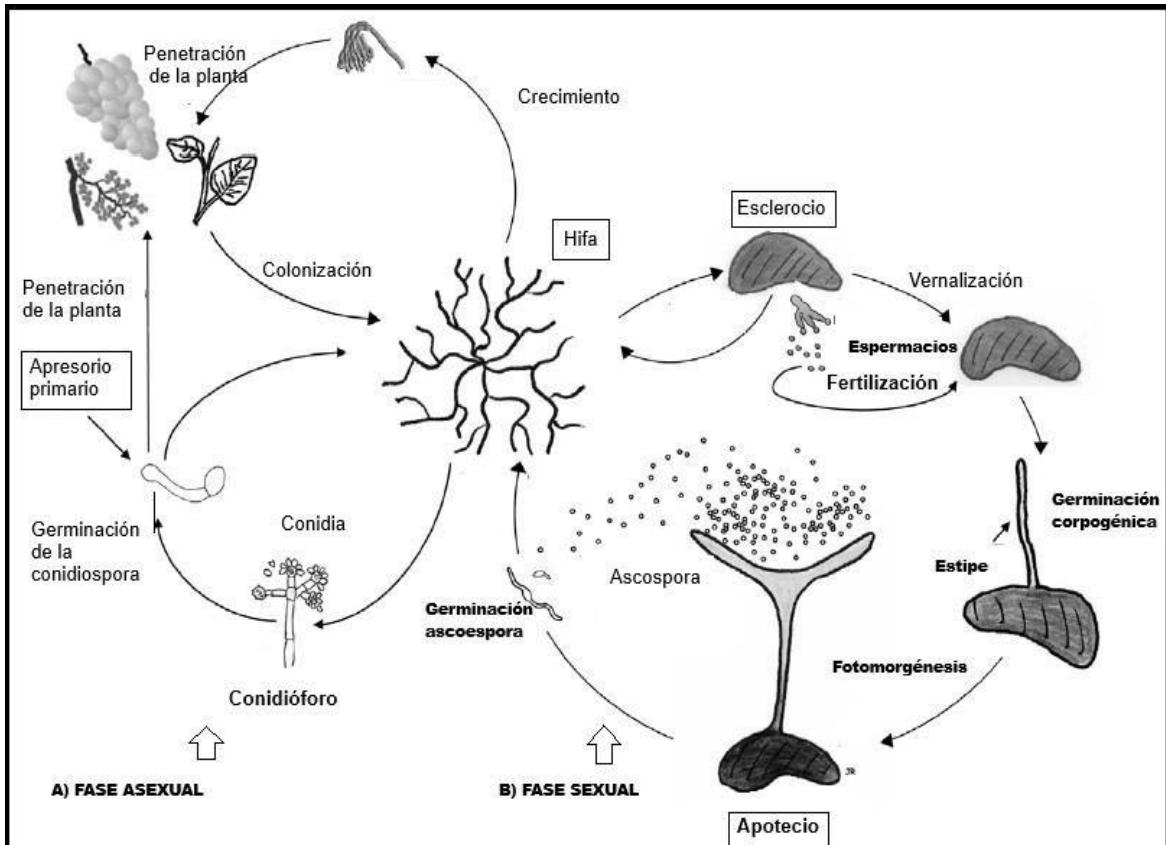


Figura 1. Ciclo de vida del hongo *B. cinerea* causante de la enfermedad del moho gris en plantas y frutos. A) La espora asexual (conidia) germina en plantas generando podredumbre y enfermedad, los conidióforos y los conidios forman el moho gris en el tejido infectado, los conidios pueden diseminarse en el tejido y germinar nuevamente para repetir el ciclo de vida. El hongo también puede producir estructuras de resistencia que se conocen como esclerocitos, las cuales, producen micelio cuando las condiciones medioambientales son favorables. Imagen modificada de Agrios, 1997. B) Estructuras de la fase sexual (Teleomorfo) de *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). Se observa la germinación del esclerocio (estructura de resistencia) para formar apotecios. El apotecio es la estructura en forma de copa que contiene las ascas y produce las ascosporas (esporas sexuales). Imagen tomada y modificada de Romanazzi y Feliziani, 2014.

2.3. Mecanismos de respuesta al estrés biótico en plantas

El sistema inmune vegetal es un sistema inmune innato que implica varios eventos de reconocimiento y respuesta, siendo el modelo Zig-Zag uno de los más estudiados (Fig. 2) (Jones & J.L., 2006). En este modelo, el reconocimiento de moléculas presentes en los microorganismos conocidas como PAMPs o DAMPs, se lleva a cabo mediante receptores PRRs en la superficie de la célula vegetal, desencadenando la respuesta PTI ("pattern-triggered immunity", por sus siglas en inglés) (Fig. 2). Algunos patógenos pueden secretar proteínas o moléculas efectoras que interfieren en la activación de la inmunidad PTI (Fig. 2); sin embargo,

las plantas han desarrollado mecanismos para detectar estos efectores (**Fig. 2**). Cuando estos efectores son reconocidos por el hospedero se inicia la susceptibilidad desencadenada por efectores o ETS (“Effector Triggered Susceptibility”, por sus siglas en inglés). La defensa desencadenada por el *gen-R*, consiste en la activación de genes de resistencia (*R*), en respuesta a diferentes efectores (Jones & J.L., 2006). Estas proteínas R en general están localizadas en la membrana plasmática o en el citoplasma, los receptores localizados en el citoplasma se conocen como proteínas NLR (Koureliss & Van der Hoorn, 2018). El reconocimiento de los efectores desencadena la respuesta ETI (“Effector-Triggered Immunity”, por sus siglas en inglés) (**Fig. 2**). Las respuestas PTI y ETI pueden potenciarse mutuamente para robustecer la respuesta inmune (Ngou et al., 2021).

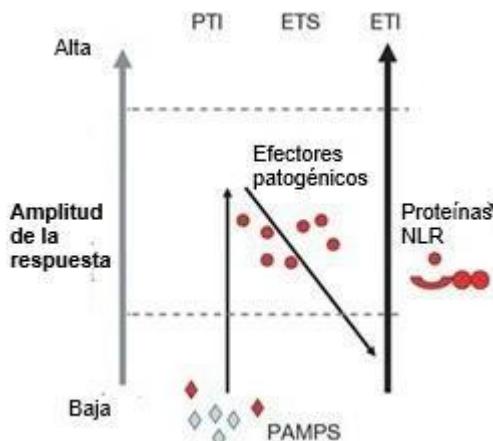


Figura 2. Modelo de defensa Zig-Zag en plantas. Amplitud de la respuesta en diferentes etapas de la infección: 1) Los PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) son reconocidos por receptores PRRs (Pattern Recognition Receptors) enseguida se lleva a cabo la activación de la inmunidad PTI (Pattern Triggered Immunity), generalmente la amplitud de la respuesta no es tan alta. Sin embargo, los patógenos pueden liberar efectores para evadir la respuesta PTI; 2) El reconocimiento de estos efectores desencadena la ETS (Effector Triggered Susceptibility). Los efectores son reconocidos por las proteínas NLR (nucleotide-binding leucine-rich repeat) y, en consecuencia, se lleva a cabo la activación de la inmunidad ETI (Effector Triggered Immunity); la amplitud de esta respuesta es más alta y promueve la resistencia contra la enfermedad. La imagen fue tomada y modificada de Jones y Dangl (2006).

El proceso de reconocimiento de PAMPs mediante receptores PRRs en la respuesta PTI induce la activación de diferentes mecanismos de defensa, por

ejemplo, influjo de iones de Ca^{2+} , deposición de callosa, producción de EROs; tales como, O_2^- y H_2O_2 (Naveed et al., 2020) (**Fig. 3**). Además, se lleva a cabo la activación de las proteínas quinasas (MAPKs) (Asai et al., 2002), las cuales participan en diferentes eventos de señalización, así como la inducción de diferentes genes asociados a la respuesta de defensa (Pieterse et al., 2012) (**Fig. 3**).

El modelo clásico en el cual la planta reconoce PAMPs o DAMPs por medio de receptores PRRs ha sido replanteado, debido a que, actualmente se ha propuesto que la activación de la respuesta inmune vegetal es un proceso que se desencadena en distintos sitios. Este modelo indica que la inmunidad puede establecerse ya sea extracelular o intracelularmente (**Fig. 3**). Cuando el reconocimiento de los PAMPs o bien de los efectores se realiza mediante receptores extracelulares conocidos como receptores RLKs o RLPs (Bi et al., 2023) presentes en la membrana plasmática (ExIP, “Extracellular Immunogenic Pattern”, por sus siglas en inglés) se desencadena la respuesta ExTi (“Extracellularly Triggered immunity”, por sus siglas en inglés). Por otro lado, cuando el reconocimiento se realiza intracelularmente mediante receptores citoplasmáticos (IniP, “Intracellular Immunogenic Pattern” por sus siglas en inglés) (**Fig. 3**) se desencadena la respuesta InTi (“Intracellularly Triggered immunity”, por sus siglas en inglés) (Van der Burgh & Joosten, 2019). Debido a esto, se introdujo el término de “inmunidad espacial” el cual se centra en el sitio donde se lleva a cabo el reconocimiento de estos patrones inmunogénicos (Van der Burgh & Joosten, 2019).

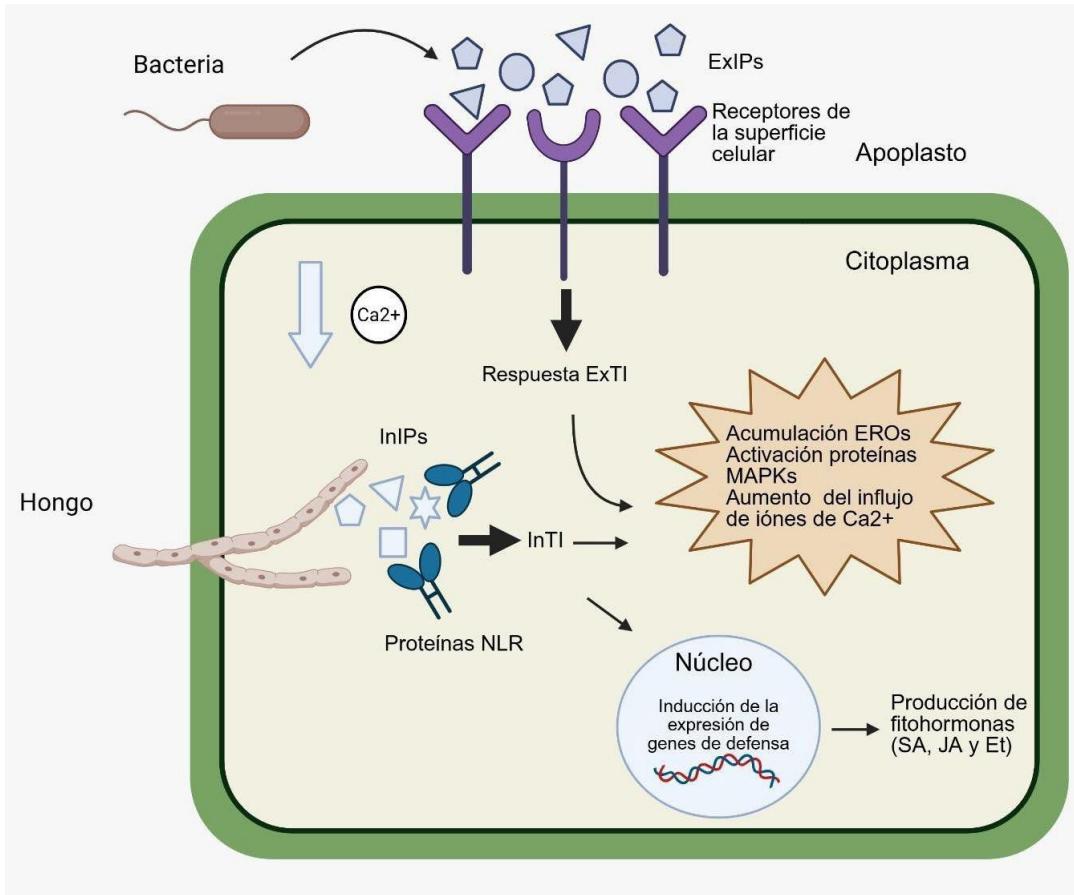


Figura 3. Modelo de inmunidad espacial de la respuesta inmune vegetal. El reconocimiento de ExIPs (Extracellular Immunogenic Patterns) mediante receptores de la superficie celular desencadena la respuesta ExTi (Extracellularly Triggered Immunity), por otro lado, los InIPs (Intracellular Immunogenic Patterns) son detectados por receptores citoplasmáticos como las proteínas NLR (Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat) y desencadenan la respuesta InTi (Intracellularly Triggered Immunity). El reconocimiento de ambos ExTi e InTi contribuye al establecimiento de la respuesta de defensa de la planta, desencadenando diferentes eventos como la acumulación de EROS, activación de las proteínas quinásas MAPKs, el aumento del influjo de iones de Ca²⁺, así como la inducción de la expresión de genes de defensa y la producción de fitohormonas. Created in <https://BioRender.com>. Tomado y modificado de Van der Burgh & Joosten, 2019.

En nuestro estudio evaluamos la respuesta de defensa de *A. thaliana* contra *B. cinerea*. Actualmente se conoce que los mecanismos por los cuales este patógeno desencadena la respuesta inmune de la planta no se alinean totalmente con los modelos previamente mencionados, debido a que, este hongo puede manipular los procesos de muerte celular del hospedero para su propio beneficio (Govrin & Levine, 2000). El proceso de infección de *B. cinerea* comienza con la penetración de la cutícula mediante tubos conidiales germinativos (Dinh et al., 2011), así como, con la secreción de enzimas PCWDEs (“Plant Cell Wall Degrading

Enzymes”, por sus siglas en inglés) que pueden degradar la pared celular (Williamson et al., 2007). Posteriormente, la infección se divide en dos fases:

- a) Formación de la infección local.
- b) Infección tardía: caracterizada por la formación de una abundante biomasa fúngica.

B. cinerea manipula la maquinaria del hospedero mediante proteínas tipo CDIPs las cuales pueden regular la maquinaria RCD de la planta, lo cual promueve la muerte celular localizada (Bi et al., 2023). Al finalizar la etapa temprana, la proliferación de la muerte celular proporciona al hongo nutrientes suficientes para colonizar los tejidos y así propagar su biomasa. Se ha planteado que, después de la propagación de la muerte celular, continúa la activación de la HR y que el hongo puede mantener la manipulación de los sistemas regulatorios de la HR mediante la secreción de efectores fúngicos (Torres et al., 2005).

Los CDIPs han sido clasificados como PAMPs que pueden ser reconocidos por receptores RLKs y RLPs (por sus siglas en inglés “Receptor Like Proteins”) (Bi et al., 2023). Este reconocimiento puede desencadenar una cascada de señalización que incluye la fosforilación de RLCKs (“Receptor Like Cytoplasmic Kinases”, por sus siglas en inglés), dentro de ellos se encuentra el gen *BIK1* (“*Botrytis induced kinase 1*”, por sus siglas en inglés) (Veronese P. et al., 2006). Posteriormente, río abajo de la activación de estas cascadas de señalización se produce la acumulación de las EROs, la deposición de callosa y la producción de compuestos antimicrobianos (Veronese et al., 2006).

2.4. Participación de las fitohormonas en la defensa vegetal

Las rutas de señalización de las hormonas vegetales son complejas y, en general, actúan de forma interconectada; las sofisticadas redes de comunicación que se presentan en las diferentes vías de señalización hormonal promueven una respuesta eficiente contra el ataque de microorganismos (Verma et al., 2016). Generalmente, el contenido de estas hormonas incrementa en respuesta al ataque por patógenos, y pueden regular la expresión de genes relacionados con la

respuesta al estrés biótico (Verma et al., 2016). Dentro de las hormonas vegetales que participan en la defensa de las plantas se encuentran el SA, el JA y ET (**Fig. 4**) (Vuorinen et al., 2021). De manera clásica, el SA se ha relacionado principalmente con la respuesta de defensa contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos (**Fig. 4**) (Pieterse et al., 2012) en contraste, el JA y ET han sido implicados en la regulación de la defensa contra patógenos necrotróficos (**Fig. 4**) (Pieterse et al., 2012).

La activación de la biosíntesis del SA puede desencadenarse tras el reconocimiento de PAMPs o efectores de patógenos (Mishina & Zeier, 2007). La producción de SA induce la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) y la activación de la SAR (Mur et al., 2006). En *Arabidopsis*, la biosíntesis de SA puede realizarse mediante dos vías principales: la vía del isocorismato y la vía de la fenilalanina amonio liasa, principalmente se utiliza corismato como precursor, el cual es obtenido mediante la ruta del shikimato (Ding & Ding, 2020). Las proteínas tipo lipasa EDS1 (“Enhanced Disease Susceptibility”) y PAD4 (“Phytoalexin Deficient4”) pueden activar al gen *ICS1* (“*Isochorismate Synthase 1*”, por sus siglas en inglés) el cual codifica para la enzima isocorismato sintasa (Ding & Ding, 2020). La señalización río abajo de SA está mayormente controlada por un grupo de genes reguladores conocidos como “*NON EXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1*” (*NPR1*). Esta familia de genes se compone de *NPR1* y 5 genes adicionales (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013). Esta familia de genes codifica para un conjunto de proteínas *NPR1*, estas proteínas contienen dominios conservados clave, como el BTB/POZ, los dominios de repetición de anquirina y residuos de cisteína altamente conservados (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013). Dentro de ellas, *NPR2*, *NPR3* y *NPR4* participan en la cascada de señalización del SA (Moore et al., 2011). La detección de bajas concentraciones de SA activa a *NPR1* el cual puede inducir la expresión de genes de resistencia “*R*” (**Fig. 4**) (Moore et al., 2011). El SA es percibido por diferentes receptores, tales como, *NPR3/NPR4* (Li et al., 2019). Por otro lado, *NPR1* actúa como coactivador transcripcional de los genes que responden a SA. En ausencia de SA los receptores *NPR3/NPR4* se mantienen unidos a *NPR1* y lo etiquetan para su degradación en proteasomas, regulando negativamente la expresión de genes en respuesta a SA. El aumento de SA induce la unión de esta molécula a *NPR3/NPR4* generando la pérdida de afinidad de estas

por NPR1, y desencadenando la expresión de genes asociados a SA (Li et al., 2019).

La unión del receptor NPR1 con el SA modifica su conformación, generando dímeros. Esta unión es mediada por un metal de transición de cobre utilizando un complejo de coordinación (Wu et al., 2012). La activación de NPR1 puede inducir la expresión de genes de defensa: *PR1*, *PR2* y *PR5* (Ding & Ding, 2020). La acumulación de SA resulta en la activación localizada de la HR en el sitio de infección, un tipo de PCD inducida también por la ETI (Radojičić et al. 2018). La activación de la HR desencadena la producción y eliminación de EROS las cuales son moléculas que juegan un rol crucial en la respuesta de defensa contra patógenos (Mishra et al., 2024). Además, la acumulación de SA puede inducir cambios epigenéticos, tales como, la metilación del DNA y la modificación de histonas, lo cual afecta directamente el perfil de expresión génica durante la respuesta de defensa (Aftab and Yusuf 2021).

La síntesis de JA y el ET confiere resistencia a la planta en respuesta al ataque de diferentes patógenos necrotróficos, tales como, *B. cinerea* (Mur et al., 2006). Después del reconocimiento de algún patógeno o insecto se inicia la biosíntesis de JA mediante la ruta de la oxilipina (Gfeller et al., 2010), generalmente estos compuestos derivan de los lípidos y su biosíntesis inicia con la liberación de ácido α -linoleico (α -LA) (Gfeller et al., 2010). Posteriormente, con una serie de reacciones mediadas por las enzimas 13-lipoxigenasa, aleno óxido sintasa y ciclaza, se obtiene el ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) (Li et al., 2019). El OPDA es producido en cloroplastos y posteriormente transportado a peroxisomas donde es reducido por medio de la enzima OPDA reductasa 3 y luego oxidado mediante la enzima Acil-CoA oxidasa produciendo JA (Li et al., 2019). Interesantemente, se ha observado que la activación de la vía de señalización del JA puede ser inducida por el receptor NPR3, el cual, ha sido asociado con la degradación del factor transcripcional JAZ (**Fig. 4**) (Li et al., 2019). Las proteínas JAZ son supresoras de la respuesta transcripcional inducida por JA. Cuando la planta se ve expuesta a algún tipo de estrés, se acumula el conjugado JA-isoleucina, el cual se une a la proteína COI1 para facilitar la formación del complejo COI1-JAZ, resultando en la degradación de los represores JAZ (**Fig. 4**) (Li et al., 2019). Río abajo de la

percepción del complejo COI1-JAZ, se conocen dos vías principales de señalización de JA, la vía MYC y la ERF (**Fig. 4**), la primera es regulada por los genes *VSP2* (“*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2*”) y la segunda por los miembros de *AP2/ERF* (“*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR*”) (Pieterse et al., 2012). La vía MYC se activa principalmente por el ataque de insectos y es regulada por los factores de transcripción *MYC2*, *MYC3* y *MYC4* (Pieterse et al., 2012). En cambio, la vía ERF es inducida principalmente por el ataque de patógenos necrotróficos y controlada principalmente por los factores de transcripción *ORA59* y *ERF1*, que pueden activar la expresión de genes marcadores, tales como *PDF1.2*, *ORA59* y *ERF1* (**Fig. 4**) (Pré et al., 2008).

Existen mecanismos de regulación que conectan las vías de señalización mediadas por SA, JA y ET. Concentraciones elevadas de SA inhiben la expresión de genes relacionados con la síntesis de JA (**Fig. 4**). Si bien el efecto del SA sobre la regulación de la vía de síntesis de JA puede ser antagónico, sinérgico o neutral, en la mayoría de los casos el SA participa en la supresión de la vía del JA a nivel transcripcional (Proietti et al., 2018). Por ejemplo, algunos factores de transcripción, tales como, *NPR1*, *WRKY* y *TGA*, pueden regular negativamente la expresión de genes relacionados con la vía del JA (Proietti et al., 2018). El factor de transcripción *WRKY70* está relacionado con la supresión de la expresión de genes que inducen la vía del JA/ET (Li et al., 2019). *NPR1* juega un rol importante en el papel antagónico del SA sobre el JA, debido a que, ha sido asociado con la regulación antagónica de genes en respuesta a JA, tales como, *LIPPOXYGENASE 2* (*LOX2*), *VSP2* y *PLANT DEFENSIN 1.2* (*PDF1.2*) (Spoel et al., 2003).

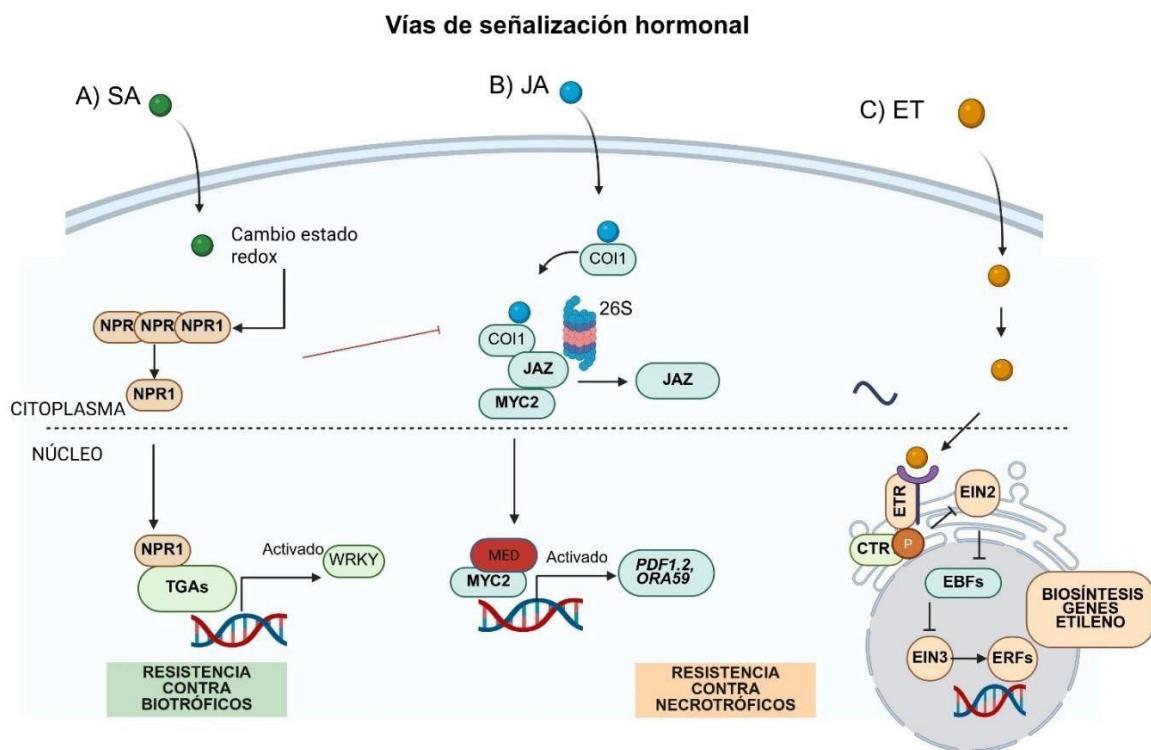


Figura 4. Rutas de señalización hormonal durante la respuesta de defensa contra patógenos: A) SA, B) JA y C) ET. Cada ruta de señalización es activada bajo diferentes condiciones; en general, las rutas de señalización hormonal pueden actuar de forma antagónica, interconectada o sinérgica. A) La percepción de SA genera un cambio en el estado redox, lo cual, induce la producción de monómeros de NPR1 (NON PATHOGENESIS RELATED GENES 1), traslocándose hacia el núcleo donde interactúa con la familia de factores de transcripción TGAs y funciona como un coactivador transcripcional de los genes que responden a SA (Tomado y modificado de Pieterse et al., 2012). B) Despues del aumento de los niveles de JA la proteína COI1 (CORONATIVE INSENSITIVE 1) interactúa con los represores JAZ para inducir la liberación de MYC2, el cual interactúa con el mediador transcripcional MED, induciendo la expresión de genes asociados con la señalización de la vía del JA, tales como, *PDF1.2* y *ORA59* (Tomada y modificada de Li et al., 2019). C) El aumento de los niveles de ET es percibida por el receptor ETR1 (ETHYLENE RESISTANT 1), la actividad quinasa de CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE) es inactivada y el CEND (C-terminal END de EIN2) (ETHYLENE INSENSITIVE 2) se desfosforila y se escinde. Posteriormente, el CEND se transloca al núcleo para atenuar la función de la ligasa E3 de EBF. La proteína EIN3 estabilizada activa entonces los factores de transcripción ERFs (ETHYLENE RESPONSE FACTOR) y se induce la activación de los factores de transcripción ERFs, son clave para la inducción de la vía de señalización del ET. (Tomada y modificada de Li et al., 2019). Created in <https://BioRender.com>.

En este trabajo, el estudio de la expresión de genes marcadores asociados a las vías de señalización hormonal (SA, JA/ET) durante la interacción *Arabidopsis-Botrytis* en líneas mutantes del transporte de poliaminas tuvo como finalidad esclarecer si existen alteraciones en la expresión de los marcadores debido a la disrupción del transporte de poliaminas, lo cual podría deberse a interconexiones

entre el metabolismo de poliaminas y las respuestas de defensa mediadas por las hormonas en cuestión.

2.5. Generalidades de las poliaminas.

Las poliaminas más importantes desde el punto de vista biológico son la Put, Spd y Spm (Blázquez et al., 2014), y se encuentran presentes en todos los seres vivos (Abdulhussein & Wallace, 2014). Inicialmente, las poliaminas se estudiaron por su capacidad de unirse con macromoléculas aniónicas y debido a esto se les consideraba únicamente como policationes con roles estructurales. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que funcionan como moléculas reguladoras de procesos celulares fundamentales (Igarashi & Kashiwagi, 2010; Tiburcio et al., 2014). Las poliaminas son aminas de bajo peso molecular con funciones esenciales y versátiles durante el ciclo de vida de los organismos, por ejemplo, participan en la proliferación celular, diferenciación y muerte celular programada (Kusano et al., 2007). Dentro de las principales poliaminas se encuentran la diamina Put, la triamina Spd, y la tetramina Spm (**Fig. 5**). La Spm y algunos compuestos catiónicos similares han sido estudiados debido a su participación en procesos tales como la organización de la cromatina, la traducción del mRNA y la biogénesis del ribosoma (Igarashi & Kashiwagi, 2000; Thomas & Thomas, 2001). A nivel fisiológico, las poliaminas pueden funcionar como reguladores de crecimiento en diversas etapas del desarrollo vegetal, tales como, embriogénesis, rizogénesis, senescencia, desarrollo y maduración del fruto (Jiménez-Bremont et al., 2014). La Put es la polamina más abundante encontrada en las plantas, y es utilizada como precursor para la biosíntesis de la triamina Spd y la tetramina Spm (**Fig. 5**) mediante la acción de aminopropil transferasas (Moallem et al., 2017). Además, funciona como precursor para la síntesis de alcaloides pirrolinídicos (Moallem et al., 2017). Se ha identificado también un isómero de la Spm conocida como tSpm, la cual es sintetizada por una aminopropil transferasa codificada por el gen *ACAULIS5* (*ACL5*) (Yoshimoto et al., 2012). Adicionalmente, se ha descrito un grupo de poliaminas conjugadas, unidas covalentemente a ácidos hidroxicinámicos (como los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico). Estas moléculas, se encuentran en la mayoría de las especies vegetales y desempeñan un papel crucial en los mecanismos de defensa

y desarrollo (Tiburcio et al., 2014).

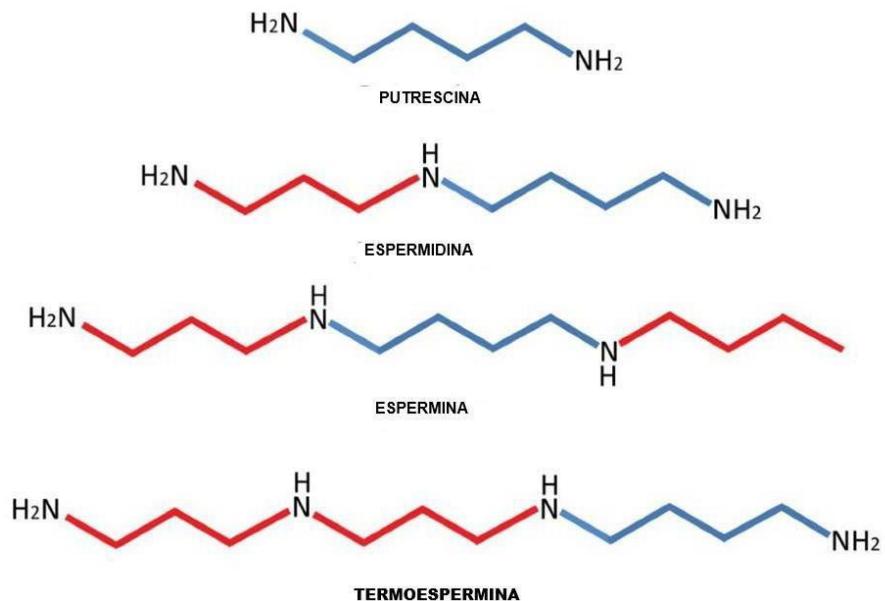


Figura 5. Estructura química de las poliaminas más abundantes en plantas. Put, Spd, Spm y tSpm. Los grupos aminopropilo (en rojo) se añaden al esqueleto lineal de cuatro carbonos de la Put (en azul) para producir Spd, Spm y tSpm. Imagen modificada de Bitrián et al., 2012.

2.6. Metabolismo de las poliaminas.

La síntesis de las poliaminas puede realizarse por diferentes vías (directa e indirecta) (Fig. 6). En la ruta de síntesis directa, la Put es obtenida mediante la descarboxilación de la ornitina, ruta que ocurre en la mayoría de las plantas excepto en *Arabidopsis* (debido a la ausencia del gen *ODC*), por acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) (Hanfrey et al., 2001). Por otro lado, la Put también puede ser sintetizada de forma indirecta, esta vía consiste en la descarboxilación de arginina a agmatina a través de la enzima arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19) (Fig. 6). En *A. thaliana* se han identificado dos genes parálogos que codifican para la enzima ADC, estos son *ADC1* y *ADC2*, los cuales probablemente se hayan generado durante la evolución como parte de un mecanismo compensatorio resultante de la ausencia del gen *ODC* (Hanfrey et al., 2001). Inicialmente, se produce la hidrólisis de agmatina a *N*-carbamoyl-putrescina

por la enzima agmatina iminohidrolasa (AIH, EC 3.5.3.12), después la *N*-carbamoil-putrescina es transformada a Put por la acción de la enzima *N*-carbamoil-putrescina amidohidrolasa (NCPAH, EC 3.5.1.53) (Bagni & Tassoni, 2001) (Fig. 6). Posteriormente, la Put es convertida en Spd, mediante la enzima espermidina sintasa (SPDS; EC 2.5.1.16) y sucesivamente, se produce la adición de otro grupo amino por la acción de la enzima espermina sintasa (SPMS; EC 2.5.1.22) o termoespermina sintasa (TSPMS; EC 2.5.1.79) para obtener Spm o tSpm (Fig. 6), respectivamente (Tiburcio et al., 2014).

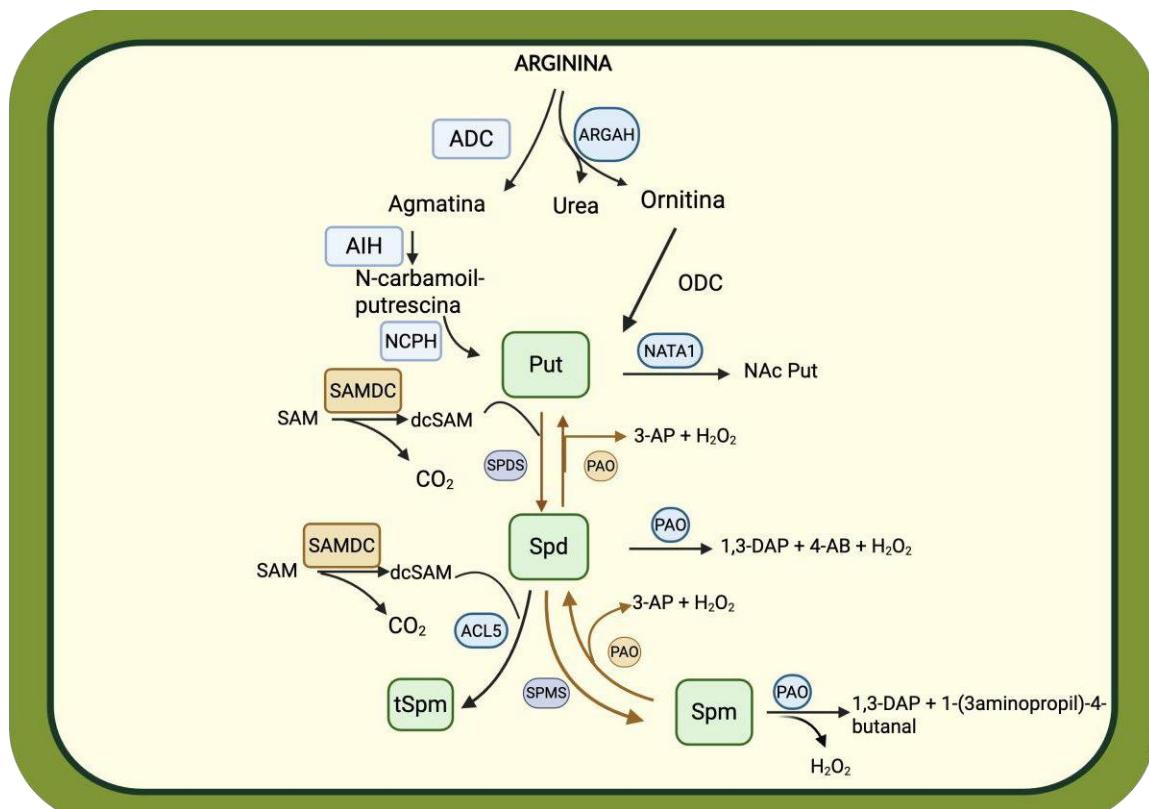


Figura 6. Ruta directa e indirecta de biosíntesis de poliaminas en plantas. La biosíntesis de poliaminas implica varios pasos para generar a las poliaminas principales: Put, Spd, Spm y tSpm. La Put es sintetizada de forma directa e indirecta. La vía indirecta consiste en la descarboxilación de arginina a agmatina a través de la enzima arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19), posteriormente la agmatina es hidrolizada por la enzima agmatina iminohidrolasa (AIH, EC 3.5.3.12), después la *N*-carbamoil-putrescina es transformada a Put por la acción de la enzima *N*-carbamoil-putrescina amidohidrolasa (NCPAH, EC 3.5.1.53). La biosíntesis de Spm y Spd es mediada por las enzimas espermina sintasa (SPMS) y espermidina sintasa (SPDS), respectivamente. El S-adenosil metionina (SAM) es descarboxilado por la acción de la enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC), liberando S-adenosil metionina descarboxilado (dcSAM), el cual sirve de

donador de grupos aminopropil para llevar a cabo estas reacciones. Posteriormente, la Spm y Spd pueden ser oxidadas por enzimas PAOs, mediante el catabolismo terminal y obtener 1,3-diaminopropano (1,3-DAP), 4-aminobutanal (4-AB) y H₂O₂. Además, las enzimas PAOs pueden presentar actividad de retroconversión de poliaminas para obtener Spd y Put, liberando 3-aminopropanal (3-AP) y H₂O₂ (Gonzalez et al., 2021). Created in <https://BioRender.com>.

2.7. Catabolismo de las poliaminas

El catabolismo de las poliaminas es mediado por las enzimas diamina oxidasa (DAO, E.C. 1.4.3.6) y poliamina oxidasa (PAO E.C. 1.4.3.3) (**Fig. 6**) (Moschou et al., 2012). Las DAOs son enzimas homodiméricas, cada subunidad consta de 70 a 90 kDa (Angelini et al., 2010) y se localizan mayormente en el citoplasma y en el peroxisoma (Takahashi et al., 2010). Las enzimas DAOs actúan principalmente sobre Put, cadaverina (Cad) y algunas monoaminas aromáticas y alifáticas, y son dependientes de cobre. Las DAOs actúan sobre los grupos amino primarios (Luna-Esquível et al., 2014), de forma que su acción libera H₂O₂, 4-aminobutanal (4-AB) y amoníaco (NH₃) (Moschou et al., 2012; Sequera-Mutiozabal et al., 2016).

Las enzimas PAOs generalmente catabolizan la oxidación de Spd, Spm y tSpm en sus grupos amino secundarios (**Fig. 6**) (Tavladoraki et al., 2012), y son dependientes de flavina (FAD) (Takahashi et al., 2010). Estas enzimas participan en dos tipos de catabolismo: están involucradas en el catabolismo terminal (**Fig. 6**), el cual consiste en la desaminación de Spm y Spd para obtener 1,3-diaminopropano (1,3-DAP), 4-aminobutanal (4-AB) y H₂O₂ (Moschou et al., 2012;) y también pueden realizar reacciones de retroconversión, oxidando Spm y Spd para obtener Spd y Put, respectivamente, y liberando H₂O₂ y 3-aminopropanal (3-AP) (Sequera-Mutiozabal et al., 2016). Las PAOs se han descrito como enzimas monoméricas con subunidades de 53-60 kDa (Tavladoraki et al., 2012). Diferentes estudios han reportado que las PAOs actúan y se localizan en diferentes compartimentos intracelulares. Así, las PAO2, PAO3 y PAO4, que comparten una similitud del 60-84 %, se ubican en el peroxisoma. Debido a esto, se ha atribuido que mayormente en *Arabidopsis* el catabolismo de las poliaminas es peroxisomal (Kamada-Nobusada et al., 2008; Moschou et al., 2008). En cambio, las enzimas PAO1 y PAO5 se encuentran en el citoplasma (Takahashi et al., 2010). Entre las PAOs, PAO2, PAO3 y PAO4 utilizan como sustrato tanto Spd como Spm, mientras que

PAO3 y PAO1 presentan mayor afinidad por Spm (Fincato et al., 2011). Por su parte, PAO5 presenta una mayor afinidad por la tSpm que por Spd o Spm (Takahashi et al., 2010). También se ha reportado que las enzimas PAO3 y PAO4 participan principalmente en la ruta de retroconversión de Spm a Spd (Moschou et al., 2008). PAO3 cataliza la oxidación de Spm a Spd y, finalmente, a Put (Kamada-Nobusada et al., 2008; Moschou et al., 2008). Takahashi et al. 2010 reportaron que PAO4 participa en la retroconversión de tSpm a Spd y finalmente hasta Put, lo que indica que, en forma similar a la Spm, la tSpm también puede ser retroconvertida. Adicionalmente, se reportó que la enzima PAO1 presenta afinidad por tSpm y NorEspermina (NorSpm) (Takahashi et al., 2010). Respecto al catabolismo terminal se ha reportado que las enzimas PAO catalizan la oxidación de la Spd, Spm y tSpm, produciendo diferentes aminoaldehídos, 4-AB y N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal, así como, H₂O₂ y 1,3-diamino propano (1,3-DAP) (**Fig. 6**) (Moschou et al., 2012; Wang et al., 2019). Generalmente, las enzimas PAOs que se localizan en el peroxisoma tienen actividad de catabolismo por retroconversión, mientras que las que se localizan en el citoplasma presentan actividad de catabolismo terminal (Moschou et al., 2008).

2.8. Clasificación de los transportadores de aminoácidos

Actualmente se han identificado al menos 5 familias diferentes de proteínas que transportan aminoácidos, con afinidades y selectividades distintas (Rentsch et al., 2007). Dentro de las cinco familias de proteínas transportadoras de aminoácidos se encuentran las siguientes:

- A) ATF (Amino acid Transporter Family, por sus siglas en inglés)
- B) APC (Amino acid-Polyamine-Choline, por sus siglas en inglés)
- C) MCF (Mitocondrial Carrier Family, por sus siglas en inglés)
- D) OEP16 (Plastid Outer Envelope Porin of 16kDa, por sus siglas en inglés)
- E) DASS (Divalent Anion: Na⁺ Symporter, por sus siglas en inglés)

En *A. thaliana* se han identificado diferentes transportadores de aminoácidos que pertenecen a la familia APC y, en general, estos transportadores presentan

actividad de simporte y antiporte (Rentsch et al., 2007). La actividad de simporte funciona como un transporte acoplado, donde la transferencia del soluto depende del co-transporte de otro soluto (**Fig. 7a**); en cambio, en la actividad de antiporte la transferencia de los solutos ocurre en sentido inverso (**Fig. 7b**) (Alberts et al., 2008).

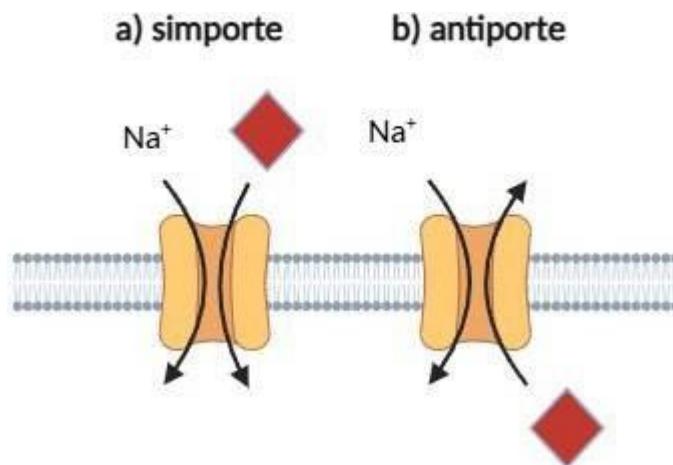


Figura 7. Mecanismo de transporte de diferentes tipos de proteínas acarreadoras. a) Actividad de simporte, b) actividad de antiporte. Created in <https://BioRender.com>.

2.9. Transporte de poliaminas

Al presente, se han identificado en mamíferos dos familias principales de proteínas integrales de membrana con función de transporte de diferentes moléculas como aminoácidos, azúcares y vitaminas, los cuales se clasifican como: "ATP-Binding Cassette" (ABC) y transportadores acarreadores de soluto (SLC) (Ahmed et al., 2014). Dentro de ellos se han descrito seis transportadores tipo SLC que pueden mediar el transporte de poliaminas en células humanas; estos transportadores son SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC47A1, SLC7A1, SLC3A2, SLC12A8A, y SLC22A16 (Ahmed et al., 2014). Asimismo, se han caracterizado algunos transportadores de poliaminas en bacterias y levaduras (Kashiwagi y Igarashi, 2011). Sin embargo, se tiene poca información acerca del transporte de poliaminas en plantas. En *Arabidopsis* se ha identificado una familia de transportadores denominada tipo-LAT, la cual, según un análisis filogenético, comparte una alta similitud con las subunidades de la cadena ligera del sistema de

transporte de aminoácidos tipo-LAT en humanos (Rentsch et al., 2007).

Los primeros estudios sobre el transporte de poliaminas en plantas se realizaron en protoplastos de zanahoria, observándose una absorción eficiente de Spd y Put y sugiriéndose la existencia de un mecanismo de tipo antiporte, el cual facilita el importe de las poliaminas (Pistocchi et al., 1988). Otro estudio realizado en protoplastos de zanahoria indicó que la adición de Ca^{2+} incrementa la rapidez de la absorción de Put y Spd (Pistocchi et al., 1990). Por otro lado, se describió que los transportadores de poliaminas están presentes en el sistema vascular de la planta y pueden transportar poliaminas a través del xilema y del floema (Pistocchi et al., 1990). El primer transportador caracterizado fue encontrado en plantas de arroz (*OsPUT1*) y forma parte de la subfamilia de transportadores L-tipo (LAT). Este transportador presenta mayor afinidad por el importe de Spd que por Put (Mulangi et al., 2012), y se localiza en la mayoría de los tejidos y órganos vegetales, excepto en semillas y raíces (Mulangi et al., 2012). A nivel subcelular, en plantas se ha reportado la presencia de poliaminas en el núcleo, vacuolas, mitocondrias, cloroplastos y membranas celulares (Fujita & Shinozaki, 2015). Mas allá de la contribución de los procesos de síntesis y catabolismo a la presencia de poliaminas en distintas localizaciones subcelulares, estas moléculas pueden ser translocadas entre diferentes compartimentos celulares mediante la acción de transportadores específicos (Wuddineh et al., 2018). Su entrada a la célula o a los compartimentos está regulada por un gradiente eléctrico transmembranal, y la absorción y transporte juegan un papel clave en la homeostasis del contenido de poliaminas en la célula vegetal (Fujita & Shinozaki, 2015).

En *A. thaliana* se han identificado cinco transportadores de poliaminas (los cuales pertenecen a la subfamilia tipo LAT) y se han clasificado como LAT1-5 o PUT1-5 ("Polyamine Uptake Transporter" por sus siglas en inglés) (Wipf et al., 2002). La subfamilia de transportadores de aminoácidos L-tipo (LAT) pertenece a la familia de transportadores APC (Aminoacid-Polyamine-Choline) (Rentsch et al., 2007). Generalmente, se ha descrito que la subfamilia de transportadores LAT posee 12 dominios transmembranales, así como una región amino y carboxilo terminal orientada hacia el citoplasma y tienen capacidad para transportar

poliaminas (Rentsch et al., 2007). Diferentes estudios han señalado que estos se localizan en distintos compartimentos celulares (Fig. 8); por ejemplo, PUT3 se localiza mayormente en la membrana plasmática (Shen et al., 2016) y en el cloroplasto (Ahmed et al., 2017) (Fig. 8), y es responsable del influjo de poliaminas hacia el interior de la célula (Shen et al., 2016). PUT5 se localiza en el retículo endoplásmico (Wuddineh et al., 2018) y PUT4 en la membrana plasmática (Méndez-Iberri et al., 2017; Tesis de Licenciatura) (Fig. 8). Los transportadores PUT2 y PUT1 se ubican principalmente en el aparato de Golgi y retículo endoplásmico; respectivamente, y comparten alrededor de 68-76 % de similitud (Miller-Fleming et al., 2015) (Fig. 8) mientras que PUT5 y PUT4 comparten un porcentaje de similitud de alrededor de 40-50 % (Martinis et al., 2016).

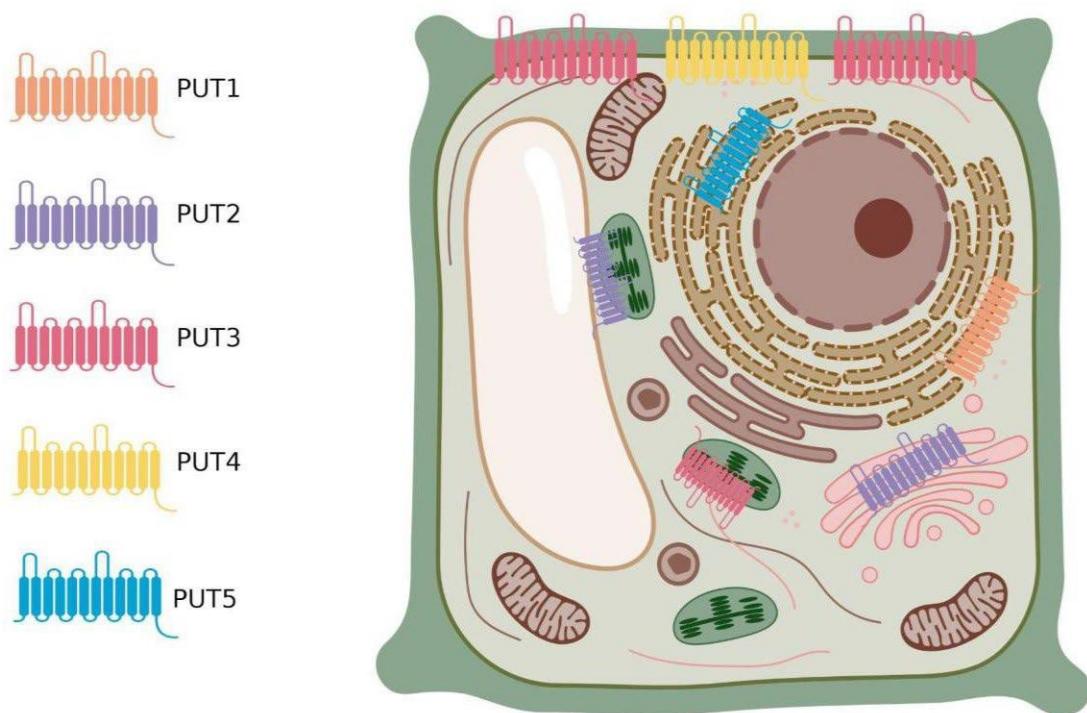


Figura 8. Representación gráfica de la localización intracelular de los transportadores PUT en *Arabidopsis thaliana*. PUT1 y PUT5 (Wuddineh et al., 2018) se localizan en el retículo endoplásmico, PUT2 (Miller-Fleming et al., 2015) en el aparato de Golgi y en el cloroplasto, PUT3 en la membrana plasmática y el cloroplasto (Shen et al., 2016; Ahmed et al., 2017) y PUT4 en la membrana plasmática (Méndez-Iberri et al., 2017; Tesis de Licenciatura). Created in <https://BioRender.com>.

Inicialmente, el transportador de poliaminas PUT3/RMV1 (*RESISTANT TO*

METHYL VIOLOGEN1, “por sus siglas en inglés”) fue identificado como un transportador de la familia de transportadores de aminoácidos tipo L (LAT). PUT3/RMV1 mostró capacidad para importar poliaminas y paraquat (PQ) (Fujita et al., 2012). Adicionalmente, se observó que la línea mutante *rmv1* de *A. thaliana* fue altamente resistente al PQ debido a la reducción de la actividad de transporte de este herbicida (Fujita et al., 2012). Martinis et al. (2016), reportaron que el transportador PUT3/RMV1 participaba en el transporte a larga distancia de poliaminas y vitamina B1 a través del floema, desde hojas hasta raíces. Para analizar la expresión tejido-específica del transportador PUT3 se generó una línea reportera *pPUT3:GUS*, los análisis mostraron mayor expresión del gen *PUT3* en el floema, así como, en la roseta y en el ápice radicular (Martinis et al., 2016).

Se ha demostrado que la activación de estos transportadores es mediada por diferentes eventos de fosforilación e interacciones proteína-proteína en respuesta a condiciones de estrés (Chai et al., 2020). Se realizó un estudio en células de levaduras y se observó que la fosforilación de PUT3 realizada por la proteína cinasa SOS2 puede activar la función de transporte de PUT3. Asimismo, las proteínas SOS1 y SOS2 pueden formar un complejo y regular la actividad del transportador PUT3 (Chai et al., 2020). En este sentido, la sobreexpresión del gen *PUT3* (*PUT3OE*) generó hipersensibilidad a la adición de poliaminas y PQ; sin embargo, la hipersensibilidad de *PUT3OE* fue inhibida por la mutación de *sos1* y *sos2* (Chai et al., 2020).

Adicionalmente, se reportó que el estrés por calor induce la expresión del gen *LHR1/PUT3* (*LOWER EXPRESSION OF HEAT RESPONSIVE GENE*) en *Arabidopsis* (Shen et al., 2016). A través de un estudio dirigido por mapeo genético se identificó que el gen *LHR1* codifica el transportador PUT3, el cual se localiza principalmente en la membrana plasmática (Shen et al., 2016). Actualmente hay evidencia de la participación del transportador *LHR1/PUT3* en el mantenimiento de la estabilidad de los mRNAs en respuesta al estrés por calor y también se ha descrito que tiene capacidad para importar Spd (Shen et al., 2016). Adicionalmente, se estudió el índice de absorción de Spd en plantas mutantes *lhr1* y el ecotipo silvestre WT y se observó un rendimiento menor de absorción de Spd en plantas mutantes *lhr1* en comparación con la WT (Shen et al., 2016).

Además, se ha descrito la participación del transportador de aminoácidos tipo-L de *Arabidopsis* LAT5/PUT5 en etapas de desarrollo de la planta tales como la floración y la senescencia. Adicionalmente, se estudió la especificidad de tejido de la expresión del gen *LAT5/PUT5* y su rol en la mediación del transporte de aminoácidos (Begam et al., 2020). Interesantemente, se comprobó la presencia de actividad GUS en el floema, cuando el gen reportero que codifica esa enzima fue fusionado al promotor de *LAT5/PUT5*. Además, se detectó la actividad del producto del gen reportero en raíces principales y laterales en plantas maduras, así como en las raíces y el ápice de plántulas (Begam et al., 2020).

Evidencia reciente, vincula al transporte de poliaminas con la respuesta de defensa de la planta, en un estudio realizado en plantas de *A. thaliana* infectadas con *Pst* DC3000 se reportó que el transportador PUT2 contribuye al transporte de Put hacia tejidos distales durante la SAR, participa en la modulación de EROs, SA y algunos compuestos fenólicos (Flores-Hernández et al., 2025).

Aunque en nuestro estudio no se abordó el transporte de aminoácidos mediado por los transportadores PUT/LAT, hay algunos reportes que vinculan al transportador LAT5/PUT5 con la captación de aminoácidos, en este sentido se reportó que la línea mutante *lat-5* resultó hipersensible a la adición de leucina 1 mM, generando una disminución del crecimiento del 62 % comparada con la WT, lo cual, fue asociado principalmente con la disrupción de la distribución adecuada de leucina en la planta (Begam et al., 2020).

2.10. Importancia del metabolismo de poliaminas frente al ataque de patógenos

Diversos trabajos han mostrado que la biosíntesis de poliaminas se incrementa en respuesta al ataque de patógenos (Pal & Janda, 2017). Así, un estudio realizado en plantas de *N. tabacum* infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV) reportó un aumento de las actividades enzimáticas ODC y ADC (Torrigiani et al., 1997). Se estudió el efecto de la adición de difluorometilornitina (un inhibidor de la enzima ODC) en plantas de tomate y se observó una disminución de la podredumbre gris causada por *B. cinerea*. Por consiguiente, se concluyó que el mecanismo de control de la enfermedad causada por el hongo está asociado con

la inhibición de la biosíntesis de poliaminas (Elad, 1991). Por otra parte, se analizó la respuesta de líneas mutantes del gen *ADC* a la infección por *B. cinerea*, verificándose que las mismas fueron más susceptibles al ataque por el patógeno, desarrollando una lesión de mayor tamaño y mostrando mayor incidencia de la enfermedad que en el ecotipo silvestre. Sin embargo, después de realizar un pre-tratamiento con Put se observó el restablecimiento del fenotipo, resultando similar al del ecotipo silvestre (Chávez Martínez et al., 2018).

La acumulación de poliaminas puede generar mayor resistencia de las plantas contra los patógenos (Gonzalez et al., 2021; Walters, 2003). El aumento de la concentración de poliaminas se presenta como respuesta al estrés biótico, produciéndose cambios en su nivel y localización (Walters, 2003). En un estudio realizado en plantas de maíz infectadas con el patógeno *Ustilago maydis* se detectó un incremento en el contenido de Put libre y conjugada (Rodríguez-Kessler et al., 2008). Por otra parte, se estudiaron dos variedades de plantas de *Vitis vinifera*, una resistente y otra sensible a la sequía (Hatmi et al., 2015). La planta resistente a la sequía mostró un mayor contenido de poliaminas libres, así como algunos aminoácidos, tales como arginina, glutamato y prolina (Hatmi et al., 2015). También se observó una regulación positiva de genes asociados con la biosíntesis y catabolismo de poliaminas, tales como, *ADC*, *CuAO* y *PAO* (Hatmi et al., 2015). Además, se observó que la planta tolerante a la sequía se volvió más resistente al ataque del patógeno *B. cinerea* (Hatmi et al., 2015).

También se ha reportado que plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan un gen de Spd sintasa (35S::*SpdSyn*) presentaron un aumento de susceptibilidad a *B. cinerea* (Nambeesan et al., 2012). Dado que las poliaminas y el Et derivan de un mismo precursor (S-adenosilmetionina) (Martin-Tanguy, 1997; Bouchereau et al., 1999; Flur and Matthoo, 1996) y que las plantas transgénicas antes mencionadas acumularon altos niveles de Spd, se concluyó que el incremento de la susceptibilidad a *B. cinerea* mostrado por estas líneas sobreexpresoras podría relacionarse en parte con la inhibición de la síntesis de Et (Nambeesan et al., 2012). Interesantemente, el fenotipo de susceptibilidad fue restablecido después de realizar un pre-tratamiento con precursores del Et (Nambeesan et al., 2012). Otro estudio indicó que el tratamiento con Spm y Spd

(100 y 500 μ M) incrementó la resistencia frente a *B. cinerea* (van Rensburg & Van den Ende, 2021). El aumento en la concentración de estas poliaminas en la planta promovió la actividad de enzimas antioxidantes, tales como, catalasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa, generando una reducción del contenido de H_2O_2 (van Rensburg & Van den Ende, 2021).

Sobre la base de los antecedentes mencionados, queda claro que es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos específicos de regulación del transporte de poliaminas durante los eventos de estrés biótico en plantas.

3. JUSTIFICACIÓN

A lo largo de la historia, las plantas han sido afectadas por diversas enfermedades, lo que ha provocado una pérdida dramática de cultivos, así como pérdidas económicas devastadoras (FAO, 2024). *B. cinerea* es un patógeno necrotrófico que causa enfermedades en más de 1000 especies de plantas (Veloso & van Kan, 2018), el cual induce la respuesta hipersensible, desencadenando la acumulación de EROs y la muerte celular (Rossi et al., 2017). El reconocimiento del patógeno por receptores específicos activa la respuesta de defensa vegetal, que implica un aumento en la expresión de genes y la síntesis de metabolitos de defensa, así como la síntesis de hormonas vegetales, tales como, SA, JA y ET. Dentro de los metabolitos se encuentran las poliaminas, las cuales se definen como compuestos poliacídicos de bajo peso molecular (Kusano et al., 2007). Por su naturaleza, las PAs pueden unirse a macromoléculas como el DNA y regular su expresión (Blázquez, 2024). El rol de las poliaminas en la defensa contra patógenos se ha estudiado en diferentes modelos de interacción planta-microorganismo y se ha descrito que el catabolismo de las poliaminas está interconectado con la síntesis de moléculas de señalización como el H₂O₂, el cual, participa en la regulación de la muerte celular y el fortalecimiento de la pared celular (Moschou et al., 2012). Aunque el estudio del impacto de las poliaminas ha avanzado, aún no se conocen en detalle todas las facetas de su mecanismo de acción. Poco se conoce sobre la dinámica de su transporte en células vegetales y los actores moleculares implicados. A la fecha, se han identificado cinco transportadores con funciones de importe de poliaminas en *Arabidopsis thaliana*, conocidos como “*Polyamine Uptake Transporter*” (PUT1-5) (Wipf et al., 2002). De estos, PUT3 es el mejor caracterizado, y participa en la regulación del crecimiento de la raíz, la floración y la respuesta al estrés salino (Chai et al., 2020). Sin embargo, la función de otros miembros de la familia PUT aún es desconocida (Wuddineh et al., 2018). Dada la importancia de las poliaminas en la respuesta de defensa y los antecedentes específicos que muestran que la suplementación con poliaminas imprime resistencia contra *B. cinerea*, en este trabajo se planteó evaluar la contribución del transporte de poliaminas a la defensa vegetal, empleando el patosistema *Arabidopsis-Botrytis* como modelo de estudio.

4. HIPÓTESIS

El transporte de poliaminas, mediado por miembros de la familia PUT, contribuye a la defensa vegetal en la interacción *Arabidopsis-Botrytis*.

5. OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar funcionalmente la familia de transportadores de poliaminas PUT en la interacción *Arabidopsis-Botrytis*.

ESPECÍFICOS

- 1.- Analizar la expresión de los genes *PUT* en hojas de plantas de *A. thaliana* inoculadas con *B. cinerea* para determinar si son regulados durante la respuesta de defensa de la planta.
- 2.- Determinar el fenotipo de resistencia/susceptibilidad de líneas mutantes y de sobreexpresión de los genes *PUT* de *A. thaliana* en interacción con *B. cinerea*, para conocer si el transporte de poliaminas desempeña un papel en la respuesta de defensa de la planta.
- 3.- Realizar ensayos de suplementación de poliaminas en plantas WT y mutantes *put* para determinar si la suplementación de poliaminas influye en la resistencia de plantas WT y mutantes *put* contra la infección por *B. cinerea*.
- 3.- Analizar los niveles de poliaminas en plantas WT y las líneas mutantes *put* en interacción con *B. cinerea* para establecer si existe una alteración en la homeostasis de poliaminas.
- 4.- Medir la actividad de enzimas antioxidantes y los niveles de EROs en plantas WT y las líneas mutantes de los genes *PUT* de *Arabidopsis* en interacción con *B. cinerea* para determinar si las líneas mutantes presentan cambios en el estatus redox.
- 5.- Evaluar la expresión de genes marcadores de la vía del ácido salicílico, metil jasmonato y etileno en las líneas mutantes de los genes *PUT* de *Arabidopsis* en interacción con *B. cinerea* para elucidar si existen alteraciones en la expresión de los marcadores debido a la disrupción del transporte de poliaminas

6. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

6.1.1 Plantas

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* del ecotipo silvestre (WT) y líneas insercionales de T-DNA para los genes *PUT*: *put1-1* (GABI_890C10), *put2-1* (SALK_119707C), *put3-1* (SALK_206472C), *put4-1* (SAIL_1275_C06), y *put5-1* (SALK_007135), las cuales fueron obtenidas del Instituto de Análisis Genómicos “SALK” (www.signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress). La línea doble mutante *put2-1 put5-1* se obtuvo por cruzas genéticas tradicionales, y las líneas homocigotas fueron identificadas por PCR empleando oligonucleótidos específicos (**Tabla suplementaria 1**). Además, la ausencia de la expresión de los genes *PUT2* y *PUT5* en la línea doble mutante *put2-1 put5-1* se confirmó mediante qPCR (**Fig. suplementaria 1**).

6.1.2. Generación de las líneas 35S::*PUT2* y *pPUT2::GUS*

Las secuencias del marco de lectura abierto (1485 pb) y de la región promotora (1821 pb) del gen *PUT2* fueron amplificadas por PCR y clonadas en el vector de entrada *pENTER-D-TOPO* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para obtener la línea de sobreexpresión 35S::*PUT2*, el vector de entrada *pENTER-PUT2* se recombinó con en el vector destino *pEarley103* (Earley et al., 2006) utilizando el mix enzimático LR clonase (Invitrogen). Por otro lado, para obtener la línea reportera del promotor del gen *PUT2* (*pPUT2::GUS*) se realizó la recombinación del vector de entrada *pENTER-pPUT2* al vector destino *pKGWFS7* (Karimi et al., 2002), utilizando el mix para clonación Gateway LR.

Ambos vectores *pEarley-35S::PUT2* *pKGWFS7-pPUT2::GUS* fueron transformados en la cepa *Rhizobium radiobacter* GV3101 (anteriormente conocida como *Agrobacterium tumefaciens*) mediante choque térmico y posteriormente introducidos en *A. thaliana* mediante la técnica de floral dip. Para el ensayo de floral dip se utilizaron botones florales inmaduros. Se eligieron plantas con botones florales sin abrir y solo unas pocas flores abiertas o fertilizadas. Posteriormente, los

botones florales inmaduros se sumergieron en la solución bacteriana que contiene sacarosa como estimulante de *R. radiobacter* y Silwett L77 como tensoactivo para favorecer la entrada de las bacterias a las células vegetales. La solución se colocó en un vaso de precipitado grande y las inflorescencias se sumergieron suavemente en el líquido durante 1 o 2 s. Posteriormente, las plantas se cubrieron con una película de plástico para mantener la humedad y se colocaron en la oscuridad durante 24 h. Enseguida, se colocaron en una cámara de crecimiento en condiciones controladas. Posteriormente, se obtuvieron semillas, que fueron sembradas y seleccionadas en medio MS con glufosinato de amonio (BASTA®) a 10 mg/mL. Se extrajo DNA de las plantas resistentes a BASTA y se confirmó la presencia del casete de sobreexpresión mediante PCR. Se obtuvieron plantas de la generación T1, T2 y T3; se seleccionaron únicamente las líneas generadas que mantenían la segregación mendeliana. Se eligieron tres líneas sobreexpresoras independientes para los análisis posteriores: 35S::*PUT2*-2, -18, y -27. La línea reportera *pPUT2::GUS* fue generada previamente (Méndez-Iberri et al., 2017; Tesis de Licenciatura). Se seleccionaron cuatro líneas reporteras del promotor (*pPUT2::GUS*) que exhibieron patrones de expresión similares, de las cuales se eligió la *pPUT2::GUS*-2 para los análisis histoquímicos posteriores (Jefferson et al., 1987).

6.1.3 Cepa fúngica

Se utilizó la cepa de *B. cinerea* B05.10 obtenida del Instituto Tecnológico de Chascomús, Buenos Aires, Argentina. La cepa fue sembrada en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA) a una temperatura de 22 °C por dos semanas. Después de este tiempo se colectaron las esporas de las placas y se pasaron a tubos falcon con una solución de Tween 20 al 0,02 % (v/v). Posteriormente, la solución fue filtrada y centrifugada a 2,500 g por 15 min, se realizó un lavado con agua destilada y se suspendió en caldo papa dextrosa (PDB) suplementado con sacarosa 10 mM y fosfato de potasio 10 mM. De la solución resultante se tomó una alícuota y se hizo una dilución 1:10 para realizar el conteo de esporas. Finalmente, se realizó la dilución dependiendo de la concentración requerida para cada ensayo de acuerdo con protocolos ya estandarizados (Govrin & Levine, 2002). Para los ensayos en

hoja cortada en placa se utilizó una concentración de 1×10^5 esporas mL⁻¹, mientras que para los ensayos de planta en maceta se utilizó una concentración de 5×10^5 esporas mL⁻¹. Las esporas se incubaron por 3 h a temperatura ambiente previo a la inoculación de la planta.

6.2 Condiciones de crecimiento de la planta e inoculación fúngica

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con etanol al 96 % y después con hipoclorito de sodio al 30 % (se dejó en agitación por 8 min) y posteriormente se lavaron con agua destilada (6 veces). Enseguida, las semillas fueron estratificadas en la oscuridad (3 días a 4° C). Las semillas fueron sembradas en macetas o placas Petri. Para maceta se utilizó un sustrato comercial compuesto por vermiculita:perlita:tierra (en una proporción 3:1:1, respectivamente) y para las placas de Petri se utilizó medio MS sólido 0,5x con sacarosa (1,5 % p/v), suplementado con MES (0,05 %). Se ajustó el pH a 5,7. Las plantas que fueron sembradas en maceta se mantuvieron en cámaras de crecimiento por 4 semanas bajo condiciones controladas de fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a una temperatura de 22 ± 2 °C.

Para los ensayos de inoculación con *B. cinerea*, se utilizaron plantas de treinta días de edad. El ensayo de medición del tamaño de lesión consistió en seleccionar y cortar hojas de las plantas y transferirlas a placas de agar:agua (0,8 % p/v). Posteriormente, se inocularon con una gota de suspensión de *B. cinerea* que contenía 1×10^5 esporas mL⁻¹. La gota de la suspensión fúngica (5 µL) se colocó al lado izquierdo o derecho de la nervadura central (Govrin & Levine, 2002). Finalmente, las placas fueron transferidas a cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Se tomaron fotografías con una cámara de teléfono a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inoculación. El tamaño de la lesión se determinó con el software *Image-Pro Plus* (v 4.5) expresando el área de la lesión en mm².

En otro experimento diferente se inocularon tres hojas por planta con una

gota de 5 μ L de suspensión fúngica de *B. cinerea* bajo una concentración 5×10^5 esporas/mL. Como controles se utilizaron hojas inoculadas con 5 μ L de solución mock (medio PDB con sacarosa y fosfato de potasio). Después de inocular con el patógeno se colectó el material vegetal cada 24 h hasta completar 72 h post-inoculación, durante este tiempo, las plantas inoculadas se mantuvieron en cámaras de crecimiento a una temperatura de 22 ± 2 °C bajo ciclos de luz/oscuridad (16/8 h). Estas muestras se procesaron para el análisis de expresión génica, la actividad enzimática (actividad catalasa, poliamina oxidasa, ascorbato peroxidasa), la estimación del contenido de ROS y poliaminas, así como la detección histoquímica de peróxido de hidrógeno, superóxido y determinación de muerte celular.

6.3 Ensayo de suplementación con poliaminas

Se seleccionaron y cortaron hojas de plantas de treinta días de edad y se transfirieron a placas de agar:agua (0,8 % p/v) suplementadas con 50 o 200 μ M de poliaminas (Put, Spd y Spm) y en seguida fueron inoculadas con una gota de 5 μ L de suspensión fúngica de *B. cinerea* que contenía 1×10^{-5} esporas mL $^{-1}$. Las hojas control se inocularon con 5 μ L de solución mock (medio PDB). Las hojas inoculadas se colocaron en cámaras de crecimiento a 22 °C con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h. Estas muestras se utilizaron para registrar el tamaño de las lesiones y cuantificar los niveles de algunas poliaminas, tales como, Put, Spd y Spm.

Adicionalmente, se determinaron los niveles de poliaminas en plántulas de 15 días de edad, para lo cual se suplementan placas con medio MS con diferentes poliaminas Spd y Spm y transcurrido este tiempo se colectó el material vegetal (20 mg) y se determinó el contenido de poliaminas según el protocolo de Marcé et al., (1995).

6.3. Extracción de ácidos nucleicos

6.3.1- Aislamiento de DNA

El DNA fue extraído de plantas de 30 días de edad utilizando el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Wagner et al., 1987). El tejido vegetal fue

congelado y homogeneizado en nitrógeno líquido. Se añadieron 300 μ L de CTAB, se mezcló e incubó por 45 min a 65 °C. Después se agregaron 300 μ L de cloroformo, se centrifugó a 12,000 g por 5 min, se añadieron 300 μ L de isopropanol y 30 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y se dejó reposar durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 g por 5 min para obtener el pellet con el DNA precipitado, y se decantó el sobrenadante. Finalmente, el pellet con el DNA fue lavado con 500 μ L de etanol al 70 % y se centrifugó a 12,000 g por 3 min. El DNA fue resuspendido en H₂O destilada y se almacenó a 4 °C. El DNA fue empleado para la tipificación de las líneas insercionales de T-DNA, siguiendo protocolos estándares.

6.3.2- Aislamiento de RNA

Se colectó material vegetal de plantas de 30 días de edad inoculadas y plantas control y fue macerado en nitrógeno líquido con pistilo. Para la extracción de RNA, el tejido vegetal se homogeneizó con 500 μ L del reactivo TRI Reagent (Sigma-Aldrich), se mezcló en el vortex por 30 seg y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 100 μ L de cloroformo y se mezclaron con ayuda del vortex, en seguida se incubó 7 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C, se obtuvo el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de isopropanol frío. Posteriormente, se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo por 10 min, luego de lo cual se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue descartado y se obtuvo el RNA precipitado en forma de gel. La pastilla fue lavada con 1 mL de etanol frío al 75 % y centrifugada a 7,500 g por 5 min a 4 °C, finalmente se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla y el RNA total se suspendió en 30 μ L de agua destilada estéril tratado con DEPC (0,01 %) y se almacenó a -80 °C. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis para verificar la integridad del RNA. Se colocaron 2 μ L de RNA total y 6 μ L de buffer formamida al 50 % y se calentó a 95 °C por 5 min para su desnaturalización. El RNA fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,2 % a 70 mV por 30 min; la integridad del RNA se visualizó en un fotodocumentador.

6.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA) y análisis de la expresión génica

Se determinó la concentración del RNA ("Ribonucleic acid" por sus siglas en inglés) utilizando un Nanodrop. Se ajustó la concentración a 1 μ g/ μ L. Por consiguiente, se realizó un tratamiento empleando el kit TURBO DNA-freeTM. Para cada muestra se utilizaron 2,2 μ L de 10X TURBO DNaseTM - Buffer, RNA (μ g/ μ L), 1 μ L TURBO DNase y nuclease-free water (incluida en el kit) hasta alcanzar un volumen total de 22 μ L, con el objetivo de eliminar el DNA ("Deoxyribonucleic acid" por sus siglas en inglés) presente en la muestra. Después, las muestras fueron colocadas a 37 °C por 40 min. Se agregaron 2 μ L de "DNase inactivation reagent" para detener la reacción y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10, 000 g durante 90 s, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo de PCR nuevo y estéril para finalmente almacenarlo a -80 °C.

La síntesis DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando el kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Para lo cual, se colocaron 10 μ L de RNA (1 μ g RNA total tratado con DNase), 1 μ L de Oligo dT (stock 50 μ g) y 1 μ L de H₂O₂ DEPC (0,1 %), para obtener un volumen total de 12 μ L. Se incubó a 65 °C por 5 min y se pasó a hielo. Luego se agregaron 4 μ L de 5X reaction Buffer for DNA, 2 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de Ribolock y 1 μ L de la enzima RevertAid para obtener un volumen final de 20 μ 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 el análisis de expresión génica por qPCR.

Los niveles de expresión génica fueron cuantificados por qPCR usando el Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific). Los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la **tabla suplementaria 1**. A continuación se describen las condiciones de reacción de la qPCR: 30 s a 95 °C (desnaturalización inicial), 40 ciclos de PCR de 10 seg a 95 °C (desnaturalización) y 30 seg a 60 °C (hibridación/extensión). Las curvas de fusión comenzaron a 65 °C y la temperatura se incrementó gradualmente cada 0,5 °C hasta alcanzar los 95 °C. El grado de cambio en la expresión génica relativa se determinó mediante el método

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El gen de referencia fue *EF1α* de *Arabidopsis*.

6.5. Determinación de los niveles de poliaminas libres

El contenido de poliaminas libres (Put, Spd y Spm) fue determinado de acuerdo con la metodología reportada por Marcé et al. (1995) con algunas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo utilizando 200 mg de material vegetal aplicando un pre-tratamiento a la muestra, para lo cual se agregaron 0,6 mL de ácido perclórico al 5 % (v/v) y se dejó durante 18 h a 4°C. Posteriormente el material fue centrifugado y se obtuvo el sobrenadante. Para la reacción de derivatización se mezclaron 60 μ L del extracto con 60 μ L de carbonato de sodio saturado (Na_2CO_3), 75 μ L de cloruro de dansilo (10 mg mL⁻¹ acetona), y 6 μ L de 1,7-diaminoheptano (HTD; 100 μ M) como estandar interno. Se utilizó un volumen final de reacción de 200 μ L. La mezcla de reacción fue incubada durante toda la noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción fue detenida adicionando 25 μ L de prolina (100 mg mL⁻¹) y las poliaminas dansiladas fueron extraídas con 200 μ L de tolueno. La fase orgánica se evaporó al vacío y las poliaminas dansiladas se disolvieron en 40 μ L de acetonitrilo. La detección del contenido de poliaminas se realizó mediante HPLC de fase inversa utilizando un sistema Waters (bomba HPLC binaria Waters 1525 y detector de fluorescencia Multi λ Waters 2475) y una columna Phenomenex C18 [Phenomenex 00G-4252-E0, Luna 5 μ m C18(2) 100 Å, columna LC 250 x 4,6 mm]. Para el análisis se inyectaron en el equipo muestras de 10 μ L de las poliaminas dansiladas. Se utilizaron las condiciones de corrida descritas por Marce et al., 1995.

6.5. Actividad poliamina oxidasa

El primer paso fue la extracción de proteínas del tejido vegetal, para lo cual el tejido fue macerado con un pistilo en nitrógeno líquido y se añadió un buffer de extracción que contenía buffer de fosfatos 200 mM (pH 7,0) suplementado con el inhibidor de proteasas PMSF (100 mM). Cada muestra fue homogenizada en 800 μ L del buffer de extracción e incubada en hielo durante 7 min. Posteriormente, se centrifugó a 5, 000 g durante 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El

contenido de proteína total fue cuantificado por el método de Bradford a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

La actividad PAO se determinó espectrofotométricamente por la formación de un aducto rosado ($\epsilon_{515} = 2.6 \times 104 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), según la metodología reportada por Jasso Robles et al. (2016). La mezcla de reacción contenía 50 μL de buffer de fosfato de potasio 200 mM (pH 7,0), 1 μL de peroxidasa (HRP) (0.06 mg/mL) (250 U/mg), 1 μL 4-aminoantipirina (100 μM), 1 μL ácido-3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico (1 mM) y 45 μL de extracto de proteína y se utilizó como sustrato Spm o Spd 2 mM, añadiendo 2 μL de cada poliamina. La reacción se llevó a cabo a 30 °C en un volumen final de 0.1 mL. La actividad PAO se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 515 nm. La actividad PAO fue expresada como nKat/mg proteína.

6.6. Determinación de los niveles de H_2O_2

El contenido de H_2O_2 fue determinado a partir de muestras de 50 mg de tejido vegetal. Las muestras fueron homogeneizadas en baño de hielo con 0.5 mL de ácido tricloroacético al 0.1% (p/v) y, posteriormente, centrifugadas a 12,000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la cuantificación. La mezcla de reacción consistió en 0.5 mL de buffer fosfato de potasio 10 mM (pH 7.0), 1 mL de yoduro de potasio (KI) 1 M y 0.5 mL del extracto vegetal. Tras una incubación de 2 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia del yodo liberado a 390 nm en un espectrofotómetro. El contenido de H_2O_2 fue estimado utilizando una curva de calibración de H_2O_2 . Los resultados fueron expresados como μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de peso fresco (Hassan & Mohamed, 2019).

6.7. Actividad catalasa

La actividad catalasa fue determinada de acuerdo con la metodología reportada por Sahebani y Hadavi (2009) con algunas modificaciones. Se midió la tasa de descomposición de H_2O_2 a una absorbancia de 240 nm. La mezcla de

reacción (500 μ L) contenía 50 μ L de extracto proteico, buffer de fosfatos 10 mM (pH 7,0) y H_2O_2 al 3 % (v/v). El decrecimiento de los niveles de H_2O_2 se confirmó monitoreando la caída de la densidad óptica (λ_{max}) a una longitud de onda de 240 nm. La actividad catalasa se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar 43,6 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para H_2O_2 . Una unidad de catalasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar de 1 μmol de H_2O_2 por minuto por mg de proteína (Sahebani & Hadavi, 2009).

6.8. Actividad Ascorbato peroxidasa

La actividad ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) fue determinada de acuerdo con el protocolo de Zavaleta-Mancera et al. (2007) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 mL, 0,95 mL de buffer de fosfato de potasio (pH 7,0) (10 mM) con ácido ascórbico 0,5 mM, 30 μ L de extracto de proteína y 20 μ L de H_2O_2 al 3 % (v/v) (Zavaleta-Mancera et al., 2007).

6.9. Análisis histoquímico

Se realizaron diferentes pruebas histoquímicas, para la detección de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$, muerte celular y actividad de GUS. Todos los ensayos se realizaron en plantas de 30 días de edad. A continuación, se describe el procedimiento para realizar cada técnica.

6.9.1 Detección histoquímica de H_2O_2

La determinación histoquímica se realizó utilizando el reactivo 3,3-diaminobenzidina (DAB), para lo cual se preparó una solución TRIS-acetato 50 mM y se ajustó a pH 5,0 con ácido acético glacial. El DAB se preparó a una concentración de 10 mM. El material vegetal fue infiltrado por 1 minuto con la solución de DAB e incubado en la oscuridad por 24 h a 25 °C (Rodríguez & Taleisnik, 2012). Posteriormente, se decantó la solución que contenía el DAB y se

sustituyó por una solución de etanol-glicerol (90:10, v/v), dejándolo durante 10 min a 70°C o hasta perder completamente la clorofila del tejido vegetal. Finalmente, el tejido vegetal se montó en un portaobjetos colocando una solución de ácido láctico: fenol: agua (1:1:1). El tejido fue observado con un estereoscopio marca ZEISS modelo StemiDV4 bajo un objetivo 10x y se tomaron fotografías de cada una de las líneas bajo los diferentes tratamientos con una cámara de un dispositivo móvil acoplada al ocular del estereoscopio.

6.9.2 Detección histoquímica de O₂ ⁻

Para la detección del anión radical O₂ ⁻ se colocó el tejido vegetal en un tubo apropiado y se cubrió completamente con una solución de nitroazul de tetrazolio (NBT). El tejido fue infiltrado aplicando 8 a 10 pulsaciones de vacío por 10 s e incubando posteriormente durante 2 h a 20 °C en la oscuridad. Luego, la solución de NBT fue decantada y se reemplazó por una solución de etanol: glicerina (90:10, v/v). Para eliminar la clorofila de las hojas se colocaron los tubos en baño de agua caliente y se dejaron hasta que el color verde desapareció completamente. Finalmente, el tejido vegetal se montó en un portaobjetos colocando una solución de ácido láctico: fenol: agua (1:1:1). El tejido fue observado con un estereoscopio marca ZEISS modelo StemiDV4 bajo un objetivo 10x y se tomaron fotografías de cada una de las líneas bajo los diferentes tratamientos con una cámara de un dispositivo móvil acoplada al ocular del estereoscopio (Rodríguez & Taleisnik, 2012).

6.9.3 Detección histoquímica de muerte celular

Se colectaron hojas de plantas inoculadas con el hongo *B. cinerea* y de plantas control (mock) a las 24, 48 y 72 h. Las hojas se colocaron en tubos Falcon con 5 mL de una solución acuosa de Azul de Evans (0,25 g en 100 mL de CaCl₂ 0,1 M pH 6,0), cubriendo el tejido completamente. Luego de agitar durante 20 min a 125 rpm se decantó la solución de Azul de Evans y se realizaron 5 lavados con agua destilada. Finalmente, el tejido se montó en un portaobjetos, colocando una

solución de ácido láctico: fenol: agua 1:1:1 y se lo analizó por microscopía óptica. El tejido fue observado con un estereoscopio marca ZEISS modelo StemiDV4 bajo un objetivo 10x y se tomaron fotografías con una cámara de un dispositivo móvil acoplada al ocular del estereoscopio.

6.9.4 Tinción histoquímica de GUS

La detección histoquímica de la actividad β -glucuronidasa (GUS) se llevó a cabo empleando la línea reportera *promPUT2::GUS*, que contiene una región de 1821 pares de bases del promotor del gen *PUT2* (*At1g31830*) fusionada al gen reportero *GUS*. El ensayo de actividad enzimática se realizó de acuerdo con protocolos estandarizados con algunas modificaciones (Jefferson et al., 1987). El material vegetal recolectado fue incubado durante 16 horas a 37 °C en la solución de revelado GUS. Finalizada la incubación, dicha solución fue retirada y las hojas se sometieron a un proceso de aclarado mediante inmersión en una mezcla etanol:glicerol (90:10, v/v), la cual se calentó a 70 °C durante 10 min con agitación constante, o hasta eliminar completamente la clorofila. Posteriormente, las muestras fueron montadas en portaobjetos utilizando una solución compuesta por ácido láctico, fenol y agua en proporción 1:1:1 (v/v/v), y observadas bajo un estereoscopio marca ZEISS modelo StemiDV4 bajo un objetivo 10x. Para cada tratamiento se emplearon tres réplicas biológicas. Se capturaron imágenes de las hojas teñidas con una cámara de un dispositivo móvil acoplada al ocular del estereoscopio, seleccionando aquellas que fueran representativas de cada tratamiento y línea.

6.10. Análisis estadístico

Los resultados de los diferentes experimentos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba t de Student o ANOVA de una o dos vías y comparaciones de Fisher LSD dependiendo del experimento usando el software GraphPad Prism versión 10.0.0. Para el ajuste de los análisis se utilizaron modelos lineales mixtos generalizados (LMM) con una distribución binomial negativa, mediante un paquete estadístico Infostat v2020e. Las gráficas fueron creadas

utilizando el software GraphPad versión 10.0.0.

7. RESULTADOS

7.1 Participación de la familia de genes *PUT/LAT* durante la respuesta de defensa vegetal de *A. thaliana* contra *B. cinerea*

Con el objetivo de conocer la participación de los genes *PUT* en la respuesta de defensa vegetal contra *B. cinerea* se determinaron los perfiles de expresión de los genes *PUT/LAT* durante la interacción *Arabidopsis-Botrytis* desde las 24 hasta las 72 hpi (**Fig. 9**). Se observó que los genes *PUT1*, *PUT2*, *PUT3*, y *PUT4* fueron regulados positivamente respecto al genotipo WT (alrededor de 1,5- 2 veces) (24 hpi) (**Fig. 9**); sin embargo, la expresión del gen *PUT5* fue reprimida (24 hpi) (**Fig. 9**). A las 48 hpi, se observó que la expresión de los genes *PUT1*, *PUT2* y *PUT3* fue regulada negativamente y en el caso de *PUT4* no presentó cambios en comparación con WT, mientras que la expresión del gen *PUT5* incrementó (alrededor de 2 veces) (**Fig. 9**). Posteriormente, se observó que los genes *PUT1*, *PUT2* y *PUT3* se indujeron (alrededor de 2 veces) (72 hpi) (**Fig. 9**). Por otro lado, la expresión del gen *PUT4* no presentó ningún cambio y la expresión del gen *PUT5* se reprimió (**Fig. 9**).

Los cambios en los niveles de expresión detectados mediante este análisis indican que los genes *PUT/LAT* participan en la respuesta de defensa de *A. thaliana* contra *B. cinerea*, sugiriendo que los cambios que ocurren en el metabolismo de poliaminas de la planta en respuesta a la infección no solo incluyen los bien conocidos efectos sobre la síntesis y el catabolismo, sino que también implican una modulación del transporte de tales compuestos.

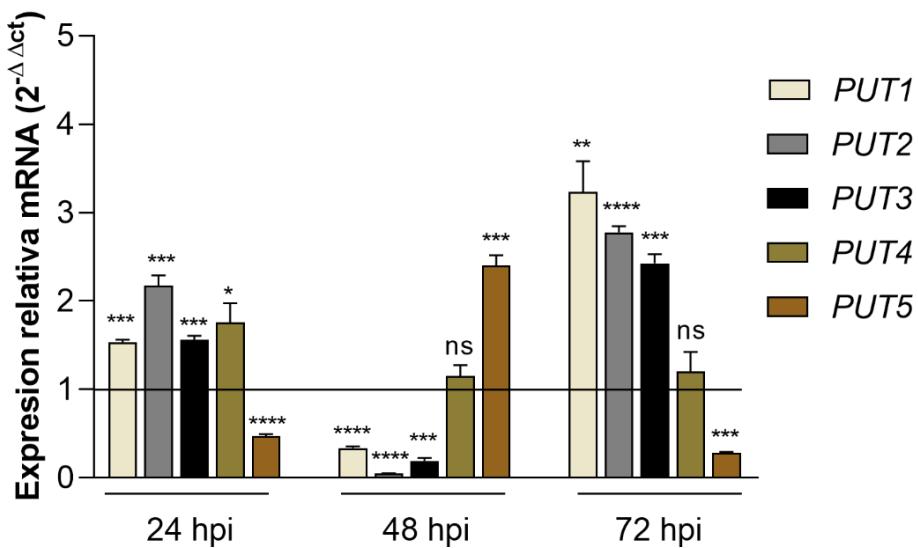


Figura. 9. Análisis de la expresión de los genes PUT en plantas de *A. thaliana* WT inoculadas con *B. cinerea*. Se inocularon hojas de la roseta de plantas de 30 días de edad con 5 μ L de una suspensión conidial de *B. cinerea* (5×10^5 esporas/mL), las muestras se colectaron a las 24, 48, y 72 horas post-inoculación. Los valores de expresión génica se normalizaron con respecto al gen de referencia *AtEF1 α* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los controles utilizados fueron normalizados con respecto a uno y son representados con una línea negra. Los valores son medias de tres réplicas biológicas \pm SE. Los asteriscos indican diferencias significativas en la expresión de cada gen entre plantas infectadas por *B. cinerea* y plantas control (*, $p \leq 0,1$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$), según la prueba t de Student. Los experimentos fueron repetidos tres veces, obteniendo resultados similares. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al., 2025.

7.2. Las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* son más susceptibles a la infección por *B. cinerea*

Se evaluó el tamaño de lesión provocado por *B. cinerea* en plantas WT y las diferentes líneas mutantes *put* (*put1-put5*). De acuerdo con el análisis se observó que las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* presentaron un incremento en el tamaño de lesión con respecto a la WT en todos los tiempos analizados (Fig. 10). Las líneas mutantes *put1-1* y *put3-1* mostraron lesiones similares a la WT mientras que *put4-1* presentó lesiones de menor tamaño a las 24 y 72 hpi (Fig. 10). El aumento del tamaño de lesión en las mutantes *put2-1* y *put5-1* indica que estos genes participan en la respuesta de defensa de *A. thaliana* contra dicho patógeno. Con el objetivo de analizar si la ausencia simultánea del transporte de *PUT2* y *PUT5* exacerbaría el fenotipo de susceptibilidad observado en las mutantes simples, se generó una

línea doble mutante de los genes *PUT2* y *PUT5*. Los resultados mostraron que esta línea desarrollo tamaños de lesión mayores que el ecotipo WT y que las líneas mutantes simples a las 24 y 48 hpi (**Fig. 11**). A las 72 hpi, *put2-1 put5-1*, aún presentó un tamaño mayor de lesión respecto a la WT y la *put2-1* (**Fig. 11**). El aumento de la susceptibilidad a *B. cinerea* en las mutantes simples *put2-1* y *put5-1* y la mutante doble *put2-1 put5-1* sugiere que los transportadores *PUT2* y *PUT5* son necesarios para la defensa vegetal y que su actividad contribuye a limitar la progresión de la infección causada por *B. cinerea*.

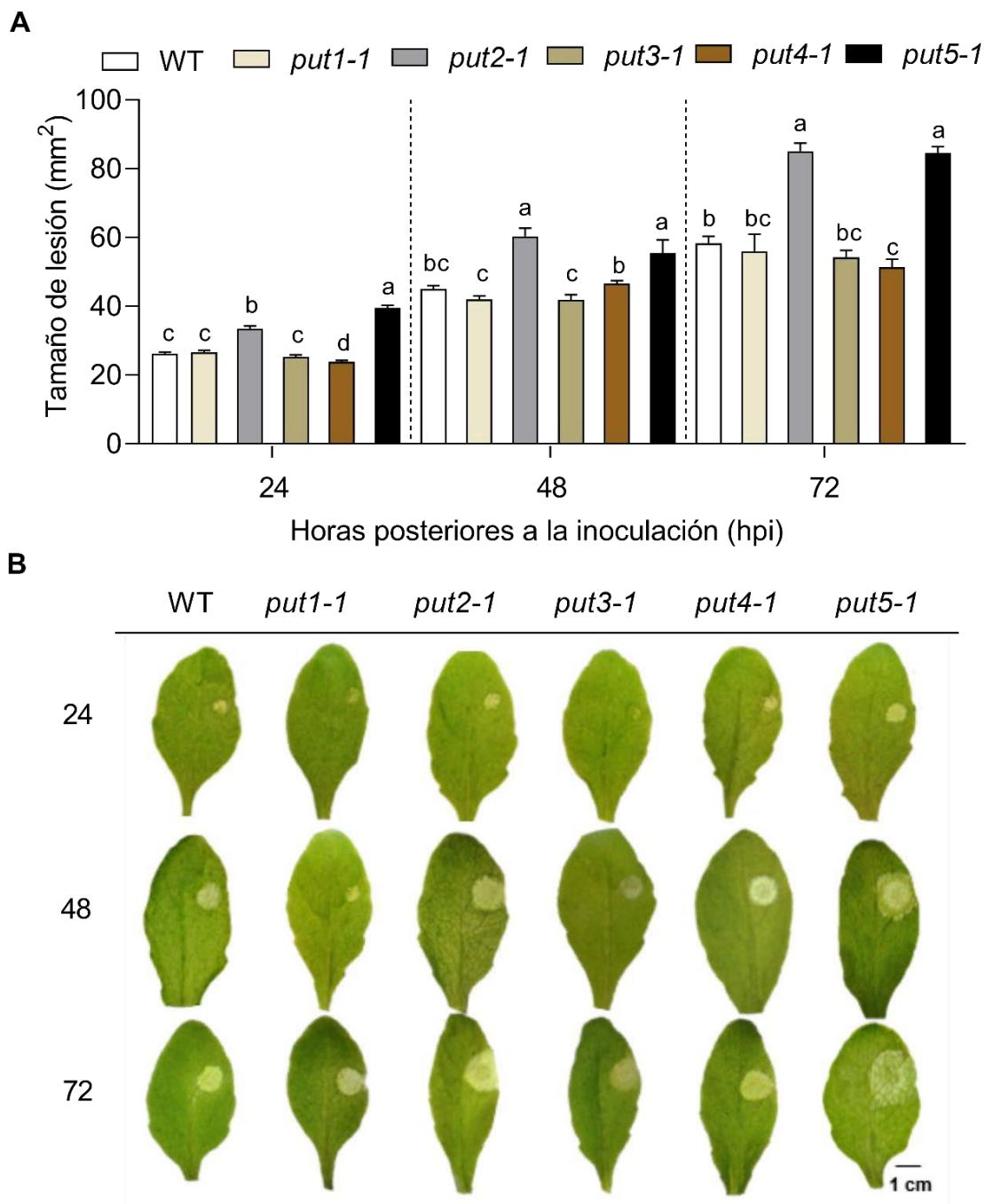


Figura 10. Severidad de la infección por *B. cinerea* en hojas de plantas de *A. thaliana* WT y líneas mutantes *put*. A) Determinación del tamaño de lesión (mm^2) en hojas de plantas del ecotipo silvestre y líneas mutantes *put* (*put1-1* a *put5-1*) infectadas por *B. cinerea*. Las hojas de plantas de 30 días de edad se colocaron en placas con agar agua y fueron inoculadas con 5 μL de una suspensión conidial de *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). El tamaño de la lesión fue determinado a las 24, 48 y 72 hpi. La significancia estadística entre los genotipos en el mismo punto de tiempo se denotó por diferentes letras ($p \leq 0.05$) de acuerdo con el análisis estadístico de una vía ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Fisher LSD. Las barras representan el promedio \pm SE de 30 réplicas biológicas. B) Imágenes representativas de hojas infectadas de plantas WT y líneas mutantes *put* mostrando lesiones necróticas. Barra de escala = 1 cm. La imagen del panel a) fue tomada

y modificada de Peña-Lucio et al., 2025.

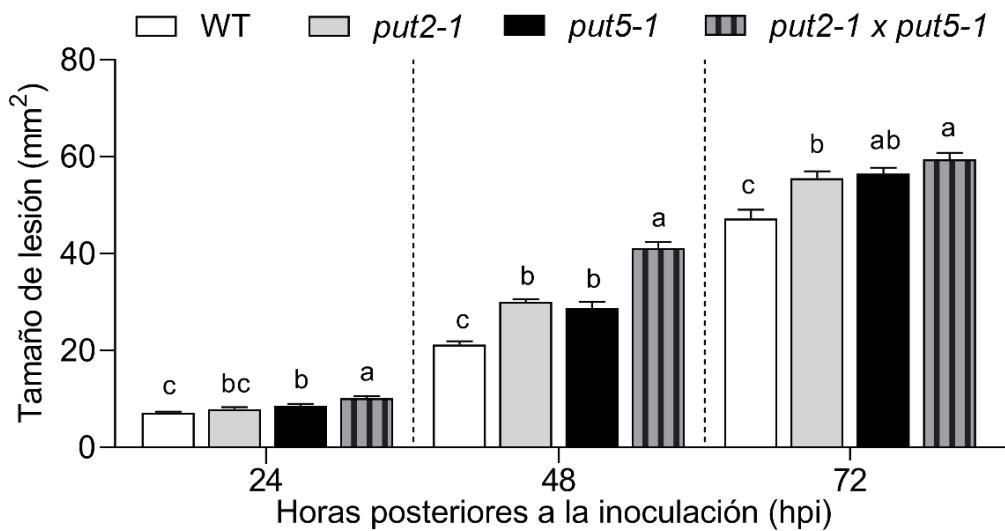


Figura 11. Severidad de la infección por *B. cinerea* en hojas de plantas de *A. thaliana* WT y de líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1*. A) Tamaño de lesión (mm^2) en hojas de plantas del ecotipo silvestre y líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* infectadas por *B. cinerea*. Las hojas de plantas de 30 días de edad se colocaron en placas con agar/agua y fueron inoculadas con 5 μL de una suspensión conidial de *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). El tamaño de la lesión se determinó a las 24, 48 y 72 hpi. La significancia estadística de las diferencias entre los genotipos a un mismo tiempo ($p \leq 0.05$) se señala con diferentes letras de acuerdo con el análisis estadístico de una vía ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Fisher LSD. Las barras representan el promedio \pm SE de 30 réplicas biológicas. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

7.3. La presencia de muerte celular se detecta de forma localizada en el sitio de infección, siendo más intensa la señal en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* que en la WT

Con el objetivo de determinar si el aumento del tamaño de lesiones mostrado por las mutantes *put2-1* y *put5-1* se correlacionaba con los niveles de muerte celular, se realizaron tinciones con Azul de Evans en hojas infectadas. La tinción azul de Evans se manifiesta como una coloración azul intensa en células o tejidos dañados, con pérdida de la integridad de la membrana plasmática, lo que permite identificar células muertas. En plantas WT y de las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* esta señal azul intensa fue evidente en el sitio de inoculación a las 24 y 48 hpi (Fig. 12). El área correspondiente a tejido muerto fue mayor en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* en comparación con la WT a las 24 hpi; mientras que, en la doble mutante *put2-1 put5-1* se observó menor presencia de muerte celular (Fig.

12). Posteriormente, a las 48 hpi, la línea mutante *put2-1* mantuvo una mayor área de tejido muerto, comparado con la WT (Fig. 12). Estas diferencias en el área de la hoja afectada por la presencia de tejido muerto entre las mutantes *put* y la WT son consistentes con los resultados de la sección previa, en la que se analizó el tamaño de lesiones, mostrando además que estas últimas involucran mayoritariamente tejido muerto (Fig. 12).

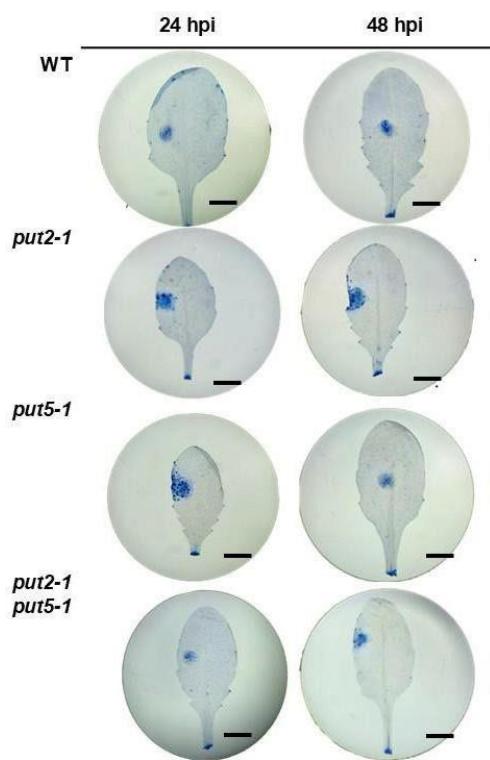


Figura 12. Detección histoquímica de muerte celular mediante la tinción de Azul de Evans en plantas de *A. thaliana* del ecotipo WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* durante la inoculación con *B. cinerea*. El experimento se realizó con plantas de 30 días de edad. Se presentan imágenes representativas de un total de 6 réplicas biológicas por línea por cada tratamiento. La tinción de las muestras se realizó a 24 y 48 hpi. Tamaño de escala= 1 cm.

7.4. La sobreexpresión del gen *PUT2* genera resistencia a *B. cinerea*

Debido a que la pérdida de función del gen *PUT2* incrementa la susceptibilidad de *A. thaliana* contra *B. cinerea*, se decidió generar y evaluar el fenotipo de tres líneas de sobreexpresión (35S::*PUT2*) de dicho gen. Los análisis demostraron que las líneas de sobreexpresión 35S::*PUT2*-2, 35S::*PUT2*-18 y 35S::*PUT2*-27 presentaron menores tamaños de lesión que la WT a las 48 y 72 hpi (**Fig. 13**). Este resultado resalta la contribución del gen *PUT2* a la respuesta de defensa, al limitar el desarrollo de la lesión.

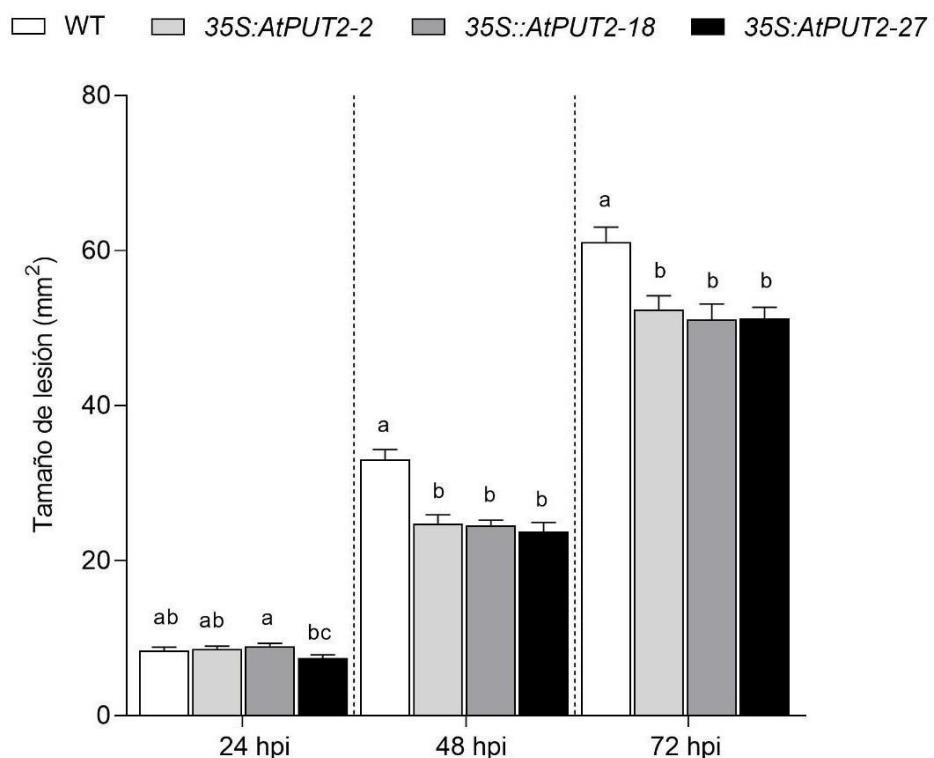


Figura 13. Severidad de la infección causada por *B. cinerea* en hojas de plantas de *A. thaliana* WT y de las líneas de sobreexpresión 35S::*PUT2*. Tamaño de lesión (mm^2) en hojas de plantas del ecotipo silvestre y líneas de sobreexpresión 35S::*PUT2*-2, 35S::*PUT2*-18, 35S::*PUT2*-27, infectadas por *B. cinerea*. Las hojas de plantas de 30 días de edad se colocaron en placas con agar:agua y fueron inoculadas con 5 μL de una suspensión conidial de *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). El tamaño de la lesión fue determinado a las 24, 48 y 72 hpi. La significancia estadística de las diferencias en los tamaños de lesión entre los genotipos en el mismo punto de tiempo se denotó por diferentes letras ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Fisher LSD. Las barras representan el promedio \pm SE de 30 réplicas biológicas.

7.5. El efecto de protección contra *B. cinerea* conferido por la suplementación con poliaminas se ve atenuado en las mutantes *put2-1* y *put5-1*

Como se mencionó previamente, las mutantes simples *put2-1*, *put5-1* y la doble mutante *put2-1 put5-1* son más susceptibles a la infección por *B. cinerea*. Dado que la suplementación de poliaminas (principalmente Spd y Spm) confiere resistencia a *B. cinerea* (van Rensburg et al., 2021), se decidió evaluar el efecto de la suplementación de poliaminas en las mutantes *put* para determinar la contribución del transporte de estas aminas a la respuesta de defensa.

7.5.1- Efecto de la suplementación con Spd en el desarrollo de lesiones en plantas de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea*.

Hojas de las líneas mutantes *put* y la WT fueron colocadas en placas de agar-agua suplementadas con Spd a concentraciones de 0, 50 y 200 μ M y posteriormente fueron inoculadas con el hongo. En los tres tiempos evaluados, 24, 48 y 72 hpi, se observó que los tratamientos con Spd fueron efectivos, disminuyendo el tamaño de la lesión causada por *B. cinerea* en plantas WT comparado con el control sin tratamiento (**Fig. 14**). Este efecto benéfico no fue observado en la misma magnitud en las líneas mutantes, si bien en la doble mutante *put2-1 put5-1* el tratamiento con Spd 50 μ M generó una reducción en el tamaño de la lesión en los tres tiempos evaluados, y en las mutantes simples *put2-1* y *put5-1* se observó a las 48 y 72 hpi, esta reducción fue mucho menor que en la WT. (**Fig. 14**).

Por otro lado, *put2-1*, *put5-1* y la línea doble mutante *put2-1 put5-1* no mostraron cambios en el tamaño de la lesión tras la suplementación con Spd 200 μ M a las 24 hpi (**Fig. 14**). Además, a las 48 hpi, *put2-1* tampoco mostró un efecto en el tamaño de la lesión con el tratamiento de Spd 200 μ M (**Fig. 14**). Finalmente, ninguna de las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* mostraron reducción en el tamaño de lesión 72 hpi después de suplementar con 200 μ M de Spd (**Fig. 14**).

Los resultados anteriores muestran que la suplementación con Spd confiere resistencia a *B. cinerea* en plantas WT mientras que en las líneas mutantes *put* no

genera el mismo nivel de protección, lo cual indica que los transportadores PUT2 y PUT5 desempeñan un rol importante en el transporte y relocalización de Spd en condiciones de estrés biótico. Estos hallazgos sugieren que el desequilibrio en el transporte de poliaminas puede afectar su homeostasis y favorecer la propagación del patógeno.

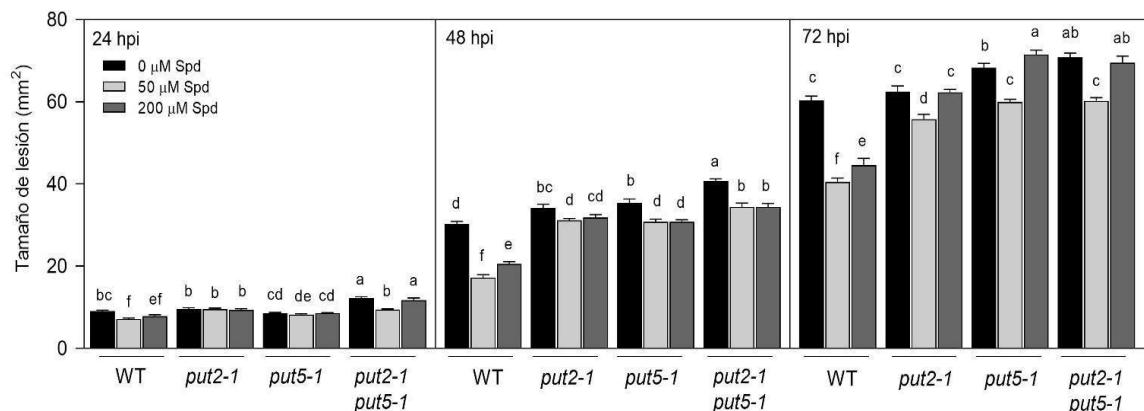


Figura. 14. Efecto de la suplementación con Spd en el desarrollo de lesiones en plantas de *A. thaliana* WT y de las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* infectadas con *B. cinerea*. Se colocaron hojas de plantas del ecotipo WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* en placas con agar agua (0,8 % p/v) suplementadas con Spd (50 y 200 µM) y posteriormente se inocularon con *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos para un tiempo determinado, de acuerdo con un ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples LSD Fisher. Las barras representan el promedio \pm SE de 20 réplicas biológicas. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al., 2025.

7.5.2- Efecto de la suplementación con Spm en el desarrollo de lesiones en plantas de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea*

Además de la Spd, se evaluó el efecto de la suplementación con Spm en la resistencia a *B. cinerea*. En las primeras 24 hpi no se observó ningún efecto de la suplementación con Spm sobre el tamaño de la lesión en plantas WT ni en mutantes *put* (Fig. 15). En la WT, tratamientos con 50 y 200 µM de Spm redujeron notablemente el tamaño de la lesión a las 48 y 72 hpi (Fig. 15). Con un efecto mucho menor, se observó que ambas concentraciones de Spm (50 y 200 µM) redujeron el tamaño de la lesión en *put2-1* y la doble mutante *put2-1 put5-1* a las 48 hpi, mientras que no se detectó dicho efecto en *put5-1* (Fig. 15). En relación con lo observado en las líneas mutantes a las 72 hpi, únicamente la línea *put2-1* presentó una ligera

disminución en el tamaño de lesión después de suplementar con 50 y 200 μM de Spm, en *put5-1* ninguna de las concentraciones tuvo efecto, y en la doble mutante únicamente 200 μM redujo el tamaño de las lesiones (**Fig. 15**).

El hecho de que el efecto protector de la Spm contra *B. cinerea* fue menor en las mutantes *put* que en la WT sugiere que los transportadores PUT movilizan y redistribuyen Spm durante la respuesta de defensa contra *B. cinerea*, de forma similar a lo observado con la suplementación de Spd.

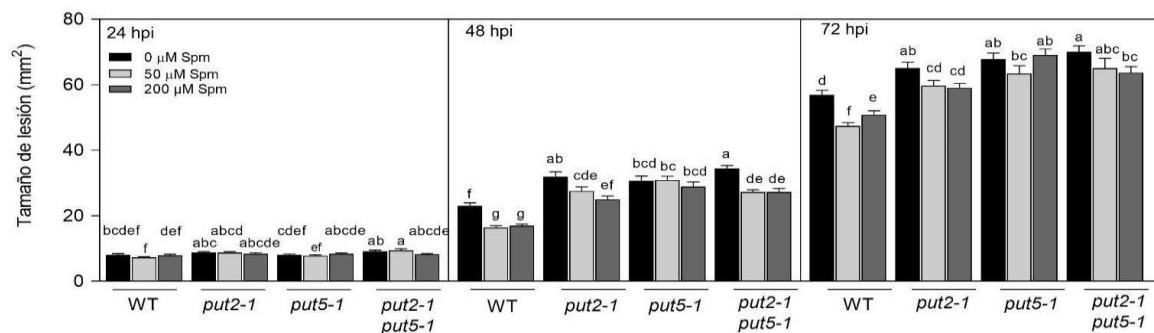


Figura. 15. Efecto de la suplementación con Spm en el desarrollo de lesiones en plantas de *A. thaliana* WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1*, y *put2-1 put5-1* infectadas con *B. cinerea*. Se colocaron hojas de plantas del ecotipo WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* en placas con agar agua (0,8 % p/v) suplementadas con Spd (50 y 200 μM) y posteriormente se inocularon con *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos para un tiempo determinado, de acuerdo con un ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples LSD Fisher. Las barras representan el promedio \pm SE de 20 réplicas biológicas. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al., 2025.

7.5.3- Efecto de la suplementación con Put en el desarrollo de lesiones en plantas de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea*

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la suplementación con Put en la resistencia de la planta contra *B. cinerea*. En líneas generales, la Put fue menos efectiva que la Spd y la Spm en conferir resistencia contra el hongo. A las 24 hpi, la suplementación con dicha diamina no impactó sobre el tamaño de la lesión de ninguna de las plantas tratadas, a excepción de la mutante *put5-1*, donde tratamientos con 50 y 200 μM de Put disminuyeron ligeramente el tamaño de la lesión (**Fig. 16**). Posteriormente se observó que la suplementación con Put redujo el tamaño de lesión a las 48 hpi en la WT (**Fig. 16**). Las líneas mutantes, simples

como la doble, no presentaron una disminución del tamaño de lesión después de suplementar con 50 μ M de Put (**Fig. 16**), y únicamente, 200 μ M de Put tuvieron un efecto en *put5-1* y en la línea doble mutante *put2-1 put5-1* (**Fig. 16**). Finalmente, a las 72 hpi, se observó que la Put disminuyó el tamaño de la lesión solamente en *put2-1* (**Fig. 16**). Estos resultados indican una baja efectividad en la Put para inducir resistencia contra *B. cinerea* tanto en la WT como en las mutantes *put* (**Fig. 16**). Sin embargo, en forma similar a lo descrito para Spd y Spm, el efecto de la suplementación con Put fue en general menor en las mutantes *put* que en la WT.

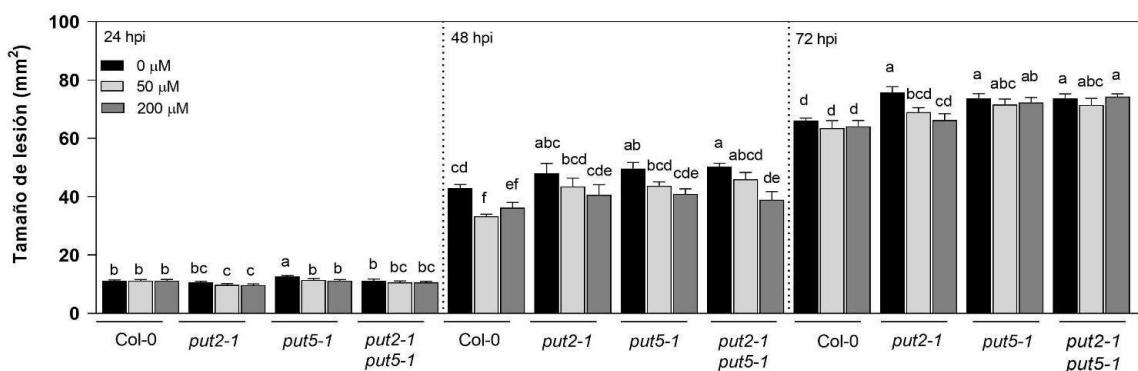


Figura. 16. Efecto de la suplementación con Put en el desarrollo de lesiones en plantas de *A. thaliana* WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1*, y *put2-1 put5-1* infectadas con *B. cinerea*. Se colocaron hojas de plantas del ecotipo WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* en placas con agar agua (0.8 % p/v) suplementadas con Spd (50 y 200 μ M) y posteriormente se inocularon con *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los distintos tratamientos para un tiempo determinado, de acuerdo con un ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples LSD Fisher. Las barras representan el promedio \pm SE de 20 réplicas biológicas. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

7.6. La suplementación con Spd en las líneas de sobreexpresión 35S::PUT2 confiere mayor resistencia contra *B. cinerea* comparado con plantas silvestres

Se realizaron experimentos similares a los descritos en secciones precedentes, en este caso, suplementando con Spd la línea sobreexpresora del gen *PUT2* y analizando su efecto protector contra la infección por *B. cinerea*. Al evaluar el tamaño de la lesión, se observó que la suplementación con Spd redujo el tamaño de la lesión en plantas WT, así como en las líneas de sobreexpresión 35S::PUT2-2 y 35S::PUT2-18 (**Fig. 17**).

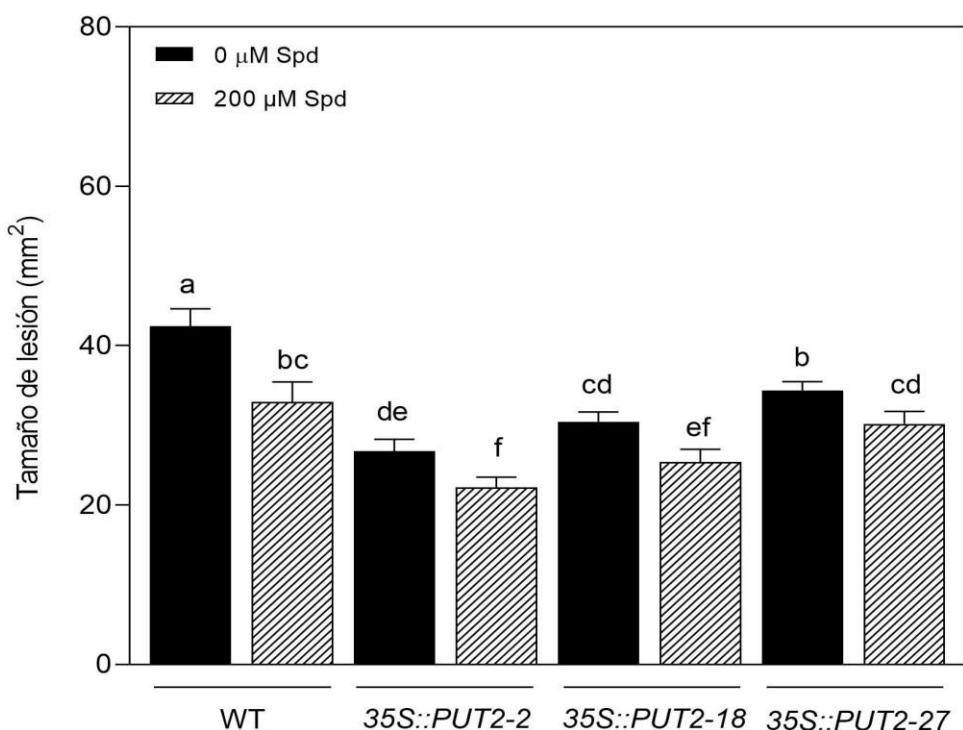


Figura 17. Severidad de la infección causada por *B. cinerea* en hojas de plantas de *A. thaliana* WT y las líneas de sobreexpresión 35S::PUT2 suplementadas con Spd (200 μM). Se colocaron hojas de plantas del ecotipo WT y las líneas de sobreexpresión 35S::PUT2-2, 35S::PUT2-18, 35S::PUT2-27, en placas con agar:agua (0,8 % p/v) suplementadas con Spd (200 μM), e inoculadas con 5 μL de una suspensión conidial de *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). El tamaño de lesión fue determinado a las 24 hpi. La significancia estadística de las diferencias en los tamaños de lesión entre los genotipos en el mismo punto de tiempo se denotó por diferentes letras ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Fisher LSD. Las barras representan el promedio \pm SE de 20 réplicas biológicas. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al., 2025.

7.7- Análisis de los perfiles de poliaminas en plantas WT y en las líneas mutantes *put*

Teniendo en cuenta que las líneas mutantes *put* mostraron mayor susceptibilidad a *B. cinerea* que la WT, así como también que tales mutantes respondieron de manera diferente a las WT ante la suplementación con poliaminas, se decidió analizar el contenido de poliaminas en estas plantas con el objetivo de determinar si existen diferencias en su perfil y correlacionarlas con el fenotipo de mayor susceptibilidad. Inicialmente se determinó el contenido de poliaminas en plantas WT suplementadas con Spd y, posteriormente, en plantas WT y las líneas mutantes *put* suplementadas con Spd y Spm sin inocular e inoculadas con *B. cinerea*.

7.7.1- Determinación de los niveles de poliaminas en plantas WT

Primero, se realizó un ensayo para determinar, en un sistema de hoja cortada, las condiciones experimentales adecuadas para analizar los efectos de la suplementación sobre los niveles de poliaminas. Esta información resulta útil para analizar posteriormente la participación de los transportadores PUT en la homeostasis de poliaminas y, además, correlacionar los niveles de susceptibilidad con los cambios en los niveles de dichos metabolitos provocados por la disfuncionalidad de tales transportadores en las mutantes. Para ello se emplearon hojas de plantas WT de 30 días de edad, se tomaron de la roseta y se colocaron en placas de agar-agua suplementadas con diferentes concentraciones de Spd. Se seleccionó esta poliamina con base en reportes previos que indican que los transportadores PUT tienen mayor afinidad por ella en comparación con otras poliaminas (Mulangi et al., 2012). Se detectó que el tratamiento con Spd a 200 μ M indujo cambios significativos en las concentraciones de Put y Spd a las 24 y 48 h tras la suplementación (**Fig. 18a y b**). Respecto al contenido de Spm, la suplementación con 200 μ M de Spd no tuvo efecto (**Fig. 18c**). A diferencia de lo observado al suplementar con Spd 200 μ M, la suplementación con Spd 50 μ M en líneas generales no provocó cambios en los niveles de las poliaminas analizadas con la excepción de un aumento leve y transitorio de los niveles de Spd (**Fig. 18**). Con base en estos resultados se seleccionó la concentración de 200 μ M para los

siguientes experimentos.

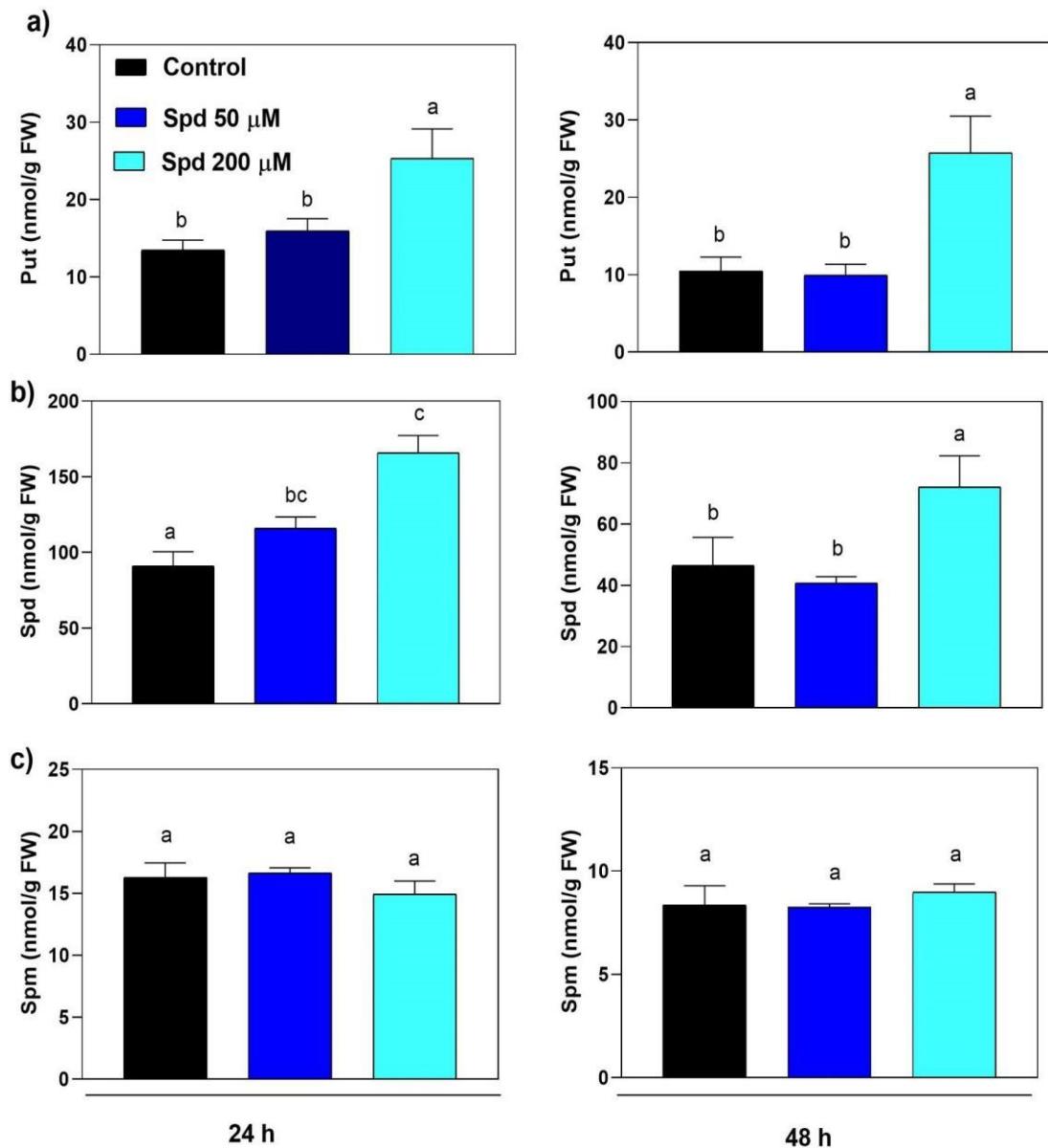


Figura 18. Determinación del contenido de poliaminas libres en hojas de plantas WT. El ensayo se realizó en placas de agar:agua suplementadas con 50 y 200 μ M de Spd durante 24 y 48 horas. El contenido de poliaminas libres: a) Put, b) Spd y c) Spm, se expresó en nmol/g de peso fresco (FW). La significancia estadística de las diferencias en el contenido de poliaminas entre los diferentes tratamientos en el mismo punto de tiempo se denotó por diferentes letras ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Fisher LSD. Las barras representan las medias de 6 muestras biológicas \pm SE ($n = 6$).

7.7.2- Determinación de los niveles de poliaminas en plantas WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* suplementadas con Spm y Spd

Se determinó el contenido de poliaminas (Put, Spd, y Spm) en hojas de plantas WT y de las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1*, y *put2-1 put5-1* a las 24 y 48 horas posteriores a la suplementación con Spd y Spm (200 μ M). Se observó que las hojas control (sin suplementar) de plantas WT y las mutantes presentaron diferencias menores en el contenido de poliaminas a las 24 y 48 h (**Fig. 19 y 20**). Por ejemplo, la línea mutante *put5-1* presentó un mayor contenido de Put en comparación con WT (24 h) (**Fig. 19a**). La línea mutante *put2-1* mostró un incremento en el contenido de Spm en comparación con WT (24 h) (**Fig. 19c**). Los niveles de Spd y Spm de la línea doble mutante *put2-1 put5-1* fueron superiores a los de plantas WT tanto a las 24 como a las 48 h (**Fig. 19b, c y 20b, c**), mientras que los de Put solo fueron más altos a las 48 h (**Fig. 20a**).

Posteriormente, se detectó que la suplementación con Spd (200 μ M) generó diferencias en el contenido de poliaminas respecto a los controles sin suplementar (24 h). A modo de ejemplo, este tratamiento incrementó los niveles de Put y Spd en WT (**Fig. 19a y b**), mas no los de Spm (**Fig. 19c**). Por otro lado, no se observó ningún cambio en el nivel de poliaminas endógenas en la *put5-1* (**Fig. 19**) (24 h), mientras que se incrementó el contenido de Put en la *put2-1 put5-1* (**Fig. 19a**) y de Spd en la *put2-1* (**Fig. 19b**) (24 h). Respecto a las 48 h se observó un patrón similar a excepción que el contenido de Put permaneció sin aumentar tanto en WT como en las líneas mutantes (**Fig. 20a**). Adicionalmente, no se observó algún cambio en el contenido de Spd en las mutantes *put* (**Fig. 20c**).

Por otro lado, la suplementación con Spm incrementó notablemente el contenido de Spm en plantas WT y las líneas mutantes a las 24 h (**Fig. 19c**). Un comportamiento similar se presentó a las 48 h a excepción de la línea doble mutante *put2-1 put5-1*, la cual no presentó cambios en el contenido de Spm (**Fig. 20c**). La suplementación con Spm indujo un pequeño incremento en el contenido de Spd en la línea mutante *put2-1* a las 24 h, en cambio en la línea mutante *put5-1* presentó una disminución (**Fig. 19b**). A las 48 h la suplementación con Spm no tuvo ningún efecto en los niveles de Spd tanto en WT como en las líneas mutantes *put* (**Fig. 20b**).

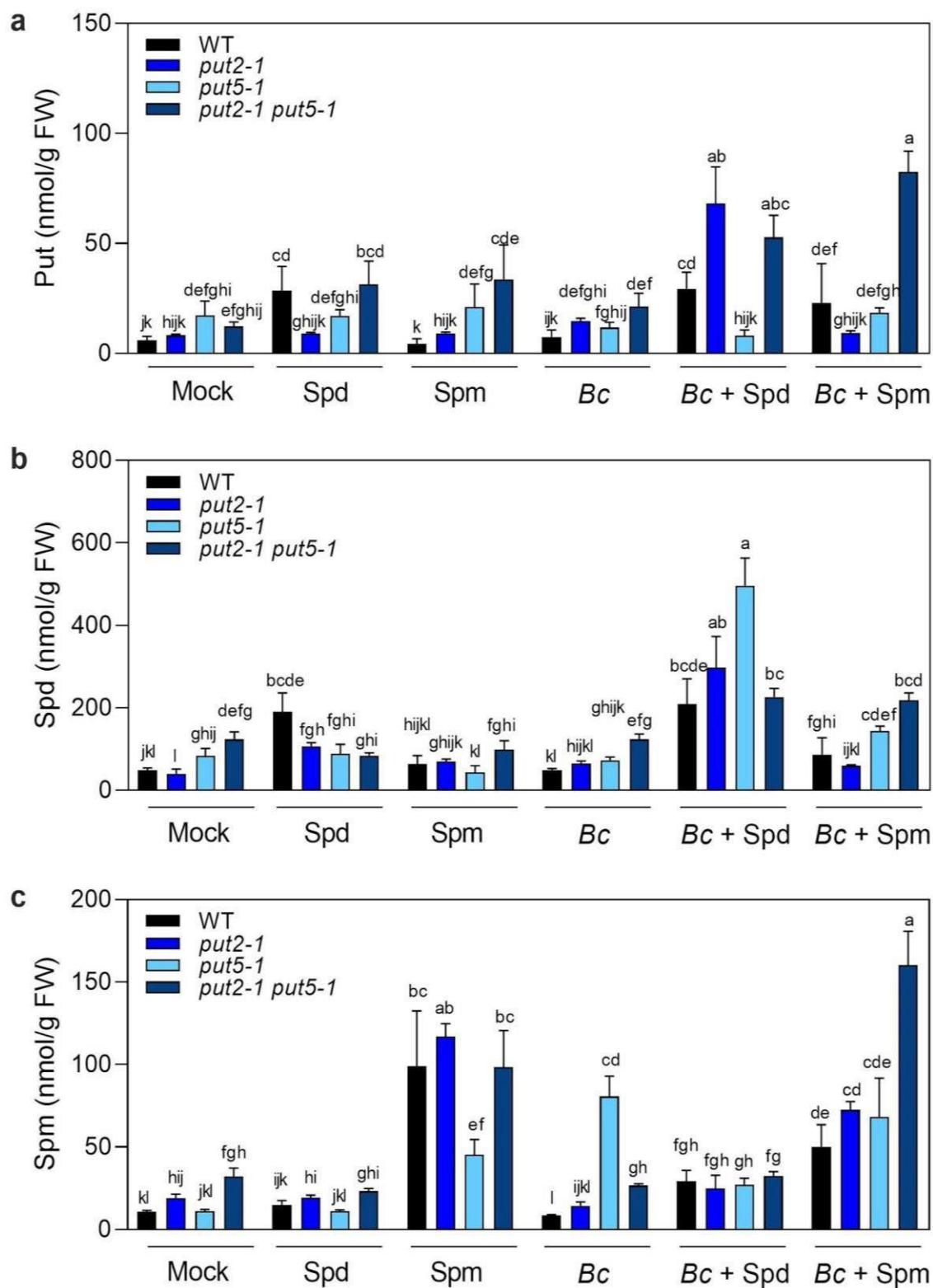


Figura 19. Contenido de poliaminas libres en hojas de plantas WT y líneas mutantes *put* en respuesta a la suplementación con poliaminas y a la infección por *B. cinerea* a las 24 hpi. Se utilizaron hojas de plantas de treinta días de plantas WT y las líneas

mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* y se colocaron en placas con agar:agua suplementadas con 200 μ M de Spd o Spm, posteriormente, fueron inoculadas con 5 μ L de una suspensión de *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). El contenido de poliaminas libres se estimó a las 24 hpi. a) Put, b) Spd y c) Spm. La significancia estadística fue determinada utilizando modelos mixtos linearizados (GLMMs) con una distribución binomial negativa seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Fisher con LSD, las letras diferentes denotan significancia estadística ($p \leq 0,05$). Las barras representan medias \pm SE ($n = 6$). Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al., 2025.

7.7.3- Determinación de los niveles de poliaminas en plantas WT y las líneas mutantes *put* después de la infección y suplementación con poliaminas

Cuando las plantas experimentan eventos de estrés biótico, se pueden presentar cambios en la biosíntesis de las poliaminas y, en consecuencia, incrementos en su concentración (Gonzalez et al., 2021; Jasso-Robles et al., 2015; Jiménez-Bremont et al., 2014). Tal como se describió en otras secciones, existe información sobre el papel de los procesos biosintéticos y catabólicos en las modificaciones de los niveles de poliaminas desencadenadas por el estrés biótico, pero el papel del transporte de tales compuestos es prácticamente desconocido. Por tal motivo, se analizó el contenido de poliaminas en las líneas mutantes *put* y la WT después de inocular con *B. cinerea*, así como, en tratamientos combinados de inoculación y suplementación. Por un lado, se evaluó el efecto de la inoculación con *B. cinerea* sobre el incremento de los niveles de poliaminas a las 24 y 48 hpi. En plantas WT, los niveles de poliaminas no cambiaron a las 24 hpi (**Fig. 19**); sin embargo, posteriormente los niveles de Put incrementaron notablemente a las 48 hpi (**Fig. 20a**). De manera similar a la WT, el contenido de Put aumentó en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* a las 48 hpi (**Fig. 20a**). En cuanto al resto de las poliaminas analizadas, el único cambio detectado fue un aumento del nivel de Spm en la *put5-1* a las 24 hpi (**Fig. 19C**). La línea doble mutante *put2-1 put5-1* no mostró cambios en los niveles de poliaminas en respuesta a la infección con *B. cinerea* en ninguno de los tiempos analizados (**Fig. 19** y **Fig. 20**).

En plantas WT y la mutante *put5-1*, la suplementación con Spd combinada con la inoculación con *B. cinerea* generó un incremento en los niveles de Spm (24 hpi) (**Fig. 19c**) en comparación con el tratamiento de suplementación de Spd sin

inoculación. Posteriormente, a las 48 hpi la WT presentó cambios en los niveles de Put (48 hpi) (**Fig. 20a**), y Spd (48 hpi) (**Fig. 20b**), bajo las mismas condiciones del tratamiento previamente mencionado. Adicionalmente, la línea doble mutante *put2-1 put5-1* también presentó un aumento en los niveles de Put a las 48 hpi tras aplicar el tratamiento combinado de inoculación y suplementación con Spd y Spm (**Fig. 20a**). Respecto a la línea mutante *put2-1*, se observó que el tratamiento combinado aumentó significativamente el contenido de Put y Spd a las 24 hpi (**Fig. 19a y 19b**). Asimismo, se observó un incremento en el contenido de Spd en las líneas *put5-1* y *put2-1 put5-1* expuestas al tratamiento mencionado (24 hpi) (**Fig. 19b**).

Con respecto al efecto de la suplementación con Spm combinado con la inoculación con *B. cinerea*, se detectó un aumento en los niveles de Put en plantas WT, en comparación con las plantas solo suplementadas con Spm (24 y 48 hpi) (**Fig. 19c y 20c**). Sin embargo, los niveles de Spd y Spm disminuyeron o permanecieron sin cambios (**Fig. 19b y 19c**). Por otro lado, en la línea doble mutante *put2-1 put5-1* se observó que la inoculación con *B. cinerea* en combinación con la suplementación con Spm (24 hpi) aumentó significativamente todos los niveles de poliaminas en comparación con la suplementación con Spm sin inoculación (**Fig. 19**), a las 48 hpi se observó un comportamiento similar detectando un incremento de Put y Spm (**Fig. 20a y 20c**). El tratamiento combinado también indujo la acumulación de Spd en la línea mutante *put5-1* (24 hpi) (**Fig. 19b**). Adicionalmente, se detectó un incremento en los niveles de Put en las mutantes *put2-1* y *put5-1* (48 hpi) (**Fig. 20c**).

En general, se puede observar que el aumento de la concentración de poliaminas está más asociado a la suma del tratamiento combinado de la infección más la suplementación que al tratamiento individual de la aplicación exógena de Spd y Spm.

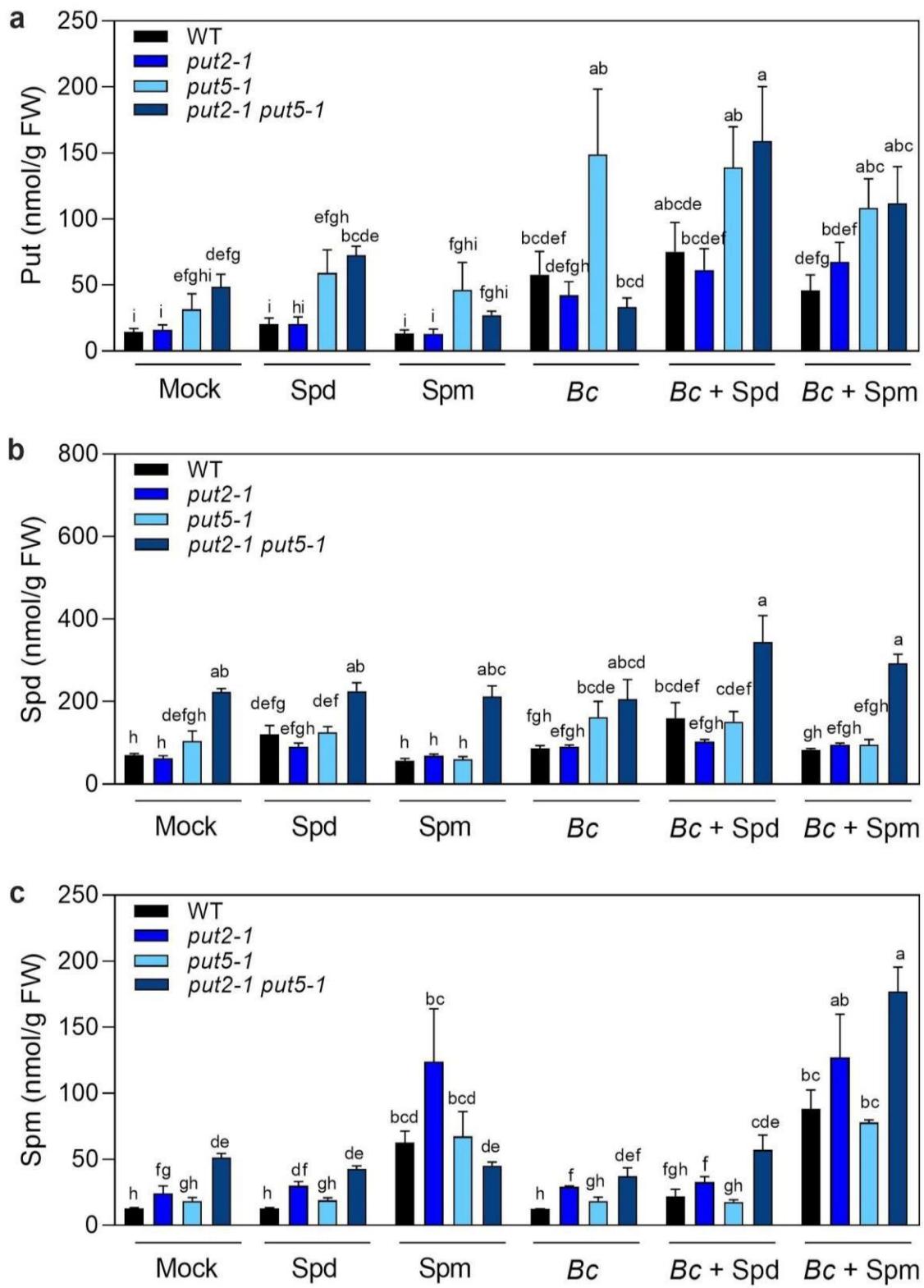


Figura 20. Contenido de poliaminas libres en hojas de plantas WT y líneas mutantes *put* en respuesta a la suplementación con poliaminas y a la infección por *B. cinerea* a las 48 hpi. Se utilizaron hojas de plantas de treinta días de plantas WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* y se colocaron en placas con agar:agua suplementadas con 200 μ M de Spd o Spm, posteriormente fueron inoculadas con 5 μ L de

una suspensión de *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). El contenido de poliaminas libres se estimó a las 24 hpi. a) Put, b) Spd y c) Spm. La significancia estadística fue determinada utilizando modelos mixtos linearizados (GLMMs) con una distribución binomial negativa seguido de una prueba de comparaciones múltiple de Fisher con LSD, las letras diferentes denotan significancia estadística ($p \leq 0,05$). Las barras representan medias \pm SE ($n = 6$). Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

7.8- La actividad poliamina oxidasa permanece atenuada en las líneas mutantes *put* infectadas con *B. cinerea*

Las enzimas PAOs catabolizan la oxidación de Spd, Spm y se puede llevar a cabo mediante dos vías: el catabolismo terminal y la ruta de retroconversión (Moschou et al., 2012). La oxidación de estas poliaminas genera como producto H₂O₂ (Sequera-Mutiozabal et al., 2016). El H₂O₂ puede fungir como una molécula de señalización y activar la respuesta de defensa de la planta (Tavladoraki et al., 2012). Para determinar si las líneas mutantes de transportadores PUT presentan alteraciones en la oxidación de poliaminas en respuesta a la infección, se evaluó la actividad PAO en plantas inoculadas con *B. cinerea*. Inicialmente se observó un aumento en la actividad de oxidación de Spd y Spm en plantas WT (24 hpi) después de inocular con *B. cinerea* en comparación con plantas control (**Fig. 21**). Posteriormente, la actividad PAO no presentó cambios en la actividad de oxidación de Spm (48 y 72 hpi) comparada con los controles (**Fig. 21b**). Respecto a la actividad de oxidación de Spd se observó que a las 48 hpi (**Fig. 21a**) se presentó una disminución en comparación con los controles sin inocular y a las 72 hpi (**Fig. 21a**) no se detectaron cambios.

Por otro lado, en las líneas mutantes *put* no se observó un incremento en la actividad PAO después de inocular con el patógeno (24 hpi) (**Fig. 21**), resultando esto una diferencia importante con respecto a lo detectado en las plantas WT. Además, se detectó una disminución de la oxidación de Spm en las mutantes *put2-1* y *put5-1* inoculadas con *B. cinerea* en comparación con controles inoculados con mock (24 hpi) (**Fig. 21b**). A las 48 y 72 hpi no se evidenciaron cambios en la actividad de oxidación de Spd y Spm en respuesta a la inoculación en las líneas mutantes *put* (**Fig. 21a y b**), a excepción del pequeño incremento de la oxidación de ambas poliaminas mostrado por la línea mutante *put5-1* (48 hpi) (**Fig. 21a y b**),

y el aumento de oxidación de Spm detectado en la línea doble mutante *put2-1 put5-1* (48 hpi) (Fig. 21b). Estos resultados muestran que los cambios en las actividades de oxidación de Spd y Spm inducidos por la infección con *B. cinerea* se encuentran alterados en las mutantes *put*, sugiriendo la participación de los transportadores PUT en procesos que contribuyen al catabolismo de poliaminas durante la respuesta de defensa.

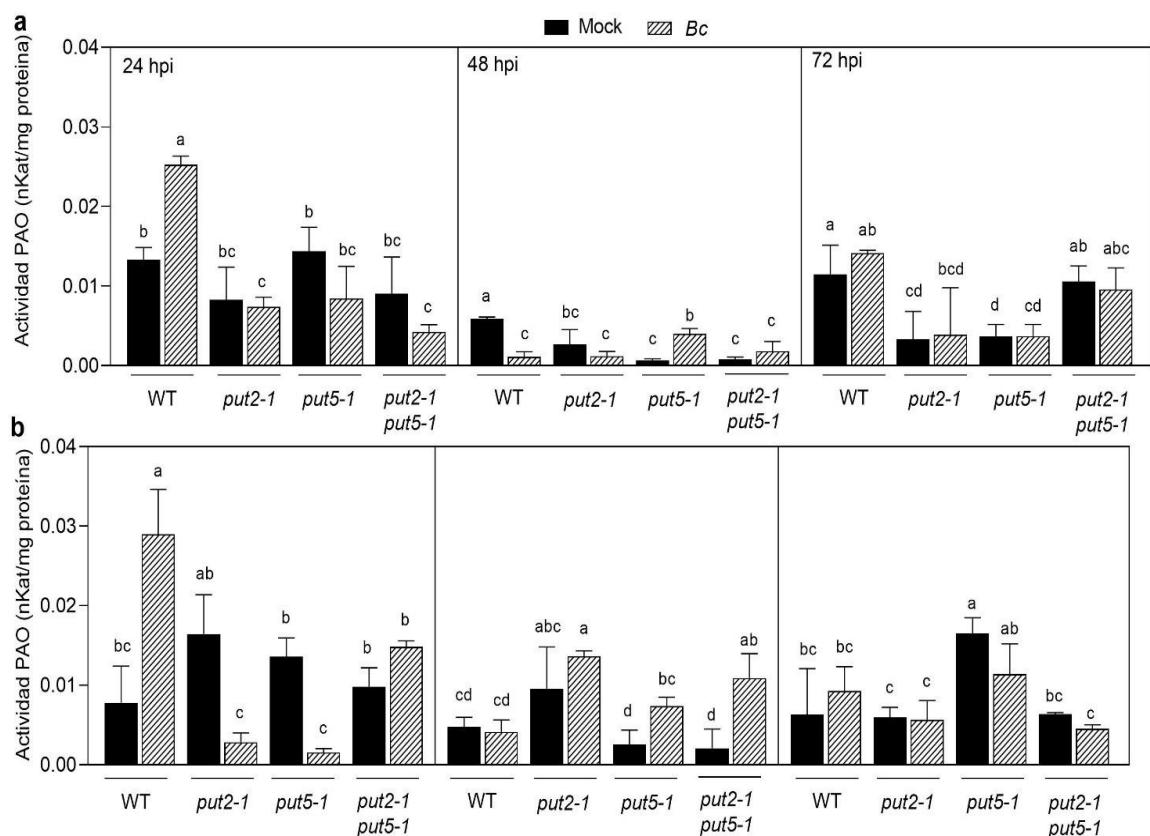


Figura. 21. Estimación de la actividad PAO en hojas de plantas WT y líneas mutantes *put* infectadas por *B. cinerea*. La actividad PAO se determinó en plantas WT, *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* de 30 días de edad, 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (hpi). Se utilizó (a) Spd y (b) Spm como sustratos para la oxidación de aminas. La actividad PAO se midió por la producción de un aducto de color rosa a 515 nm. Las barras representan la media \pm del error estándar ($n = 3$). La significancia estadística de las diferencias en la actividad PAO entre los diferentes tratamientos en el mismo punto de tiempo se denotó por diferentes letras ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Fisher LSD. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

7.9. Las líneas mutantes *put* presentan alteraciones en el contenido de H₂O₂ y en los patrones de acumulación de H₂O₂ y O₂·⁻ en respuesta a la infección por *B. cinerea*

La inoculación con *B. cinerea* induce el estallido respiratorio y el establecimiento de la HR en *A. thaliana*, esta respuesta de la planta genera la acumulación de EROs, por ejemplo, H₂O₂ y O₂·⁻ (Govrin & Levine, 2000). El aumento de susceptibilidad observado en las líneas mutantes *put* podría asociarse en parte con la desregulación en el contenido de estas EROs. Por otra parte, las alteraciones en la actividad de enzimas PAO mostradas por dichas mutantes, tambien podria generar perturbaciones en el estatus redox, teniendo en cuenta la contribucion de tales enzimas a la producción de H₂O₂. Por lo tanto, con el objetivo de determinar si las mutantes *put* presentan alteraciones en el estatus redox, se realizó la cuantificación del contenido de H₂O₂, asimismo, se hizo una tinción histoquímica para detectar la presencia de H₂O₂ y O₂·⁻.

7.9.1- Determinación de los niveles de H₂O₂.

De manera general se observó que bajo condiciones control (sin inocular) el ecotipo WT presentó mayores niveles de H₂O₂ que las líneas mutantes *put*, a excepción de la *put2-1*, la cual presenta niveles similares que la WT (24 y 48 hpi) (**Fig. 22**). Posteriormente, se analizaron estos niveles después de la inoculación con *B. cinerea*, observándose inicialmente que los niveles de H₂O₂ disminuyeron en la WT y la línea mutante *put2-1* en comparación con los controles sin inocular (24 h) (**Fig. 22**). La línea doble mutante no presentó cambios (24 h) (**Fig. 22**). Por otro lado, la mutante *put5-1* si mostró un incremento en los niveles de H₂O₂ (24 h) (**Fig. 22**). A diferencia de lo observado previamente, a las 48 hpi sí se detectó un incremento significativo en los niveles de H₂O₂ en plantas WT y las líneas mutantes *put* infectadas con *B. cinerea* (**Fig. 22**), siendo la línea mutante *put2-1* la que presentó una mayor acumulación (**Fig. 22**).

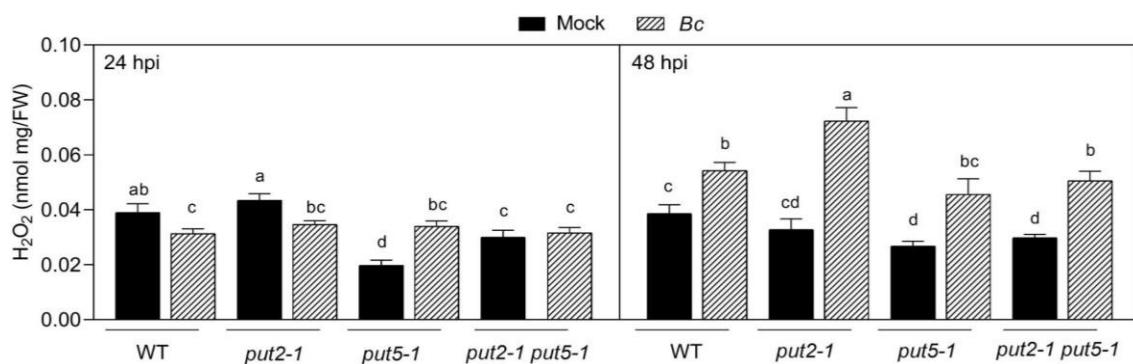


Figura 22. Contenido de H₂O₂ en hojas de plantas WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* infectadas por *B. cinerea*. Se utilizaron hojas de plantas de treinta días las cuales fueron inoculadas con 5 µL de *B. cinerea* (5×10^5 esporas/mL). Se colectaron muestras a las 24 y 48 hpi. El contenido de H₂O₂ fue determinado espectrofotométricamente a 515 nm de acuerdo con el coeficiente de extinción molar ($2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las barras representan la media ± DE (n = 3). La significancia estadística se indica con letras diferentes dentro del mismo punto de tiempo ($p \leq 0,05$), con base en un ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de LSD Fisher. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

7.9.2- Detección histoquímica de H₂O₂ mediante tinción de 3,3-diaminobenzidina (DAB)

Se analizó la producción *in situ* de H₂O₂ mediante la detección histoquímica de diaminobencidina (DAB) en plantas WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y la línea doble mutante *put2-1 put5-1* inoculadas con el patógeno *B. cinerea*. Los análisis evidenciaron que la WT presentó una tinción localizada en el sitio de la inoculación con el patógeno (24 y 48 hpi) (Fig. 23), sin embargo, esta señal fue más intensa en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* (Fig. 23). En la doble mutante *put2-1 put5-1* también se observó señal de DAB en el sitio de infección, pero ésta no fue tan intensa como en las mutantes simples (Fig. 23). Adicionalmente, se observó que la WT mostró señal de DAB a lo largo de la nervadura central a las 24 hpi (Fig. 23). Las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* también presentaron una tinción pronunciada en el ápice y base de la hoja y alrededor del sitio de la inoculación a las 24 y 48 hpi (Fig. 23).

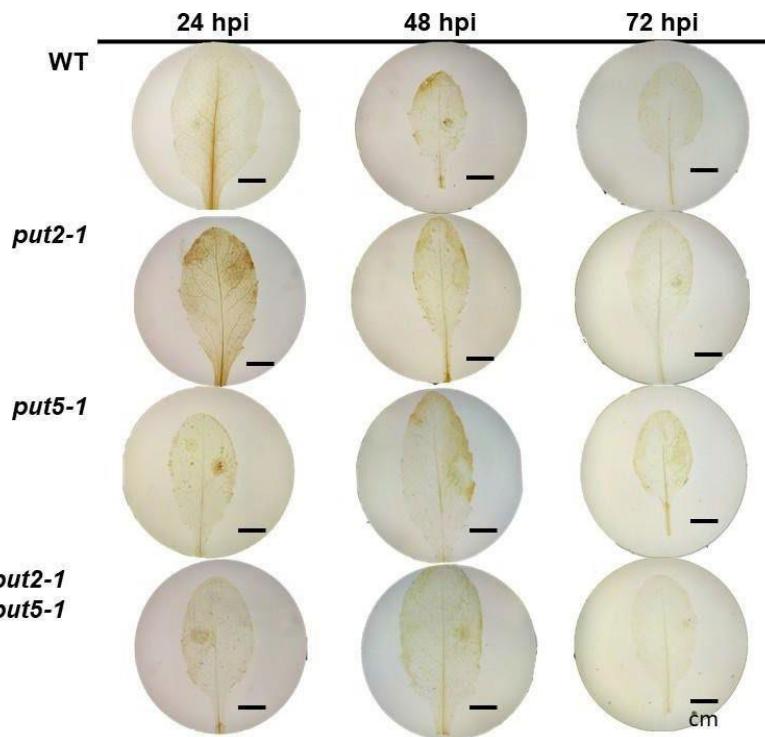


Figura 23. Detección histoquímica de H_2O_2 mediante tinción de 3,3-diaminobenzidina (DAB) en plantas de *A. thaliana* del ecotipo WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* inoculadas con *B. cinerea* a las 24, 48 y 72 hpi. Se utilizaron plantas de 30 días de edad. Se empleó un total de 20 réplicas biológicas por tratamiento. Se mostraron imágenes representativas de cada tratamiento.

7.9.3- Detección histoquímica de O_2^- mediante tinción de NBT

Se analizó la producción *in situ* de O_2^- mediante la detección histoquímica NBT en plantas WT y las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* inoculadas con el patógeno *B. cinerea*. Los análisis evidenciaron que el ecotipo WT presentó una tinción localizada en el sitio de la inoculación con el patógeno (24 hpi) (Fig. 24), sin embargo, esta señal fue más intensa en la línea mutante *put5-1* (24 hpi). En la línea mutante *put2-1* se observó una tinción localizada en el sitio de infección (24 y 48 hpi); sin embargo, alrededor del sitio de infección no se detectó tinción (Fig. 24). Adicionalmente, se observó que el ecotipo WT mostró una tinción pronunciada del lado contrario al sitio de inoculación; sin embargo, esto no se observó a las 48 hpi (Fig. 24). La línea mutante *put2-1* también presentó una tinción pronunciada en el ápice y base de la hoja y del lado izquierdo a las 24 y 48 hpi (Fig. 24). Respecto a la línea mutante *put5-1* sólo se observó la tinción en toda la hoja y alrededor de la lesión a las 24 hpi (Fig. 24).

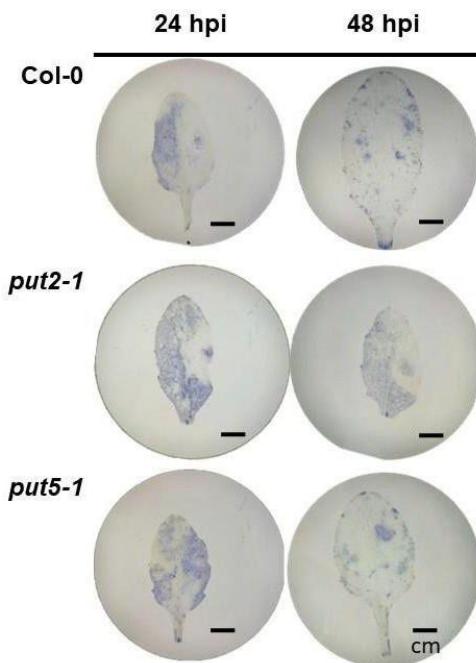


Figura. 24. Detección histoquímica de O_2^- mediante tinción de NBT en plantas de *A. thaliana* del ecotipo WT y las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* inoculadas con *B. cinerea* a las 24, 48 hpi. Se utilizaron plantas de 30 días de edad. Se utilizaron un total de 20 réplicas biológicas por tratamiento. Barra de escala = 1 cm. Se mostraron imágenes representativas de cada tratamiento.

7.10. Determinación de la actividad catalasa y ascorbato peroxidasa

La detoxificación de los niveles de EROs durante eventos de estrés biótico en las plantas está regulada en parte por la actividad de enzimas antioxidantes (Sahebani & Hadavi, 2009). Dado que las líneas mutantes *put* presentaban alteraciones en el contenido de EROs respecto a la WT, se decidió cuantificar la actividad de algunas enzimas antioxidantes, tales como, CAT y APX con el objetivo de determinar si existían cambios en su actividad.

7.10.1 Determinación de la actividad catalasa

Se determinó la actividad de la enzima catalasa (CAT), implicada en la detoxificación de H_2O_2 (Anjum et al., 2016) en plantas WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y la *put2-1 put5-1* sin inocular e inoculadas con *B. cinerea*. La WT y la línea mutante *put2-1* mostraron niveles similares de actividad CAT cuando se inocularon con mock (Fig. 25a), mientras que la mutante *put5-1* y la doble mutante

put2-1 put5-1 evidenciaron una mayor actividad en comparación con la WT (**Fig. 25a**). Posteriormente, a las 48 h bajo condiciones control no se detectaron diferencias entre la WT y las mutantes *put* (**Fig. 25a**).

Después de inocular con *B. cinerea*, se observaron diferencias importantes entre la WT y las mutantes *put*. Por ejemplo, a las 24 hpi las plantas WT incrementan la actividad enzimática CAT (**Fig. 25a**), sin embargo, la mutante *put2-1* y la línea doble mutante *put2-1 put5-1* no mostraron este aumento y en el caso de la *put5-1* se observó una reducción en comparación con el mock (**Fig. 25a**). Posteriormente, no se detectaron diferencias en la actividad CAT en la WT y las líneas mutantes *put5-1* y la *put2-1 put5-1* después de inocular con *B. cinerea* (**Fig. 25a**). Sin embargo, la línea mutante *put2-1* si presentó una reducción en la actividad CAT (**Fig. 25a**). Esta menor actividad CAT en *put2-1* podría estar relacionada con la mayor acumulación de H₂O₂ que presenta dicha mutante después de inocular con *B. cinerea* (**Fig. 25a**).

7.10.2 Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa

Otra de las enzimas implicadas en la detoxificación del H₂O₂ es la APX. A diferencia de la CAT, su actividad puede ser inducida a concentraciones muy bajas de H₂O₂ y utiliza ascorbato como donador de electrones específico (Yoshimura & Ishikawa, 2024). Inicialmente, se observó que a las 24 h en condiciones mock las líneas mutantes *put* tienen mayor actividad APX que la WT (**Fig. 25b**), sin embargo, posteriormente ya no se detectó alguna diferencia bajo condiciones control (Mock) (48 hpi) (**Fig. 25b**). Después de la inoculación con *B. cinerea* se observó un incremento en la actividad APX en plantas WT (24 hpi) (**Fig. 25b**), mas no en las mutantes *put* (**Fig. 25b**). A las 48 hpi no se detectaron incrementos en la actividad APX en la WT ni en las mutantes *put* inoculadas con *B. cinerea* (**Fig. 25b**).

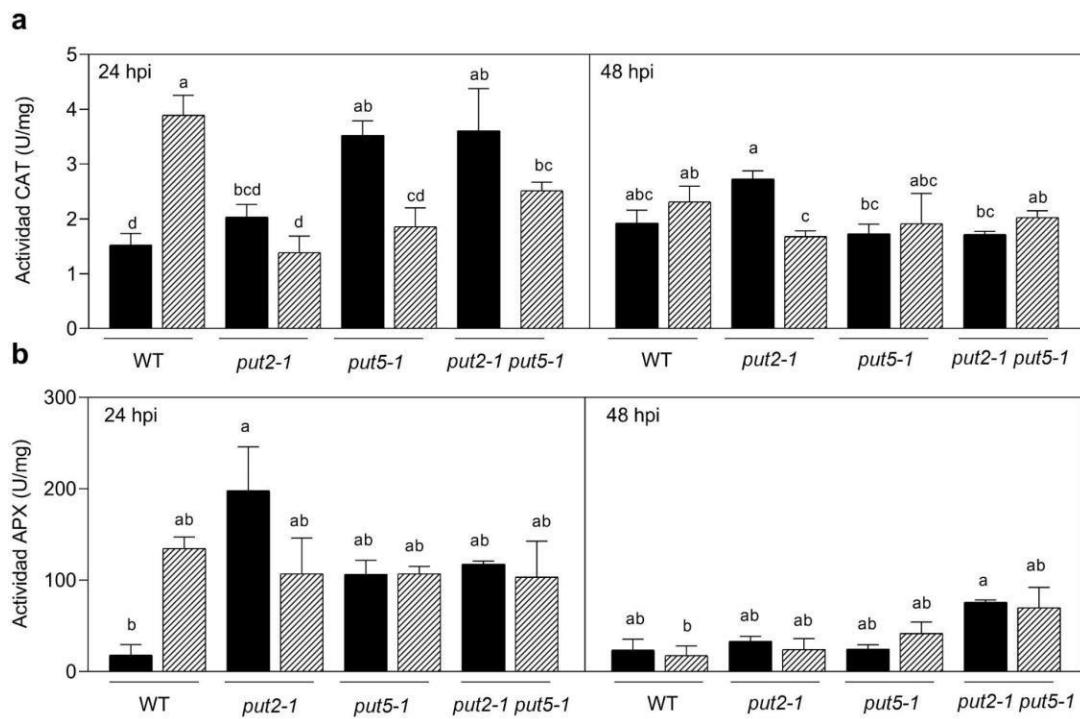


Figura 25. Actividad enzimática catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) en hojas de plantas WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* y *put2-1 put5-1* infectadas por *B. cinerea*. Se utilizaron hojas de plantas de treinta días, las cuales fueron inoculadas con 5 μ L de una suspensión de esporas de *B. cinerea* (5×10^5 esporas/mL). Se colectaron muestras a las 24 y 48 hpi. A) La actividad de CAT se estimó con base en la tasa de descomposición de H_2O_2 a 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). B) La actividad de APX se determinó con base en la disminución de la absorbancia a 290 nm debida a la oxidación del ascorbato. Las barras representan la media \pm DE ($n = 3$). La significancia estadística de las diferencias en la actividad CAT y APX entre los diferentes tratamientos en el mismo punto de tiempo se denotó por diferentes letras ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Fisher LSD. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

7.11. El perfil de expresión de los genes marcadores de ET/JA y SA muestra variaciones en las líneas mutantes *put* infectadas con *B. cinerea*

La regulación de la respuesta de defensa de las plantas es compleja, e involucra a diversas vías metabólicas conectadas entre sí. Algunas de tales vías son las implicadas en la producción de hormonas tales como el SA, el ET y el JA (Pieterse et al., 2012). Por otra parte, la acumulación de EROs y cambios en el estado REDOX también desempeñan funciones regulatorias clave, y ambas vías a su vez interactúan con el metabolismo de poliaminas. Por lo tanto, se consideró pertinente evaluar si las mutantes *put* presentaban alteraciones en vías de señalización hormonal implicadas en la defensa. Para ello se analizó la expresión de algunos genes marcadores de las vías de señalización del SA (*PR1*) y ET/JA. (*PDF1.2*, *PR3*, *ACS2*), después de inocular plantas con *B. cinerea*. La expresión del gen *PR1* fue mayor en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* en comparación con la WT en condiciones control (mock) (**Fig. 26d**). En la WT al igual que en *put5-1*, la expresión de *PR1* incrementó en respuesta a *B. cinerea* (**Fig. 26d**) mientras que en la mutante *put2-1*, disminuyó en forma pronunciada. Posteriormente, se analizó la expresión del gen *PDF1.2* y se determinó que presentó mayores niveles de expresión en las mutantes *put2-1* y *put5-1* que la WT en el mock (**Fig. 26b**), sin embargo, posterior a la inoculación con *B. cinerea* se observó que su expresión incrementó tanto en la WT como en las mutantes *put* (**Fig. 26b**). Adicionalmente, se observó que la línea mutante *put2-1* presentó mayores niveles de expresión que la WT y la *put5-1* (**Fig. 26b**). También se evaluaron los niveles de expresión del gen *PR3* (*Pathogenesis Related Protein 3*), los resultados indicaron que su expresión fue mayor en la línea mutante *put2-1* en comparación con la WT en los controles inoculados con mock (**Fig. 26c**), mientras que en *put5-1* la expresión fue menor que la WT (**Fig. 26c**). Posteriormente se observó que la infección con *B. cinerea* indujo un incremento significativo en la expresión de *PR3* tanto en la WT como en los mutantes *put* (**Fig. 26c**). Finalmente, se detectó que bajo condiciones control (mock) la expresión del gen *ACS2* en la línea mutante *put2-1* fue superior a la de la línea WT, mientras que ocurrió lo contrario en la línea *put5-1* (**Fig. 26a**). Después de la inoculación con *B. cinerea* tanto las plantas WT como la línea mutante *put5-1* mostraron un aumento en la expresión de *ACS2*, mientras que la *put2-1* exhibió una disminución significativa en su expresión (**Fig. 26a**).

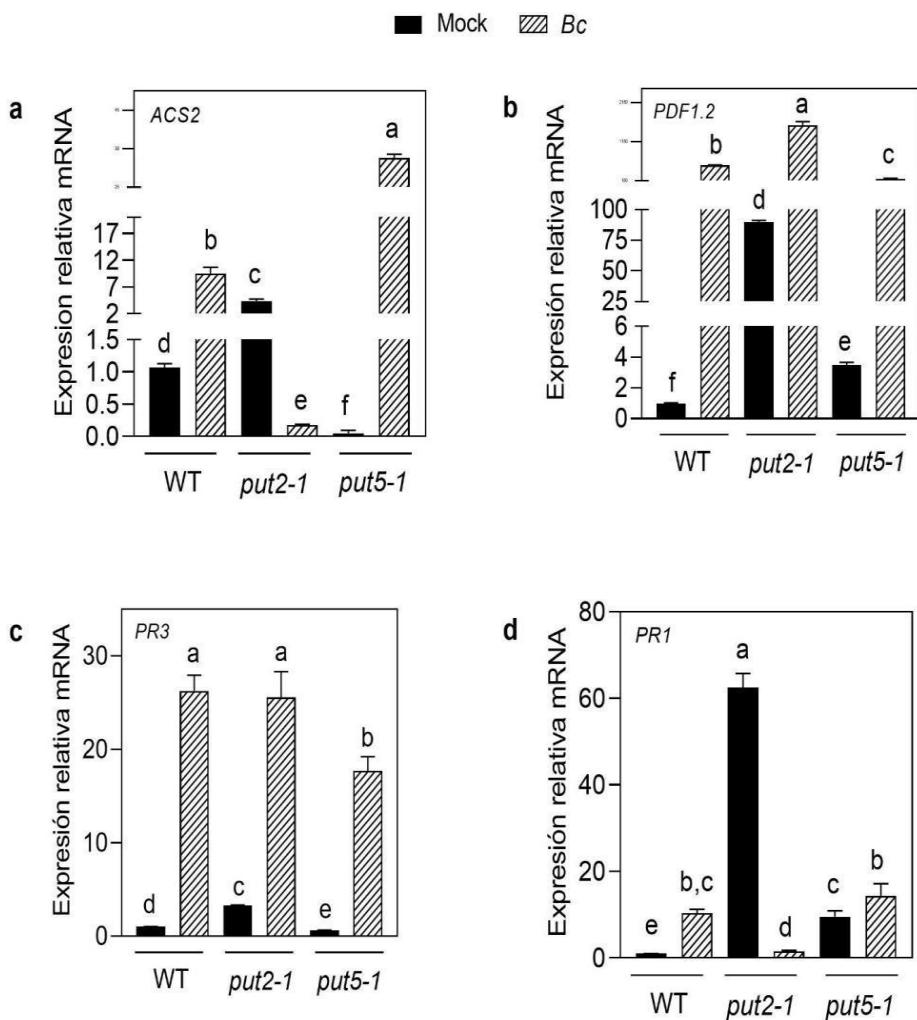


Figura. 26. Expresión de genes marcadores de las vías de señalización mediadas por ET/JA y SA en plantas de *A. thaliana* WT y las líneas mutantes *put2-1*, *put5-1* inoculadas con *B. cinerea*. a) ACS2, b) PDF1.2, c) PR3, y d) PR1. Se inocularon hojas de la roseta de plantas de 30 días de edad con 5 μ L de una suspensión conidial de *B. cinerea* (5×10^5 esporas/mL), las muestras se colectaron a las 24 horas post-inoculación. Los valores de expresión génica fueron normalizados con respecto al gen de referencia *EF1 α* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los controles utilizados fueron normalizados con respecto a uno. Los valores son medias de tres réplicas biológicas \pm SE. La significancia estadística de las diferencias en la expresión génica entre los diferentes genotipos en el mismo punto de tiempo se denotó por diferentes letras ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Fisher LSD. Los experimentos fueron repetidos tres veces, obteniendo resultados similares. Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

7.12. La expresión del gen *PUT2* se observa predominantemente alrededor del sitio de infección del hongo *B. cinerea*

Tomando como referencia que el gen *PUT2* responde transcripcionalmente a la inoculación con el patógeno *B. cinerea* (Fig. 9), además que la línea sobreexpresora 35S::*PUT2* presentó mayor resistencia contra la infección por *B. cinerea* (Fig. 16) se decidió explorar la expresión del gen *PUT2* de forma tejido-específica para determinar si presenta algún patrón característico en respuesta a la infección causada por *B. cinerea*. Las hojas inoculadas con mock presentaron una señal homogénea de GUS desde la zona de la base hasta el ápice de la hoja en todos los tiempos analizados (Fig. 27), siendo más intensa esta señal a las 48 h (Fig. 27). En hojas inoculadas con *B. cinerea* se observó que la señal de GUS es intensa y se localizó principalmente alrededor del sitio de infección a las 24 y 48 hpi (Fig. 27), limitando claramente la lesión causada por el hongo, mientras que, a las 72 hpi la señal de GUS fue débil alrededor del sitio de infección debido a que las hojas presentaban una necrosis extendida a causa del progreso de la infección (Fig. 27).

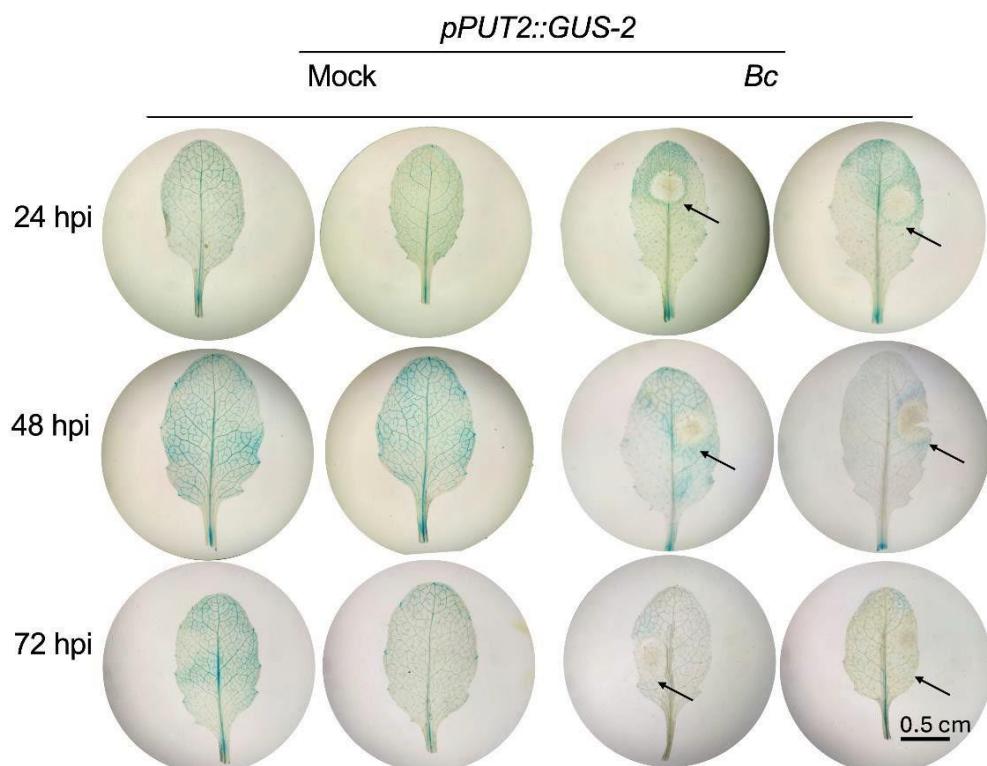


Figura 27- Expresión de la línea reportera pPUT2::GUS-2 en hojas infectadas por *B. cinerea*. Imágenes representativas de hojas infectadas de la línea reportera pPUT2::GUS-2 en plantas de control e infectadas por *B. cinerea*. Se utilizaron plantas de 30 días de edad y un total de 20 réplicas biológicas por tratamiento. El color azul revela la tinción histoquímica de GUS. La flecha negra indica la lesión fungica. Barra de escala = 0,5 cm.

Imagen tomada y modificada de Peña-Lucio et al. 2025.

8. DISCUSIÓN

Actualmente se conocen cinco transportadores de poliaminas en *A. thaliana* los cuales pertenecen a la familia de transportadores PUT (“*Polyamine Uptake Transporters*”) (Fujita & Shinozaki, 2015). Estos transportadores participan en la movilización de poliaminas (Begam & Good, 2017) y son cruciales para la homeostasis de dichos metabolitos en las plantas (Ahmed et al., 2017). Nuestro grupo de investigación ha estudiado la participación del transporte de poliaminas bajo estrés biótico, utilizando dos patógenos: en respuesta a la infección por *B. cinerea* (Peña et al., 2025) y a *Pst DC3000* (Flores-Hernández et al., 2025). Adicionalmente, otros grupos de investigación han generado información que asocia al transporte de poliaminas con la respuesta al estrés abiótico (Chai et al., 2020; Shen et al., 2016). Se ha reportado que las proteínas integrales de membrana plasmática PUT3 y SOS1 forman un complejo con la proteína quinasa SOS2 en respuesta a condiciones de estrés salino para modular la actividad de transporte de PUT3 mediante interacciones proteína-proteína y fosforilación (Chai et al., 2020). Además, se ha descrito que el transportador PUT3 juega un rol importante en la estabilización de mRNA de genes de respuesta al estrés por calor (Shen et al., 2016).

En el presente estudio, se encontró que los genes *PUT1-PUT5* se inducen en respuesta a la infección por *B. cinerea* (**Fig. 9**). El perfil de expresión de los genes *PUT* presento variaciones dependiendo de la progresión de la enfermedad, por ejemplo, los genes *PUT1*, *PUT2*, *PUT3* y *PUT4* se indujeron en las horas tempranas de la infección (**Fig. 9**), sin embargo, el gen *PUT5* se indujo principalmente cuando la enfermedad había avanzado (**Fig. 9**). Similarmente, se ha reportado que la expresión del gen *PUT2* se indujo en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Pst DC3000* (Flores-Hernández et al., 2025). Adicionalmente, otros estudios han indicado que los genes *PUT* responden transcripcionalmente a condiciones de estrés abiótico (Chai et al., 2020; Shen et al., 2016; Sagor et al.,

2016; Zhong et al., 2023). El gen *LHR1/PUT3* está asociado con la regulación de la respuesta al estrés salino (Chai et al., 2020). Además, se ha reportado que el gen *PUT3* es regulado negativamente en condiciones de estrés por calor (Sagor et al., 2016). En otro estudio, se analizó la expresión de miembros de la familia génica *PUT* en plantas de *S. lycopersicum* (Zhong et al., 2023) y se observó que el transcripto del mRNA de los genes *PUT1-PUT5* se indujo rápidamente después de su exposición al estrés por sequía (Zhong et al., 2023). Adicionalmente, en ese mismo estudio se reportó que la expresión de los genes *PUT1*, *PUT2* y *PUT5* fue regulada positivamente bajo condiciones de estrés salino (Zhong et al., 2023); además, la expresión del gen *PUT4* fue inducida después de someter a las plantas a estrés por frío (Zhong et al., 2023). En conjunto, el presente trabajo de tesis y los antecedentes mostrados demuestran la participación de los genes *PUT* en la respuesta de defensa de la planta durante eventos de estrés biótico y abiótico.

En el presente estudio se observó que la pérdida de función de los genes *PUT2* y *PUT5* afecta la respuesta de defensa de la planta frente a *B. cinerea* (**Fig. 10 y Fig. 11, respectivamente**), mientras que la sobreexpresión del gen *PUT2* generó resistencia de la planta *Arabidopsis* al ataque del hongo (**Fig. 13**). Otro estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio reportó que el transportador de poliaminas *PUT2* es esencial para el establecimiento de la SAR en *Arabidopsis* (Flores-Hernández et al., 2025). Resultó interesante que en dicho estudio se reportó que la línea mutante *put2-1* mostró deficiencia para establecer la SAR, debido a que, mostró títulos bacterianos más altos en hojas sistémicas en comparación con plantas WT (Flores-Hernández et al., 2025). Por otro lado, en ese mismo estudio se verificó que la línea sobreexpresora del gen *PUT2* (35S::*PUT2*) mostró resistencia contra la infección por *Pst DC3000*, debido a que mostró títulos bacterianos similares a los de las plantas WT en hojas distales (Flores-Hernández et al., 2025). La disrupción del transporte de poliaminas en las líneas mutantes *put2-1* y *put5-1* afectó la respuesta de defensa de la planta contra diferentes patógenos, además la sobreexpresión del gen *PUT2* indujo mayor resistencia contra la infección de *B. cinerea* y *Pst DC3000* indicando que el transporte de poliaminas influye en los mecanismos para el establecimiento de la respuesta de defensa de *Arabidopsis*.

De manera general la suplementación con poliaminas disminuyó el tamaño

de lesión generado por *B. cinerea* en plantas WT (**Fig. 14, 15 y 16**), lo cual es consistente con lo previamente reportado (van Rensburg et al., 2021). Sin embargo, en las líneas mutantes este resultado tuvo variaciones, debido a que, en algunos casos la suplementación no generó ningún efecto benéfico, detectándose tamaños de lesión similares a los controles sin suplementar (**Fig. 14, 15 y 16**). Se ha reportado que la suplementación con Spd y Spm (1, 2 y 5 mM) imprime resistencia contra *B. cinerea* en *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *Phaseolus vulgaris* mediante la regulación de la respuesta oxidativa/antioxidante y la modulación de las vías de señalización hormonal (Seifi et al., 2019). Asimismo, la suplementación con Spd y Spm puede promover la actividad antioxidante de algunas enzimas como catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (van Rensburg et al., 2021). Posiblemente, la disrupción del transporte de poliaminas en las líneas mutantes *put* afecta su importe y redistribución generando una reducción del efecto benéfico que provee el tratamiento con poliaminas; sin embargo, sería importante cuantificar los niveles de poliaminas en cada compartimento celular para determinar de forma más específica donde se presenta esta acumulación y correlacionarla con la ubicación espacial de estos transportadores.

Dado que la suplementación con poliaminas no generó el mismo efecto benéfico en las líneas mutantes *put* que en la WT, se hipotetizó que la disrupción del transporte de poliaminas podría afectar la homeostasis de poliaminas y, en consecuencia, afectar los niveles de poliaminas en estas líneas. Se determinó el contenido de poliaminas (Put, Spd y Spm) en condiciones control y suplementadas con Spd y Spm, así como, después de inocular con *B. cinerea* y en ensayos combinados de suplementación e inoculación con *B. cinerea* (**Fig. 19 y 20**). Inicialmente, se analizaron los controles sin la adición de poliaminas y se observó que las líneas mutantes *put* mostraron niveles mayores de algunas poliaminas, tales como, Spm (**Fig. 19c**). En otro estudio se reportó que la línea mutante *put2-1* presentó mayor contenido de Spm bajo condiciones basales (Flores-Hernández et al., 2025). Adicionalmente, Kim et al., 2019 reportaron que semillas de plantas de la línea mutante *put2-1* presentaban mayores niveles de Spd y Spm. El aumento en el contenido de poliaminas en plantas deficientes del transporte de estas moléculas podría asociarse con una deficiencia en la redistribución a nivel celular, así mismo,

con fallas en su metabolismo como consecuencia de las alteraciones en su mobilización.

Los ensayos de suplementación evidenciaron que los transportadores PUT mobilizan preferencialmente Spd, dado que la suplementación con Spm incrementó los niveles de Spm tanto en WT como en las mutantes *put* (**Fig. 19c**); sin embargo, la suplementación con Spd no afectó los niveles endógenos de Spd en mutantes *put*, en comparación con plantas WT (**Fig. 19b y 20b**). Interesantemente, se ha reportado que los transportadores de poliaminas PUT transportan preferencialmente Spd (Mulangi et al., 2012). Otro estudio reportó que la línea mutante *put2-1* presentaba deficiencias en el transporte de Put, debido a que posterior a la infiltración con Put no se observó un aumento en la concentración de Put en hojas sistémicas en comparación con plantas WT (Flores-Hernández et al., 2025). Estos resultados indican que los transportadores PUT son esenciales para mantener la homeostasis de poliaminas a nivel celular, así mismo, la ausencia de estos puede afectar su importe y modificar su contenido.

La inoculación y suplementación con poliaminas indujo un incremento en el contenido de poliaminas en plantas WT y las líneas mutantes *put*, sin embargo, esta acumulación fue mayor en las líneas mutantes (**Fig. 19 y 20**). Similarmente, se ha indicado que posterior a la infección con *Pst DC3000* se presentó un incremento del contenido de Spm en la línea mutante *put2-1* comparado con WT (Flores-Hernández et al., 2025). Esto refuerza la hipótesis que la deficiencia del transporte de poliaminas afecta la homeostasis de poliaminas, lo cual, puede disminuir la disponibilidad de estos metabolitos a nivel celular, impactando en otros procesos como su catabolismo y en consecuencia alterar eventos de señalización para el establecimiento de la respuesta inmune vegetal.

Las EROs son producidas en la planta bajo diferentes condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico, y están asociadas con la señalización para el establecimiento de la respuesta de defensa vegetal. Dentro de las diferentes EROs se encuentran el H_2O_2 y el O_2^- , las cuales juegan un rol importante en la respuesta de estrés biótico, debido a que funcionan principalmente como moléculas mensajeras que activan la expresión de genes de defensa, así como, algunas vías de señalización hormonal (Liu et al., 2019; Moschou et al., 2012). De manera

general se observó que los niveles de H_2O_2 fueron similares tanto en las mutantes *put* como en la WT después de inocular con *B. cinerea* (**Fig. 22**), aunque la línea mutante *put2-1* exhibió una mayor concentración de H_2O_2 , así como, una disminución en su actividad CAT comparado con WT (**Fig. 25a**). La tinción histoquímica de DAB en la línea mutante *put2-1* también indicó una mayor presencia de H_2O_2 en el sitio de inoculación y alrededor de la lesión (**Fig. 23**). Adicionalmente, no se encontró un patrón distinto en la detección O_2^- en las mutantes *put* comparado con WT, a excepción de la mutante *put5-1* la cual evidenció mayor acumulación de O_2^- tanto en el sitio de infección como alrededor de ella (**Fig. 24**). La acumulación de EROs puede generar toxicidad y en consecuencia afectar la respuesta inmune de las plantas (Sewellam et al., 2014). Adicionalmente, se ha reportado que la acumulación de EROs contribuye al desarrollo de la infección causada por *B. cinerea* en hojas de plantas de tabaco (Rossi et al., 2017). Estos incrementos en los niveles de H_2O_2 pueden exacerbar la respuesta hipersensible del hospedero, beneficiando la colonización del patógeno y el establecimiento de la muerte celular en el sitio de infección (Govrin & Levine, 2000; Rossi et al., 2017). Las líneas mutantes *put* presentaron mayor actividad CAT y APX bajo condiciones mock (**Fig. 25a, b**), lo cual podría indicar que estas líneas mutantes presentan una alteración en el metabolismo de EROs. Debido a que las líneas mutantes *put* presentan un desbalance en el contenido de poliaminas esto puede afectar otros procesos, tales como su catabolismo induciendo cambios en el contenido de algunas EROs, tales como, H_2O_2 y O_2^- afectando a su vez otros procesos de señalización a nivel celular.

Los niveles de poliaminas en las plantas están regulados por diferentes procesos, tales como su biosíntesis y catabolismo (Baron & Stasolla, 2008). El catabolismo de las poliaminas está mediado por diferentes enzimas, por ejemplo, las DAOs (Angelini et al., 2010) y las PAOs (Tavladoraki et al., 2012). La actividad PAO ha sido estrechamente vinculada con la modulación de la respuesta de defensa de la planta frente al ataque por patógenos (Wang et al., 2019). La actividad PAO se ve notablemente afectada en las líneas mutantes *put* tras la infección con *B. cinerea* (**Fig. 21**). Consistentemente, las líneas mutantes *put* mostraron mayores áreas de lesión después de inocular con *B. cinerea* (**Fig. 10**). Similarmente, en otro

estudio se reportó que la reducción de la actividad PAO contribuyó al desarrollo de tumores en la planta *Ustilago maydis* (Jasso-Robles et al., 2015). Posiblemente los cambios la actividad de catabolismo de poliaminas altera otros procesos como la generación de moléculas de señalización, tales como, el H₂O₂ (**Fig. 22**), lo cual induce alteraciones en los procesos de señalización celular afectando los mecanismos de establecimiento de la respuesta de defensa vegetal.

Las vías de señalización hormonal pueden activarse simultáneamente y trabajar en conjunto para detener el avance de los patógenos (Pieterse et al., 2012). Generalmente, el aumento en el contenido de JA se ha asociado con el aumento de la resistencia contra *B. cinerea* (Zhang et al., 2023). Similarmente, la acumulación de Et en plantas de tomate promovió el incremento de la resistencia contra *B. cinerea* (Cui et al., 2024). En nuestro estudio se observó que la expresión de algunos genes marcadores de vías de señalización del SA y Et/JA fueron regulados negativamente (**Fig. 26**). En otro reporte se realizó un análisis por RNA-seq en la línea mutante *put2-1* infiltrada con *Pst DC3000* y se observó que los genes relacionados con la biosíntesis y señalización de SA estaban desregulados (Flores-Hernández et al., 2025). Adicionalmente, también se reportó que genes asociados con las vías de señalización del JA/Et fueron regulados negativamente y esto en que impacta, falta discutir o decir algo (Flores-Hernández et al., 2025). En un estudio realizado en plantas de tomate infectadas con *B. cinerea*, se observó que la sobreexpresión del gen *SPMS* incrementó el contenido de Spm afectando la vía de síntesis del Et y aumentando la susceptibilidad de la planta contra la infección (Nambeesan et al., 2012). Por otro lado, la línea mutante *Arabidopsis spms*, la cual presentó menores niveles de Spm y acumulación de JA, presentó un fenotipo de resistencia contra *B. cinerea* (Zhang et al. 2023). Estos cambios en la regulación de los genes marcadores de las vías de señalización hormonal en las mutantes *put* afectan la modulación de la respuesta inmune vegetal. La disruptión de los genes de transportadores de poliaminas afecta la expresión de genes marcadores de vías de señalización hormonal. El cambio en los niveles de poliaminas que presentan estas mutantes *put* demuestran que existen alteraciones en su metabolismo y de acuerdo con lo reportado previamente por Nambeesan et al., 2012, donde la alteración en el contenido de Spm afectó la síntesis de JA, se podría hipotetizar que

los cambios en el contenido de algunas poliaminas en las mutantes *put* induce alteraciones en la síntesis de algunas hormonas, así como cambios en los perfiles de expresión de genes marcadores de las vías de SA y JA/ET.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se determinó que los genes *PUT2* y *PUT5* son cruciales para la respuesta de defensa de *A. thaliana* contra *B. cinerea*. La expresión de los cinco genes *PUT* de *Arabidopsis* es modulada por *B. cinerea* en distintos tiempos de la interacción, sugiriendo un rol importante del transporte de poliaminas en la defensa vegetal. Se determinó que las líneas mutantes de los genes *PUT2* y *PUT5* son más susceptibles a *B. cinerea*, mientras que la sobreexpresión de *PUT2* (35S::*PUT2*) confiere resistencia. El ensayo de suplementación con algunas poliaminas indicó que el efecto positivo que genera la suplementación no se presentó con la misma magnitud en las líneas mutantes *put* que en la WT. La disrupción del transporte induce cambios en el importe de poliaminas, afectando la disponibilidad de estas poliaminas a nivel celular. Las líneas mutantes mostraron alteraciones en el contenido de poliaminas, posiblemente la ausencia del transporte afecta su importe y redistribución durante eventos de estrés biótico. El estatus redox en las líneas mutantes presenta alteraciones; asimismo, la actividad PAO disminuyó, lo cual afecta otros procesos como la señalización y activación de otros mecanismos de defensa en respuesta al ataque de *B. cinerea*. La ausencia del transporte de poliaminas afectó la expresión de genes marcadores de las vías de señalización hormonal.

Es necesario realizar más ensayos para comprender los mecanismos específicos mediante los cuales el transporte de poliaminas participa en el establecimiento de la respuesta de defensa vegetal de *A. thaliana* contra *B. cinerea*. Por ejemplo, se podría medir la tasa de absorción de algunas poliaminas, tales como Spd, Spm y Put, en las mutantes *put* y compararlas con plantas WT para determinar si existen cambios en las tasas de absorción. Además, sería interesante cuantificar las poliaminas en cada compartimento celular y determinar si existen alteraciones en la homeostasis de las poliaminas como consecuencia de la disrupción de algún transportador. Sería importante también generar una línea sobreexpresora y reportera del gen *PUT5* para determinar su fenotipo y expresión tejido-específica después de inocular con *B. cinerea*. Adicionalmente, se propone medir el contenido de algunas hormonas como SA, JA y ET y asociarlo con los resultados de los niveles de expresión de los genes marcadores de señalización

hormonal. Finalmente, sería interesante realizar un análisis del contenido de aminoácidos en las líneas mutantes *put* antes y después de inocular con *B. cinerea* para determinar si la susceptibilidad que presentan estas líneas también podría estar influenciada por cambios en el contenido de aminoácidos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulhussein, A. A., & Wallace, H. M. (2014). Polyamines and membrane transporters. *Amino Acids* (Vol. 46, Issue 3, pp. 655–660). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1553-6>
- Aftab T, Yusuf M (2021). Jasmonates and salicylates signaling in plants. Springer Cham. *Signaling and Communication in Plants*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-75805-9>
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology (5a ed.). Elsevier Academic Press.
- Ahmed, S., Ariyaratne, M., Patel, J., Howard, A. E., Kalinoski, A., Phuntumart, V., & Morris, P. F. (2017). Altered expression of polyamine transporters reveals a role for spermidine in the timing of flowering and other developmental response pathways. *Plant Science*, 258, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.12.002>
- Alberts, Bruce., Bray, Dennis., Lewis, Julian., Watson, J. D., Raff, Martin., & Roberta, Keith. (2002). *Molecular biology of the cell 4th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>.
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P., Tisi, A., 2010. Plant amine oxidases “on the move”: an update. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 560-564. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.001>.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Kaushik, M., Hasanuzzaman, M., Pereira, E., Tuteja, N., & Ahmad, I. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase representative H_2O_2 detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19002–19022. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>.
- Asai, T. et al. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977–983. <https://doi.org/10.1038/415977a>.
- Bagni, N., & Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *In Amino Acids* (Vol. 20, Issue 3, pp. 301–317). <https://doi.org/10.1007/s007260170046>
- Begam, R. A., D'entremont, J., & Good, A. (2020). The *Arabidopsis* L-Type Amino Acid Transporter 5 (LAT5/PUT5) Is Expressed in the Phloem and Alters Seed Nitrogen Content When Knocked Out. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1519, 9(11), 1519. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9111519>

- Begam, R. A., & Good, A. G. (2017). The *Arabidopsis* paraquat resistant1 mutant accumulates leucine upon dark treatment. *Botany*, 95(7), 751–761. <https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0321>.
- Bergelson, J., & Roux, F. (2010). Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 11(12), 867–879. <https://doi.org/10.1038/nrg2896>
- Bitrián, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A. F., & Alcázar, R. (2012). Polyamines under abiotic stress: Metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. In *Metabolites* (Vol. 2, Issue 3, pp. 516–528). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo2030516>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. In *Trends in Plant Science* (Vol. 28, Issue 2, pp. 211–222). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Blázquez, M. A. (2024). *Annual Review of Plant Biology Polyamines: Their Role in Plant Development and Stress*. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070623>
- Brauc, S., Vooght, E.D., Claeys, Geuns, J.M.C., Hooft, M., Angenon, G., 2012. Overexpression of arginase in *Arabidopsis thaliana* influences defense responses against *Botrytis cinerea*. *Plant Biol.* 14, 39–45. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00520.x>.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140: 103–125. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00218-0).
- Buchanan, B. B., Grussem, W., & Jones, R. L. (2015). Biochemistry & molecular biology of plants (2a ed.). Wiley Blackwell / American Society of Plant Biologists.
- Caiza, V. (2013). Colección, identificación y Pruebas de Eficacia in vitro de (Trichoderma sp.) en el control biológico de *Botrytis cinerea* en la Finca Florícola Picasso Roses. Universidad Politecnica Salesiana. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/5073>.
- Chai, H., Guo, J., Zhong, Y., Hsu, C. C., Zou, C., Wang, P., Zhu, J. K., & Shi, H. (2020). The plasma-membrane polyamine transporter PUT3 is regulated by the Na^+/H^+ antiporter SOS1 and protein kinase SOS2. *New Phytologist*, 226(3), 785–797. <https://doi.org/10.1111/nph.16407>.

- Chávez Martínez, A. I., Jasso Robles, F. I., Rodríguez Kessler, M., Sarvajeet S., G., Becerra Flora, A., & Juan Francisco, J. B. (2018). Down-regulation of arginine decarboxylase gene-expression results in reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(4), 1071–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.165>
- Cohen, S. S. (1998). *A guide to the polyamines*. Oxford University Press, Ed.
- Collado, I. G., Aleu, J., Hernández-Galán, R., & Durán-Patrón, R. (2000). Botrytis Species: An Intriguing Source of Metabolites with a Wide Range of Biological Activities. Structure, Chemistry and Bioactivity of Metabolites Isolated from Botrytis Species. In *Current Organic Chemistry* (Vol. 4). <https://doi.org/10.2174/1385272003375815>.
- Cui Z, Jiang Y, Chen Y, Cheng X, Tan B, Cheng J, Zhang L, Ye X, Wang X, Li Z, Zheng X, Feng J, Wang W (2024) Overexpressing peach PpePAO1 gene improves the nutrient value of tomato and enhances resistance against *Botrytis cinerea*. *Postharvest BiolTechnol* 211:112792. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.112792>.
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: A plant defense hormone. *Trends in Plant Science*. 25(6), 549-565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>.
- Dinh, S. et al. (2011) Histology of waxflower (*Chamelaucium* spp.) flower infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 60, 278–287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02347.x>
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45(4), 616–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x>.
- Elad, Y. (1991). An inhibitor of polyamine biosynthesis-difluoromethylornithine-and the polyamine spermidine for the control of gray mold (*botrytis cinerea*). *Phytoparasitica*, 19(3), 201–209. <https://doi.org/10.1007/BF02981118>.
- Escudero, V., Torres, M. Á., Delgado, M., Sopeña-Torres, S., Swami, S., Morales, J., Muñoz-Barrios, A., Mélida, H., Jones, A. M., Jordá, L., & Molina, A. (2019). Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 (MKP1) Negatively Regulates the Production of Reactive Oxygen Species During *Arabidopsis* Immune Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 32(4), 464–478.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0217-FI>.

- Fincato, P., Moschou, P. N., Spedaletti, V., Tavazza, R., Angelini, R., Federico, R., Roubelakis-Angelakis, K. A., & Tavladoraki, P. (2011). Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 1155–1168. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq341>
- Flores-Hernández, E., Gonzalez, M. E., Alvarado-Guitron, P., Jasso-Robles, F. I., Ovando-Vázquez, C., Jiménez-Bremont, J. F., Ćavar Zeljković, S., Ulrichová, M., de Diego, N., & Rodríguez-Kessler, M. (2025). Polyamine uptake transporter 2 is essential for systemic acquired resistance establishment in *Arabidopsis*. *Plant Stress*, 18, 101046. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2025.101046>.
- Fluhr R, Mattoo AK (1996) Ethylene-biosynthesis and perception. *Crit Rev Plant Sci* 15: 479–523. <https://doi.org/10.1080/07352689609382368>.
- Fortes, A. M., & Agudelo-Romero, P. (2018). Polyamine metabolism in climacteric and non-climacteric fruit ripening. *Methods in Molecular Biology*, 1694, 433–447. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_36
- Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2012a). Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6343–6347. DOI: 10.1073/pnas.1121406109.
- Fujita, M., & Shinozaki, K. (2014). Identification of Polyamine Transporters in Plants: Paraquat Transport Provides Crucial Clues. *Plant and Cell Physiology*, 55(5), 855–861. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCU032>.
- Fujita, M., & Shinozaki, K. (2015). Polyamine Transport Systems in Plants. *Polyamine Transport Systems in Plants*, 179–185. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55212-3>
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., & Farmer, E. (2010). Jasmonate Biochemical Pathway. *Plant Biology*, 3(109). <https://doi.org/10.1126/scisignal.3109cm3>.
- Gonzalez, M. E., Jasso-Robles, F. I., Flores-Hernández, E., Rodríguez-Kessler, M., & Pieckenstain, F. L. (2021). Current status and perspectives on the role of polyamines in plant immunity. *Annals of Applied Biology*, 178(2), 244–255. <https://doi.org/10.1111/aab.12670>

- Gonzalez, M. E., Marco, F., Minguet, E. G., Carrasco-Sorli, P., Blázquez, M. A., Carbonell, J., Ruiz, O. A., & Pieckenstain, F. L. (2011). Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, 156(4), 2266–2277. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171413>.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00560-1).
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2002). Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). In *Plant Molecular Biology* (Vol. 48). <https://doi.org/10.1023/A:1013323222095>.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D., & Michael, A. J. (2001). *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: Absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant Journal*, 27(6), 551–560. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01100.x>
- Hassan, A. M., & Mohamed, H. E. (2019). L-Arginine Pretreatment Enhances Drought Resistance of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants by Increase in Polyamines Content. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 600–605. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9873-0>
- Hatmi, S., Gruau, C., Trotel-Aziz, P., Villaume, S., Rabenoelina, F., Baillieul, F., Eullaffroy, P., Clément, C., Ferchichi, A., & Aziz, A. (2015). Drought stress tolerance in grapevine involves activation of polyamine oxidation contributing to improved immune response and low susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 775–787. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru436>
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(3), 559–564. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2601>
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.017>
- Jasso-Robles, F. I., Gonzalez, M. E., Pieckenstain, F. L., Ramírez-García, J. M.,

- Guerrero-González, M. de la L., 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. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110372>
- Jasso-Robles, F. I., Jiménez-Bremont, J. F., Becerra-Flora, A., Juárez-Montiel, M., Gonzalez, M. E., Pieckenstain, F. L., García de la Cruz, R. F., & Rodríguez-Kessler, M. (2016). Inhibition of polyamine oxidase activity affects tumor development during the maize-*Ustilago maydis* interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 102, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.019>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>
- Jiménez-Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-González, M. de la L., Rossi, F. R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2014). Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00095>
- Jones, J. D. G., & J.L., Dangl. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J. D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., & Zipfel, C. (2014). Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Molecular Cell*, 54(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.021>
- Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H., & Nishimura, M. (2008). A Putative Peroxisomal Polyamine Oxidase, AtPAO4, is Involved in Polyamine Catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49(9), 1272–1282. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn114>
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAYTM vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Kashiwagi, K. and Igarashi, K. (2011) Identification and assays of polyamine transport systems in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 108

- 720: 295–308. [https: 10.1007/978-1-61779-034-8_18](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-034-8_18).
- Kim, S.-H., Kim, S.-H., Yoo, S.-J., Min, K.-H., Nam, S.-H., Cho, B. H., & Yang, K.-Y. (2013). Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(4), 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.080>
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehöver, P., & Weisshaar, B. (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1211–D1215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1047>
- Kovács, B., Kovács, A., Pál, M., Spítkó, T., Marton, C. L., & Szőke, C. (2023). Changes in polyamine contents during *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* inoculation in maize seedlings with or without seed-priming. *Biologia Futura*, 1, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s42977-023-00162-7>.
- Kourelis, J. and van der Hoorn, R.A.L. (2018) Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell* 30, 285–299. [https: 10.1105/tpc.17.00579](https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579).
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T., & Takahashi, Y. (2007). Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research*, 120(3), 345–350. <https://doi.org/10.1007/s10265-007-0074-3>
- Lariguet, P., Boccalandro, H. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Chory, J., Casal, J. J., & Fankhauser, C. (2003). A Growth Regulatory Loop That Provides Homeostasis to Phytochrome A Signaling[W]. *The Plant Cell*, 15(12), 2966–2978. <https://doi.org/10.1105/tpc.014563>
- Li, J., Mu, J., Bai, J., Fu, F., Zou, T., An, F., Zhang, J., Jing, H., Wang, Q., Li, Z., Yang, S., & Zuo, J. (2013a). PARAQUAT RESISTANT1, a Golgi-Localized Putative Transporter Protein, Is Involved in Intracellular Transport of Paraquat. *Plant Physiology*, 162(1), 470–483. <https://doi.org/10.1104/PP.113.213892>
- Li, N., Han, X., Feng, D., Yuan, D., & Huang, L. J. (2019). Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/Jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030671>
- Liu, C., Atanasov, K. E., Tiburcio, A. F., & Alcázar, R. (2019). The polyamine

putrescine contributes to H₂O₂ and RbohD/F-dependent positive feedback loop in arabidopsis pamp-triggered immunity. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00894>

Luna-Esquivel, E. N., Ojeda-Barrios, D. L., Guerrero-Prieto, V. M., Ruíz-Anchondo, T., & Martínez-Téllez, J. J. (2014). Polyamines as indicators of stress in plants. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XX(3), 283–296. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.05.019>

Majumdar, R., Minocha, R., Lebar, M. D., Rajasekaran, K., Long, S., Carter-Wientjes, C., Minocha, S., & Cary, J. W. (2019). Contribution of maize polyamine and amino acid metabolism toward resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Frontiers in Plant Science*, 10, 692. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00692>

Marcé, M., Brown, D. S., Capell, T., Figueras, X., & Tiburcio, A. F. (1995). Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 666(2), 329–335. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00586-T](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00586-T)

Marina, M., Maiale, S. J., Rossi, F. R., Romero, M. F., Rivas, E. I., Gárriz, A., Ruiz, O. A., & Pieckenstain, F. L. (2008). Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridisflava*. *Plant Physiology*, 147(4), 2164–2178. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122614>

Martin-Tanguy J (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical and physiological approaches. *Physiol Plant* 100: 675–688. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03074.x>.

Martinis, J., Gas-Pascual, E., Szydlowski, N., Crèvecœur, M., Gisler, A., Bürkle, L., & Fitzpatrick, T. B. (2016). Long-Distance Transport of Thiamine (Vitamin B1) Is Concomitant with That of Polyamines. *Plant Physiology*, 171(1), 542–553. <https://doi.org/10.1104/PP.16.00009>

Méndez-Iberri, A. E., Guerrero- Gonzalez, M. de la L., De Nova- Vazquez, J. A., Arena- Huertero, C., & Rodriguez-Kessler, M. (2017). Caracterización parcial de los transportadores de poliaminas *AtPUT2* y *AtPUT4* de Arabidopsis: un

enfoque a su localización intracelular, regulación transcripcional y filogenia. [Tesis de licenciatura no publicada]. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- Mishina, T. E., & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 50(3), 500–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x>
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- 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. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12941>
- Moallem, E., Ghasemipirbalouti, A., Nejadsattari, T., Iranbakhsh, A., & Mehregan, I. (2017). Evaluation of expression analysis of putrescine n-methyltransferase gene during different stages of growth in the medicinal plant *Physalis divaricata* (Solanaceae). *Biodiversitas*, 18(4), 1430–1437. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d180419>
- Moore, J. W., Loake, G. J., & Spoel, S. H. (2011). Transcription Dynamics in Plant Immunity. *The Plant Cell*, 23(8), 2809–2820. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087346>
- 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. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123802>
- 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.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.134932>
- Moschou, P. N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2012). The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(14), 5003–5015. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers202>
- Mulangi, V., Chibucos, M. C., Phuntumart, V., & Morris, P. F. (2012). Kinetic and phylogenetic analysis of plant polyamine uptake transporters. *Planta*, 236(4), 1261–1273. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1668-0>
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., & Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140(1), 249–262. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072348> Nambeesan, S., AbuQamar, S., Laluk, K., Mattoo, A. K., Mickelbart, M. V., Ferruzzi, M. G., Mengiste, T., & Handa, A. K. (2012). Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiology*, 158(2), 1034–1045. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188698>
- Naveed, Z. A., Wei, X., Chen, J., Mubeen, H., & Ali, G. S. (2020). The PTI to ETI Continuum in Phytophthora-Plant Interactions. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.593905>
- Ngou, B. P. M., Jones, J. D. G., & Ding, P. (2022). Plant immune networks. In *Trends in Plant Science* (Vol. 27, Issue 3, pp. 255–273). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.012>
- Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P. & Jones, J. D. G. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592, 110–115. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2024, 15 de marzo). *La sanidad vegetal es clave para la seguridad alimentaria mundial*. Recuperado de <https://www.fao.org/right-to-food/news-and-events/news/news-detail/Give-it-a-listen!-Plant-health-key-to-safeguarding-adequate-food/es>
- Pal, M., & Janda, T. (2017). Role of polyamine metabolism in plant pathogen

- interactions. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 1, 95–100. <https://doi.org/10.29328/journal.jpsp.1001012>.
- Pajerowska-Mukhtar, K. M., Emerine, D. K., & Mukhtar, M. S. (2013). Tell me more: Roles of NPRs in plant immunity. In *Trends in Plant Science* (Vol. 18, Issue 7, pp. 402–411). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.004>
- Peña-Lucio, E.M., Pieckenstain, F.L., Gonzalez, M.E. *et al.* The polyamine uptake transporters PUT2/LAT4 and PUT5/LAT5 contribute to *Arabidopsis* defense response against *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Biol Plants* 31, 1053–1069 (2025). <https://doi.org/10.1007/s12298-025-01630-1>.
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pistocchi, R., Antognoni, F., Bagni, N., & Zannoni, D. (1990). Spermidine Uptake by Mitochondria of *Helianthus tuberosus* L. In *Plant Physiol* (Vol. 92). <https://doi.org/10.1104/pp.92.3.690>
- Pistocchi, R., Keller, F., Bagni, N., & Matile, P. (1988). Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles. *Plant Physiology*, 87(2), 514–518. <https://doi.org/10.1104/pp.87.2.514>
- Pré, M.; Atallah, M.; Champion, A.; De Vos, M.; Pieterse, C.M.J.; Memelink, J. The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiol.* 2008, 147, 1347–1357. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117523>.
- Proietti, S., Caarls, L., Coolen, S., Van Pelt, J. A., Van Wees, S. C. M., & Pieterse, C. M. J. (2018). Genome-wide association study reveals novel players in defense hormone crosstalk in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, 41(10), 2342–2356. <https://doi.org/10.1111/pce.13357>
- Radojičić A, Li X, Zhang Y (2018) Salicylic acid: a double-edged sword for programmed cell death in plants. *Front Plant Sci* 9:1133. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01133>
- Rentsch, D., Schmidt, S., & Tegeder, M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. In *FEBS Letters* (Vol. 581, Issue 12, pp. 2281–2289). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.013>
- Rodríguez, A. A., & Taleisnik, E. L. (2012). Determination of reactive oxygen species in

- salt-stressed plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 913, 225–236. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_15
- Rodríguez-Kessler, M., Ruiz, O. A., Maiale, S., Ruiz-Herrera, J., & Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(8–9), 805–814. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.05.012>
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies* (pp. 131–146). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>
- Rossi, F., Gárriz, A., Marina, M., & Pieckenstain, F. (2020). Modulation of polyamine metabolism in *Arabidopsis thaliana* by Salicilic acid. 1–40. <https://doi.org/10.1111/ppl.13478>.
- Rossi, F. R., Krapp, A. R., Bisaro, F., Maiale, S. J., Pieckenstain, F. L., & Carrillo, N. (2017). Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, 92(5), 761–773. <https://doi.org/10.1111/tpj.13718>
- Sagor GH, Berberich T, Kojima S, Niitsu M, Kusano T. (2016). Spermine modulates the expression of two probable polyamine transporter genes and determines growth responses to cadaverine in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 35(6):1247–1257. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1957-3>
- Sahebani, N., & Hadavi, N. (2009). Induction of H₂O₂ and related enzymes in tomato roots infected with root knot nematode (*M. javanica*) by several chemical and microbial elicitors. *Biocontrol Science and Technology*, 19(3), 301–313. <https://doi.org/10.1080/09583150902752012>
- Sales, J. H., Pabst, E., Wenig, M., Breitenbach, H. H., Perez, G., Knappe, C., Hammerl, R., Liu, J., Rozhon, W., Poppenberger, B., Grill, E., Dawid, C., & Vlot, A. C. (2021). Local jasmonic acid cues drive systemic acquired resistance signal generation. <https://doi.org/10.1101/2021.01.20.427489>
- Sapna Mishra , Rajib Roychowdhury , Shatrupa Ray , Alkesh Hada , Ajay Kumar , Umakanta Sarker , Tariq Aftab , Ranjan Das , Salicylic acid (SA)-mediated plant immunity against biotic stresses: an insight on molecular components and signaling mechanism, *Plant Stress* (2024). <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100427>.

- Seifi, H. S., Zarei, A., Hsiang, T., & Shelp, B. J. (2019). Spermine is a potent plant defense activator against gray mold disease on *solanum lycopersicum*, *phaseolus vulgaris*, and *arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 109(8), 1367–1377. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0470-R>
- Sequera-Mutiozabal, M. I., Erban, A., Kopka, J., Atanasov, K. E., Bastida, J., Fotopoulos, V., Alcázar, R., & Tiburcio, A. F. (2016). Global Metabolic Profiling of *Arabidopsis* Polyamine Oxidase 4 (AtPAO4) Loss-of-Function Mutants Exhibiting Delayed Dark-Induced Senescence. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00173>.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J. D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Goff, S. A. (2002). A High-Throughput *Arabidopsis* Reverse Genetics System. *The Plant Cell*, 14(12), 2985–2994. <https://doi.org/10.1105/tpc.004630>
- Sewelam, N., Jaspert, N., Van Der Kelen, K., Tognetti, V. B., Schmitz, J., Frerigmann, H., Stahl, E., Zeier, J., Van Breusegem, F., & Maurino, V. G. (2014). Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Molecular Plant*, 7(7), 1191–1210. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu070>
- Shen, Y., Ruan, Q., Chai, H., Yuan, Y., Yang, W., Chen, J., Xin, Z., & Shi, H. (2016). The *Arabidopsis* polyamine transporter LHR1/PUT3 modulates heat responsive gene expression by enhancing mRNA stability. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 88(6), 1006–1021. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13310>
- Sobieszczuk-Nowicka, E. (2017). Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino Acids*, 49(1), 49. <https://doi.org/10.1007/S00726-016-2377-Y>
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., & Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15(3), 760–770. <https://doi.org/10.1105/tpc.009159>
- Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G. H. M., Niitsu, M., Berberich, T., & Kusano, T.

- (2010). Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 29(9), 955–965. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0881-1>
- Tani, H., Koshino, H., Sakuno, E., Cutler, H. G., & Nakajima, H. (2006). Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *Journal of Natural Products*, 69(4), 722–725. <https://doi.org/10.1021/np060071x>
- Tavladoraki, P., Cona, A., & Angelini, R. (2016). Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Frontiers in Plant Science*, 7, 824. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00824>.
- Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Toninello, A., & Agostinelli, E. (2012). Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids*, 42(2–3), 411–426. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1012-1>
- Torres, M.A. et al. (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 37, 1130–1134. <https://doi.org/10.1038/ng1639>
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Thomas, T., & Thomas, T. J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(2), 244–258. <https://doi.org/10.1007/PL00000852>
- Tiburcio, A. F., Altabella, T., Bitrián, M., & Alcázar, R. (2014). The roles of polyamines during the lifespan of plants: From development to stress. In *Planta* (Vol. 240, Issue 1, pp. 1–18). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2055-9>
- Torres, M.A. et al. (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 517–522. <https://doi.org/10.1073/pnas.012452499>
- Torrigiani, p., Rabiti, A. I., Bortolotti, C., Betti, I., Marani, F., Canova, A., & Bagni, n. (1997). Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response

- to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist*, 135(3), 467–473. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00669.x>
- Tsaniklidis, G., Kotsiras, A., Tsafouros, A., Roussos, P. A., Aivalakis, G., Katinakis, P., & Delis, C. (2016). Spatial and temporal distribution of genes involved in polyamine metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100, 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.01.001>
- Van der Burgh, A. M., & Joosten, M. H. A. J. (2019). Plant Immunity: Thinking Outside and Inside the Box. In Trends in Plant Science (Vol. 24, Issue 7, pp. 587–601). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.009>.
- Van Rensburg, H. C. J., Limami, A. M., & Van den Ende, W. (2021). Spermine and spermidine priming against *botrytis cinerea* modulates ros dynamics and metabolism in *arabidopsis*. *Biomolecules*, 11(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biom11020223>.
- Veloso, J., & van Kan, J. A. L. (2018). Many Shades of Grey in Botrytis–Host Plant Interactions. *Trends in Plant Science*, 23(7), 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.016>
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>
- Veronese, P. et al. (2006) The membrane-anchored BOTRYTISINDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* 18, 257–273. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035576>
- Vondráková Z, Eliášová K, Vágner M, Martincová O, Cvíkrová M. 2015. Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. *Plant Growth Regul.* 75(2):405–14. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0001-2>
- Vuorinen, K., Zamora, O., Vaahtera, L., Overmyer, K., & Brosche, M. (2021). Dissecting contrasts in cell death, hormone, and defense signaling in response to *Botrytis cinerea* and reactive oxygen species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(1), 75–87. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-20-0202-R>
- Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Marof, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., & Allard, R. W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- 84(7), 2097–2100. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.2097>
- Walters, D. (2003). Resistance to plant pathogens: Possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. In *New Phytologist* (Vol. 159, Issue 1, pp. 109–115). <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00802.x>
- Wang, W., Paschalidis, K., Feng, J. C., Song, J., & Liu, J. H. (2019). Polyamine catabolism in plants: A universal process with diverse functions. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00561>
- Williamson, B. et al. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8, 561–580
- Wipf, D., Ludewig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W., & Frommer, W. B. (2002). Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. In *TRENDS in Biochemical Sciences* (Vol. 27, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V., & Després, C. (2012). The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*, 1(6), 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>
- Wuddineh, W., Minocha, R., & Minocha, S. C. (2018). Polyamines in the context of metabolic networks. *Methods in Molecular Biology*, 1694, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_1
- 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), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S42483-022-00139-9/FIGURES/8>
- Yoshimoto, K., Noutoshi, Y., Hayashi, K., Shirasu, K., Takahashi, T., & Motose, H. (2012). Thermospermine suppresses auxin-inducible xylem differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 7(8), 937–939. <https://doi.org/10.4161/psb.20784>
- Yoshimura, K., & Ishikawa, T. (2024). Physiological function and regulation of ascorbate peroxidase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 75(9), 2700–2715. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae061>
- Zavaleta-Mancera, H. A., López-Delgado, H., Loza-Tavera, H., Mora-Herrera, M., Trevilla-García, C., Vargas-Suárez, M., & Ougham, H. (2007). Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the

chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology*, 164(12), 1572–1582. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.02.003>.

Zhang C, Atanasov KE, Murillo E, Vives-Peris V, Zhao J, Deng C, Gómez-Cadenas A, Alcázar R (2023). Spermine deficiency shifts the balance between jasmonic acid and salicylic acid mediated defence responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 46(12):3949–3970. <https://doi.org/10.1111/pce.14706>

Zhong M, Yue L, Liu W, Qin H, Lei B, Huang R, Yang X, Kang Y (2023) Genome-wide identification and characterization of the polyamine uptake transporter (Put) gene family in tomatoes and the role of *put2* in response to salt stress. *Antioxidants* 12:228. <https://doi.org/10.3390/antiox12020228>.

11. REPORTE DE SIMILITUD

Erick Maurilio Peña Lucio

Tesis Extenso Nivel Doctorado-Erick Peña.docx

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:544987530

123 páginas

Fecha de entrega

9 ene 2026, 8:31 a.m. GMT-6

32.726 palabras

Fecha de descarga

9 ene 2026, 8:57 a.m. GMT-6

175.852 caracteres

Nombre del archivo

Tesis Extenso Nivel Doctorado-Erick Peña.docx

Tamaño del archivo

13.0 MB



Página 2 de 130 - Descripción general de integridad

Identificador de la entrega trn:oid::3117:544987530

8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)
- ▶ Abstract
- ▶ Methods and Materials

Fuentes principales

- 7% Fuentes de Internet
2% Publicaciones
0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

Caracteres reemplazados

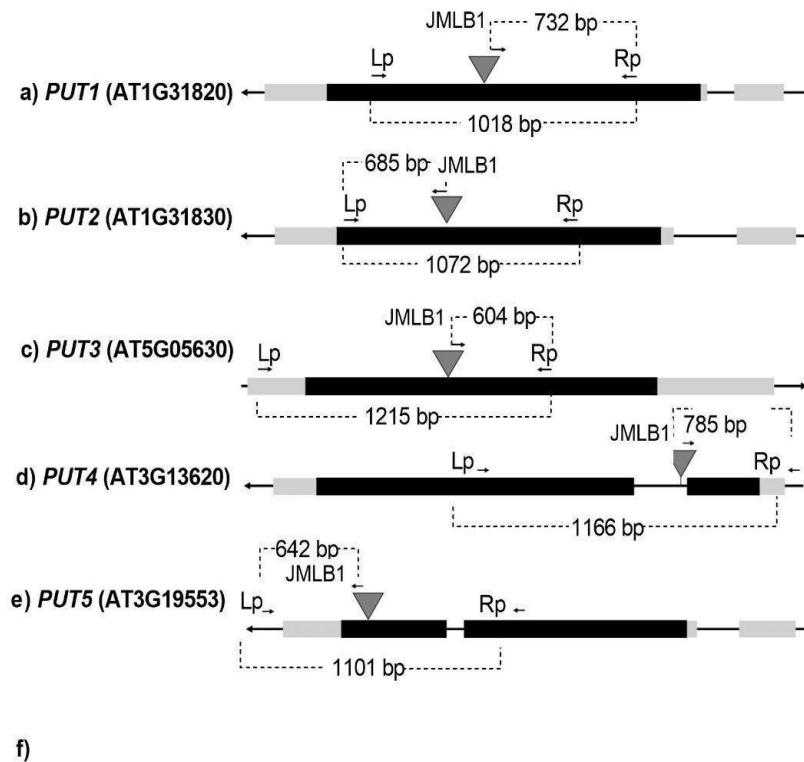
83 caracteres sospechosos en N.º de páginas

Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

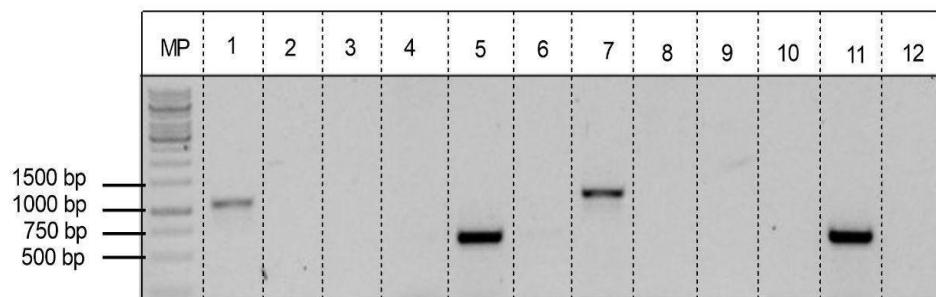
Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

12. ANEXOS



f)



g)

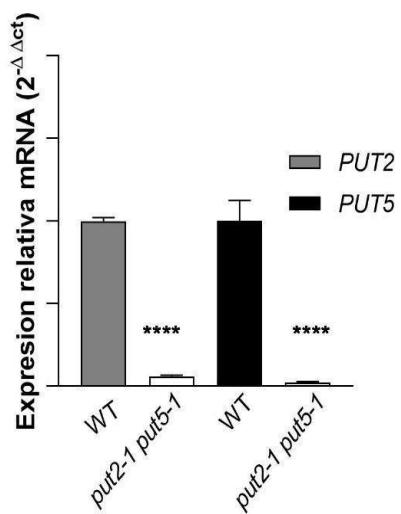


Fig. Suplementaria 1- Estructura de los genes *PUT* de *Arabidopsis thaliana*,

genotipado y niveles de expresión de los genes *PUT2* y *PUT5* en la línea doble mutante *put2-1 put5-1*. Estructura de los genes a) *PUT1*, b) *PUT2*, c) *PUT3*, d) *PUT4*, y e) *PUT5*. Los exones se indican en (cajas blancas), los intrones con líneas negras), y las regiones UTRs 5' y 3' en cajas de color gris claro.) Cada elemento se indica a escala. La posición de las inserciones de T-DNA en las líneas mutantes *put1-1* (GABI_890c10), *put2-1* (SALK_119707c), *put3-1* (SALK_206472c), *put4-1* (SAIL_1275_c06) y *put5-1* (SALK_007135) se indica con un triángulo. f) Electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos para la caracterización de la línea homocigota doble mutante *put2-1 put5-1*. El carril 1 muestra la amplificación del alelo silvestre (WT) de *PUT2* y el carril 7 el de *PUT5* en el ecotipo Col-0 de *Arabidopsis thaliana*. En la línea doble mutante *put2-1 put5-1*, no se observa amplificación de los alelos silvestres de *PUT2* (carril 2) ni *PUT5* (carril 8). El producto de amplificación para la inserción del T-DNA en la línea doble mutante *put2-1 put5-1* se muestra en los carriles 5 y 11), mientras que en la ausencia del T-DNA en la WT se indica en los carriles 4 y 10). Los carriles 3, 6, 9 y 12 son los controles negativos. g) Niveles de expresión relativa de los genes *PUT* en la línea doble mutante *put2-1 put5-1*. Los valores de expresión génica se normalizaron con el gen de referencia *EF1α* y se expresaron en relación con la expresión del gen WT mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos representan la media ± error estándar de 3 réplicas (n = 3). Los asteriscos (****) indican significancia estadística ($p \leq 0,0001$) según la prueba t de Student.

Tabla suplementaria 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para qPCR y genotipificación.

Nombre	AGI code	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplicón (pb)		Referencia
			qPCR		
<i>PUT1</i>	At1g31820	Fw 5'- ATG GGT CAA ATT CTC AGT CTG TTC T -3' Rv 5'- GTA AAA AAC GAG CAG AAA GAT ATA CAG -3'	157 pb		Este trabajo
		Fw 5'- AGC TGC AGT GAG CAT TGT GAT GA -3' Rv 5'- TAC AGA CTA TGA GAA ATT AAG CTT TTT TG-3'			
<i>PUT2</i>	At1g31830	Fw 5'- GGA TGG CTC AAG TTC TCA ACA AG -3' Rv 5'- TCT GAT CCA AAA TCC AGA AGC AAT GA -3'	243 pb		Este trabajo
		Fw 5'- GTC AAC GGA GAA CAT CCC AAA G -3 Rv 5'- GTT ACA GAA GCA AGG AAC TTA CAT TG -3			
<i>PUT3</i>	At5g05630	Fw 5'- ACC AGT TTC AGG AGT TTC ATC AGA -3' Rv 5'- TGT ACA TGA CTT ACC ATG CGC TTT -3'	132 pb		Este trabajo
		Fw 5'- GTC AAC GGA GAA CAT CCC AAA G -3 Rv 5'- GTT ACA GAA GCA AGG AAC TTA CAT TG -3			
<i>PUT4</i>	At3g13620	Fw 5'- ACC AGT TTC AGG AGT TTC ATC AGA -3' Rv 5'- TGT ACA TGA CTT ACC ATG CGC TTT -3'	402 pb		Este trabajo
		Fw 5'- GTC AAC GGA GAA CAT CCC AAA G -3 Rv 5'- GTT ACA GAA GCA AGG AAC TTA CAT TG -3			
<i>PUT5</i>	At3g19553	Fw 5'- GCT TCC ATC ACC CTT ATC TTC -3' Rv 5'- GGC TTC TCG CAC	149 pb		Este trabajo
		Fw 5'- GCT TCC ATC ACC CTT ATC TTC -3 Rv 5'- GGC TTC TCG CAC			
<i>PDF1.2</i>	At5g44420		155 pb		Este trabajo

		AAC TTC TG -3'		
<i>PR3</i>	At1g0419 0	Fw 5'- CAC GAG GAA GAA GGA GGT CG -3' Rv 5'- GTG GCG CTC GGT TCA CAG TA -3'	153 pb	Este trabajo
<i>ACS2</i>	At1g0148 0	Fw 5'- TAA CAC GGA GTG AAA CGC G -3' Rv 5'- AAT CTT CGA CTA AGT TTC CGA C -3'	151 pb	Este trabajo
<i>PR1</i>	At2g1461 0	Fw 5'- TAT GCT CGG AGC TAC GCA GAA-3' Rv 5'- TCG CTA ACC CAC ATG TTC ACG-3'	134 pb	(Escudero et al., 2019)
<i>EF1α</i>	At5g6039 0	Fw 5'- TCC AGC TAA GGG TGC CGC -3' Rv 5'- AAC GCC TGT CAA TCT TGG TCA A -3'	168 pb	(Jasso-Robles et al. 2020)
Genotipificación				
T-DNA (Salk)	---	JMLB1 5'-GGC AAT CAG CTG TTG CCC GTC TCA CTG GTG -3'		(Lariguet et al., 2003)
T-DNA (Gabi)	---			(Kleinboelting et al., 2012)
T-DNA (Sail)	---	08474: 5'-ATA ATA ACG CTG CGG ACA TCT ACA TTT T-3' LB3 5'- TAG CAT CTG AAT		(Sessions et al., 2002)
	---	TTC ATA ACC AAT CTC GAT ACA C-3'		
<i>put1-1</i>	GABI_o8 90C10	LP 5'- TAA TCA CTG CGG AGA TGA GTA CAA -3' RP 5'- ATA ACC AAA CAT ATC AGT ACA ATC GG-3'	1018 pb	Este trabajo
<i>put2-1</i>	SALK_11 9707C	LP 5'- TCA GCA AGG TTG GAT GAA ATG GC -3' RP 5'- GAG TCT GCT GTT GAA GGT CCG -3'	1079 pb	Este trabajo
<i>put3-1</i>	SALK_20 6472C	LP 5'- ATC TGC GAT TGT TTC TGG GTA TTC -3' RP 5'- AGC CAT TCC AAG TAG CTG AAA AGA -3'	1215 pb	Este trabajo
<i>put4-1</i>	SAIL_127 5_C06	LP 5'- TCT GTT CTG ATA CGA CCA ACC C -3' RP 5'- CGT TTT CCC ATC TGC TCT GAT C -3'	1166 pb	Este trabajo
<i>put5-1</i>	SALK_00 7135	LP 5'- GGA TCT CTT CAG CTT TTG GTC C -3' RP 5'- CCA AGA ACT ATG ATC ACA CCG C -3'	1114 pb	Este trabajo

13. PORTADA DE ARTÍCULO CON DOI

SPRINGER NATURE Link

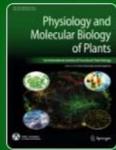
Log in

Find a journal Publish with us Track your research Search Cart

Home > Physiology and Molecular Biology of Plants > Article

The polyamine uptake transporters PUT2/LAT4 and PUT5/LAT5 contribute to Arabidopsis defense response against *Botrytis cinerea*

Research Article | Published: 26 July 2025
Volume 31, pages 1053–1069, (2025) [Cite this article](#)



Physiology and Molecular Biology of Plants

[Aims and scope →](#)
[Submit manuscript →](#)

Title: The Polyamine uptake transporters PUT2/LAT4 and PUT5/LAT5 contribute to Arabidopsis defense responses against *Botrytis cinerea*.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-025-01630-1>.

Authors and Affiliations:

M. Peña-Lucio & Emmanuel Flores-Hernández.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), San Luis Potosí, 78210, México.

Fernando L. Pieckenstain & M. Elisa Gonzalez.

Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH), Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), 7130, Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina

Margarita Rodríguez-Kessler.

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), San Luis Potosí, 78295, México

Correspondence to: "MARGARITA RODRIGUEZ Y DOMINGUEZ KESSLER"-
margarita.rodriguezdominguez@uaslp.mx and "Fernando Pieckenstain"-
pieckenstain@intech.gov.ar