



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Caracterización del catabolismo de poliaminas y su relación con la señalización que desencadena la respuesta de defensa vegetal en modelos de interacción planta-patógeno.

**OPCIÓN DE TITULACIÓN:
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

**PRESENTA
M.C. FRANCISCO IGNACIO JASSO ROBLES**

**DIRECTORES
DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ
KESSLER
DRA. MARÍA ELISA GONZÁLEZ**



SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

Agosto 2021



Caracterización del catabolismo de poliaminas y su relación con la señalización que desencadena la respuesta de defensa vegetal en modelos de interacción planta-patógeno por Jasso Robles Francisco Ignacio se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio de interacción planta-microorganismo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y en el Laboratorio de interacción planta-microorganismo del Instituto Tecnológico de Chascomús-UNSAM bajo la co-dirección de la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y la Dra. María Elisa Gonzalez.

Se agradece el financiamiento obtenido por parte del proyecto Ciencia de Frontera 2019, titulado: "Metabolismo de poliaminas, especies reactivas de oxígeno y fitohormonas en la encrucijada de respuestas locales y sistémicas al estrés biótico en *Arabidopsis thaliana*: un enfoque fenotípico, funcional y metabolómico, con número de referencia 1564453.

Se agradece la Beca-Tesis del consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT):
CVU 628963.

INDICE

	Pag.
ARTÍCULO CIENTÍFICO	1
1. Introducción.....	2
2. Objetivo.....	4
3. Resultados.....	4
4. Conclusiones.....	5
ARTÍCULO CIENTÍFICO II.....	10
1. Introducción.....	11
2. Objetivo.....	12
3. Resultados.....	12
4. Conclusiones.....	14
ARTÍCULO CIENTÍFICO III.....	18
1. Introducción.....	19
2. Objetivo.....	22
3. Conclusiones.....	22

ARTÍCULO CIENTÍFICO I



Decrease of Arabidopsis PAO activity entails increased RBOH activity, ROS content and altered responses to *Pseudomonas*

Jasso-Robles Francisco Ignacio, Gonzalez María Elisa, Pieckenstain Fernando L, Ramírez-García José Miguel, Guerrero-González María de la Luz, Jiménez-Bremont Juan Francisco, Rodríguez-Kessler Margarita.

Publicado en: Plant Science

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110372>

Recibido: 21 de julio de 2019

Revisado: 1 de octubre de 2019

Aceptado: 9 de diciembre de 2019

Publicado: 17 de diciembre de 2019

Plant Science ISSN: 0168-9452

1. Introducción

El modelo de interacción planta-patógeno *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) se ha utilizado ampliamente para entender los procesos celulares y moleculares en la interacción de las plantas con bacterias patógenas (Xin & He, 2013). Los síntomas que desarrollan las plantas a causa de la infección por *Pst* se presentan como regiones de necrosis localizada rodeadas de zonas cloróticas, las cuales son más evidentes en las etapas finales de la infección. El reconocimiento de la bacteria a través de las moléculas asociadas a su estructura (PAMPs por sus siglas en inglés) por receptores específicos de la membrana celular de la planta, desencadena diversas respuestas moleculares y bioquímicas en la célula vegetal, que tienen un impacto en la inmunidad innata de la planta. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) son parte fundamental en la defensa de la planta en contra de patógenos como *Pst*. La producción de EROs es el resultado de la actividad de diferentes enzimas como las peroxidasas de clase III de la pared celular, la enzima RBOH, las amina oxidasas dependientes de cobre (DAOs) y las poliamina oxidasas dependientes de flavina (PAOs), entre otras (Camejo et al., 2016; Kámán-Tóth et al., 2019).

Las poliaminas (PAs) son aminas alifáticas de bajo peso molecular con importantes funciones moleculares y fisiológicas. En las plantas, las PAs participan en la regulación del crecimiento, el desarrollo y la respuesta al estrés de tipo biótico y abiótico (Tiburcio et al., 2014). Las principales PAs son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y las tetraaminas espermina (Spm) y termospermina (tSpm). Los niveles de acumulación celulares de PAs están estrechamente regulados mediante su biosíntesis, catabolismo, conjugación a ácidos hidroxicinámicos y transporte (Baron & Stasolla, 2008).

Los miembros de las familias multienzimáticas DAO y PAO son responsables del catabolismo de las PAs, cada enzima tiene afinidad específica por cada poliamina. En *Arabidopsis*, las DAOs se localizan en el espacio extracelular y en los peroxisomas, y

participan en la oxidación de Put y Spd, produciendo aminoaldehídos, amoníaco y H_2O_2 (Planas-Portell et al., 2013). Las PAOs oxidan a las PAs superiores como Spd, Spm y tSpm, por catabolismo terminal, o a través de catabolismo de retroconversión. El catabolismo terminal de Spd y Spm implica la oxidación del carbono en el lado-*endo* del nitrógeno N_4 , con la producción concomitante de aminoaldehídos, 1,3-diaminopropano (1,3-Dap) y H_2O_2 . En el catabolismo de PAs por retroconversión, se oxida el carbono del lado-*exo* del nitrógeno N_4 de Spd y Spm produciendo Put y Spd, respectivamente, junto con 1,3-Dap y H_2O_2 (Moschou et al., 2013; Moschou et al., 2008). En *A. thaliana* se han identificado cinco genes que codifican para PAOs. AtPAO1 y AtPAO5 se localizan en el citosol, mientras que AtPAO2, AtPAO3 y AtPAO4 son enzimas peroxisomales (Bordenave et al., 2019; Takahashi et al., 2010).

En *Arabidopsis* se han identificado diez genes que codifican para proteínas RBOH. La enzima RBOH es una enzima transmembranal y está implicada en la producción de $O_2^{\cdot-}$, el cual dismuta a H_2O_2 espontáneamente o a través de la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Liu & He, 2016). Las enzimas AtRBOHD y AtRBOHF son importantes para la producción de EROs en respuesta al ataque de patógenos y para desencadenar la señalización que tiene como objetivo generar una muerte celular programada. Durante la interacción *Arabidopsis-Pst*, se produce de forma rápida EROs como efecto de la respuesta inmune mediada por PAMPs la cual desencadena la activación de diferentes cinasas como las cinasas de proteína activadas por mitógeno (por sus siglas en inglés MAPK). Esta producción primaria depende principalmente de la activación de AtRBOHD, lo que tiene un efecto en el cierre estomático, la biosíntesis de lignina y la deposición de callosa, como mecanismo de defensa para evitar que el patógeno proliferare (Liu & He, 2016).

Derivado del catabolismo de PAs se genera como producto el H_2O_2 , el cual se ha demostrado que es importante en la defensa de la planta ante el ataque de patógenos. La inhibición de la actividad PAO por el compuesto 1,19-bis(etilamino)-5,10,15-triazanonadecano (SL-11061), tuvo como efecto una mayor susceptibilidad de *Arabidopsis* a la infección por *Pseudomonas viridiflava* (Gonzalez et al., 2011). Por lo

tanto, se sugirió que la defensa de la planta depende del aumento de los niveles de H₂O₂ derivados de la oxidación de Spm, lo que implica que el catabolismo de PAs es un componente esencial de la respuesta de defensa (Gonzalez et al., 2011).

2. Objetivo

- Analizar los perfiles de expresión de los genes *AtPAO* durante la interacción con *Pst*.
- Caracterizar las líneas mutantes insersionales de T-DNA de genes que codifican PAOs de citoplasma (*Atpao1-1*) y de peroxisoma (*Atpao2-1*), y una línea doble mutante *Atpao1-1 x Atpao2-1* durante la interacción con *Pst*.
- Analizar los niveles de EROs y las actividades enzimáticas de enzimas productoras de EROs en las líneas mutantes durante la interacción con *Pst*.

3. Resultados

En este trabajo se analizó el rol de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* en la interacción *Arabidopsis-Pst*. Se analizaron los perfiles de expresión de los cinco genes *AtPAO* encontrando que la expresión de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* aumenta en las hojas de plántulas de *Arabidopsis* de tres semanas de edad infectadas con *Pst* a las 24 hpi. La regulación transcripcional de los genes *PAO* se ha observado en diferentes tipos de interacciones planta-patógeno. Este estudio, se enfoca en la importancia de la expresión de los genes *PAO* en respuesta al estrés biótico, en particular en el análisis de los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* en la interacción *Arabidopsis-Pst*. Además, se determinó la actividad PAO, encontrando cambios en las plántulas de *A. thaliana* (Col-0) infectadas con *Pst*. A las 24 hpi se detectó una disminución en la actividad de oxidación de Spm y posteriormente, un incremento de la oxidación de esta PA a las 48 hpi. Por otro lado, al analizar los niveles de PAs, se observó un aumento en los niveles de Put en plántulas de *A. thaliana* infectadas con *Pst*; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de PAs superiores (Spd y Spm). Por lo tanto, de acuerdo a los resultados antes mencionados se sugiere que el aumento de la actividad PAO a las 48 hpi en plántulas de *Arabidopsis* infectadas con *Pst* puede ser

responsable del incremento de Put en los tejidos infectados a través del catabolismo de retroconversión.

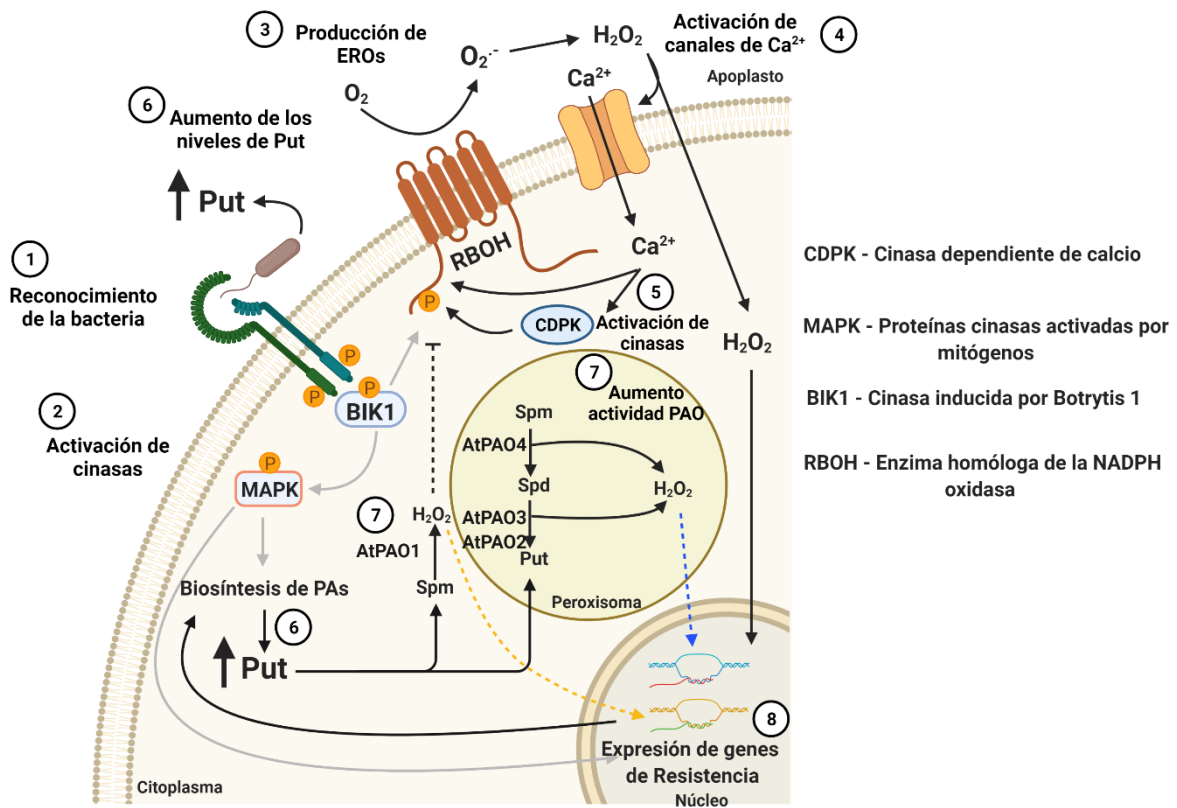
A partir de a los resultados obtenidos respecto a la expresión de los genes *AtPAO*, se decidió analizar a las líneas mutantes *Atpao1-1*, *Atpao2-1* y una línea doble mutante *Atpao1-1 x Atpao2-1*. Se analizó primero las unidades formadoras de colonias (UFC) para determinar la resistencia hacia *Pst*. En tanto, se encontró una mayor susceptibilidad en la línea doble mutante *Atpao1-1 x Atpao2-1*, y sorprendentemente, la línea mutante *Atpao1-1* mostró resistencia a *Pst*. Acorde al fenotipo de infección observado en las líneas mutantes, se decidió medir los niveles de EROs, debido a que el H₂O₂ es uno de los productos derivados del catabolismo de PAs. Por otro lado, también se decidió analizar la actividad enzimática de RBOH, catalasa (CAT) y SOD en las líneas mutantes infectadas y no infectadas por *Pst*.

Los resultados mostraron que la actividad enzimática RBOH incrementó en las líneas mutantes con y sin infección respecto al ecotipo silvestre. También se observó que las actividades CAT y SOD aumentaron en la línea mutante *Atpao1-1* durante la interacción con *Pst*. Además, se analizaron cambios en los niveles de expresión de los genes *AtRBOHD*, *AtRBOHF*, y de los genes *AtPRX33* y *AtPRX34*, los cuales codifican para peroxidasas de pared, en las líneas mutantes en interacción con *Pst*. Se observó principalmente el aumento de la expresión de estos cuatro genes en la línea mutante sencilla *Atpao1-1* a las 72 hpi.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que las alteraciones en el catabolismo de PAs afectan los niveles de EROs y las actividades de las enzimas RBOH y CAT, por lo tanto, la defensa de la planta se compromete, sugiriendo un vínculo entre el catabolismo de PAs (principalmente de la Spm) y otras enzimas implicadas en la homeostasis de las EROs. De lo anterior se propone un modelo para la participación del catabolismo de PAs en la interacción *Arabidopsis-Pst*. En primer lugar, la percepción de *Pst* por parte de los receptores de la planta conduce a la activación de enzimas (RBOH) y vías de señalización mediadas por MAPK que inducen la

producción de EROs, la expresión de genes de defensa y la síntesis de moléculas de respuesta a patógenos. Los genes *AtPAO1* y *AtPAO2* se expresan en respuesta a *Pst*, por lo tanto, su expresión es importante ante la infección, seguramente contribuyendo a una mayor oxidación de PAs en el citoplasma (*AtPAO1*) y en el peroxisoma (*AtPAO2*) mediante el catabolismo terminal o catabolismo de retroconversión. Ambas vías catabólicas conducen a la producción de H_2O_2 ; por lo tanto, la actividad PAO podría tener un impacto diferencial en la expresión génica y en las respuestas de defensa dependiendo del sitio intracelular donde se genere el H_2O_2 . Por otra parte, la hipótesis propuesta es que las enzimas PAO podrían contribuir al aumento de los niveles de Put a través de la retroconversión de Spm. La acumulación de Put ha sido reportada en la interacción *Arabidopsis-Pst*, y puede ocurrir por biosíntesis *de novo*, así como por excreción bacteriana de Put durante la colonización de la planta. En el caso de las líneas mutantes *Atpao*, los niveles de Put se encuentran aumentados. La disminución de la oxidación de PAs en citoplasma y peroxisoma en las líneas mutantes *Atpao1-1* y *Atpao2-1* afecta al contenido de EROs. En particular, la producción de $O_2^{\cdot-}$ derivada de la actividad de la RBOH, y la consiguiente producción de H_2O_2 . Por lo tanto, se propone que la oxidación intracelular de Spm por PAOs puede regular negativamente la actividad de RBOH en las plántulas WT, por un mecanismo desconocido que podría implicar la señalización de H_2O_2 .



La oxidación de PAs contribuye a la homeostasis del contenido de EROs mediante la regulación de la actividad de la RBOH en la interacción *Arabidopsis-Pst*. El reconocimiento de la bacteria a través de receptores específicos de membrana (1), desencadena la fosforilación de cinasas en el citoplasma (BIK1 y MAPK). Las cinasas activadas (2) pueden fosforilar a la enzima RBOH y por lo tanto, se produce el $O_2^{\cdot-}$ que por acción de la enzima SOD se convierte en H_2O_2 (3). El H_2O_2 puede inducir la apertura de canales de Ca^{2+} (4); este último puede activar directamente las CDPKs y a la RBOH (5). Como resultado de esta respuesta, se induce la expresión y traducción de genes involucrados en la biosíntesis y catabolismo de PAs. Aumentan los niveles de PAs, principalmente los de Put (6). El catabolismo de PAs se incrementa en citoplasma y peroxisoma (7), y se sugiere que el H_2O_2 generado induce la expresión de genes involucrados en la defensa de la planta (8).

Bibliografía

- Baron, K., & Stasolla, C. (2008). *The role of polyamines during in vivo and in vitro development*. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9176-4>
- Bordenave, C. D., Granados Mendoza, C., Jiménez Bremont, J. F., Gárriz, A., & Rodríguez, A. A. (2019). Defining novel plant polyamine oxidase subfamilies through molecular modeling and sequence analysis. *BMC Evolutionary Biology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1361-z>
- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., & Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, *103*, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.035>
- Gonzalez, M. E., Marco, F., Minguet, E. G., Carrasco-Sorli, P., Blázquez, M. A., Carbonell, J., 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>
- Kámán-Tóth, E., Dankó, T., Gullner, G., Bozsó, Z., Palkovics, L., & Pogány, M. (2019). Contribution of cell wall peroxidase- and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola*-induced oxidative burst in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, *20*(4), 485–499. <https://doi.org/10.1111/mpp.12769>
- Liu, Y., & He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports*, *35*(5), 995–1007. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1950-x>
- Moschou, P. N., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2013). *Polyamines and programmed cell death*. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert373>
- 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>

Planas-Portell, J., Gallart, M., Tiburcio, A. F., & Altabella, T. (2013). Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-109>

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>

Tiburcio, A. F., Altabella, T., Bitrián, M., & Alcázar, R. (2014). The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress PA-dependent transcriptional and translational modulation of genes and transcripts, and posttranslational modifications of proteins. *Planta*, 240, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2055-9>

Xin, X.-F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 473–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>

ARTÍCULO CIENTÍFICO II



Down-regulation of arginine decarboxylase gene-expression results in reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*

Chávez-Martínez Ana Isabel, **Jasso-Robles Francisco Ignacio**, Rodríguez-Kessler Margarita, Sarvajeet S. Gill, Becerra-Flora Alicia, Jiménez-Bremont Juan Francisco.

Publicado en: Biochemical and Biophysical Research Communications

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.165>

Recibido: 22 de octubre de 2018

Aceptado: 26 de octubre de 2018

Publicado: 5 de noviembre de 2018

Biochemical and Biophysical Research Communications ISSN: 0006-291X

1. Introducción

Las poliaminas (PAs) son compuestos nitrogenados esenciales para la vida. Entre las PAs más abundantes encontramos a la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y las tetraaminas espermina (Spm) y termoespermina (tSpm). Estas aminas tienen un papel muy importante durante el crecimiento y el desarrollo de la planta, y en respuesta a factores de estrés de tipo biótico y abiótico (Sánchez-Rangel et al., 2016).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se generan durante todo el proceso de desarrollo de la planta, derivadas de diferentes rutas metabólicas, y sobre todo en respuesta a estímulos externos que generan las condiciones de estrés. En los últimos años se ha intentado elucidar la existencia de una posible conexión entre las PAs y las EROs (Pottosin et al., 2014). Se ha sugerido que las PAs tienen una función dual en la regulación del estatus redox en la célula vegetal, funcionando como moléculas antioxidantes y produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de su catabolismo mediado por amina oxidasas como las diamina oxidasas (DAOs) y poliamina oxidasas (PAOs) (Fu et al., 2017; Jones & Dangl, 2006; Tang & Newton, 2005). El H_2O_2 es una molécula señal involucrada en la regulación de la expresión génica y por consiguiente tiene un impacto en los procesos fisiológicos y en los del desarrollo de la planta. En condiciones de estrés, el H_2O_2 es la principal ERO acumulada, provocando efectos negativos en cloroplastos, mitocondria, daño en la membrana por peroxidación de lípidos, así como daño a proteínas y al DNA (Gill & Tuteja, 2010; Arias-Moreno et al., 2017; Nishiyama et al., 2006; Wang & Liu, 2015).

En *Arabidopsis thaliana* existen dos enzimas encargadas de sintetizar Put que son la arginina descarboxilasa 1 y 2 (ADC1 y ADC2). En el presente artículo se empleó una línea transgénica (*amiR:ADC-L2*), la cual expresa un microRNA de interferencia para silenciar simultáneamente los genes que codifican a ADC1 y ADC2. Esta línea transgénica tiene niveles bajos de expresión de *ADC1* y *ADC2* y por lo tanto, presenta niveles bajos de PAs en comparación con las líneas mutantes sencillas *adc1* y *adc2* (Sánchez-Rangel et al., 2016).

En este trabajo el objetivo fue caracterizar la línea *amiR:ADC-L2* evaluando diferentes parámetros fisiológicos asociados al crecimiento y a la producción de ROS.

2. Objetivo

Evaluar el efecto de la aplicación exógena de la enzima Catalasa en la línea *amiR:ADC-L2*, en la producción de ROS y las actividades enzimáticas Catalasa, PAO y NADPH oxidasa.

3. Resultados

El primer parámetro analizado fue el contenido de clorofila en la línea *amiR:ADC-L2*, donde se observó una disminución en los niveles de clorofila respecto al ecotipo silvestre *Ws*; esta disminución en los niveles de clorofila podría estar relacionada con un bajo contenido de PAs, ya que las PAs tienen un rol importante en la protección de los fotosistemas en el cloroplasto.

Debido al interés por estudiar la producción de EROs en la línea *amiR:ADC-L2*, se evaluó el efecto de la aplicación exógena de la enzima catalasa, en plántulas de esta línea, en la producción de EROs y las actividades enzimáticas catalasa, PAO y NADPH oxidasa endógena.

En el caso de la enzima catalasa, esta forma parte del sistema antioxidante proteico de las células vegetales, su principal función es detoxificar el exceso de H_2O_2 en la célula convirtiéndolo en agua (Du et al., 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró que la aplicación exógena de la enzima catalasa promovió el crecimiento de plántulas de la línea *amiR:ADC-L2* y del ecotipo silvestre *Ws*. Esto se vio reflejado en un incremento en el peso fresco, la longitud de la raíz primaria y el contenido de clorofila. Al observarse el efecto positivo del tratamiento con catalasa en las plántulas de *amiR:ADC-L2* y del ecotipo silvestre *Ws*, se analizó la expresión del gen que codifica para la catalasa 2 (*CAT2*) y la actividad catalasa total. Se encontró que la expresión del gen *CAT2* y la actividad CAT disminuyen en la línea *amiR:ADC-L2* en comparación con la línea *Ws*. Cabe mencionar que en el genoma de *Arabidopsis* se han identificado tres genes que codifican para enzimas catalasa. Entre ellos, *CAT2* es

una de las principales isoformas en los tejidos de la roseta con importantes funciones en la detoxificación de EROs (Du et al., 2008).

En relación al nivel de EROs, se observó un aumento en el contenido de H₂O₂ en la línea *amiR:ADC-L2* en comparación con Ws. De acuerdo con este resultado, se puede sugerir que el fenotipo en cuanto al crecimiento y desarrollo de esta línea se puede deber a los bajos niveles de PAs, y al aumento de EROs. Este exceso de EROs puede deberse a que en la línea silenciante, la actividad CAT se encuentra disminuida, lo que sugiere que la capacidad antioxidante de la línea *amiR:ADC-L2* podría contribuir a dichas alteraciones fenotípicas.

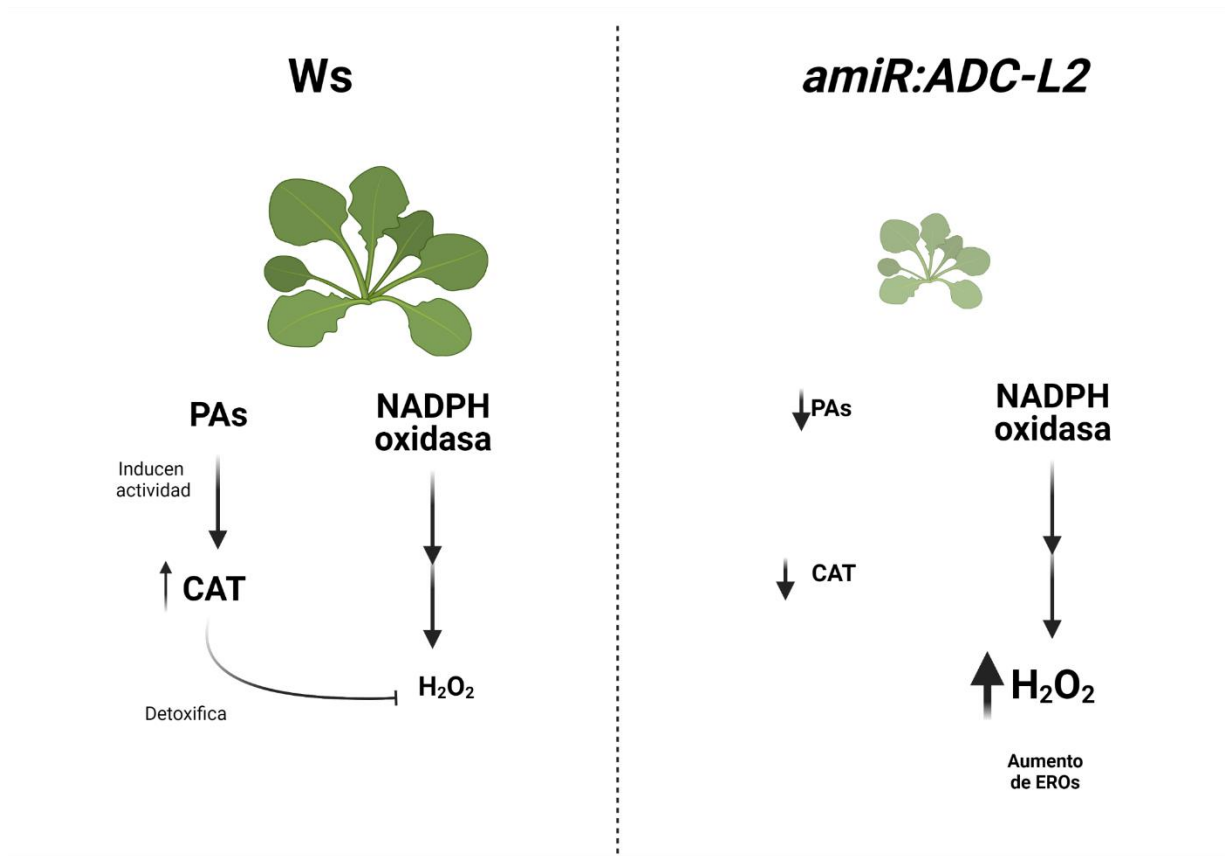
Por otro lado, se evaluó la actividad PAO, ya que se ha reportado que la oxidación de PAs contribuye a la acumulación de H₂O₂. Comparando la línea *amiR:ADC-L2* con Ws, no se encontraron diferencias en la actividad PAO, por lo tanto, la acumulación de H₂O₂ podría ser independiente del catabolismo de PAs. Por esta razón, se decidió evaluar la actividad NADPH oxidasa y los niveles del anión radical superóxido (O₂⁻), como actores importantes en la producción de H₂O₂, demostrando que efectivamente, la actividad NADPH oxidasa y los niveles de O₂⁻, se encontraban aumentados en la línea *amiR:ADC-L2*, lo que podría explicar el incremento de H₂O₂ en esta línea.

Como ya se había reportado que esta línea *amiR:ADC-L2* tenía niveles muy bajos de PAs (Sánchez-Rangel et al., 2016), se decidió evaluar el efecto de la aplicación exógena de 10 mM de PAs superiores, y se observó que la acumulación de H₂O₂ disminuyó en los ápices de las raíces de la línea *amiR:ADC-L2*. Este resultado demostró que los bajos niveles de PAs tienen como resultado una alteración en la homeostasis de las EROs. En las plántulas Ws, la adición de 10 y 50 mM de PAs condujo a un incremento de la señal de H₂O₂ en los ápices de las raíces de las plántulas. Asimismo, a una mayor concentración de PAs (50 mM) la señal de fluorescencia de *amiR:ADC-L2* aumentó, lo que indica que a mayores concentraciones de PAs añadidas la producción de H₂O₂ aumenta. Este resultado podría estar relacionado con el catabolismo de PAs, sobretodo porque se añadieron las PAs de forma exógena, y cabe mencionar que en el apoplasto se pueden oxidar tanto la Put

como la Spd por las DAOs. Por lo tanto, este aumentó en la producción de H₂O₂, se puede deber a un acelerado catabolismo extracelular. Diversos estudios han reportado que las PAs pueden modular la producción de H₂O₂ en las plantas, y que esta producción derivada del catabolismo de PAs puede contribuir al crecimiento y desarrollo de la planta.

4. Conclusiones

En particular, en este estudio se pudo observar cómo el tratamiento con Put incrementó la actividad de la enzima CAT. Por lo tanto, se demostró que las PAs son moléculas que pueden regular la producción de EROs. Asimismo, los bajos niveles de PAs que se presentan en la línea *amiR:ADC-L2* podrían ser la causa de la acumulación de EROs, debido al aumento de la actividad NADPH oxidasa y la baja actividad catalasa en la línea *amiR:ADC-L2* bajo estudio.



Las PAs pueden regular la concentración de H₂O₂ a través de la actividad CAT. El silenciamiento de los dos genes *arginina decarboxilasa* de *Arabidopsis* que codifican para las enzimas ADC1 y ADC2, resulta en bajos niveles de PAs. Esta condición conlleva a una disminución en la actividad CAT, lo que da lugar al aumento de los niveles de H₂O₂ derivado de una elevada actividad RBOH.

Bibliografía

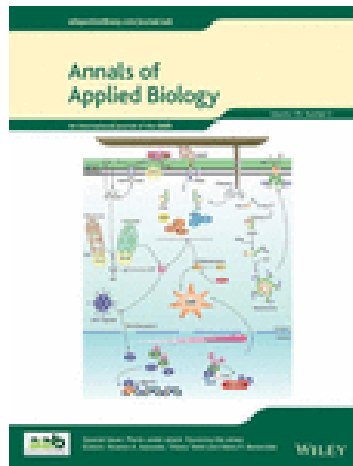
- Du, Y.-Y., Wang, P.-C., Chen, J., & Song, C.-P. (2008). Comprehensive Functional Analysis of the Catalase Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*(10), 1318–1326. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00741.x>
- Fu, Y., Guo, C., Hao Wu, ., & Chen, . Chunli. (2017). *Arginine decarboxylase ADC2 enhances salt tolerance through increasing ROS scavenging enzyme activity in Arabidopsis thaliana*. *83*, 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0293-0>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2010.08.016>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Marcela Arias-Moreno, D., Francisco Jiménez-Bremont, J., Maruri-López, I., & Delgado-Sánchez, P. (n.d.). *Effects of catalase on chloroplast arrangement in Opuntia streptacantha chlorenchyma cells under salt stress OPEN*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08744-x>
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1757*(7), 742–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.05.013>
- Pottosin, I., Shabala, S., Tiburcio, A. F., & Centre, B. (2014). *Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00154>
- Sánchez-Rangel, D., Chávez-Martínez, A. I., Rodríguez-Hernández, A. A., Maruri-López, I., Urano, K., Shinozaki, K., & Jiménez-Bremont, J. F. (2016). Simultaneous silencing of two arginine decarboxylase genes alters development in arabidopsis.

Frontiers in Plant Science, 7(MAR2016), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00300>

Tang, W., & Newton, R. J. (n.d.). *Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine*. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-6395-0>

Wang, W., & Liu, J. H. (2015). Genome-wide identification and expression analysis of the polyamine oxidase gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Gene*, 555(2), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.042>

ARTÍCULO CIENTÍFICO III



Current status and perspectives on the role of polyamines in plant immunity

Gonzalez María Elisa, **Jasso-Robles Francisco Ignacio**, Flores-Hernández
Emmanuel, Rodríguez-Kessler Margarita, Pieckenstain Fernando L.

Publicado en: Annals of Applied Biology

DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12670>

Recibido: 8 de Agosto de 2020

Revisado: 7 de Noviembre 2020

Aceptado: 6 de Diciembre 2020

Publicado: 19 de Enero 2021

Annals of Applied Biology ISSN: 1744-7348

1. Introducción

Las poliaminas (PAs) son aminas alifáticas que contienen dos o más grupos amino los cuales se encuentran protonados a pH fisiológico. Debido a esto, las PAs se pueden unir a macromoléculas cargadas negativamente, como los ácidos nucleicos y los fosfolípidos (Igarashi et al., 2010). Estas aminas se encuentran de forma ubicua en todos los organismos vivos, siendo esenciales para la supervivencia celular. En las plantas, las PAs participan en la regulación del crecimiento y el desarrollo, siendo su metabolismo el que presenta cambios durante estímulos de tipo biótico y abiótico (Fotopoulos et al., 2019; Jiménez-Bremont et al., 2014; Yu et al., 2019.). A pesar de que se conoce la importancia biológica de las PAs en diversos eventos celulares, aún se desconoce el papel preciso de estas moléculas en la defensa de las plantas en contra de patógenos. En esta revisión, se discuten los aspectos básicos del metabolismo de PAs y algunos hallazgos que pueden contribuir a enriquecer el conocimiento actual sobre las funciones específicas de las PAs en la inmunidad de las plantas.

Uno de los procesos más estudiados en relación al metabolismo de PAs bajo el estrés biótico ha sido la biosíntesis de estas aminas, ya que se ha reportado que se presenta una acumulación en los niveles de PAs ante el ataque de un patógeno. Estas alteraciones en los niveles de PAs libres y conjugadas en respuesta a patógenos con diferentes estilos de vida han sido bien estudiadas en los últimos tiempos (Alcázar et al., 2019; Jiménez-Bremont et al., 2014; Szalai et al., 2017; Walters, 2003). Por lo tanto, la acumulación de PAs derivada del estrés biótico es el resultado de la regulación transcripcional y traduccional de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis (Jiménez-Bremont et al., 2014; Tsaniklidis et al., 2020; Walters, 2003).

Procedente de los primeros estudios hasta el momento acerca de las PAs y su rol ante la respuesta a patógenos, se destaca el dinamismo con el que los niveles de PAs cambian, incluso las actividades enzimáticas involucradas en su metabolismo, principalmente en la biosíntesis y catabolismo. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo y las funciones específicas que tienen estas moléculas en la defensa de

las plantas. En estudios recientes se indica que las PAs libres pueden restringir el crecimiento de algunos hongos y bacterias patógenas *in vitro* (Mo et al., 2015; Wojtasik, K, 2015) y que la aplicación exógena de Put puede suprimir el desarrollo de nemátodos en plantas infectadas (Khajuria et al., 2018). Además de los tratamientos con Put y sus efectos en la activación de inmunidad de la planta, también se ha reportado que la aplicación de las PAs superiores como las Spd y Spm tiene efectos en la resistencia de la planta, induciendo vías de señalización importantes que pueden desencadenar una resistencia ante el ataque de fitopatógenos. En este sentido, es bien sabido que niveles elevados de Spm confieren resistencia a patógenos bacterianos (Gonzalez et al., 2011; Marco et al., 2014) y que pueden suprimir la multiplicación viral (Mitsuya et al., 2009).

El reto de estudio en este momento es el entendimiento del metabolismo de PAs en la respuesta a patógenos, vinculando estas interesantes moléculas con otras vías metabólicas, que pueden estar estrechamente relacionadas con la regulación y señalización en la defensa de la planta. Esta vinculación, ha llevado a demostrar la posible interrelación de las PAs y su metabolismo con la maquinaria antioxidante/oxidante la cual es punto importante en la resistencia al estrés biótico. Principalmente se ha observado que el catabolismo de PAs puede tener un papel fundamental a nivel regulatorio en este sistema (Jasso-Robles et al., 2020).

La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) es uno de los primeros acontecimientos que se desencadenan tras el reconocimiento de un microorganismo por parte de los receptores de membrana de las células vegetales. Esta señalización mediada por EROs puede propagarse desde diferentes compartimentos intracelulares, lo cual significa que dependiendo del sitio a nivel subcelular del cual provenga la especie reactiva, esta puede cumplir una función de señalización específica y diferencial. En trabajos recientes, se ha demostrado que el H₂O₂ derivado de los peroxisomas regula un conjunto de genes específicos, diferentes a los regulados por el H₂O₂ que proviene del cloroplasto (Sewelam et al., 2016). En este sentido, la oxidación específica de PAs en compartimentos particulares por diferentes isoformas

de PAO también contribuye a la generación de H_2O_2 y, por lo tanto, podría tener un efecto diferencial en la respuesta al estrés biótico. En particular, la oxidación citosólica y extracelular de PAs podría tener un impacto diferencial en la generación de H_2O_2 en compartimentos específicos en respuesta al ataque de patógenos (Jasso-Robles et al., 2020; Marina et al., 2008; Moschou et al., 2008).

Por lo tanto, se ha sugerido que el catabolismo intracelular de las PAs es un factor clave en la regulación de la homeostasis de las EROs a través de la regulación de la enzima RBOH. Esta oxidación mediada por PAOs es importante para la defensa de la planta, específicamente la actividad PAO intracelular puede ser crítica para definir el resultado final de la interacción planta-patógeno (Jasso-Robles et al., 2020; Mo et al., 2015; Moschou et al., 2008).

Es por ello que el estudio de las PAs y su metabolismo en condiciones de estrés biótico en plantas ha sido un área interesante para investigar. En parte, el interés por este tema se basa en los cambios inducidos por diferentes tipos de estrés que impacta en el metabolismo de estas moléculas. El estudio del metabolismo de las PAs ha demostrado que, en algunos casos, la modificación de este metabolismo, empleando herramientas de ingeniería genética, tiene como resultado una mejora en la respuesta de las plantas al estrés. En este contexto, se han logrado importantes avances en la comprensión del papel de la oxidación de las PAs en la inmunidad de las plantas. Un conjunto de evidencias ha puesto de manifiesto la relevancia de las enzimas PAO tanto a nivel intracelular como extracelular en la defensa de las plantas, contribuyendo a la oxidación de las PAs en sitios específicos y por lo tanto, a la producción de H_2O_2 como ya se ha mencionado antes. En este sentido, la implicación de la oxidación de PAs en la compleja red que modula la producción de EROs durante la infección por patógenos ha sido bien estudiada, pero al mismo tiempo sigue siendo un reto comprenderla completamente. De este modo, se requieren más estudios para evaluar la contribución del catabolismo terminal y catabolismo de retroconversión en la respuesta de defensa. Además, aunque se ha abordado la participación de algunas isoformas específicas de

PAO en la inmunidad de las plantas, aún es necesario seguir trabajando para elucidar las funciones específicas de cada miembro de esta familia multienzimática.

2. Objetivo

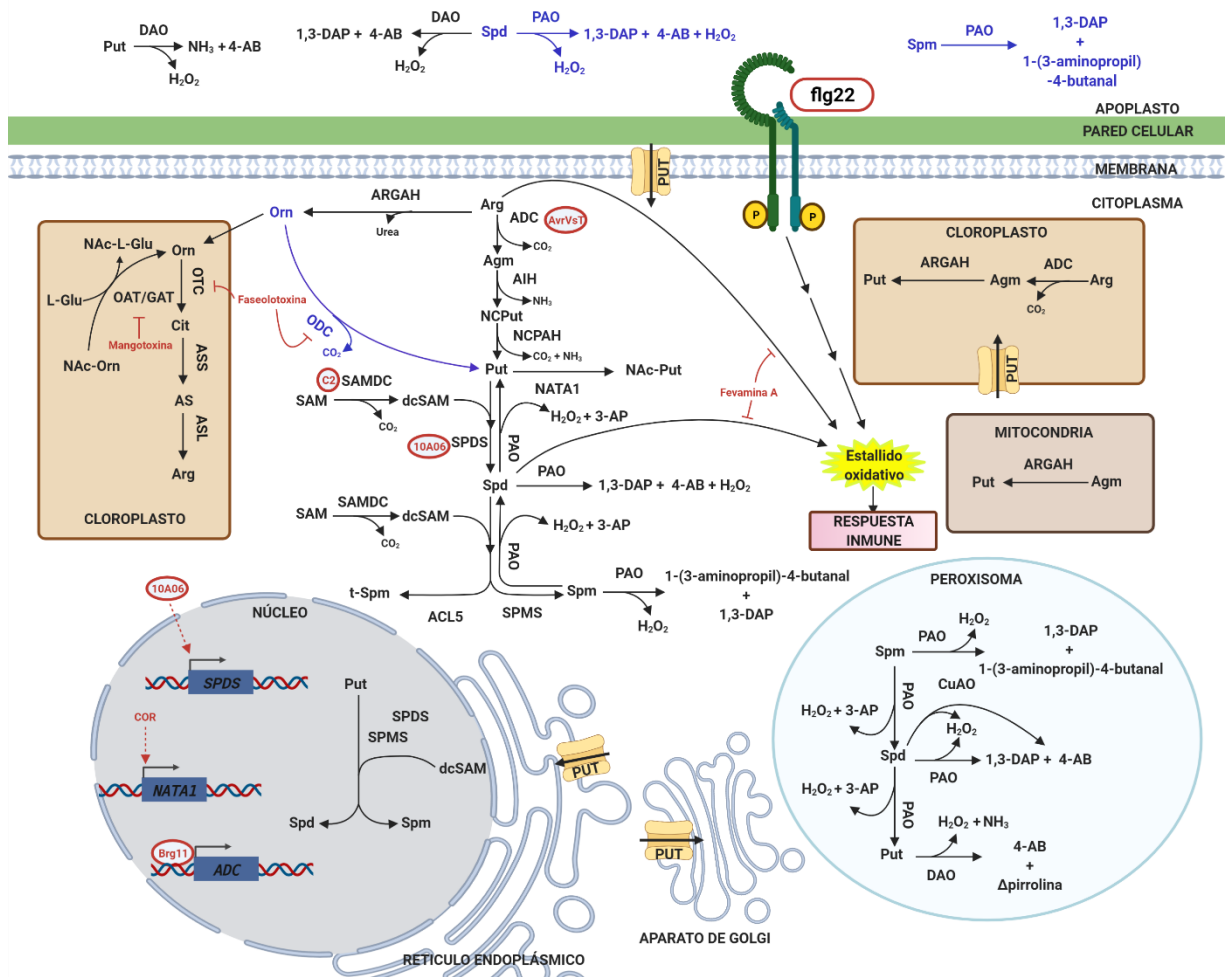
Realizar una revisión de los aspectos más importantes de la regulación de la biosíntesis, el catabolismo y la conjugación de las poliaminas bajo estrés biótico que puedan contribuir a mejorar el conocimiento actual sobre su rol en la inmunidad de las plantas.

3. Conclusiones

Tradicionalmente se ha explorado la biosíntesis y la degradación como las principales fuentes de cambios en los niveles de PAs en respuesta a la infección por patógenos. Sin embargo, el aumento de los niveles de PAs específicamente en el apoplasto en células vegetales infectadas apunta a que el transporte de PAs es un mecanismo importante en la regulación de sus niveles, en compartimentos subcelulares o extracelulares específicos. En este sentido, la caracterización de los transportadores de PAs en la interacción planta-patógeno, contribuiría a la comprensión de los mecanismos de acumulación y distribución de PAs en respuesta al ataque de patógenos, así como su contribución a la resistencia a la enfermedad. Además, la fosforilación de estos transportadores por parte de cinasas que participan en la señalización del estrés refuerza la idea de que la regulación del transporte de PAs a través de diferentes membranas celulares desempeña un papel importante en la defensa de la planta. En relación con este punto, los enfoques experimentales centrados en las consecuencias del ataque de los patógenos sobre el transporte de las PAs a compartimentos específicos y su posterior oxidación por PAOs específicas, proporcionarían sin duda una visión integral de las funciones fisiológicas de estas aminas en la inmunidad de la planta.

La participación de las PAs conjugadas en la defensa de las plantas es otro aspecto del metabolismo que se ha explorado poco. La amplia gama de moléculas que pueden conjugarse con las PAs y su gran variabilidad interespecífica dificultan su estudio. Sin

embargo, se espera que los actuales avances en el desarrollo de tecnologías analíticas para el análisis masivo de metabolitos faciliten esta tarea. Como consecuencia de la naturaleza esencial y multifuncional de las PAs, no ha sido fácil determinar si los cambios en los niveles de PAs inducidos por la infección de patógenos son realmente la consecuencia de respuestas orquestadas o el resultado de la alteración del metabolismo normal de estas.



Metabolismo de las PAs en las plantas y blancos de efectores de patógenos. La biosíntesis de la putrescina (Put) puede ocurrir por diferentes vías, a través de la arginina descarboxilasa (ADC), la agmatina iminohidrolasa (AIH) y la N-carbamoylputrescina amidohidrolasa (NCPAH). Una segunda vía implica a la ornitina

descarboxilasa (ODC). Una tercera vía implica la síntesis de Put a través de las actividades ADC y agmatinasa/arginasa (ARGAH). La Put es el precursor de las PAs superiores (Spd, Spm y tSpm), que se producen por la adición sucesiva de grupos aminopropilo por la espermidina sintasa (SPDS) y la espermina sintasa (SPMS) o la termopermina sintasa (ACL5). La síntesis de Spd y Spm puede ocurrir en el citosol o en el núcleo. En el núcleo los complejos SPDS/SPMS son responsables de la síntesis de PAs. La S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM), producida por las S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) sirve como donador de grupos aminopropilo. La Put es oxidada en el apoplasto, el citosol y el peroxisoma por diaminaoxidasas (DAOs). La Spd y la Spm son catabolizadas por las poliamina oxidasas (PAO) en el apoplasto, el citosol y el peroxisoma. La Spd también es oxidada por DAOs en el apoplasto y el peroxisoma. Los transportadores de PAs (PUT) se han identificado en la membrana celular, el cloroplasto, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Los efectores de los patógenos se representan en color rojo. La faseolotoxina inhibe a la ODC, y también a la ornitina transcarbamilasa (OTC), una enzima que convierte la ornitina (Orn) en citrulina (Cit) y participa en la biosíntesis de la arginina (Arg). La mangotoxina afecta a la actividad de la ornitina acetiltransferasa (OAT)/glutamato N-acetiltransferasa (GAT). BSCTV C2, 10A06 y AvrVsT interactúan con las enzimas implicadas en la biosíntesis de PAs y modifican su estructura. La fevamina A inhibe la producción de EROs mediado por Spd y Arg, desencadenada por el reconocimiento del patógeno. Brg11, 10A06 y la coronatina (COR) regulan la transcripción de los genes *ADC*, *SPDS* y *NATA1*, respectivamente. Las flechas azules indican reacciones que no ocurren en *Arabidopsis*.

Bibliografía

- Alcázar, R., Berberich, T., Gárriz, A., Shelp, B. J., & Soren Seifi, H. (2019). *Spermine Differentially Refines Plant Defense Responses Against Biotic and Abiotic Stresses*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00117>
- Fotopoulos, V., Obata, T., Gao, C., Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Zheng, B. (2019). *Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- Gonzalez, M. E., Marco, F., Minguet, E. G., Carrasco-Sorli, P., Blázquez, M. A., Carbonell, J., 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>
- 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>
- 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>
- Jiménez-Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-González, M. de la L., Rossi, F. R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., ... 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>
- Khajuria, A., & Ohri, P. (2018). Exogenously applied putrescine improves the

- physiological responses of tomato plant during nematode pathogenesis. *Scientia Horticulturae*, 230, 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2017.11.021>
- Marco, F., Busó, E., & Carrasco, P. (2014). *Overexpression of SAMDC1 gene in Arabidopsis thaliana increases expression of defense-related genes as well as resistance to Pseudomonas syringae and Hyaloperonospora arabidopsidis*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00115>
- Marina, M., Maiale, S. J., Rossi, F. R., Romero, M. F., Rivas, E. I., Gárriz, 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 viridiflava*. *Plant Physiology*, 147(4), 2164–2178. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122614>
- Mitsuya, Y., Takahashi, Y., Berberich, T., Miyazaki, A., Matsumura, H., Takahashi, H., Kusano, T. (2009). Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Physiology*, 166(6), 626–643. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.08.006>
- 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*. *Plant Journal*, 83(6), 962–975. <https://doi.org/10.1111/tpj.12941>
- Moschou, P. N., Paschalidis, K. A., Delis, I. D., Andriopoulou, A. H., Lagiotis, G. D., Yakoumakis, D. I., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell*, 20(6), 1708–1724. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059733>
- Sewelam, N., Kazan, K., & Schenk, P. M. (2016). Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00187>

- Szalai, G., Janda, K., Darkó, É., Janda, T., Peeva, V., & Pál, M. (2017). Comparative analysis of polyamine metabolism in wheat and maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 239–250. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2017.01.012>
- Tsaniklidis, G., Pappi, P., Tsafouros, A., Charova, S. N., Nikoloudakis, N., Roussos, P. A., Delis, C. (2020). Polyamine homeostasis in tomato biotic/abiotic stress cross-tolerance. *Gene*, 727, 144230. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2019.144230>
- Walters, D. (2003). Resistance to plant pathogens: Possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist*, 159(1), 109–115. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00802.x>
- Wojtasik, W., Kulma, A., Namysł, K., Preisner, M., & Szopa, J. (2015). Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Frontiers in Plant Science | Www.Frontiersin.Org*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00291>
- Yu, Z., Jia, D., & Liu, T. (2019). *plants Polyamine Oxidases Play Various Roles in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance*. <https://doi.org/10.3390/plants8060184>