



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y
TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización del desarrollo, el estado redox y la respuesta a estrés
abiótico y biótico de la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis***

Tesis que presenta

Ana Isabel Chávez Martínez

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., diciembre del 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Caracterización del desarrollo, el estado redox y la respuesta a estrés abiótico y biótico de la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis*” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por la M.C. Ana Isabel Chávez Martínez y aprobada el 03 de diciembre del 2020 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Director de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Asesor interno

Dr. Guillermo Pastor Palacios
Asesor interno

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler
Asesor externo

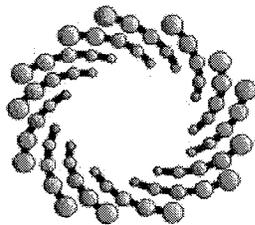


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 298530 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Se agradece al Proyecto de Problemas Nacionales **2015-01-414** “Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés por frío para generar plantas tolerantes al cambio climático”, por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 119 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de febrero del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Guillermo Pastor Palacios	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Sinodal externo	UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana Isabel Chávez Martínez

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización del desarrollo, el estado redox y la respuesta a estrés abiótico y biótico de la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis**

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:33 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de febrero de 2021.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

A Dios por permitirme descubrir el camino de la ciencia y por darme la fuerza para continuar cada día con valor y esperanza.

A mis padres, Alicia y J. Isabel, por cultivar en mí el sueño la búsqueda del conocimiento, quienes lo han sacrificado todo por ver cumplidas nuestras metas, apoyándome incondicionalmente, este logro es nuestro.

A mi pequeño Mateo con todo mi amor, eres mi fuente de inspiración y alegría.

A mis hermanos Daniel y Edgar, por estar siempre cerca, brindándome su amor y consejos.

A mi compañero de vida Julio César por su amor y apoyo incondicional.

A mi primer gran maestro el Lic. Gustavo Salazar Vázquez por ser punta de lanza en mi educación.

Agradecimientos

Quiero expresar un sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por creer en mí y por todas sus invaluable enseñanzas, ha sido un honor para mí el haber formado parte de su equipo.

Agradezco a Adriana, Azucena, Laura y Aída a quienes estimo profundamente, gracias por su sincera amistad, por sus consejos y palabras de aliento. También a mis compañeros del laboratorio de biología molecular de hongos y plantas, por las experiencias gratas y el tiempo compartido.

Así mismo, agradezco de forma especial a la M.C. Alicia Becerra Flora, por todo su apoyo para realizar esta tesis, así como por su orientación.

Agradezco al Dr. Mario Alberto Serrano Ortega, por su disponibilidad y por abrirme las puertas durante mi estancia en su laboratorio. Aprovecho también para agradecer su técnico, la M.C. Martha Torres por su amabilidad, apoyo y soporte profesional para lograr los objetivos fijados.

Agradezco al Dr. Jossep Dubrousky por su importante aporte a esta tesis y por brindarme la oportunidad de aprender de él y de su equipo durante mi estancia en su laboratorio.

De igual manera agradezco a mis sinodales, el Dr. Rubén López Revilla, el Dr. Ignacio Pastor Palacios y la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler por toda su disponibilidad y por sus valiosos consejos académicos tan importantes para mi formación.

Agradezco a la Dra. Diana Sánchez Rangel, por su instrucción y enseñanzas que han sido pioneras en mi carrera, las recuerdo con cariño.

Debo agradecer también de manera especial a la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano por su colaboración y valiosos aportes a esta tesis.

Contenido

Caracterización del desarrollo, el estado redox y la respuesta a estrés abiótico y biótico de la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis*

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Hoja para colocar la copia del acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Anexo	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvi

Índice

I. Introducción	1
1.1. Las poliaminas en las plantas	1
1.2. Las rutas de biosíntesis de novo de las poliaminas	2
1.3. La conjugación de las poliaminas	4
1.4. El catabolismo de las poliaminas	5
1.5. El transporte de las poliaminas	6
1.6. Otros mecanismo de control de la homeostasis de las poliaminas	7
1.7. Funciones de las poliaminas en las plantas	8
1.8. Funciones de las PAs durante la respuesta a estrés	9
1.9 Estrategias para el estudio de las poliaminas en las plantas	11
1.9.1. La aplicación exógena de las PAs y el uso de los inhibidores de su biosíntesis	11
1.9.2. El uso de las líneas mutantes y transgénicas del metabolismo de PAs	14
1.10 <i>Arabidopsis thaliana</i> como un modelo de estudio eficiente para comprender los mecanismos de las PAs en plantas	17
1.11 Antecedentes directos	20
Justificación	21
II. Objetivos	22

III.	Resultados	24
3.1.	Capítulo I	
	La disminución en los niveles de poliaminas en la línea silenciante- <i>adc</i> de <i>Arabidopsis</i> resulta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno	25
3.2.	Capítulo II	
	La línea silenciante- <i>adc</i> tiene mayor sensibilidad al estrés abiótico	26
3.3.	Capítulo III	
	Niveles óptimos de poliaminas son esenciales para la correcta organización de la arquitectura radicular en etapas tempranas del desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	32
3.4.	Capítulo IV	
	La línea silenciante- <i>adc</i> de <i>Arabidopsis</i> exhibe una respuesta de defensa diferencial a las infecciones por <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Pseudomonas syringae</i>	39
IV.	Conclusiones	41
V.	Referencias	45

Lista de tablas

Tabla 1. Fórmula química de PAs más abundantes en plantas	2
Tabla 2. La aplicación exógena de PAs y su efecto en la respuesta al estrés	12
Tabla 3. La sobreexpresión de genes biosintéticos de PAs y la tolerancia al estrés	15
Tabla 4. Genes identificados implicados en biosíntesis de PAs en <i>Arabidopsis</i>	18
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados	67

Lista de figuras

Figura 1. Biosíntesis de PAs en plantas	4
Figura 2. Representación esquemática de las vías del catabolismo de las poliaminas en planta	6
Figura 3. Efecto del estrés salino en las líneas silenciante- <i>adc</i> y la <i>Ws</i>	30
Figura 4. Expresión relativa de genes implicados en la respuesta a estrés salino bajo la aplicación de 150mM y 175mM NaCl	31
Figura 5. Ensayo de estrés por bajas temperaturas	32
Figura 6. Análisis de la tasa de crecimiento de la raíz primaria de las plántulas WT y silenciante- <i>adc</i>	36
Figura 7. Análisis de generación y desarrollo de raíces laterales (RL)	37
Figura 8. Análisis del RAM de plántulas de la <i>Ws</i> y la silenciante- <i>adc</i>	38
Figura 9. Tinción GUS de plántulas de <i>CycB1:amiRadc</i>	39

Anexos

1. Materiales y métodos	63
2. Publicaciones	78

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
ADC	Arginina descarboxilasa
Agm	Agmatina
AIH	Agmatina amidohidrolasa
ANPS	Proteínas anaerobias
ARGAH	Arginasa
Arg	Arginina
ARGI1	Arginasa 1
CAD	Cadaverina
CAT	Catalasa
Cit	Citrulina
CoA	Acetil coenzima A
CPA	N-carbamoil putrescina amidohidrolasa
DAO	Diamina oxidasa
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ET	Etileno
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HSPS	Proteínas de heat-shock
JA	Ácido jasmónico
LOX3	Lipoxigenasa 3
MeJA	Metil jasmonato
NCPut	N-carbamoil putrescina

ODC	Ornitina descarboxilasa
Orn	Ornitina
PAO	Poliamina oxidasa
PRs	Proteínas
Put	Putrescina
PYRR	Pirrolina
PYRRDH	Pirrolina deshidrogenasa
SA	Ácido salicílico
SAMDC	S-adenosil metionina descarboxilasa
Spd	Espermidina
SPDS	Espermidina sintasa
Spm	Espermina
SPMS	Espermina sintasa
SSPS	Proteínas de estrés salino
tSPM	Termoespermina
tSPMS	Termoespermina sintasa
WSPS	Proteínas de estrés hídrico

Resumen

Caracterización del desarrollo, el estado redox y la respuesta a estrés abiótico y biótico de la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis*

La generación de plantas auxotróficas de poliaminas (PAs) no se han podido lograr ya que se ha encontrado que estas son letales. En nuestro grupo se generó una línea de *Arabidopsis* que mediante un microRNA simultáneamente silencia a los dos genes parálogos de la arginina descarboxilasa (*AtADC1* y *2*), la cual tiene bajos niveles de PAs. El objetivo de esta tesis fue estudiar las implicaciones de la deficiencia de niveles óptimos de PAs en la línea silenciante-*adc* sobre el desarrollo y la respuesta a estrés abiótico y biótico en *Arabidopsis*. En este sentido, nosotros observamos que la línea silenciante-*adc* mostró un incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs), como resultado del incremento en la actividad de la NADPH oxidasa, así como la disminución de la actividad de la catalasa. También se reportó que las plántulas de la línea silenciante-*adc* tuvieron una mayor sensibilidad al estrés salino y por frío, evidenciada por la disminución en su crecimiento y desarrollo, así como la aparición de clorosis en las hojas. Además, se logró asociar la disminución de los niveles de PAs a defectos en los procesos de división y elongación celular en la raíz de *Arabidopsis*. Finalmente, se caracterizó la respuesta de la línea silenciante-*adc* al ataque de microorganismos fitopatógenos. Nuestros resultados muestran que la línea silenciante-*adc* fue susceptible a la infección por el hongo *Botrytis cinerea*, y resistente a la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae*. Los pre-tratamientos con Put o con MeJA en la interacción con el hongo, y el pre-tratamiento con Put para la bacteria fueron capaces de restablecer o incrementar la expresión de genes de defensa en la línea silenciante-*adc*, y para el caso del hongo previniendo además el desarrollo de los síntomas de la infección. Estos hallazgos, nos han proporcionado información clave sobre el papel que juegan las PAs en la regulación y homeóstasis del contenido de EROs, y su efecto en el desarrollo de la raíz, así como de la respuesta de defensa al estrés abiótico y biótico de *Arabidopsis thaliana*.

Palabras clave: Poliaminas, Arginina descarboxilasa, Desarrollo, Especies reactivas de oxígeno, Estrés abiótico y biótico.

Abstract

Characterization of development, redox state and response to abiotic and biotic stress of the *adc*-silenced line of *Arabidopsis*

Generation of polyamine (PAs) auxotrophic plants has not been achieved since these have been found to be lethal. In our group, an *Arabidopsis thaliana* line was generated that simultaneously silences the two paralog arginine decarboxylase (*AtADC1* and *2*) genes through a microRNA, which reduces PAs levels. The aim of this thesis was to study the implications of the deficiency of PAs in the *adc*-silenced line on the development and response to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis*. In this sense, we observed that the *adc*-silencing line showed an increase in reactive oxygen species (ROS), as a result of increase in NADPH oxidase activity, as well as a decrease in catalase activity. Also, we found that *adc*-silenced seedlings had a greater sensitivity to salt and cold stress, evidenced by the decrease in their growth and development, as well as the appearance of chlorosis in leaves. In addition, it was possible to associate the decrease in PAs levels to defects in the processes of cell division and elongation in the *Arabidopsis* root. Finally, the response of the *adc*-silenced line to attack by phytopathogenic microorganisms was characterized. Our results show that the *adc*-silenced line was susceptible to infection by the fungus *Botrytis cinerea*, and resistant to infection by the bacterium *Pseudomonas syringae*. Pre-treatments with putrescine (Put) or methyl jasmonate (MeJA) during the interaction with the fungus, and Put pre-treatment for the bacteria were able to restore or increase the expression of defense genes in the *adc*-silenced line, and in the case of the fungus also prevented the development of symptoms. These findings have provided significant information about the role that PAs plays in the regulation and homeostasis of ROS content, and its effect on root development, as well as the defense response to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis thaliana*.

Polyamines, Arginine decarboxylase, Development, Reactive oxygen species, Abiotic and biotic stress

I. Introducción

Las poliaminas (PAs) son compuestos alifáticos de bajo peso molecular que están presentes desde organismos procariontes hasta eucariontes superiores. Estas moléculas están constituidas por cadenas hidrocarbonadas con cantidad variable de grupos amino, que a pH fisiológico (5.5 a 7.5) se encuentran protonadas. Desde su descubrimiento, el estudio de las PAs ha cobrado un gran auge, debido a las múltiples evidencias que las proponen como reguladores de crecimiento claves para el correcto desarrollo de los organismos, así como de su participación en la modulación de procesos de respuesta a estrés y adaptación. Además, las PAs pueden encontrarse unidas a moléculas aniónicas como lo son los ácidos nucleicos, las proteínas y los fosfolípidos de las membranas. Lo anterior, es un punto clave de su participación en la modulación de procesos celulares, tales como: la condensación de la cromatina, la replicación del DNA, la transcripción, la estabilización del RNA, la traducción, las modificaciones post-traduccionales, la detoxificación y el ciclo celular (Igarashi-Kashiwagi, 2000; Childs et al., 2003; Wallace et al., 2003; Jiménez-Bremont et al., 2014).

1.1. Las poliaminas en las plantas

Las PAs más abundantes son la diamina Put, la triamina espermidina (Spd) y la tetramina espermina (Spm), así como su isómero estructural, la termoespermina (tSpm) (Tabla 1). Sin embargo, en ciertos tipos de plantas y bajo condiciones especiales pueden encontrarse otras PAs como la diamina cadaverina (CAD). La distribución de las PAs en las plantas ocurre de manera órgano y tejido específicos. Por ejemplo, la Put es abundante en hojas, mientras que la Spd lo es en otros órganos (Takahashi et al., 2017). El contenido de PAs oscila de un rango de entre 10 μ M a 1 mM en función del estímulo del cual se trate (Galston y Sawhney, 1990).

La participación de las PAs en puntos clave de la modulación de los diferentes procesos fisiológicos y respuesta a estímulos medioambientales requiere una estricta regulación, la cual se lleva a cabo a través de su biosíntesis, conjugación, compartimentalización, catabolismo y transporte. Adicionalmente, la homeostasis

de las PAs puede ser regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional.

Tabla 1. Fórmula química de PAs más abundantes en plantas

Nombre	Fórmula
Putrescina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Espermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Termoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

1.2. Las rutas de biosíntesis *de novo* de las poliaminas

En las plantas, las PAs pueden sintetizarse mediante tres vías diferentes (Figura 1). La primera ruta ocurre cuando la arginina (Arg) es convertida a ornitina (Orn) por la arginasa (ARGAH, EC 3.5.3.1), y a continuación la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17) remueve el grupo carboxilo del átomo de carbono no. 1 de la Orn, generando Put y CO₂ (Pegg, 2016). La segunda ruta es llevada a cabo a partir de la Arg y se efectúa en pasos subsecuentes, donde el carbono no. 8 es removido de la Arg, formando agmatina (Agm) y CO₂ por acción de la arginina descarboxilasa

(ADC, EC 4.1.1.19); posteriormente, el átomo de nitrógeno no. 2 de la agmatina es removido por la agmatina iminohidrolasa (AIH, EC 3.5.3.12), generando N-carbomoil putrescina (NCPut) y NH₃, después la NCPut es hidrolizada por la N-carbomoil putrescina amidohidrolasa (CPA, EC 3.5.1.53), retirando el grupo carbomoil y produciendo Put, CO₂ y NH₃ (Docimo et al., 2012). La tercer ruta fue demostrada recientemente en *Arabidopsis*, en donde la agmatina producida por la acción de la ADC es catalizada a Put por la acción de la agmatinasa de la ARGAH con la liberación de urea (Patel et al., 2017). Además, aunada a estas rutas, se ha propuesto una cuarta vía, hasta ahora solo reportada en *Sesamum indicum*, donde el primer paso consiste en la conversión de Arg a citrulina (Cit), y posteriormente la citrulina descarboxilasa (CDC, EC 4.1.1.-) convierte la citrulina en NCPut para la formación de Put (Ouyang et al., 2017).

Una vez que se ha formado la Put, la síntesis de las PAs superiores Spd, Spm y tSpm se lleva a cabo mediante la adición secuencial de grupos aminopropilo a una molécula amino-aceptora (Put o Spd); esta reacción es catalizada por las aminopropil transferasas como la espermidina sintasa (SPDS, EC 2.5.1.16), la espermina sintasa (SPMS, EC 2.5.1.22) y la termoespermina sintasa (tSPMS, EC 2.5.1.79). Los grupos aminopropilo son derivados de la metionina, la cual es convertida a S-adenosil metionina y posteriormente es descarboxilada por la S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC, EC 4.1.1.50).

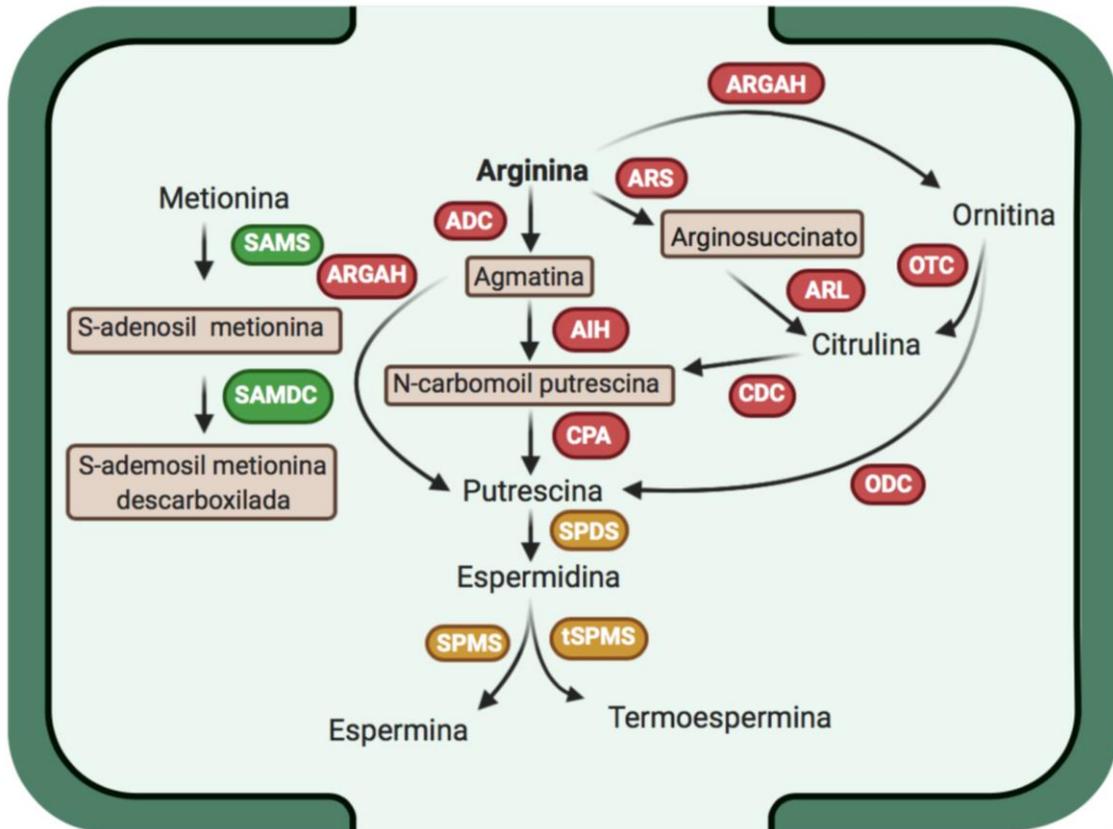


Figura 1. Biosíntesis de PAs en plantas. ADC, arginina descarboxilasa; AIH, agmatina iminohidrolasa; CPA, N-carbamoil-putrescina amidohidrolasa; ARGAH, arginasa; ODC, ornitina descarboxilasa; CDC, citrulina desacarboxilasa; ARS, argininsuccinato sintasa; ARL, argininsuccinasa; SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa; SPDS, espermidina sintasa; SPMS, espermina sintasa; tSPMS, termoespermina sintasa. Diagrama gráfico creado en BioRender.com

1.3. La conjugación de las poliaminas

En la naturaleza, las PAs pueden encontrarse en su forma libre o conjugada. Esta conjugación puede ser de forma no-covalente uniéndolas a macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, ácidos urónicos, fosfolípidos o lignina; o de forma covalente unidas a compuestos fenólicos, formando ácidos hidroxicinámicos principalmente con los ácidos cumárico, caféico, o ferúlico (Bassard et al., 2010). La conjugación de las PAs inicia con la formación de un enlace amida por acción de una transferasa, con la intervención de ésteres de acetil coenzima A (CoA). El

mecanismo de las PAs conjugadas no ha sido dilucidado por completo; sin embargo, entre las funciones que se les han atribuido se encuentran su participación en la fotosíntesis, en el inicio de la floración, y en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Bagni y Tassoni, 2001).

1.4. El catabolismo de las poliaminas

El proceso de catabolismo de PAs es efectuado por dos tipos de amina oxidasas, las amina oxidasas dependientes de Cu_2^+ (CuAO, EC 1.4.3.6) y las poliamina oxidasas dependientes de FAD (PAO, EC 1.5.3.3) (Figura 2). La enzima CuAO, utiliza como sustrato la Put y como cofactores el Cu_2^+ y la piridoxal fosfato; produciendo H_2O_2 , NH_3 y 4-aminobutanal. A continuación, el 4-aminobutanal es convertido a Δ Pirrolina (PYRR) y posteriormente por acción de la pirrolina deshidrogenasa (PYRRDH) se forma el ácido γ -aminobutírico (GABA). Subsecuentemente, el GABA es convertido a succinato y dirigido al ciclo de Krebs. En el caso de las PAOs, el cofactor requerido es el FAD, estas catalizan la conversión de la Spd y la Spm a 4-aminobutanal y N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal, respectivamente, y en la reacción se genera H_2O_2 (Kusano et al., 2015).

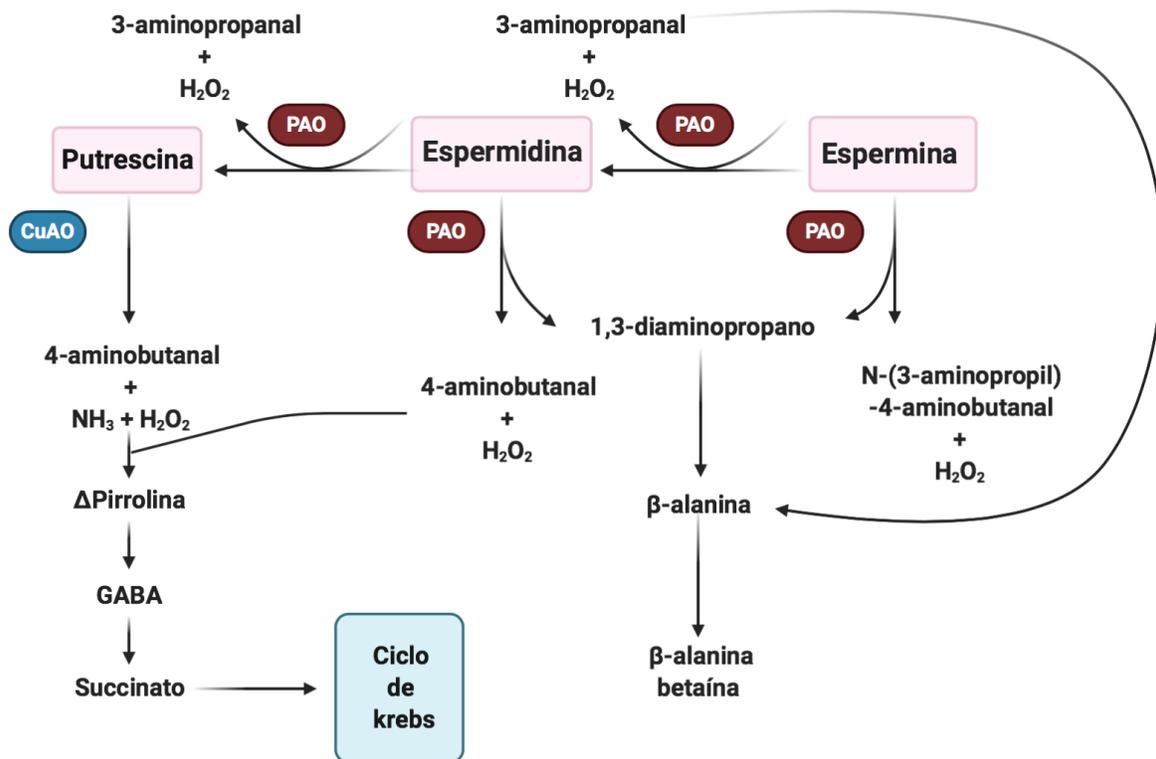


Figura 2. Representación esquemática de las vías del catabolismo de las poliaminas en plantas. CuAO, amina oxidasa dependiente de Cobre; PAO, poliamina oxidasa; Diagrama gráfico creado en BioRender.com.; GABA, Ácido γ -aminobutírico.

1.5. El transporte de las poliaminas

En su mayoría, las células son capaces de biosintetizar las PAs requeridas para el desarrollo de sus funciones biológicas. Sin embargo, bajo determinados estímulos o limitación de su biosíntesis, las PAs libres pueden ser tomadas del medio y transportadas rápidamente (Igarashi y kashiwagi, 2010). En células vegetales, las PAs se encuentran mayoritariamente ubicadas en la pared celular, la vacuola, el núcleo, la mitocondria y el cloroplasto (Slocum y Flores 1991). Esta compartamentalización de las PAs en diferentes organelos puede ocurrir debido a

su biosíntesis o por transporte intracelular de las PAs; este último se ha demostrado realizando ensayos en cultivos celulares, vacuolas y mitocondrias de diferentes especies (Fujita y Shinosaki, 2014). El primer reporte sobre el transporte de PAs de plantas fue realizado por Costa y Bagni en 1983. En este trabajo se comprobó la absorción de Put exógena, así como su efecto positivo sobre el desarrollo y rendimiento de frutos en *Malus domestica*. Posteriormente, fueron identificados los transportadores de PAs *OsPut1, 2 y 3*, así como los *AtPUT1, 2 y 3* en *Oryza sativa* y *Arabidopsis*, respectivamente (Mulangi et al., 2012a, b). Estos genes fueron clasificados como miembros de la familia de proteínas transportadoras de L-aminoácidos (LAT, por sus siglas en inglés). También en ese año se identificó a RMV1, una permeasa de aminoácidos que contiene 12 dominios transmembrana que transporta PAs y paraquants (PQ), nombrada AtLAT1 por su similitud con las proteínas LAT de *Arabidopsis* (Fujita et al., 2012). Un año más tarde fue publicada la caracterización de PAR1, un transportador de aminoácidos involucrado en el transporte intracelular de paraquants (Li et al 2013). Así mismo, en ensayos con protoplastos de *Arabidopsis*, los transportadores AtPUT1/AtLAT3, PAR1/AtLAT4/AtPUT2 y RMV1/AtLAT1/AtPUT3 fueron localizados en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y membrana plasmática (Fujita et al., 2012; Li et al. 2013; Fujita y Shinosaki., 2014). No obstante, el mecanismo de acción de los transportadores de PAs aún no ha sido completamente entendido.

1.6. Otros mecanismos de control de la homeostasis de las poliaminas

Aunado a los mecanismos de control de la homeostasis de las PAs convencionalmente estudiados, recientemente otros mecanismos han tomado importancia. Uno de ellos es la regulación de la traducción de los genes de biosíntesis y catabolismo de las PAs mediante marcos abiertos de lectura ubicados en las regiones 5'-UTR (uORFs, por sus siglas en inglés) de dichos genes. El mecanismo general de los uORFs consiste en la inhibición de la traducción del marco de lectura principal del gen por el bloqueo del escaneo ribosomal. Hasta ahora, los genes implicados en el metabolismo de las PAs en donde se han caracterizado uORFS en plantas son: el gen *ADC* de *Dianthus caryophyllus* L., de *A. thaliana*, de *Gossypium hirsutum* y de *Nicotiana tabacum*, el gen *ODC* de

Lycopersicon esculentum Mill, y los genes *SAMDC1* y *PAO2* de *A. thaliana* (Vaugh et al., 2012; Hanfrey et al., 2005; Hayden y Jorgensen 2007; Guerrero-González et al., 2014).

Otro mecanismo de regulación involucra la formación de homodímeros funcionales de las enzimas relacionadas al metabolismo de las PAs; incluso se ha reportado la formación de heterodímeros, como es el caso de las proteínas *AtADC1* y *AtADC2* de *A. thaliana* que forman heterodímeros en el cloroplasto y en el citosol (Maruri-López y Jiménez-Bremont, 2017). En el caso de las aminopropil transferasas, el homodímero de la *AtSPDS1* ha sido localizado en el núcleo y en el citosol, mientras que el heterodímero de la *AtSPDS1* y la *AtSPDS2* se ubica principalmente en el núcleo. Por su parte, la *AtSPMS* forma homodímeros, localizados únicamente en el citosol (Sekula y Dauter, 2018). Adicionalmente, algunas proteínas implicadas en el catabolismo de las PAs poseen péptidos de exporte celular, tal es el caso de las amino oxidasas *PsCuAO* de *Pisum sativum*, la *MdAO2* de *Malus domestica*, *AtAO1* y *AtCuAO1* de *A. thaliana* (Tipping y McPherson, 1995; Planas-Portell et al. 2013; Zarei et al. 2015).

Aunado a esto, la homeostasis de las PAs también puede ser regulada por mecanismos post-traduccionales como la presencia de secuencias de degradación “PEST”. Estas secuencias PEST son ricas en los aminoácidos Prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) y son señales de degradación proteolítica por la vía del proteosoma 26S (Rechsteiner y Rogers, 1996). Se han caracterizado estas secuencias PEST en las proteínas *AtSAMDC1* y la *AtPAO5* de *A. thaliana*, así como la *ZmSPMS1* de maíz la (Zhang et al., 2011; Maruri-López et al., 2014; Ahou et al., 2014).

1.7. Funciones de las poliaminas en las plantas

En las plantas, los procesos de crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés están regulados a través de una compleja red de rutas metabólicas, donde intervienen una gran variedad de moléculas, cuyas funciones específicas son ejecutadas en un escenario dinámico y sinérgico. Entre las cuales, las PAs tienen una gran

participación durante todo el ciclo de vida de las plantas. En 1911, Ciamician and Ravenna identificaron por primera vez la presencia de la putrescina (Put) en la planta *Datura stramonium*. Posteriormente, en 1952 Richards y Coleman reportaron la acumulación de Put en respuesta a condiciones de estrés por deficiencia de potasio en *Hordeum vulgare* (Richards y Coleman 1952). Casi dos décadas después, las PAs (Put, Spd y Spm) fueron declaradas ubicuas en las plantas superiores (Smith, 1971) y años más tarde, se descubrió que la adición de Put o Spd lograba retrasar la senescencia en protoplastos de *Avena sativa* (Galston et al., 1978).

Actualmente se sabe que las PAs están involucradas en un amplio rango de procesos como son la transcripción, la traducción, la estabilización de ácidos nucleicos, la modificación post-traducciona, la modulación del ciclo celular, la apoptosis, la detoxificación celular, la embriogénesis, la organogénesis, el desarrollo de la flor y el fruto, la inhibición de la senescencia, y la respuesta al estrés biótico y abiótico. Además, fungen como reserva de carbono y nitrógeno (Minocha et al., 1995; Kusano et al., 2008; Handa et al., 2018; Tiburcio et al., 2014). Por otro lado, al igual que los reguladores de tipo hormonal, las PAs han sido consideradas reguladores de crecimiento. Sin embargo, a diferencia de las hormonas, las PAs son ubicuas en cada célula de la planta, y su concentración es mucho mayor que las hormonas, llegando a concentraciones milimolares a largo de su desarrollo, en condiciones de estrés abiótico y por la interacción con microorganismos (Pandey et al., 2000; Xu et al., 2014b; Takano et al., 2012).

1.8. Funciones de las poliaminas durante la respuesta a estrés

Ante una condición de estrés, el proceso de adaptación de las plantas depende de censar rápidamente la condición adversa, transmitir efectivamente las señales a la maquinaria celular y desencadenar una respuesta adaptativa (Minocha et al., 2014). Inicialmente las señales de estrés son percibidas por los receptores en la membrana plasmática activando la acumulación de mensajeros secundarios como el CA^+ libre, las EROs y los inositol fosfatos. A su vez, estos activan componentes río abajo como las fosfatasas y las quinasas. A continuación, la cascada de señalización induce

cambios que se manifiestan a nivel molecular, bioquímico, fisiológico y anatómico (Nakashima et al., 2009).

La salinidad y las bajas temperaturas son de los factores de estrés abiótico que más afectan el crecimiento y el desarrollo de las plantas. En el caso del estrés por salinidad, este además puede generar toxicidad iónica, estrés osmótico y oxidativo (Zhu, 2007; Hanin et al., 2016). Las plantas son capaces de almacenar Na^+ hasta 10 mM (Taiz et al., 2010). Sin embargo, al rebasar este límite, la alta concentración de sales, disminuye el potencial del agua y la turgencia celular. A continuación, se genera el cierre estomático, la restricción de crecimiento, la reducción de la viabilidad del polen, la inhibición de la actividad de las enzimas fotosintéticas y finalmente la acumulación de H_2O_2 (Miller et al., 2008). El exceso de acumulación de EROs por su parte, conlleva a cambios en la fluidez de la membrana, la peroxidación lipídica, el daño a los ácidos nucleicos, la desnaturalización proteica, la oxidación de carbohidratos, la senescencia y la muerte celular (Andronis et al., 2010; Allu et al., 2014). No obstante, el nivel de estrés por salinidad depende de la concentración y la capacidad de la planta para tolerar o mitigar los efectos negativos causados por la acumulación de NaCl (Hanin et al., 2016; Assaha et al., 2017). En lo que respecta al estrés por bajas temperaturas (0-15 °C), este disminuye la fotosíntesis por fotoinhibición, restringe el crecimiento y el desarrollo, llegando a provocar clorosis, marchitez y necrosis.

En este sentido, la respuesta de adaptación a estas condiciones involucra la modulación de los reguladores de tipo hormonal como las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el etileno, el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA), el ácido abscísico (ABA), proteínas de respuesta a estrés, tales como las proteínas de respuesta al calor (HSPs, del inglés Heat-Shock Proteins), a la deshidratación (WSPs, Water Stress Proteins), a la salinidad (SSPs, salt stress proteins), a la anoxia (ANPs, anaerobic proteins), a la interacción con patógenos (PRs, pathogenesis-related), entre otras. Además, en la respuesta al estrés participan otras moléculas tales como las especies reactivas de oxígeno (EROs) [el ión radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)] y

solutos compatibles como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, betaínas y las poliaminas (PAs) (Verma et al., 2016; Rai et al., 2019).

Desde el inicio del estudio de la participación de las PAs en la respuesta al estrés de las plantas, el entendimiento de su mecanismo ha enfrentado diversos retos entre los que se pueden incluir su ubicuidad celular, que son esenciales, además de su estricta regulación. A pesar de esas limitantes, ha sido ampliamente documentado que los genes que codifican para las enzimas que participan en el metabolismo de las PAs son altamente responsivos a la percepción de factores adversos (Gupta et al., 2012; Shi y Chan, 2014). Estas condiciones conllevan a una gran acumulación de PAs, por ejemplo, se ha reportado que el estrés salino induce la acumulación de Spm en arroz, maíz y trigo. Así mismo, las PAs pueden mitigar los efectos de este estrés al bloquear los canales de entrada de Na⁺, incrementar la acumulación de osmoprotectores como la prolina e inducir el sistema antioxidante (Maiale et al., 2004; Jiménez-Bremont et al., 2007; Reggiani et al. 1994).

De igual manera, los fenotipos de plantas tolerantes a estrés abiótico han sido asociados a niveles elevados de PAs, así como, la aplicación exógena de estas aminas con la mejora de la respuesta de tolerancia (Minocha et al., 2014). En este sentido, es sabido que bajo condiciones de estrés, las PAs inducen la acumulación de glicina betaína, GABA, y metabolitos antioxidantes, además estabilizan las membranas celular y de los organelos, secuestran oxígeno y radicales hidroxilo, incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes y promueven la señalización mediante la producción de H₂O₂ (Guo et al., 2014; Sagarika et al., 2016).

1.9. Estrategias para el estudio de las poliaminas en las plantas

1.9.1. La aplicación exógena de poliaminas y el uso de los inhibidores de su biosíntesis

En la búsqueda del entendimiento del papel fisiológico que desempeñan las PAs en las plantas, la aplicación exógena de alguna PA específica ha brindado un amplio panorama del papel que juegan estas aminas en el desarrollo y en la respuesta a estrés (Yu et al., 2019; Bano et al., 2020). Por su parte, los efectos de la aplicación

exógena de las PAs han sido estudiados en diferentes especies de plantas (Liu et al., 2013; Wu et al., 2018); por ejemplo, la aplicación exógena de PAs induce la embriogénesis en *Vitis vinifera* y en *Oryza sativa*; y en el caso de la aplicación de Spd se ha reportado una aceleración de la floración en *A. thaliana* y *Dendranthema morifolium* (Tan et al., 2017; Xu, 2015).

Bajo condiciones de estrés, se ha visto que los tratamientos con PAs pueden activar los mecanismos de tolerancia en plantas a las condiciones de estrés mecánico, salino, osmótico, hídrico, oxidativo, por frío, por deficiencia nutricional, por rayos UV y contaminantes, así como por el ataque de patógenos (Yin et al., 2015; Wu et al. 2018; Benavides et al., 2018 Walters, 2003; Chen et al., 2019); algunos ejemplos de tratamientos con PAs exógenas son enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. La aplicación exógena de PAs y su efecto en la respuesta al estrés

Planta	Factor estresor	Poliamina aplicada	Respuesta	Referencia
<i>Triticum aestivum</i> L.	estrés por sequía	Put 0.1 mM	incremento de pro, fotosíntesis y reducción del daño	Gupta et al., 2012
<i>Nicotiana tabacum</i>	estrés osmótico	Put 1 mM	prevención de la pérdida de agua, incrementa la eficiencia del fotosistema ii	Kotakis et al., 2014
<i>Triticum aestivum</i> cv. <i>Giza 168</i>	estrés por altas temperaturas (35± 2° c)	Put o Arg 2.5 mM	incremento de tolerancia al estrés	Hassanein et al., 2013

<i>Oryza sativa</i> L. <i>Ssp indica</i>	estrés salino por nacl	Spd 1 mM	mejora de la respuesta de defensa	Saleethong et al., 2013
<i>Citrus aurantium</i> L.	estrés salino por nacl	Put, Spd o Spm 1 mM	activación del sistema antioxidante y mejora de la respuesta de defensa	Tanou et al., 2014
<i>Cynodon dactylon</i>	estrés por sequía, salino por nacl,	Put, Spd o Spm 1 mM	incremento de proteínas relacionadas a la respuesta a estrés y las enzimas antioxidantes	Shi et al., 2013

Sin embargo, a pesar de las aportaciones de estos reportes sobre el efecto de la aplicación exógena de PAs, la complejidad de la homeostasis de las PAs, que incluye inter-conversiones entre ellas y su catabolismo, hace complicado el estudio de la función de cada PA.

Adicionalmente, otra estrategia utilizada para el estudio de la PAs ha sido la inhibición de las diversas enzimas implicadas en su metabolismo. Los principales inhibidores utilizados para bloquear la biosíntesis de las PAs han sido la α -difluorometilornitina (DFMO, análogo de la ornitina) y la difluorometilarginina (DFMA, análogo de la arginina), los cuales inhiben de manera irreversible la actividad enzimática de la ODC y la ADC, respectivamente. Aunado a estos, el uso de los inhibidores reversibles de las enzimas implicadas en los pasos subsecuentes, metilgloxal-bis guanilhidrazona (MGBG) para inhibir la actividad enzimática de la SAMDC, y la ciclohexilamina (CHA) para interrumpir la actividad de la SPDS y la SPMS por la competencia de su sustrato han sido utilizados en diversas plantas en función de discernir el papel de cada PA en el desarrollo y en la respuesta al estrés. En este sentido, se sabe que la aplicación de DFMO inhibe el desarrollo del fruto en

tomate. Así mismo, tanto el DFMO como el DFMA inhiben la formación de las células embrionarias en zanahoria Egea-Cortines y Mizrahi (1991). Así mismo, la aplicación de DFMO restringe la tuberización en camote e inhibe la diferenciación de la raíz en tabaco (Galston y Flores 1991; Burtin et al. 1989). En *Arabidopsis thaliana*, la aplicación de los inhibidores MGBG y D-Arg reducen drásticamente el crecimiento de la raíz primaria, provocando un arresto del ciclo celular en la línea reportera CycB1-GUS (Ortega-Amaro et al., 2011).

Adicionalmente, en condiciones de estrés se ha visto que la aplicación de DFMA y DFMO afecta la tolerancia al estrés por salinidad de *Oryza sativa* (Yamamoto et al., 2016). Recientemente, Li y colaboradores (2018) reportaron que la disminución de PAs por la aplicación de ciclohexilamina (CHA) disminuye la tolerancia al estrés por sequía en la planta *Trifolium repens*. No obstante, inhibidores como el MGBG genera toxicidad celular, además el DFMO, el DFMA y la CHA han presentado la desventaja de ser poco estables y/o inespecíficos, pudiendo afectar la actividad de otras enzimas involucradas en el metabolismo de PAs como ADC y PAO (Burtin et al., 1989; Batchelor et al., 1986; Maiale et al., 2008).

1.9.2. El uso de líneas mutantes y transgénicas del metabolismo de PAs

La generación de líneas mutantes y líneas de sobreexpresión mediante el uso de la ingeniería genética ha aportado grandes contribuciones al entendimiento del papel de las PAs *in vivo*. Por ejemplo, la sobreexpresión del gen *AtADC2* en *Arabidopsis* bajo el control del promotor 35S CaMV del virus del mosaico de la coliflor mostró un desajuste en los niveles Spd y Spm, así como la disminución en el contenido de giberelinas, ocasionando un fenotipo de retraso de la floración y enanismo. De manera similar, en tabaco la sobreexpresión del gen *ADC* de avena generó entre otros defectos, una reducción en la longitud del tallo y de las raíces, además de la aparición de clorosis (Masgrau et al., 1997; Panicot et al., 2002b). Estos reportes proporcionaron evidencias de la importancia que tienen las PAs en el desarrollo de las plantas y como el desajuste en sus niveles puede inducir cambios en la fisiología de las plantas. No obstante, la sobreexpresión de la SPDS de *Cucurbita facifolia* en *Arabidopsis* conyeva al incremento de la tolerancia a diferentes tipos de estrés

abiótico (Kasucabe et al., 2004; Groppa y Benavides, 2008). Además, las líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *SAMDC1* tienen mayor resistencia al ataque de los microorganismos *Pseudomonas syringae* y *Hyaloperonospora arabidopsidis*. En dicho trabajo, los autores sugieren que el aumento en la resistencia de las líneas sobreexpresoras de la SAMDC al ataque de patógenos, correlaciona con la inducción de la expresión de los genes relacionados con la defensa de la planta (Marco et al., 2014). A continuación, en la Tabla 3 se enlistan algunos ejemplos de los efectos de la sobreexpresión de genes codificantes para las enzimas de biosíntesis de las PAs en diferentes especies de plantas.

Tabla 3. La sobreexpresión de genes biosintéticos de PAs y la tolerancia al estrés

Sobreexpresión de genes	Planta	Respuesta de tolerancia	Referencia
ADC	<i>Oryza sativa</i>	estrés salino	Roy y Wu, 2001
ADC	<i>Brassica juncea</i>	estrés salino y por frío	Mo y Pua, 2002
ADC1, ADC2	<i>Oryza sativa</i>	estrés por sequía	Capell et al., 2004
ADC1, ADC2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	estrés por congelamiento	Cuevas et al., 2008
ADC	<i>Malus domestica</i>	estrés por frío, salino y por deshidratación	Hao et al 2005
ADC	<i>Oryza sativa</i>	estrés por frío	Akiymaya y Jin 2007
AtADC2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	estrés salino	Urano et al., 2004
ADC	<i>Solanum melongena</i>	estrés por frío, salinidad y por deshidratación	Prabhathi y Rajam, 2007
ADC	<i>Zea maize</i>	estrés por salinidad	Jiménez Bremont et al., 2007

MdADC	<i>Malus sylvestris (L.) Mill</i>	estrés por salinidad	Liu et al. 2006
PaADC2	<i>Pringlea antiscorbutica</i>	estrés por salinidad y frío	Hummel et al. 2004
cDNA ODC (Mus musculus)	<i>Tabaco</i>	estrés por salinidad	Kumria y Rajam, 2002
MdSAMDC2	<i>Malus sylvestris</i>	estrés por salinidad y frío	Hao et al., 2005
MdSAMDC2	<i>Pyrus communis</i>	estrés por salinidad	He et al., 2008
cDNA SPDS (cucurbita ficifolia)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	estrés por salinidad, por frío y por sequía	Kasukabe et al., 2004
cDNA SPDS (cucurbita Ficifolia)	<i>Pyrus communis</i>	estrés salino y por metales pesados	Wen et al., 2008
35S::ADC (Avena sativa)	<i>Solanum melongena</i>	estrés salino, por sequía, por bajas y altas temperaturas y toxicidad por Cd ²⁺	Prabhavathi y Rajam, 2007
35S::SAMDC (Capsicum annum)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	estrés por sequía	Wi et al 2014
pRD29A::ADC (Avena sativa)	<i>Lotus tenuis</i>	estrés por sequía	Espasandin et al., 2014
35S::SPMS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	estrés por alta temperatura	Sagor et al., 2013

Por otro lado, la auxotrofia de PAs por la mutación de los genes de su biosíntesis, no se han podido lograr. Por ejemplo, la doble mutación (*adc1^{-/-} x adc2^{-/-}*) de ambos

parálogos *AtADC* en *Arabidopsis*, al igual que la de los genes *AtSPDS* (*spds1^{-/-}* x *spds2^{-/-}*) inducen arresto embrionario (Urano et al., 2005; Imai et al., 2004b). Por otro lado, la doble mutante *acl5^{-/-}* x *spms^{-/-}* de *Arabidopsis* logra completar su ciclo biológico, aunque presenta un fenotipo de hipersensibilidad al estrés por salinidad y por sequía, lo que muestra la importancia de la espermina y termoespermina en la respuesta al estrés abiótico (Yamaguchi et al., 2007). Aunado a éstas, las líneas mutantes individuales de las poliamina oxidasas *Atpao1-1* y *Atpao2-1*, aunque no muestran un fenotipo en desarrollo, acumularon especies reactivas de oxígeno (Jasso-Robles et al., 2019).

Estos reportes demuestran la complejidad de la regulación de las PAs y cómo los cambios en sus niveles alteran significativamente el desarrollo y la respuesta al estrés de las plantas. Razón por la cual, la búsqueda de sus mecanismos de acción en los diversos procesos celulares es de suma importancia.

1.10. *Arabidopsis thaliana* como un modelo de estudio eficiente para comprender los mecanismos de las PAs en plantas

Una gran parte del conocimiento que se tiene sobre las PAs ha sido posible gracias al uso de organismos modelo como la planta *Arabidopsis thaliana*. El genoma de este miembro de la familia Brassicáceas fue secuenciado en el año 2000, y su uso como modelo de estudio ofrece una serie de ventajas entre las que se encuentran: un ciclo de vida corto (6 semanas aproximadamente), un genoma constituido por sólo cinco cromosomas, una transformación genética sencilla, poco espacio requerido para su crecimiento y autopolinización, entre otras. Particularmente para el estudio de las PAs en *Arabidopsis*, al carecer del gen de la ODC, la biosíntesis *de novo* de Put ocurre predominantemente a través de la vía de la arginina, mediante la enzima ADC (Hanfrey et al., 2001). En la Tabla 4, se muestran los genes que participan en la biosíntesis de PAs en esta planta modelo (Tabla 4 adaptada a partir de Kusano y Suzuki, 2015).

Tabla 4. Genes identificados implicados en biosíntesis de PAs en *Arabidopsis*

Función catalítica	Gen	Locus	Localización	Factores que incrementan su expresión	Referencias
Arginina descarboxilasa	<i>ADC1</i>	<i>At2g1650</i> 0	cloroplasto, citoplasma**	frío, estrés oxidativo, salino	Borrel et al., 1995; Maruri-López y Jiménez-Bremont, 2017
	<i>ADC2</i>	<i>At4g3471</i> 0	núcleo, cloroplasto, citoplasma**	deficiencia de K, estrés por sequía, frío, mecánico, osmótico, oxidativo, salino, por interacción con agentes patógenos	Maruri-López y Jiménez-Bremont, 2017; Patel et al., 2017
Agmatina iminohidrolasa	<i>AIH</i>	<i>At5g0817</i> 0	núcleo, citoplasma	estrés por choque de calor, por salinidad	Kilian et al., 2007; Hoper et al., 2017
N -Carbomoil putrescina amidohidrolasa	<i>CPA</i>	<i>At2g2745</i> 0	citoplasma	estrés por calor, por choque osmótico, por daño mecánico	Kilian et al., 2007, Tanz et al., 2013

Arginasa	<i>ARGAH 1</i>	<i>At4g0890</i> 0	mitocondria	estrés por sequía, interacción con bacterias	Flores et al., 2008; Labudda et al., 2016
	<i>ARGAH 2</i>	<i>At4g0887</i> 0	estroma de cloroplasto, mitocondria, citoplasma **	interacción con hongos, MeJA	Gravot et al., 2012; Patel et al., 2017
S-Adenosil metionina Descarboxilasa	<i>SAMD C1</i>	<i>At3g0247</i> 0	Citoplasma*	interacción con agentes virales	Zhang et al., 2011 Base de datos SUBA4
	<i>SAMD C2</i>	<i>At5g1595</i> 0	núcleo, citoplasma*	estrés por frío, por choque de calor	Urano et al. 2003; Majundar et al., 2017
	<i>SAMD C3</i>	<i>At3g2557</i> 0	Citoplasma*	dato aún no disponible	Base de datos SUBA4
	<i>SAMD C4/BU D2</i>	<i>At5g1893</i> 0	núcleo, citoplasma*	auxinas	Cui et al., 2010
	Espermidina sintasa	<i>SPDS1</i>	<i>At1g2382</i> 0	núcleo, cloroplasto, citoplasma**	sequía, ABA
<i>SPDS2</i>		<i>At1g7031</i> 0	núcleo, cloroplasto, citoplasma,	Citocininas	Belda et al., 2012

			membrana plasmática **		
Espermina sintasa	<i>SPMS</i>	<i>At5g5312</i> 0	núcleo, citoplasma*	estrés por sequía, Interacción con bacterias	Belda et al., 2012; Shinohara et al., 2019
Termoespermina sintasa	<i>ACL5</i>	<i>At5g1953</i> 0	núcleo, citoplasma*	auxinas	Tong et al., 2014

* Localización predictiva

** Localización experimental

Como se mencionó anteriormente, en *A. thaliana* el primer paso limitante en la biosíntesis de las PAs es catalizado por las enzimas *ADC1* (*At2G16500*) y *ADC2* (*At4G34710*). Aunado a esto, los dos genes parálogos para la ADC tienen un 85% de identidad, por lo que su manipulación es un punto de control para regular los niveles de PAs y obtener información respecto a su función.

1.11 Antecedentes directos

En un trabajo previo, nuestro grupo de investigación generó la línea amiR:*ADC-L2*, que de manera simultánea induce el silenciamiento de ambos transcritos de *ADC*, por la acción de un microRNA artificial (*AmiR:ADC*). Esta línea permite explorar las implicaciones de una reducción significativa en los niveles de PAs sobre el desarrollo de *A. thaliana* (Sánchez Rangel et al., 2016). Las plántulas de la línea silenciante-*adc* (amiR:*ADC-L2*) presentan una reducción en los niveles de PAs de hasta un 85% comparado con su parental (ecotipo *Ws*). A pesar de que esta línea silenciante-*adc* tiene un ciclo biológico completo, presenta diversas alteraciones en su desarrollo, tanto en etapa de plántula y como de planta adulta (Sánchez-Rangel et al., 2016). En etapas tempranas de desarrollo, la reducción de los niveles de PAs en la línea silenciante genera un retraso en el crecimiento, denotado por la disminución de longitud de raíz primaria y del peso fresco en comparación con las

plantas Ws. En etapa adulta, esta línea muestra una modificación en la morfología de sus hojas de roseta, adquiriendo un mayor número de dentaciones en los bordes de las hojas (hoja aserrada), un retraso en el inicio de la floración, así como la disminución en la cantidad, peso y tamaño de las semillas y la aparición de semillas abortivas por arresto del desarrollo embrionario (Sánchez-Rangel et al., 2016). Dichos fenotipos fueron parcialmente reestablecidos por la aplicación exógena de Put en experimentos *in vitro* y en suelo (Sánchez-Rangel et al., 2016).

Justificación

Realizar investigaciones que generen un mayor acercamiento al entendimiento de los mecanismos de las PAs durante el desarrollo y en la respuesta al estrés es muy importante en la biología molecular de plantas. Por un lado, se ha reportado que el aumento en los niveles de PAs, ya sea mediante la aplicación exógena o con líneas sobre-expresoras de genes biosíntesis de PAs, muestran tolerancia al estrés abiótico y resistencia contra patógenos; y por otro lado que la disminución en los niveles de PAs, mediante el uso de mutantes o inhibidores, muestran un fenotipo contrario de sensibilidad a los agobios tanto abióticos como bióticos.

Esta tesis se enfocó en continuar con la caracterización de la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis*. Esto nos permitió observar que dicha línea acumula especies reactivas de oxígeno (EROs), un dato novedoso que no se había reportado hasta el momento. Adicionalmente, logramos asociar el fenotipo de raíz corta de la línea silenciante-*adc* a defectos en los procesos de elongación y división celular. Aunado a esto, se demostró que plántulas de esta línea silenciante-*adc* son más susceptibles al estrés por NaCl y a bajas temperaturas, lo que correlaciona con los niveles elevados de EROs y con el incremento de sensibilidad ante una condición desfavorable.

También analizamos el comportamiento de esta línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis* bajo estrés biótico, mediante las confrontaciones con los microorganismos fitopatógenos *B. cinerea* y *P. syringae*. Interesantemente, la línea

silenciante muestra una reducción en la resistencia contra el ataque del hongo *B. cinerea*; y un incremento ante la bacteria *P. syringae*.

II. OBJETIVOS

a) Objetivo general

Caracterización de la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis* en el desarrollo, la respuesta al estrés abiótico y durante la interacción con microorganismos patógenos.

b) Objetivos particulares

- 1.- Analizar el efecto de la aplicación exógena de catalasa (CAT) sobre el crecimiento de la línea silenciante-*adc* y su parental *Ws*.
- 2.- Determinar el estatus de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en las plántulas de la línea silenciante-*adc* mediante su visualización *in situ* y su cuantificación.
- 3.- Analizar el nivel de expresión del gen *AtCAT2* en las líneas silenciante-*adc* y *Ws*.
- 4.- Cuantificar las actividades enzimáticas de catalasa (CAT), poliamina oxidasas (PAOs) y NADPH oxidasa en plántulas de las líneas silenciante-*adc* y *Ws*.
- 5.- Analizar el fenotipo de la línea silenciante-*adc* bajo condiciones de estrés abiótico por salinidad y bajas temperaturas.
- 6.- Analizar la arquitectura y el desarrollo de raíces de la línea silenciante-*adc*.
- 7.- Generar líneas marcadoras de ciclo celular con silenciamiento de los genes *ADC* (*CycB1:amiR-adc*) para analizar el patrón de expresión del gen reportero *GUS*.
- 8.- Estudiar la respuesta de defensa de la línea silenciante-*adc* ante los microorganismos fitopatógenos.

9.- Analizar el efecto de los pre-tratamientos con Put y MeJA sobre el desarrollo de los síntomas de la infección del hongo *B. cinerea*, y del tratamiento de Put para *P. syringae* en la línea silenciante-*adc* así como en su respuesta mediada por los niveles de expresión de los genes marcadores de defensa.

III. Resultados

Debido a que las PAs son indispensables para los organismos no se ha podido generar una línea auxótrofa de PAs que permita el estudio de las implicaciones de la deficiencia de estas poliaminas en el desarrollo y la respuesta al estrés en plantas. Por ello, nuestro grupo de investigación desarrolló una línea de *Arabidopsis* que silencia los genes de *ADC*. Esto se logró mediante un microRNA artificial, el cual está dirigido a una región conservada entre los genes parálogos *ADC1* y *ADC2* de *Arabidopsis*. De esta manera, nosotros obtuvimos la línea amiR:*ADC-L2* (silenciante-*adc*), la cual presenta una disminución de hasta el 85% en los niveles de PAs en plántula. Los resultados se presentan en los capítulos siguientes:

Capítulo I. La disminución en los niveles de poliaminas en la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis* resulta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Este estudio se publicó en *Biochemical and Biophysical Research Communications* con el título “Down-regulation of arginine decarboxylase gene-expression results in reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*”.

Capítulo II. La línea silenciante-*adc* presenta mayor sensibilidad al estrés salino y por bajas temperaturas.

Capítulo III. Niveles óptimos de poliaminas son esenciales para la correcta organización de la arquitectura radicular en etapas tempranas del desarrollo de *Arabidopsis*.

Capítulo IV. La línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis* exhibe una respuesta de defensa diferencial a las infecciones por *B. cinerea* y *P. syringae*. Estudio publicado en la revista *Plant Physiology and Biochemistry* con el título “*Arabidopsis adc*-silenced line exhibits differential defense responses to *B. cinerea* and *P. syringae* infection”.

Capítulo I

La disminución en los niveles de poliaminas en la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis* resulta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno

La línea silenciante-*adc* es una herramienta útil para estudiar el fenotipo en desarrollo y estrés de plántulas de *Arabidopsis* con bajos niveles de PAs. Para profundizar en la caracterización de dicha línea determinamos los niveles de H₂O₂, observando que las raíces de las plántulas de la línea silenciante-*adc* acumulan H₂O₂. Este comportamiento se logra restablecer mediante la aplicación exógena de PAs. Además, se encontró que la expresión del gen *CAT2* y la actividad de catalasa disminuyen en la línea silenciante-*adc*, en comparación al ecotipo silvestre *Ws*. Estos datos sugieren una menor actividad de detoxificación de EROs en esta línea silenciante. Por otro lado, se analizó la actividad de PAO, dado que esta enzima también genera H₂O₂ cuando oxida PAs. Los datos obtenidos muestran que no existen cambios significativos en la actividad de PAO en la línea silenciante con respecto a las plántulas *Ws*; lo que sugiere que se debe a un defecto en el sistema antioxidante, y no a un desajuste en el catabolismo de PAs lo que provocaría la acumulación de H₂O₂. Aunado a esto, se cuantificó el contenido del ion radical superóxido y se determinó la actividad enzimática de NADPH oxidasa, encontrando un claro incremento, lo que sugiere que esta enzima y su producto contribuyen a la acumulación de H₂O₂ en la línea silenciante. Estos resultados muestran que la disminución en los niveles de PAs provocan la acumulación de EROs.

Trabajo publicado en: Biochemical and Biophysical Research Communications

Capítulo II

La línea silenciante-*adc* tiene mayor sensibilidad al estrés abiótico

Las PAs son altamente acumuladas bajo condiciones de estrés. Incluso, se ha demostrado que las plantas que toleran mejor las condiciones de estrés tienen una mayor concentración de PAs respecto a las que son sensibles (Yamaguchi et al., 2007; Liu et al., 2007; Li et al., 2016). De hecho, se ha propuesto que el incremento de los niveles de Spm en plantas podría ser un importante indicador de la tolerancia al estrés por salinidad (Li et al., 2012). En este sentido, las PAs participan en mitigar el estrés a diferentes niveles, por ejemplo, bloqueando los canales de entrada de sodio, brindando protección a la membrana y a los ácidos nucleicos, e induciendo la expresión de genes involucrados en la tolerancia al estrés, como por ejemplo genes que codifican proteínas del sistema antioxidante (Todorova et al., 2013). Por su parte, ya ha sido documentado que la adaptación de las plantas a las condiciones de estrés por frío es mediada por el incremento de PAs, Ca, y etileno (Alcázar et al., 2011; Sun et al., 2020).

En este capítulo de la tesis se evaluó la sensibilidad de la línea silenciante-*adc* a la aplicación de estrés abiótico. En este sentido, la parental *Ws* y la línea silenciante-*adc* fueron sometidas a estrés salino inducido por NaCl y a tratamientos de bajas temperaturas. El análisis de fenotipo de la línea silenciante bajo estrés salino mostró que esta línea fue más sensible a los tratamientos con NaCl. Posteriormente, el análisis transcripcional de los genes involucrados en la respuesta al estrés salino, denotó que la respuesta de tolerancia de la línea silenciante-*adc* está afectada. En el caso de los tratamientos de estrés por bajas temperaturas, se realizó un ensayo de germinación de ambas líneas bajo condiciones de frío (4 °C y 10 °C). Nuestros resultados muestran un claro retraso en la germinación, así como, clorosis en la línea silenciante. Estos datos confirman que la falta de PAs en la línea silenciante, afecta su desarrollo y la capacidad de adaptación a las condiciones de estrés abiótico.

Resultados

La línea silenciante-*adc* tiene mayor sensibilidad al estrés salino

Nosotros analizamos el fenotipo de la línea silenciante bajo condiciones de estrés salino. En este sentido, ambas líneas *Ws* y silenciante-*adc* de 7 días de edad fueron sometidas por 5 días más a los tratamientos de NaCl a 150 y 175 mM. Trascurrido ese tiempo se evaluaron el peso fresco, la longitud de la raíz primaria y la clorofila total. Adicionalmente, se registró la presencia de cotiledones verdes bajo los diferentes tratamientos. En ambas concentraciones de NaCl, tanto el peso fresco como la raíz primaria disminuyeron significativamente en ambas líneas. Particularmente bajo el tratamiento de NaCl 175 mM se observaron daños severos en la línea silenciante, evidenciados por una reducción en su longitud de raíz primaria y clorofila del 57 y 34%, respectivamente (Figura 3). Así mismo, gran parte de los cotiledones de las plántulas silenciantes mostraron síntomas severos de clorosis, disminuyendo el porcentaje de cotiledones verdes en un 41% respecto a las plántulas no tratadas.

Análisis de la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés salino en la línea silenciante-*adc*

Con el objetivo de analizar la respuesta de señalización inducida por condiciones de estrés abiótico, las líneas *Ws* y silenciante-*adc* fueron sometidas a estrés salino con la aplicación exógena de NaCl 150mM y 175mM por 24 h. En este sentido se determinó el nivel de expresión de los genes responsivos a condiciones de estrés como *CAT2*, *GPX2*, *TIR1* y *BI-1*. Los genes *CAT2* y *GPX2* codifican para las subunidades que mayoritariamente contribuyen a la formación de la catalasa y glutatión peroxidasa, respectivamente; por su parte, *TIR1* es un receptor de auxinas y *BI-1* un supresor de muerte celular. Estos genes han sido reportados como elementos clave en la respuesta de defensa de la planta a condiciones de estrés (Du et al., 2008; Akbudak et al., 2018; Rugger et al., 1998; Kawai et al., 2004). Bajo condiciones control, solo *GPX2* mostró una disminución importante en su expresión con respecto a la parental *Ws*. No obstante, bajo ambas concentraciones de NaCl, los genes evaluados se observaron inducidos en la línea silenciante (Figura 4).

El estrés por frío provoca mayor daño en la línea silenciante-*adc*

Con el objetivo de caracterizar el efecto del estrés por bajas temperaturas en la etapa más temprana del establecimiento de *Arabidopsis* bajo la condición de insuficiencia de PAs, ambas líneas *Ws* y silenciante-*adc* fueron germinadas y crecidas en placas de medio MS en cámaras de crecimiento a 22 °C, 10 °C y 4 °C por 22 días. Como se muestra en la Figura 5, la germinación de la línea silenciante-*adc* fue claramente afectada por ambos tratamientos de frío. Este fenotipo fue evidenciado a partir del día 5 posterior a la siembra, donde el porcentaje de germinación de la línea silenciante-*adc* muestra un retraso significativo con respecto a la *Ws*. En particular, bajo el tratamiento más severo de 4 °C, solo el 10% de los germinados de la línea silenciante desarrollaron cotiledones verdes, mientras que la *Ws* mantuvo un 55% con respecto de la *Ws* (Figura 5).

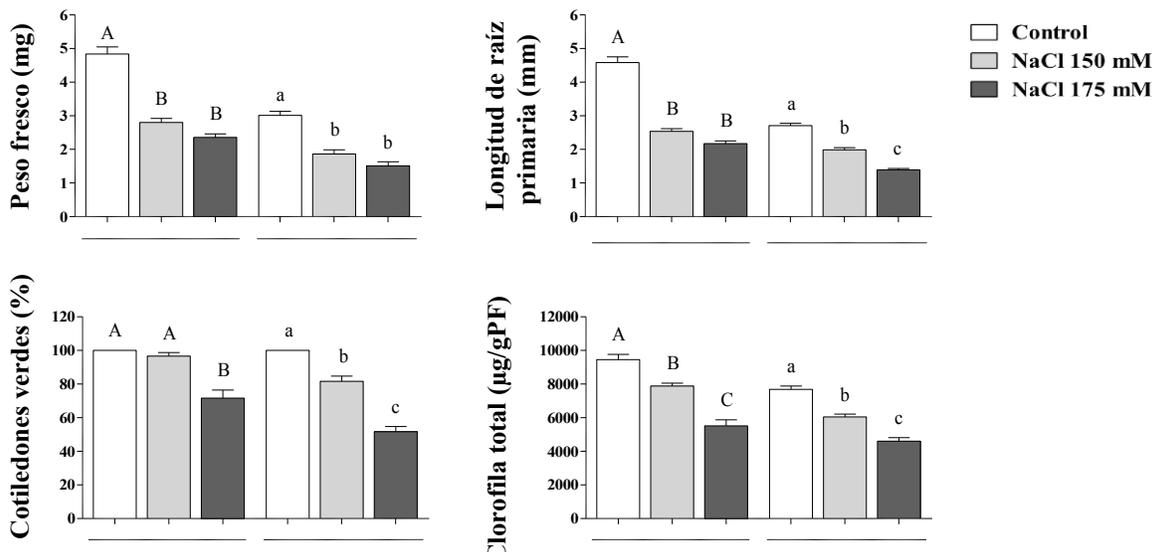
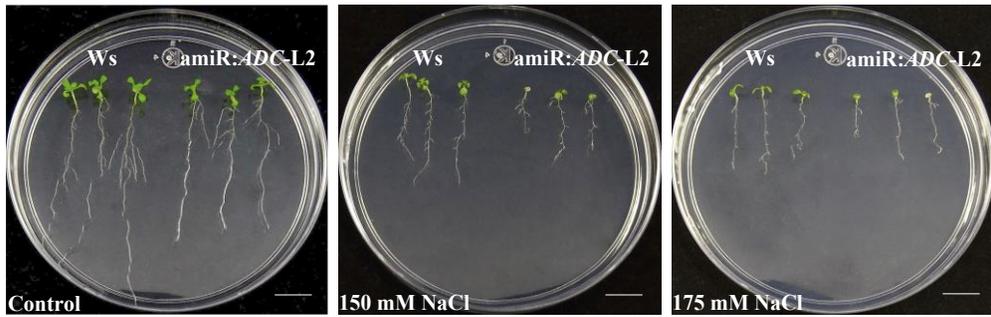


Figura 3. Efecto del estrés salino en las líneas silenciante-*adc* y la *Ws*. A) Fotografías de las plántulas de 14 días de edad crecidas por 7 días en placas con medio MS suplementadas con NaCl 150 y 175 mM. Las barras de escala corresponden a un 1 cm. Las medias de los datos obtenidos de las mediciones del peso fresco (B), la longitud de la raíz primaria (C), los cotiledones verdes (D), y el total de clorofila (E) son expresados gráficamente. Las barras representan la media \pm del error estándar ($n=15$) de cinco replicas. Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p<0.05$).

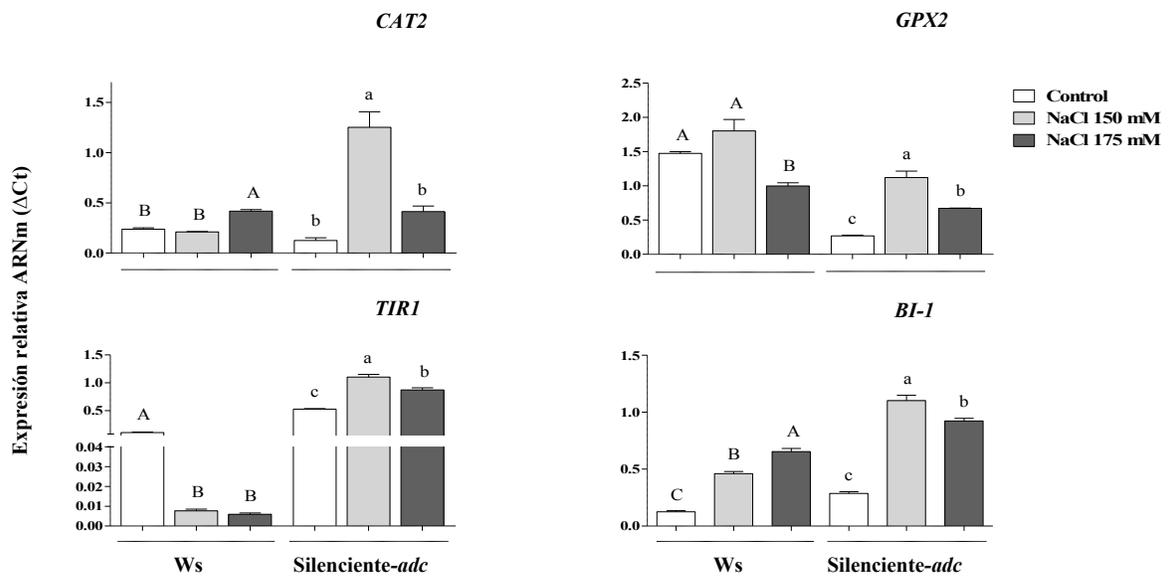
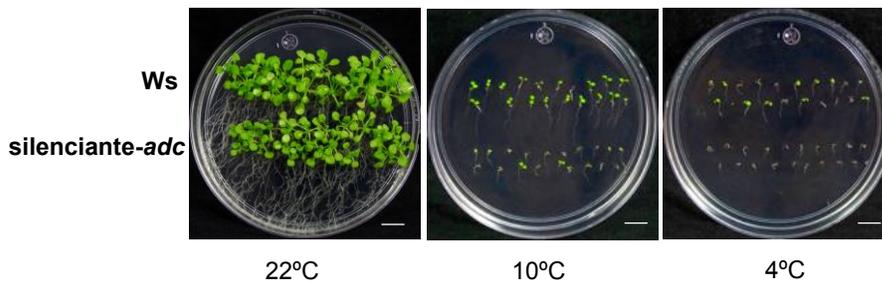
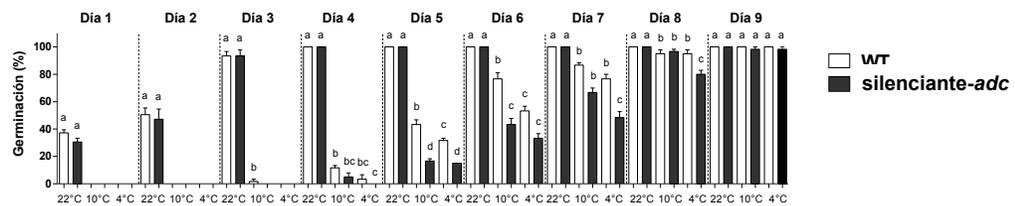


Figura 4. Expresión relativa de genes implicados en la respuesta a estrés salino bajo la aplicación de NaCl 150mM y 175mM. Los niveles transcripcionales de cada gen fueron estimados mediante qRT-PCR, usando el gen *UBQ5* como gen de referencia. Las diferentes letras indican diferencia significativa mediante un análisis de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($P < 0.05$).

A)



B)



C)

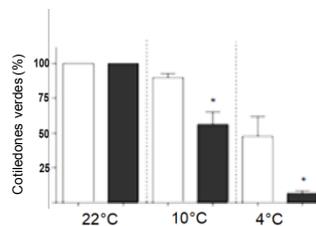


Figura 5. Ensayo de estrés por bajas temperaturas. Las semillas de ambas líneas Ws y silenciante-*adc* fueron crecidas en placas con medio MS 0.5 x durante 20 días. A) Fenotipo representativo de ambas líneas sometidas a 4, 10 y 22 °C ± 2 a los 20 días de edad. B) Representación gráfica de la tasa de germinación correspondiente al período del día 1 al 9 post-siembra, expresada en porcentaje (%). C) Cuantificación de cotiledones verdes al día 20 post siembra. Las barras representan la media ± error estándar (n = 20) de tres réplicas. Los asteriscos y las diferentes letras indican la diferencia significativa entre la línea silenciante-*adc* y Ws, calculada usando una prueba de comparación de t de Student y ANOVA de dos vías, respectivamente ($P < 0.05$).

Capítulo III

Niveles óptimos de poliaminas son esenciales para la organización de la arquitectura radicular en etapas tempranas del desarrollo de *Arabidopsis*

Al ser organismos sésiles, las plantas están expuestas a múltiples factores bióticos y medioambientales que inducen cambios en sus condiciones de crecimiento modificando su fisiología y anatomía. Particularmente, la arquitectura de la raíz tiene una gran plasticidad, en función de asegurar la vida de la planta. Siendo uno de sus órganos más importantes, la raíz no solo asegura la toma de agua y nutrientes, además sirve de anclaje y de interacción con la biosfera. En este sentido, una condición desfavorable resulta en una reestructuración del crecimiento de la raíz. A nivel celular, estos cambios consisten en modificar los procesos de elongación y división celular. Ambos procesos han sido relacionados con el efecto y la distribución específica del H₂O₂ en la raíz primaria.

Con los antecedentes en el defecto en el crecimiento de la raíz, así como de una mayor acumulación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) observados en la línea silenciante-*adc*, nosotros nos planteamos investigar cuál de los procesos que orquestan la organización celular de la raíz está afectado en esta línea con bajos niveles de PAs. En primera instancia, nuestros análisis revelaron que la tasa de crecimiento celular de la raíz en la línea silenciante-*adc* fue más lenta con respecto a su parental *Ws*. Además, el análisis de la elongación celular denotó una reducción significativa en el tamaño de las células corticales de la raíz primaria, lo cual sugiere que sus células no están alargándose completamente antes de migrar a la zona de diferenciación. Al analizar los primordios de las raíces secundarias de la línea silenciante-*adc* observamos que su índice de su iniciación está afectado. También, el análisis de la zona meristemática de la raíz principal de la línea silenciante-*adc* mostró algunas alteraciones, resultando en la disminución de la tasa de división celular. Finalmente, este dato fue confirmado mediante la generación y el análisis de las líneas reporteras de ciclo celular *CycB1:amiRadc*, que silencian los genes *adc*, en donde se observó una señal baja en el meristemo apical y en la punta de raíz de esta línea marcadora, con respecto a su parental *CycB1:uidA*; esta señal fue claramente recuperada mediante el pretratamiento con PAs. Estos resultados

muestran que la reducción en los niveles óptimos de PAs resulta en una disminución de los eventos de división celular en las raíces, así como células más compactas, generando un fenotipo de raíz corta.

Resultados

El fenotipo de crecimiento retardado en la línea silenciante-*adc* está relacionado con la disminución de la elongación celular

Previamente nosotros reportamos varias alteraciones morfológicas asociadas a la falta de niveles óptimos de PAs la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis*. En particular, el sistema radicular está afectado (Sánchez-Rangel et al., 2016). En esta parte del trabajo se realizó el análisis del sistema radicular de la línea silenciante-*adc* y del genotipo *Ws* (WT). Nuestros datos mostraron que, a los ocho días de edad la línea silenciante-*adc* tiene una reducción del 38% y 46% en la longitud de la raíz primaria y la tasa de crecimiento, respectivamente, en comparación con las plantas de su parental *Ws* (Figura 6B y C). Además, en la zona de raíces laterales (RL), la longitud de las células corticales se redujo en un 14% en la línea silenciada por *adc* (Figura 6D). Estos datos mostraron que los niveles insuficientes de PAs afectan la tasa de crecimiento, así como la elongación celular de la raíz principal de *Arabidopsis* en etapa de plántula.

El inicio de generación de primordios de raíces laterales (RL) es restringido por niveles subóptimos de PAs en la línea silenciante-*adc*

Posteriormente, se analizó la producción y desarrollo de RL en ambas líneas, WT y silenciante-*adc*. Para lo cual, se realizó el análisis de la densidad de eventos de RL (RL + primordios de raíz lateral (PRL)) en la línea silenciante-*adc*. Nuestros datos muestran que esta línea tiene una disminución del 37% y 16% en la densidad de PRL y RL + PRL, respectivamente, en comparación con WT (Figura 7A y B). Además, el inicio del índice de RL se redujo en un 56% (Figura 7C). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la incidencia de primordios en las diferentes etapas de desarrollo (I-VII) entre ambas líneas (Figura 7D). Nuestros

datos sugieren que el bajo índice de raíces laterales en la línea silenciante-*adc* está relacionado con una disfunción en los procesos de iniciación RL.

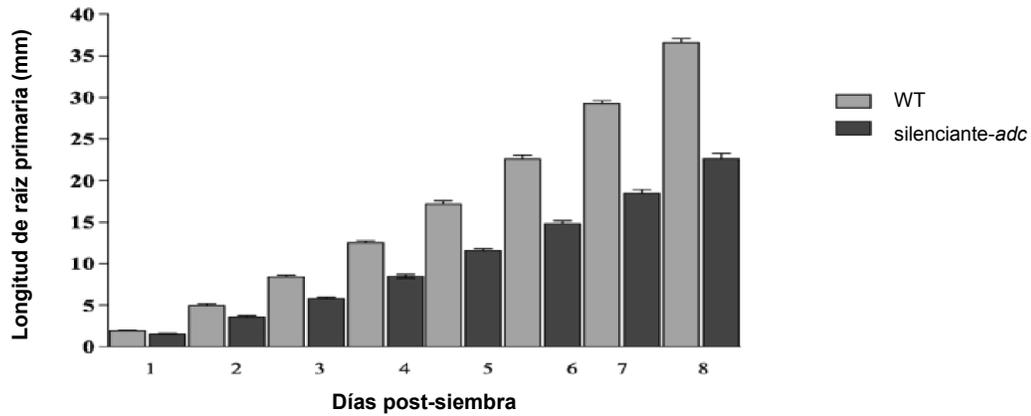
El meristemo apical de la raíz primaria en la línea silenciante-*adc* muestra un desarrollo anormal

Debido a que la actividad y distribución del meristemo apical de la raíz (RAM) es clave para su crecimiento y desarrollo, a continuación, realizamos la caracterización del RAM de las plántulas de raíces primarias silenciadas-*adc* y WT. Curiosamente, las células iniciales de la línea silenciante tienen aparentemente una mayor actividad que las de la WT (Figura 8A y B). Sin embargo, la tasa de producción de celular muestra una reducción del 51% (Figura 8B). Así mismo, el número de células en el dominio de proliferación de la línea silenciante-*adc* es un 37% menor en comparación con WT (Figura C). En acorde a lo anterior, la duración del ciclo celular en esta línea muestra un claro retraso (31%) (Figura 8D). Estos resultados sugieren que la restricción de PAs en *Arabidopsis* afecta gravemente el proceso de proliferación celular.

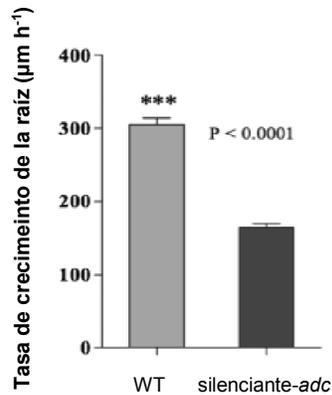
El ciclo celular de las zonas meristemáticas de las líneas *CycB1:amiRadc* es deficiente

Con base en la evidencia obtenida de la participación de los PAS en la proliferación celular en la raíz primaria, generamos líneas transgénicas *CycB:amiRadc* (1 y 2). Posteriormente, se evaluó el patrón espacio-temporal de la expresión de *CycB1-GUS* en las puntas de las raíces de plántulas *CycB1:amiRadc* de 10 días de edad. De acuerdo con nuestros resultados del análisis del RAM, en las plántulas *CycB1:amiRadc* solo fue posible detectar una leve señal. Sin embargo, el pre-tratamiento con PAs incremento notablemente la señal GUS de las líneas *CycB1:amiRadc*, reafirmando el papel de las PAs en la modulación del ciclo celular (Figura 9).

A)



B)



C)

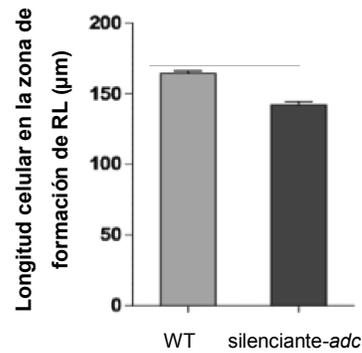


Figura 6. Análisis de la tasa de crecimiento de la raíz primaria de las plántulas WT y silenciadas-*adc*. Datos obtenidos a partir de plántulas de *Arabidopsis* de ambas líneas de 8 días crecidas en medio MS 0.2 x. A) representación gráfica del crecimiento de la longitud de la raíz primaria (mm) a partir del primer día de germinación hasta el día 8 (n = 15); B) Tasa de crecimiento obtenida mediante el cociente del crecimiento de la punta de la raíz entre las últimas 24 h antes de finalizar el experimento, expresado en µm/h (n=10); C) longitud celular de diez células corticales por planta expresada en µm. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t de Student y la diferencia significativa está señalada por asteriscos. El nivel de significancia fue $P < 0.001$.

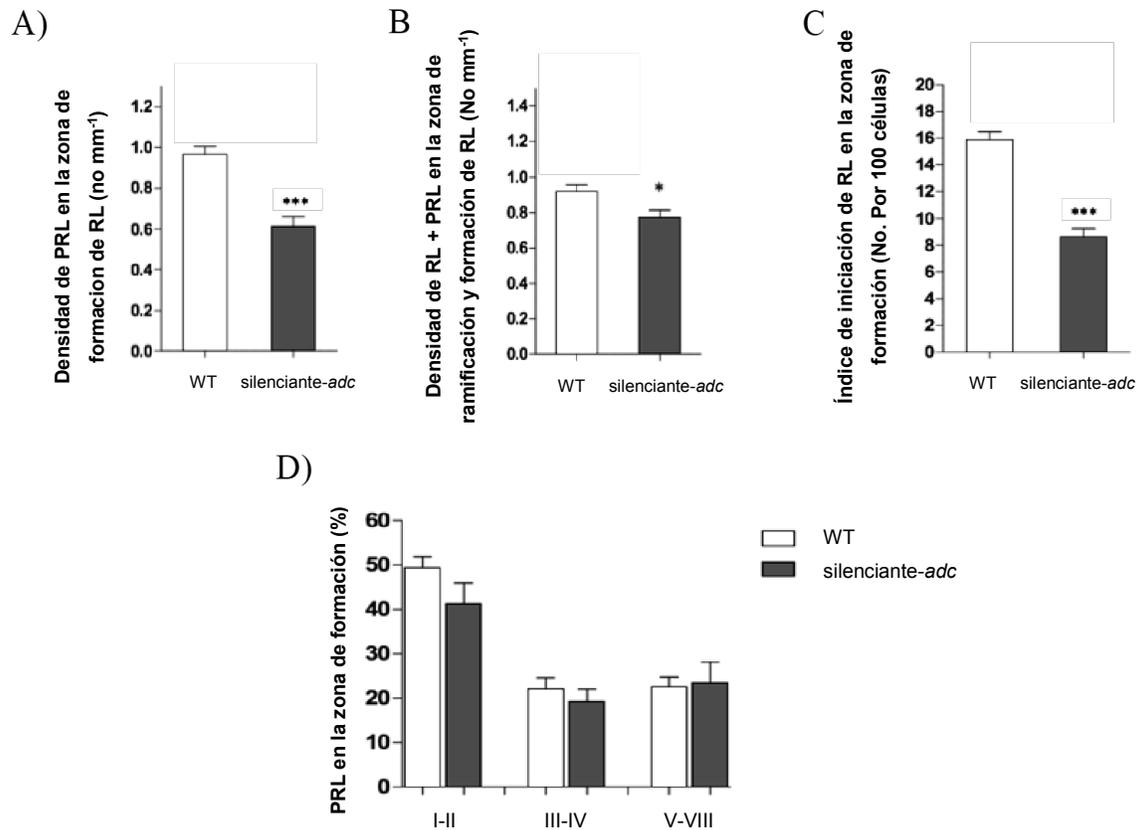
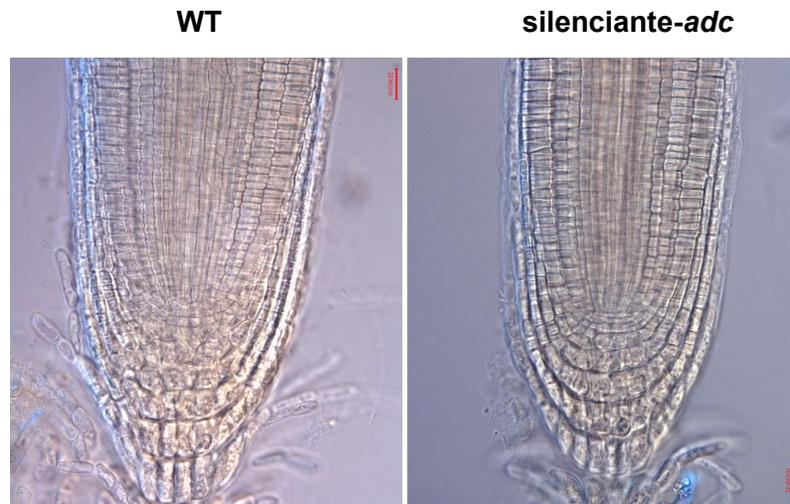
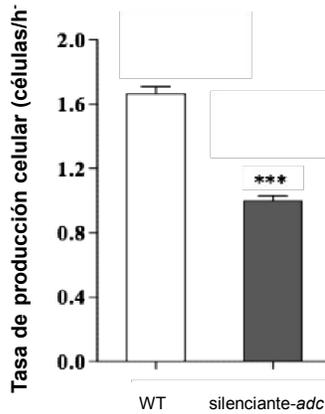


Figura 7. Análisis de generación y desarrollo de raíces laterales (RL). Para el análisis de RL en la zona de formación, se utilizaron plántulas de 10 días de edad de la parental Ws y la silenciante-*adc*, cultivadas en medio MS 0.2 x. A) densidad de primordios de raíces laterales (PRL); B) densidad de eventos combinados RL (incluidos RL y PRL); C) índice de iniciación de RL por 100 células; y D) PRL en zona de formación (%) según su etapa de desarrollo (I-VII). En cada caso se analizaron 15 plántulas por línea (n = 15). Usamos un aumento de 40 X bajo un microscopio Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Alemania). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t de Student y la diferencia significativa está señalada por asteriscos. El nivel de significancia fue $P < 0.001$.

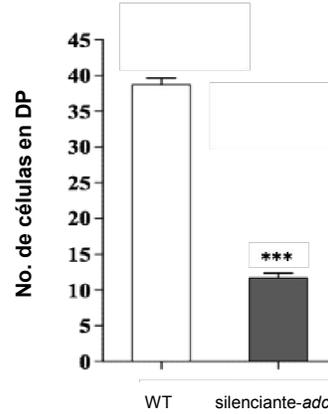
A)



B)



C)



D)

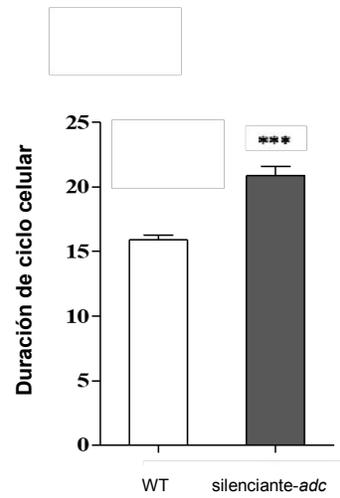


Figura 8. Análisis del RAM de plántulas de la *Ws* y la *silenciante-*adc**. A) Imagen de los meristemos apicales de plántulas de 8 días de edad de ambas líneas, *Ws* y *silenciante-*adc** crecidas en medio 0.2 x MS y clarificadas con una solución de NaI (Dubrovsky et al., 2009). Las imágenes se adquirieron con un aumento de 40X bajo un microscopio Zeiss Axiovert 200M (barra de escala = 20 micrones). B) Tasa de producción de células por hora en el dominio de proliferación (DP); C y D) el número de células y la duración del ciclo celular se representan gráficamente. En cada caso se analizaron 15 plántulas por línea ($n = 15$). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t de Student y la diferencia significativa está señalada por asteriscos. El nivel de significancia fue $P < 0.001$.

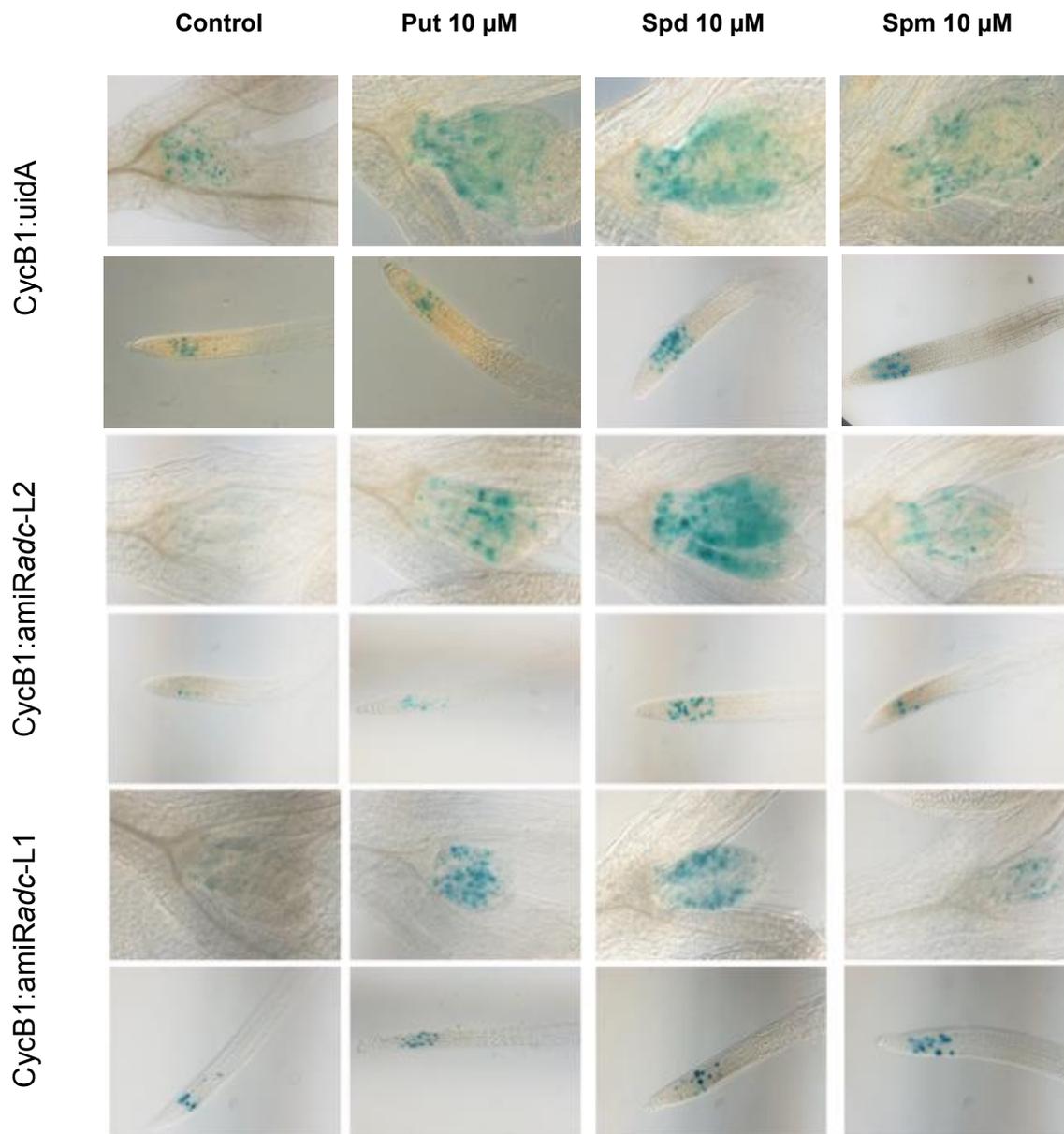


Figura 9. Tinción GUS de plántulas de CycB1:amiRadc. Las plántulas CycB1:uidA y CycB1:uidA-amiRadc de siete días de edad fueron sometidas a una tinción histoquímica GUS y se analizaron bajo microscopio con un aumento de 10X. Las imágenes son representativas de 15 plántulas analizadas.

Capítulo IV

La línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis* exhibe una respuesta de defensa diferencial a las infecciones por *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*

Ana Isabel Chávez-Martínez¹, María Azucena Ortega-Amaro¹, Martha Torres², Mario Serrano² and Juan Francisco Jiménez-Bremont^{1*}

En la naturaleza las plantas están bajo la constante interacción con los microorganismos que se desarrollan a su alrededor. Particularmente, el ataque de microorganismos patógenos ejerce una fuerte presión sobre las estrategias de defensa de las plantas. Para poder lidiar con el ataque, éstas deben ser capaces de percibir rápidamente al patógeno para generar una respuesta eficiente. En este sentido, la respuesta de defensa de las plantas involucra una red compleja de barreras físicas y moleculares que funcionan de manera coordinada. Una vez que la cascada de señalización se desencadena, los recambios moleculares y anatómicos se han relacionado principalmente a la modulación del ácido salicílico (AS), del ácido jasmónico (AJ), del etileno (Et). Aunado a estas fitohormonas, otras moléculas que juegan un papel clave en la señalización y en la respuesta de defensa son las EROs. Por su parte, cada vez más investigaciones señalan a las PAs como elementos clave que podrían estar orquestando la respuesta de defensa por la interacción y modulación de las fitohormonas y las EROs involucradas.

En la etapa final de este trabajo de tesis, nosotros estudiamos si la respuesta de defensa de la línea silenciante-*adc* podría estar afectada. Lo anterior, con base en los diversos reportes donde se ha visto que la aplicación exógena de PAs, o bien mediante la sobreexpresión de los genes relacionados con su metabolismo activa la respuesta de defensa de las plantas en contra diversos patógenos. En este sentido, se hipotetizó que la acumulación de EROs en conjunto con la deficiencia de PAs en la línea silenciante podría ser un factor determinante que comprometa su respuesta de defensa al ataque de patógenos.

La línea silenciante fue retada a la interacción con los microorganismos patógenos *B. cinerea* y *P. syringae*. Nuestros resultados mostraron un incremento en la

sensibilidad a la infección por Botrytis, respecto a las la Ws. En congruencia con esto, el nivel de expresión de genes relacionados con la defensa de la planta, tuvieron una menor expresión en la línea silenciante-*adc* bajo la interacción con *B. cinerea*. Posteriormente, se realizaron pre-tratamientos con soluciones asperjadas de Put o de MeJA antes de la infección. Interesantemente, ambos tratamientos fueron capaces de restablecer o incrementar la expresión de los genes relacionados con la defensa de la línea silenciante, previniendo además el desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Por otro lado, la línea silenciante mostró resistencia a la infección por *Pseudomonas*. Sin embargo, esta respuesta fue parcialmente reestablecida por el pre-tratamiento con Put antes de la infección. De forma similar los genes relacionados con la respuesta de defensa mostraron una desregulación en la línea silenciante, la cual fue recuperada por la aplicación de Put. En respecto a estos resultados, podemos sugerir que la sobreacumulación de las EROs por la carencia de PAs en la línea silenciante-*adc* modifican la respuesta de defensa en contra de los microorganismos patógenos en función de su estilo de vida.

Trabajo publicado en: Plant Physiology and Biochemistry

IV. Conclusiones

Capítulo I

La aplicación exógena de catalasa induce el crecimiento en etapas tempranas del desarrollo de *Arabidopsis*.

La disminución del contenido de PAs genera un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa y una disminución de la actividad de catalasa, lo cual conlleva a la acumulación de especies reactivas de oxígeno en la línea silenciante-*adc* de *Arabidopsis*.

Perspectivas

Continuar analizando el porqué de la sobreacumulación de las especies reactivas de oxígeno en la línea silenciante-*adc* a través del análisis de los organelos (mitocondria, cloroplasto y peroxisomas) involucrados en la producción y almacenamiento de especies reactivas de oxígeno.

Realizar el seguimiento del origen del incremento en los niveles de EROs en la línea silenciante-*adc*, mediante la determinación de las actividades de glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa.

Capítulo II

La disminución de los niveles de PAs por el silenciamiento simultáneo de los genes ADC aumenta la sensibilidad al estrés abiótico inducido por estrés salino y bajas temperaturas de *Arabidopsis*.

Bajo condiciones de estrés por salinidad y los bajos niveles de PAs, la expresión de los genes *CAT2*, *GPX2*, *TIR1* y *BI-1* es modulada positivamente en la línea silenciante-*adc*.

Perspectiva

Analizar la relación entre la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la susceptibilidad de la línea silenciante-*adc* al estrés salino y por frío.

Capítulo III

Los niveles sub-óptimos de PAs (<20% respecto a los niveles de una planta silvestre) en la línea de *Arabidopsis* silenciante-*adc* resultan en la disminución significativa de la tasa de crecimiento de la raíz primaria.

Las células del córtex de la raíz primaria de la línea silenciante-*adc* migran prematuramente a la zona de diferenciación antes de alargarse completamente, lo que resulta en células más pequeñas.

La disminución en la densidad de las raíces laterales de la línea silenciante-*adc* está relacionada con un bajo índice de iniciación de raíces laterales, lo cual fue independiente de la velocidad del desarrollo de las raíces laterales en las diferentes etapas entre el inicio del primordio y la emergencia de la raíz lateral.

Las alteraciones en el patrón de desarrollo del meristemo apical de la raíz primaria de la línea silenciante-*adc* están asociados a un retardo significativo en la duración del ciclo celular, resultando en una menor tasa de producción celular que contribuye al fenotipo de raíz corta.

Niveles bajos de PAs por silenciamiento simultáneo de los genes *ADC* en la línea reportera *CycB1* disminuyen notablemente el ciclo celular en las zonas meristemáticas de las líneas reporteras *CycB1:amiRadc*.

Perspectivas

Continuar con la caracterización del centro quiescente de la raíz primaria de la línea silenciante-*adc*.

Investigar los efectos de la aplicación de poliaminas exógenas sobre la arquitectura radicular de la línea silenciante-*adc*.

Capítulo IV

Los pre-tratamientos con Put y MeJA previenen la susceptibilidad de la línea silenciante-*adc* a *B. cinerea*, mediante el incremento en la expresión de los genes relacionados con la respuesta de defensa mediada por el ácido jasmónico.

La línea silenciante-*adc* es más resistente a la infección de *P. syringae* debido al incremento de la expresión de los genes involucrados en la respuesta mediada por ácido salicílico.

Perspectivas

Investigar si la aplicación de alguna enzima antioxidante como la catalasa puede restablecer la respuesta de defensa de la línea silenciante-*adc* contra *B. cinerea* y *P. syringae*.

Determinar la presencia *in situ* de especies reactivas de oxígeno durante la infección simultánea con ambos patógenos, *B. cinerea* y *P. syringae*.

V. Referencias

- Ahou, A., Martignago, D., Alabdallah, O., Tavazza, R., Stano, P., Macone, A., ... & Tavladoraki, P. (2014). A plant spermine oxidase/dehydrogenase regulated by the proteasome and polyamines. *Journal of experimental botany*, 65(6), 1585-1603
- Akbudak, M. A., Filiz, E., Vatansever, R., & Kontbay, K. (2018). Genome-wide identification and expression profiling of ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) genes under drought stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(3), 925-936
- Akiyama, T., & Jin, S. (2007) Molecular cloning and characterization of an arginine decarboxylase gene up-regulated by chilling stress in rice seedlings. *J Plant Physiol* 164:645
- Alcazar, R., Cuevas, J. C., Planas, J., Zarza, X., Bortolotti, C., Carrasco, P. et al., (2011) Integration of polyamines in the cold acclimation response. *Plant Sci* 180:31–38
- Allu, A. D., Soja, A. M., Wu, A., Szymanski, J., & Balazadeh, S. (2014). Salt stress and senescence: identification of cross-talk regulatory components. *J. Exp. Bot.* 65, 3993-4008. DOI:10.1093/jxb/eru173
- Andronis, E. A., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2010). Short-term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PCD hall marks in planta in contrast to long-term stress. *Planta* 231,437–448. DOI:10.1007/s00425-009-1060-x
- Assaha, D. V., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2017). The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Frontiers in physiology*, 8, 509
- Batchelor, K. W., Smith, R. A., & Watson, N. S. (1986). Dicyclohexylamine is not an inhibitor of spermidine synthase. *Biochemical Journal*, 233(1), 307

Bagni, N., & Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, 20(3), 301–317. DOI:10.1007/s007260170046

Bano, C., Amist, N., & Singh, N. B. (2020). Role of polyamines in plants abiotic stress tolerance: Advances and future prospects. In *Plant Life Under Changing Environment* (pp. 481-496). Academic Press

Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., & Werck-Reichhart, D. (2010). Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*, 71(16), 1808-1824

Benavides, M. P., Groppa, M. D., Recalde, L., & Verstraeten, S. V. (2018). Effects of polyamines on cadmium-and copper-mediated alterations in wheat (*Triticum aestivum* L) and sunflower (*Helianthus annuus* L) seedling membrane fluidity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 654, 27-39

Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., & Ferrando, A. (2012). Aminopropyl transferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One*, 7(10), e46907

Berberich, T., Sagor, G. H. M. & Kusano, T. (2015). "Polyamines in plant stress response," in *Polyamines*, eds T. Kusano and H. Suzuki (Springer: Japan), 155–168. DOI:10.1007/978-4-431-55212-3_13

Borrell, A., Culiáñez-Macia, F.A., Altabella, T., Besford, R.T., Flores, D., & Tiburcio, A.F. (1995). Arginine Decarboxylase Is Localized in Chloroplasts. *Plant Physiol.* 109(3):771-776. DOI:10.1104/pp.109.3.771

Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

Burtin, D., Martin-Tanguy, J., Paynot, M., & Rossin, N. (1989). Effects of the suicide inhibitors of arginine and ornithine decarboxylase activities on organogenesis,

growth, free polyamine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explants of *Nicotiana xanthi* nc cultivated in vitro in a medium producing callus formation. *Plant Physiology*, 89(1), 104-110

Capell, T., Bassie, L., & Christou, P. (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9909–9

Ciamician, G. & Ravenna, G. (1911) cited by T.A. Smith, Historical perspective on research in plant polyamine biology, in: R.D. Slocum, H.E. Flores (Eds.), *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, CRC Press, Boca Raton. FL, 1991, p. 2

Costa, G., Baraldi, R., & Bagni, N. (1983). Influence of putrescine on fruit-set of apple (cv" Ruby Spur"). *Flowering and Fruit Set in Fruit Trees* 149, 189-196

Cuevas, J.C., López-Cobollo, R., Alcázar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.T., & Ferrando, A. (2008) Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol* 148:1094–1105

Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A., & Zheng, B. (2019). Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1945

Childs, A. C., Mehta, D. J., & Gerner, E. W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(7), 1394-1406. DOI: 10.1007/s00018-003-2332-4

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research*, 13(13), 4777–4788. DOI: 10.1093/nar/13.13.4777

Docimo, T., Reichelt, M., Schneider, B., Kai, M., Kunert, G., Gershenzon, J., & D'Auria, J. C. (2012). The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant molecular biology*, 78(6), 599-615.

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. DOI:10.1111/j.1744-7909.2008.00741.x

Dubrovsky, J.G., Gambetta, G.A., Hernández-Barrera, A., Shishkova S., & González I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: Developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann. Bot. (Lond.)* 97: 903–915

Dubrovsky, J.G., Soukup, A., Napsucialy-Mendivil, S., Jeknic, Z., & Ivanchenko, M.G. (2009). The lateral root initiation index: An integrative measure of primordium formation. *Ann. Bot. (Lond.)* 103: 807–817

Egea-Cortines, M., & Mizrahi, Y. (1991). Polyamines in cell division, fruit set and development, and seed germination. *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*, 143-158

Espasandin, F.D., Maiale, S.J., Calzadilla, P., Ruiz, O.A., & Sansberro, P.A. (2014). Transcriptional regulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene by putrescine accumulation positively modulates ABA synthesis and drought tolerance in *Lotus tenuis* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 76, 29–35. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.12.018

Flores T, Todd C.D., Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, & Polacco J.C. (2008). Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol.* 147(4):1936-46. DOI: 10.1104/pp.108.121459. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18567826; PMCID: PMC2492630

Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., ... & Shinozaki, K. (2012). Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6343-6347

Fujita, M., & Shinozaki, K. (2014). Identification of Polyamine Transporters in Plants: Paraquat Transport Provides Crucial Clues, *Plant and Cell Physiology*, Volume 55, Issue 5, Pages 855–861, DOI: 10.1093/pcp/pcu032

Galston, A. W., Altman, A. & Kaur-Sawhney R. (1978). Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat leaf protoplasts *Plant Sci. Lett.*, 11, pp. 69-79

Galston, A. W., & Flores, H. E. (1991). Polyamines and plant morphogenesis. *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*, 175-186.

Galston, A. W., & Sawhney, R. K. (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant physiology*, 94(2), 406-410.

Guerrero,-González, M. L., Rodríguez-Kessler, M., & Jiménez-Bremont, J. F. (2014). uORF, a regulatory mechanism of the *Arabidopsis* polyamine oxidase 2. *Molecular biology reports*, 41(4), 2427-2443

Gravot, A., Deleu, C., Wagner, G., Lariagon, C., Lugan, R., Todd, C., ... & Manzanares-Dauleux, M. J. (2012). Arginase induction represses gall development during clubroot infection in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 53(5), 901-911

Groppa, M. D. & Benavides, M. P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35–45. DOI: 10.1007/s00726-007-0501-8

Guo, Z., Tan, J., Zhuo, C., Wang, C., Xiang, B., & Wang, Z. (2014). Abscisic acid, H₂O₂ and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. *Plant Biotechnol. J.* DOI: 10.1111/pbi.12166.

Gupta, S., Agarwal, V. P., & Gupta, N. K. (2012). Efficacy of putrescine and benzyladenine on photosynthesis and productivity in relation to drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 18, 331–336. DOI: 10.1007/s12298-012-0123-9

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., & Masmoudi, K. (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in plant science*, 7, 1787

Hanfrey, C., Elliott, K. A., Franceschetti, M., Mayer, M. J., Illingworth, C., & Michael, A. J. (2005). A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39229-39237

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. *The Plant Journal*, 27(6), 551-560

Handa, A. K., Fatima, T., & Mattoo, A. K. (2018). Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. *Frontiers in chemistry*, 6, 10

Hao, Y.J., Zhang, Z., Kitashiba, H., Honda, C., Ubi, B., Kita, M., & Moriguchi, T. (2005) Molecular cloning and functional characterization of two apple S-adenosylmethionine decarboxylase genes and their different expression in fruit development, cell growth and stress responses. *Gene* 350:41–50

Hassanein, R. A., El-Khawas, S. A., Ibrahim, S. K., El-Bassiouny, H. M., Mostafa, H. A., & Abdel-Monem, A. A. (2013). Improving the thermo tolerance of wheat plant by foliar application of arginine or putrescine. *Pak. J. Bot.* 45, 111–118

Hayden, C. A., & Jorgensen, R. A. (2007). Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in *Arabidopsis* and rice reveals ancient eukaryotic origin of

select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes. BMC biology, 5(1), 1-30

He, L., Ban, Y., Inoue, H., Matsuda, N., Liu, J., & Moriguchi, T. (2008) Enhancement of spermidine content and antioxidant capacity in transgenic pear shoots overexpressing apple spermidine synthase in response to salinity and hyperosmosis. *Phytochemistry* 69:2133–21

Hooper, C.M., Castleden, I.R., Tanz, S.K., Aryamanesh, N., & Millar, A.H. (2017). SUBA4: the interactive data analysis centre for *Arabidopsis* subcellular protein locations. *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D1064-D1074

Hummel, I., Gouesbet, G.E.I., Amrani, A., Aïnouche, A., & Couée, I. (2004) Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression during development and response to environmental stress. *Gene* 342:199–2

Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(3), 559-564. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2601

Igarashi, K. & Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 506–512. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.01.017

Imai, A., Akiyama, T., Kato, T., et al. (2004;b) Spermine is not essential for survival of *Arabidopsis*. *FEBS Letters*. 556:148–152

Isah, Tasiu. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*. 52. DOI: 10.1186/s40659-019-0246-3

Ivanov V.B. & Dubrovsky J.G. (1997). Estimation of the cell-cycle duration in the root meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *Int. J. Plant Sci.* 158: 757–763

Jasso-Robles F. I., Gonzalez M. E., Pieckenstain F. L., Ramírez-García, J. Guerrero-González, M. de la Luz, Jiménez-Bremont J. F., Rodríguez-Kessler M. (2019) Decrease of *Arabidopsis* PAO activity entails increased RBOH activity, ROS content and altered responses to *Pseudomonas*, Plant Science, DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110372

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

Jiménez Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-Gonzalez, M. D. L. 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, 95. DOI: 10.3389/fpls.2014.00095

Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz, O.A. & Rodríguez-Kessler, M. (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 45, 812–821

Junglee S., Urban L., Sallanon H. & Lopez-Lauri F. (2014) Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. Am J Anal Chem 5:730–736. DOI 10.4236/ajac.2014.511081

Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I. & Tachibana, S. (2004). Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stress and upregulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45:712-722

Kawai-Yamada, M., Ohori, Y., & Uchimiya, H. (2004). Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. The Plant cell, 16(1), 21–32. DOI: 10.1105/tpc.014613

Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., & Harter, K. (2007). The At Gen Express global stress

expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 50(2), 347–363. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03052.x

Kotakis, C., Theodoropoulou, E., Tassis, K., Oustamanolakis, C., Ioannidis, N. E., and Kotzabasis, K. (2014). Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress. *J. Plant Physiol.* 171, 48–51. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.09.015

Kumria, R., & Rajam, M.V. (2002) Ornithine decarboxylase transgene in *tobacco* affects polyamine metabolism, in vitro morphogenesis and response to salt stress. *J Plant Physiol* 159:983

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.

Kusano, T., Kim, D. W., Liu, T., & Berberich, T. (2015). Polyamine catabolism in plants. In *Polyamines* (pp. 77-88). Springer, Tokyo.

Labudda, M., Róžańska, E., Cieśla, J., Sobczak, M., & Dzik, J. M. (2016). Arginase activity in *Arabidopsis thaliana* infected with *Heterodera schachtii*. *Plant Pathology*, 65(9), 1529-1538

Li J., Mu J., Bai J., Fu F., Zou T., An F., Zhang J., Jing H., Wang Q., Li Z., Yang S., & Zuo J. (2013) Paraquat Resistant1, a Golgi-localized putative transporter protein, is involved in intracellular transport of paraquat. *Plant Physiol* 162:470–483. DOI: 10.1104/pp. 113.213892

Li, S., Jin, H. & Zhang, Q. (2016). The effect of exogenous spermidine concentration on polyamine metabolism and salt tolerance in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud) subjected to short-term salinity stress. *Front. Plant Sci.* 7:1221. DOI: 10.3389/fpls.2016.01221

Li, Y. & He, J. (2012). Advance in metabolism and response to stress of polyamines in plant. *Acta Agric. Boreali Sinica* 27, 240–245. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7091.2012.z1.048

Li, Z., Zhang, Y., Peng, D. *et al.* (2018). The inhibition of polyamine biosynthesis weakens the drought tolerance in white clover (*Trifolium repens*) associated with the alteration of extensive proteins. *Protoplasma* 255, 803–817 DOI: 10.1007/s00709-017-1186-9

Liu, J. H., Kitashiba H., Wang J, Ban Y & . & Moriguchi T. (2007). Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol.* 24:117–126

Liu, J.H., Nada, K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X.P., Pang, X.M., Moriguchi, T. (2006) Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *J Exp Bot* 57:2589–25

Maiale, S. J., Marina, M., Sánchez, D. H., Pieckenstain, F. L., & Ruiz, O. A. (2008). In vitro and in vivo inhibition of plant polyamine oxidase activity by polyamine analogues. *Phytochemistry*, 69(14), 2552-2558

Maiale, S., Sánchez, D.H., Guirado, A., Vidal, A. and Ruiz, O.A. (2004) Spermine accumulation under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 161, 35–42

Majumdar, R., Shao, L., Turlapati, S. A., & Minocha, S. C. (2017). Polyamines in the life of *Arabidopsis*: profiling the expression of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene family during its life cycle. *BMC plant biology*, 17(1), 264

Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 124 (1), 33-44

Marco, F., Busó, E., & Carrasco, P. (2014). Overexpression of SAMDC1 gene in *Arabidopsis thaliana* increases expression of defense-related genes as well as resistance to *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Frontiers in plant science*, 5, 115

Maruri-López, I., Rodríguez-Kessler, M., Rodríguez-Hernández, A. A., Becerra-Flora, A., Olivares-Grajales, J. E., & Jiménez-Bremont, J. F. (2014). A maize

spermine synthase 1 PEST sequence fused to the GUS reporter protein facilitates proteolytic degradation. *Plant physiology and biochemistry*, 78, 80-87

Maruri-López, I., & Jiménez-Bremont, J.F. (2017) Hetero- and homodimerization of *Arabidopsis thaliana* arginine decarboxylase AtADC1 and AtADC2. *Biochem Biophys Res Commun* 484(3):508-513. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.083

Masgrau, C., Altabella, T., Farràs, R., Flores, D., Thompson, A. J., Besford, R. T., & Tiburcio, A. F. (1997). Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 11: 465-473

Miller, G., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* 133,481–489. DOI:10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x

Minocha, S. C., & Minocha, R. (1995). Role of polyamines in somatic embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I* (pp. 53-70). Springer, Berlin, Heidelberg

Minocha, R., Majumdar, R., & Minocha, S. C. (2014). Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship¹. *Frontiers in plant science*, 5, 175

Mo, H., & Pua, E. C. (2002) Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiol Plant* 114:439–4

Mulangi, V., Chibucos, M.C., Phuntumart, V., Morris, P.F. (2012a) Kinetic and phylogenetic analysis of plant polyamine uptake transporters. *Planta (Berl)* 236:1261–1273. DOI: 10.1007/s00425-012-1668-0

Mulangi V, Phuntumart V, Aouida M, Ramotar D, Morris P (2012b) Functional analysis of OsPUT1, a rice polyamine uptake transporter. *Planta (Berl)* 235:1–11. DOI: 10.1007/s00425-011-1486-9

Murashige, T. & Skoog, F.A. (1962) Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol.* 149, 88–95. DOI:10.1104/pp.108.129791

Ortega-Amaro, M. A., Rodríguez-Kessler, M., Becerra-Flora, A., & Jiménez-Bremont, J. F. (2012). Modulation of *Arabidopsis* CYCB1 expression patterns by polyamines and salt stress. *Acta physiologiae plantarum*, 34(2), 461-469

Ouyang, J., Song, C., & Chen, D. (2017). Research progress on heat-tolerance mechanism and transports of polyamines in plant. *Mol. Plant Breed*, 15, 3286-3294

Pandey, S., Ranade, S. A., Nagar, P. K., & Kumar, N. (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Biosciences*, 25(3), 291-299.

Panicot M., Masgrau C., Borrell A., Cordeiro A., Tiburcio A.F., & Altabella T. (2002b). Effects of putrescine accumulation in tobacco transgenic plants with different expression levels of oat arginine decarboxylase. *Plant Physiol.* 114: 281-287

Patel, J., Ariyaratne, M., Ahmed, S., Ge, L., Phuntumart, V., Kalinoski, A., & Morris, P. F. (2017). Dual functioning of plant arginases provides a third route for putrescine synthesis. *Plant Science*, 262, 62-73. DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.05.011

Pegg, A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 14904-14912. DOI: 10.1074/jbc.R116.731661

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

Prabhavathi, V.R., & Rajam, M.V. (2007) Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. *Plant Biotechnol* 24:273

Rai, K.K., Pandey, N., & Rai, S.P. (2019). Salicylic acid and nitric oxide signaling in plant heat stress. *Physiol. Plant.*168: 241–255. DOI: 10.1111/ppl.12958

Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences*, 21(7), 267-271

Reggiani, R., Bozob, P. & Bertania, A. (1994) Changes in polyamine metabolism in seedlings of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt sensitivity. *Plant Science* 102, 121–126

Richards, F.J. & Coleman R.G. (1952). Occurrence of putrescine in potassium-deficient barely *Nature*, 170, p. 460

Rodríguez-Hernández, A.A., Maiale S.J., Menéndez A.B. & Ruiz O.A. (2009) Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *J Exp Bot* 60:4249-4262

Roy, M., & Wu, R. (2001) Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Sci* 160:869–8

Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W. M., Hobbie, L., Turner, J., & Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *gr1p*. *Genes & development*, 12(2), 198-207. DOI: 10.1101/gad.12.2.198

Sagarika, S., Kalra, A., & Ahmad, S. (2016). Pacific Ocean SST and Z500 climate variability and western US seasonal streamflow. *International Journal of Climatology*, 36(3), 1515-1533.

Sagor, G.H., Berberich, T., Takahashi, Y., Niitsu, M., & Kusano, T. (2013). The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by

increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Res.* 22, 595–605. DOI: 10.1007/s11248-012-9666-3

Sahebani, N. & Hadavi, N. (2009) Induction of H₂O₂ and related enzymes in tomato roots infected with root rot nematode (*M. javanica*) by several chemical and microbial elicitors. *Biocontrol Sci Technol* 19:301-313, DOI 10.1080/09583150902752012

Saleethong, P., Sanitchon, J., Kong-Ngern, K., and Theerakulpisut, P. (2013). Effects of exogenous spermidine (Spd) on yield, yield-related parameters and mineral composition of rice (*Oryza sativa L. ssp. indica*) grains under salt stress. *Aust. J. Crop Sci.* 9, 1293–1301

Sekula, B., & Dauter, Z. (2018). Crystal structure of thermospermine synthase from *Medicago truncatula* and substrate discriminatory features of plant aminopropyltransferases. *Biochemical Journal*, 475(4), 787-802

Shi, H., Ye, T., & Chan, Z. (2013). Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous polyamines in the bermudagrass (*Cynodon dactylon*) response to salt and drought stresses. *J. Proteome Res.* 12, 4951–4964. DOI: 10.1021/pr400479k

Shimizu, Y., Rai, A., Okawa, Y., Tomatsu, H., Sato, M., Kera, K., Suzuki, H., Saito, K., & Yamazaki, M. (2019). Metabolic diversification of nitrogen-containing metabolites by the expression of a heterologous lysine decarboxylase gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* 100:505-521

Shinohara, S., Okamoto, T., Motose, H., & Takahashi, T. (2019). Salt hypersensitivity is associated

Slocum, R. D., & Flores, H. E. (1991). Biochemistry and physiology of polyamines in plants. CRC press with excessive xylem development in a thermospermine-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 100, 374–383. DOI: 10.1111/tpj.14448

Smith, T. A. (1971). The oxidation of polyamines in higher plants. *Xenobiotica*, 1(4-5), 449-450

Stitt, M. & Hurry, V. (2002). A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 5: 199–206

Su, C., Liu, L., Liu, H. et al. H₂O₂ regulates root system architecture by modulating the polar transport and redistribution of auxin. *J. Plant Biol.* 59, 260–270 (2016). <https://DOI.org/10.1007/s12374-016-0052-1>

Sun, W., Timofejeva, Y., Chen, L., Grossniklaus, C., U. and Ma, H. (2006) Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1) encoding a putative bHLH transcription factor. *Development*, 133, 3085–3095

Sun, X., Li, X., Zhu, J. et al. (2020). Polyamines and ethylene metabolism during cold acclimation in zoysiagrass (*Zoysia Japonica* Steud.). *Acta Physiol Plant* 42, 138 DOI: 10.1007/s11738-020-03122-z

Takahashi, Y., Tahara, M., Yamada, Y., and Ai, E. (2017b). Characterization of the polyamine biosynthetic pathways and salt stress response in *Brachypodium distachyon*. *J. Plant Growth Regul.* 37, 625–634. 10.1007/s00344-017-9761-z

Takano, A., Kakehi, J. I., & Takahashi, T. (2012). Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom. *Plant and Cell Physiology*, 53(4), 606-616

Tanou, G., Ziogas, V., Belghazi, M., Christou, A., Filippou, P., Job, D., et al. (2014). Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell and Environ.* 37, 864–885. DOI: 10.1111/pce.12204

Tanz, S. K., Castleden, I., Small, I. D., & Millar, A. H. (2013). Fluorescent protein tagging as a tool to define the subcellular distribution of proteins in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 214

Tiburcio, A. F., Altabella, T., Bitrián, M., & Alcázar, R. (2014). The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta*, 240(1), 1-18. DOI: 10.1007/s00425-014-2055-9

Tipping, A. J., & McPherson, M. J. (1995). Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), 16939-16946

Todorova, D., Katerova, Z., Sergiev, I., & Alexieva, V. (2013). Role of polyamines in alleviating salt stress. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (pp. 355-379). Springer, New York, NY

Tong, W., Yoshimoto, K., Kakehi, J., Motose, H., Niitsu, M. & Takahashi, T. (2014) Thermospermine modulates expression of auxin-related genes in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 5: 94

Tsaniklidis, G., Pappi, P., Tsafouros, A., Charova, S.N., Nikoloudakis, N., Roussos, P.A., Paschalidis, K.A. & Delis, C. (2019). Polyamine Homeostasis in Tomato Biotic/Abiotic Stress Cross Tolerance, *Gene Gene*. DOI:10.1016/j.gene.2019.144230

Urano, K., Hobo, T., & Shinozaki, K. (2005). *Arabidopsis ADC* genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Letters*; 579:1557–1564

Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2004) *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* 313:369–3

Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., & Shinozaki, K. (2003). Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell & Environment*, 26(11), 1917-1926

Vaughn, J. N., Ellingson, S. R., Mignone, F., & von Arnim, A. (2012). Known and novel post-transcriptional regulatory sequences are conserved across plant families. *Rna*, 18(3), 368-384

Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 86. DOI: 10.1186/s12870-016-0771-y

Wallace, H. M., Fraser, A. V., & Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal*, 376(1), 1-14. DOI: 10.1042/BJ2003132

Walters, D. R. (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64(1), 97-107

Wen, X.P., Pang, X.M., Matsuda, N., Kita, M., Inoue, H., Hao, Y.J. et al (2008) Overexpression of the apple spermidine synthase gene in pear confers multiple abiotic stress tolerance by altering polyamine titers. *Transgenic Res* 17:251–263

Wi, S.J., Kim, S.J., Kim, W.T., & Park, K.Y. (2014). Constitutive S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression increases drought tolerance through inhibition of reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*. *Planta* 30, 30. DOI: 10.1007/s00425-014-2027-0

Wu, J., Shu, S., Li, C., Sun, J., & Guo, S. (2018). Spermidine-mediated hydrogen peroxide signaling enhances the antioxidant capacity of salt-stressed cucumber roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 152-162

Xu, L., Xing S. T., & Sun, X. (2014b). Effects of polyamines on hormones contents and the relationship with the flower bud differentiation in chrysanthemum. *Plant Physiol. J.*50, 1195–1202

Yamamoto A., Shim I.S. & Fujihara S. (2016) Inhibition of putrescine biosynthesis enhanced salt stress sensitivity and decreased spermidine content in rice seedlings. *Biol Plant* 61:385–388

Yin, L., Wang, S., Tanaka, K., Fujihara, S., Itai, A., Den, X., et al. (2015). Silicon-mediated changes in polyamines participate in silicon-induced salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. *Plant Cell Environ.* DOI: 10.1111/pce.12521

Yu, Z., Jia, D., & Liu, T. (2019) Polyamine Oxidases Play Various Roles in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Plants*, 8, 184.

Zhang, Z., Chen, H., Huang, X., Xia, R., Zhao, Q., Lai, J., Teng, K., Li, Y., Liang, L., Du, Q., Zhou, X., Guo, H., & Xie, Q. (2011). BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 23(1), 273–288. DOI: 10.1105/tpc.110.081695

Zarei, A., Trobacher, C. P., & Shelp, B. J. (2015). NAD⁺-aminoaldehyde dehydrogenase candidates for 4-aminobutyrate (GABA) and β -alanine production during terminal oxidation of polyamines in apple fruit. *FEBS letters*, 589(19), 2695-2700

Zhu, J. K. (2007). *Plant salt stress*. eLS.

Anexo 1

Materiales y métodos

1. Material vegetal y microorganismos

1.1. *Arabidopsis thaliana*

Este trabajo fue efectuado usando a la planta *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio. Las semillas silenciadas-*adc* (Sánchez-Rangel et al., 2016) pertenecientes al ecotipo Wassilewskija (Ws) fueron usadas para la caracterización de esta línea. Adicionalmente, las semillas de la línea reportera de ciclo celular CycB1:uidA fueron utilizadas para la generación y estudio de las líneas CycB1:amiR*adc*. La superficie de las semillas fue esterilizada mediante lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 20% (v/v), seguido por 4 enjuagues con agua destilada estéril. A continuación, las semillas fueron estratificadas manteniéndolas a 4 °C en oscuridad por un periodo de dos días. Posteriormente, estas fueron germinadas y crecidas en placas de medio Murashige y Skoog (MS) 0.5 x pH 5.7, que contenían 0.5% (p/v) de sacarosa y 1% (p/v) de agar (Murashige y Skoog, 1962). En el caso particular de los ensayos de análisis del meristemo apical de la raíz, así como de la determinación de las raíces laterales, el medio MS 0.2 x fue preparado a partir del medio Linsmaier and Skoog (L477; Phyto Technology Laboratories, Lenexa, KS, USA), ajustado a pH 5.7 y suplementado con vitaminas (piridoxina 0.1 mg L⁻¹ y ácido nicotínico 0.1mg L⁻¹, de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), sacarosa 1% y agar 0.8% (w/v, Bacto™ Agar; BD Difco, Sparks, MD, USA). Las placas fueron orientadas verticalmente e incubadas a 22 ± 2 °C en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz (100 μmol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad.

1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la generación de las líneas CycB1:amiR*adc*, se realizó la transformación estable de las plantas de *A. thaliana* CycB1:uidA, empleando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 (Deblaere et al., 1985) que contiene el vector de expresión pMDC32-amiR*adc*.

1.3. *Botrytis cinerea*

En este trabajo se usó la cepa B05.10 del hongo fitopatógeno *B. cinerea*. Las esporas del hongo fueron inoculadas en placas de medio agar de papa y dextrosa (PDA) y mantenidas a 28 °C por 5 días en oscuridad. Posteriormente, el micelio fue retirado con un asa bacteriológica, para posteriormente ser resuspendido en agua destilada estéril y filtrado. La solución de esporas fue almacenada a 4 °C en oscuridad. Para los ensayos de interacción, la suspensión fue ajustada a una concentración de 2×10^5 esporas/mL en caldo PDA (0.25 x).

1.4. *Pseudomonas syringae*

Células de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 fueron usadas en los ensayos de interacción, como modelo de un microorganismo necrotrófico. La cepa crecida en placas de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/mL fue incubada a 37 °C en oscuridad por 24 horas. Trascorrido ese tiempo, una colonia fue seleccionada e inoculada en 50 mL de medio líquido LB conteniendo rifampicina 50 µg/mL. El inóculo fue incubado a 37 °C en oscuridad y agitación constante (5000 rpm) por 12 horas. Subsecuentemente, el cultivo fue centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos y suspendido ajustado en MgCl₂ 10 mM a una concentración de 1×10^8 CFU/mL. La solución de infiltración fue usada inmediatamente.

2. Plásmido empleado

Para la obtención de las plantas transformantes CycB1:amiR*adc* se usó la construcción pMDC32-amirR:*adc* (Sánchez-Rangel et al., 2018). Este vector está dirigido bajo el promotor constitutivo 35S y contiene una región que codifica un microRNA artificial diseñado para el silenciamiento específico de los genes *ADC* de *A. thaliana*.

2.1. Transformación genética de *Arabidopsis*

La transformación estable de plantas de *Arabidopsis* se realizó mediante el método de inmersión floral descrito por Zhang y col. (2006). Las células de *A. tumefaciens*

conteniendo el pMDC32:amiRadc fueron ajustadas a una densidad óptica (OD) de 0.6 en una solución de transformación consistente en medio MS con 70 µl de Silwett L-77. Los botones florales inmaduros de plantas de 3 semanas de edad de la línea CycB1:uidA fueron sumergidos en la solución de transformación por 15 segundos. A continuación, las plantas fueron dispuestas de manera horizontal en oscuridad por un periodo 24 h. Posteriormente fueron transferidas a una cámara de crecimiento bajo las condiciones de crecimiento anteriormente descritas. Finalmente, las semillas recuperadas de las plantas utilizadas fueron seleccionadas mediante su crecimiento en medio MS 0.2 x suplementado con el antibiótico higromicina a una concentración de 50 µg/mL.

3. Técnicas para los análisis transcripcionales

3.1. Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de DNA complementario (DNAc)

El RNA total de *A. thaliana* de las líneas silenciante-*adc* y Ws de 10 días de edad, en el caso de la medición de la expresión de los genes *AtCAT2*, *GPX*, *TIR1* y *BI-1*; en el caso del material vegetal para el análisis de los genes relacionados con la defensa ante el ataque de patógenos se usaron hojas provenientes de ambos genotipos de 4 semanas de edad. La extracción de este material en ambos casos se realizó mediante el uso del reactivo Concert Plant Reagent (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante; las muestras fueron almacenadas a -70 °C para análisis posteriores. El DNA genómico fue removido mediante el tratamiento con DNAsa Turbo (Ambion). La concentración del RNA fue medida en un espectrofotómetro Epoch 2 (Biotek Instruments, Winnoski, USA). La síntesis del DNA complementario (DNAc) se realizó a partir de 1 µg de ARN total tratado con DNAsa. La síntesis de DNAc fue llevada a cabo mediante el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA), acorde a las especificaciones del fabricante.

3.2. Amplificación de los transcritos por qRT-PCR

La reacción para el análisis de qRT-PCR fue llevada a cabo en 10 μ L de una mezcla de reacción conteniendo el DNAc (100 ng), cada uno de los oligonucleótidos (200 nM) y 5 μ L del reactivo Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2 x) (Applied Biosystems). Se empleó el software StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems). El número del ciclo umbral (valor Ct) fue usado para calcular el nivel de expresión relativa. El valor Ct de cada gen fue normalizado por la sustracción del valor Ct del gen constitutivo *UBQ5* (At3g62250). Las veces en la expresión génica en relación con las muestras de control se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los oligonucleótidos usados se incluyen en la Tabla 5. Para cada muestra se analizaron tres réplicas biológicas ($n = 3$) con sus respectivas réplicas técnicas.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados

Gen	No. de acceso al GenBank	Oligos diseñados 5'-3'
<i>UBQ5</i>	<i>AT3G62250</i>	TCG ACG CTT CAT CTC GTC CT
		CGC TGA ACC TTT CCA GAT CC
<i>CAT2</i>	<i>AT4G35090</i>	RV-TAC CGT ACC TTT ACA CCA GAG A
		TCT GTC CCA AAG ACT TAT CAG C
<i>GPX</i>	<i>AT1G63460</i>	ATC TCT GTA AGA CCT TGC CAT C
		GTG GAT GTG AAC GGT AAG AAC A
<i>TIR1</i>	<i>AT3G62980</i>	ATG AAG TAA AGA AGC AGA CCG G

		ACA CGA ACC AGT TGC TTG AAT G
<i>BI-1</i>	<i>AT5G47120</i>	TCT TTG GTG GCT CTG CAT CTA T
		GAA TCC GAA CAA ACA CAG CTA C
<i>PR1</i>	<i>AT2G14610</i>	TTC TTC CCT CGA AAG CTC AA
		AAG GCC CAC CAG AGT GTA TG
<i>LOX3</i>	<i>AT1G17420.1</i>	CTT CAC TGC TGG TGC ATA CG
		AAG ACC ATG TGG TTG TGT TGC A
<i>PDF1.2</i>	<i>AT5G44420</i>	ATG GCT AAG TTT GCT TCC AT
		TTA ACA TGG GAC GTA ACA GA
<i>PAD3</i>	<i>AT3G26830</i>	GGA TCT GGT AGG AGA ATA TGT C
		TGA TGA TCT CTT TGG CTT CCT C

<i>WRKY33</i>	<i>AT2G38470</i>	CTC TAG AGC AAA GGA AGA ACC
		GTA GTA AAA TCC TTT GGT GGC AG
<i>WRKY54</i>	<i>AT2G40750</i>	CAT ACT CAA AGA GAA GAC CTA G
		GGT TTG GCA AGA GAC GAT GAT
<i>WRKY70</i>	<i>AT2G38470</i>	TGT TTT CCA CTC TAC ATG GCC
		CAG GAT CTC ATG GTG TTT GGA

4. Tratamientos de estrés

4.1. Ensayo de estrés salino

Las semillas de *A. thaliana* de la línea silenciante-*adc* y Ws fueron crecidas en placas MS de 0.5X durante 7 días. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a placas con MS conteniendo NaCl 150 y 175 mM, el control consistió en MS 0.5 x. Las plántulas bajo los diferentes tratamientos fueron mantenidas en una cámara de crecimiento con las condiciones anteriormente mencionadas, por 5 días más.

4.2. Ensayo de estrés por bajas temperaturas

Semillas de *Arabidopsis* de ambas líneas, previamente lavadas y estratificadas, fueron sembradas en placas con medio MS 0.5 x e incubadas a 4, 10 y 22 °C en cámaras de crecimiento con las condiciones de luz antes descritas, por 20 días. El

registro de la germinación fue realizado cada 24 h del día 1 al 9 posteriores a la siembra. Los registros, fotográfico y del número de cotiledones verdes, fueron realizados habiendo transcurrido el último día de tratamiento.

4.3. Ensayos de estrés biótico

4.3.1. Experimento de interacción *Arabidopsis-B. cinerea*

En estos ensayos se usaron 50 plantas de *Arabidopsis* de ambos genotipos Ws y silenciante-*adc* de 4 semanas de edad, crecidas en suelo (sustrato sunshine mezcla #3), en charolas plásticas de crecimiento. Previamente a la inoculación, cinco hojas por planta ($n=250$), fueron seleccionadas y marcadas. Posteriormente sobre la superficie de cada hoja se colocó una gota (4 μ L) de la suspensión de esporas de *B. cinerea* (B05.10). Para el tratamiento control, la misma cantidad de plantas fueron goteadas con medio nutritivo, caldo de patata y dextrosa (0.25 x). Las plantas inoculadas fueron cubiertas con domos plásticos, los cuales fueron previamente humedecidos con agua destilada estéril para incrementar la humedad relativa y asegurar la infección. Las charolas fueron selladas e incubadas a 22 °C en condiciones de oscuridad por 72 horas. Trascurrido ese tiempo, se llevó a cabo, la determinación de la incidencia de la infección (expresada en porcentaje), dada por el cociente de la cantidad de hojas que desarrollaron síntomas de la infección entre la cantidad total de hojas inoculadas. Subsecuentemente, la longitud del diámetro de las lesiones fue medido mediante el uso de un calibrador Vernier Digital (Truper 14388).

4.3.2. Experimento de interacción *Arabidopsis-P. syringae*

Para este ensayo, 50 plantas de ambas líneas Ws y silenciante-*adc* fueron utilizadas. La inoculación con *Pseudomonas* se realizó mediante una infiltración con 500 μ L del inóculo en la cara abaxial de las hojas. Las charolas con las plantas inoculadas fueron cubiertas con un domo plástico, selladas y mantenidas a 22 °C por 72 horas. Posteriormente, la población bacteriana proveniente de la interacción fue estimada mediante el aislamiento de las unidades formadoras de colonia (UFC) provenientes de la zona de infección. En este sentido, se extrajeron seis discos de

1 cm² de las zonas infectadas, los cuales fueron homogenizados en una solución de MgCl₂ 10 mM, constituyendo una muestra biológica. Para este ensayo se usaron tres muestras biológicas por línea, por tratamiento. Subsecuentemente, se realizaron diluciones seriadas de cada una de las muestras y fueron goteadas (4 µL) en placas con medio Lb suplementado con rifampicina. A continuación, las placas fueron incubadas a 28 °C, en oscuridad por 72 horas. Finalmente, para realizar el cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de peso fresco, se llevó a cabo la ecuación, $CFU/cm^2 = \text{no. Colonias} \times \text{Factor de dilución} / \text{área}$.

5. Aplicación de pre-tratamientos

5.1. Aplicación de catalasa (CAT) exógena a medio nutritivo sólido

Las semillas de la línea silenciante-*adc* y de la silvestre *Ws* crecidas en medio MS 0.5x por 7 días fueron transferidas a placas de medio conteniendo catalasa (CAT, Sigma Aldrich). La solución de trabajo de CAT fue preparada a una concentración de 2000 u/mL en una solución amortiguadora de fosfato de potasio a pH 7 y temperatura ambiente. La solución fue esterilizada mediante filtración y usada inmediatamente después de su preparación. La enzima fue suplementada en el medio MS a las siguientes concentraciones de 0, 200 y 300 U/mL. Las placas fueron incubadas por 5 días más bajo las condiciones controladas previamente descritas.

5.2. Tratamientos con CAT y PAs suplementadas al medio líquido

Las plántulas de siete días de edad las líneas *Ws* y silenciante-*adc* fueron transferidas placas de cultivo transparentes de 24 pozos que contenían medio líquido MS suplementado con: CAT de 200U / mL, Put 10 µM, Spd 10 µM, Spm 10 µM, Put 50 µM, Spd 50 µM y Spm 50 µM. Posteriormente las plántulas fueron enjuagadas con agua destilada y utilizadas para la determinación de H₂O₂.

5.3. Tratamiento con Metil jasmonato (MeJA) y Put previo a los ensayos de interacción

Previamente a los ensayos de susceptibilidad a *B. cinerea* y *P. syringae* en plantas de *A. thaliana* de cuatro semanas de edad de la línea silenciante-*adc* y *Ws*. Los pretratamientos foliares con Put y MeJA se realizaron durante una semana antes de la infección. Se realizaron tres aplicaciones, cada dos días asperjando las hojas con soluciones de Put o MeJA 10 μM .

6. Determinación de actividad enzimática

6.1. Extracción de proteína

Para obtener las proteínas requeridas para las determinaciones enzimáticas, se utilizaron 200 mg de tejido (plántulas de diez días de edad) de las líneas silenciante-*adc* y *Ws*. El material vegetal fue molido con nitrógeno líquido en un mortero y homogenizado en 400 μL de un buffer de extracción de fosfato de sodio (pH 7; a una proporción 1:2 p/v) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride) 1mM. El contenido total de proteína fue determinado empleando el método de Bradford (1976) con seroalbúmina bovina como estándar.

6.2. Actividad de las poliamino oxidasas (PAOs)

La actividad de PAO fue estimada por espectrofotometría a partir del extracto proteínico descrito. En este sentido, para cada muestra se preparó una mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de sodio 0.2 M pH 7.0, 0.06 mg de peroxidasa de rábano, 4-aminoantipirina 100 μM , ácido 3,5-dicloro-2-diclorobencensulfónico 1mM en un volumen total de 100 μL . A continuación, la reacción fue iniciada por la adición de 2 μL de los sustratos Spd y Spm e incubada a 30 °C por un minuto. Finalmente, la actividad de PAO fue medida espectrofotométricamente, tomando en consideración el coeficiente de extinción del producto de la reacción ($\xi_{515} = 2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y fue expresada en nKat/mg de proteína.

6.3. Actividad de NADPH oxidasa

El extracto proteínico de las líneas silenciante-*adc* y *Ws* fue usado para esta determinación de acuerdo con lo reportado por *Rodríguez et al., 2009*. Los geles de

poliacrilamida se escanearon con el sistema Pharos FX (Biorad) y se detectó la intensidad de la banda de NTB con el programa Image J. La actividad de NADPH oxidasa se expresó como unidades relativas (RU).

6.4. Actividad de catalasa

La cuantificación de la actividad de catalasa se realizó a partir de la proteína extraída de plántulas de diez días de edad de las líneas silenciante-*adc* y *Ws* en acorde a lo publicado por Sahebani y Hadavi (2009), con algunas modificaciones. En este sentido, semillas de la línea silenciante y la *Ws* fueron germinadas en mallas dispuestas sobre medio MS 0.5 x y cultivadas por ocho días bajo condiciones controladas. A continuación, las plántulas se transfirieron sobre la malla a un medio fresco que contenía Put a 0 o 10 μM durante 48 h. La actividad de catalasa se midió como una disminución en la absorbancia de H_2O_2 a 240 nm después de 1 minuto de reacción. El coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a 240 nm ($43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) fue utilizado para la estimación de la actividad de catalasa. La actividad enzimática se expresó como U/mg de proteína.

7. Determinación de especies reactivas de oxígeno (EROs) a partir de plántulas

7.1. Detección de peróxido mediante el uso de la diaminobencidina (DAB)

La visualización de la producción de H_2O_2 se realizó mediante el compuesto 2',7'-diclorofluoresceín diacetato (DCFH₂-DA). Las plántulas de las líneas *Ws* y silenciante-*adc* mantenidas por 4 horas en medio líquido MS suplementado con CAT o PAs, como se describió anteriormente, fueron usadas para este ensayo. El material vegetal fue transferido a placas de cultivo transparentes de 24 pozos, conteniendo una solución de DCFH₂-DA a 25 μM en Tris (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH 7.2). A continuación, Las placas fueron selladas e incubadas a 30 °C en condiciones de oscuridad con agitación (40 rpm) durante 20 min. Posteriormente, las plántulas fueron lavadas con una solución amortiguadora de Tris (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH 6.1) para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, se realizó el montaje de las plántulas tratadas sobre portaobjetos conteniendo 30 μL de glicerol

al 50% y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Imager M2 / 3525000525) a una longitud de excitación y de emisión de 480 nm y 550 nm, respectivamente. Se analizaron al menos seis plántulas de cada línea por tratamiento. Cada ensayo se repitió tres veces.

7.2. Cuantificación de peróxido de hidrógeno y del anión superóxido

El contenido de H₂O₂ fue determinado en plántulas de diez días de edad de las líneas silenciante-*adc* y *Ws*. Para esto, 100 mg de tejido fresco de ambas líneas fue molido y homogenizado con 375 µl de ácido tricloroacético 0.1%. Posteriormente, el homogenizado fue centrifugado a 7000 rpm por 20 minutos. A continuación, 250 µl del sobrenadante fueron puestos en tubos nuevos, a los cuales se agregó el mismo volumen de búfer de fosfato de sodio 10 mM (V/V) a pH 7. Finalmente, se añadieron 500 µl de una solución de yoduro de potasio 1 M y se dejó reaccionar por 2 min. La lectura se realizó a 390 nm (Junglee et al 2014).

En el caso de la determinación del anión superóxido, las plántulas de 10 días de ambas líneas fueron incubadas en una solución de XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) a una concentración de 0.5 mM. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 30 °C en condiciones de oscuridad por 5 horas. Trascurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante fue recuperado y la absorbancia fue mediada a 470 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf, Hauppauge, NY).

8. Determinación de parámetros fisiológicos involucrados en el crecimiento

8.1. Estimación de peso fresco, longitud de la raíz primaria

Las semillas de *A. thaliana* de las líneas silenciante-*adc* y *Ws* fueron crecidas en placas MS de 0.5 x durante 7 días. Posteriormente, las plántulas bajo los diferentes tratamientos fueron mantenidas en una cámara de crecimiento con las condiciones anteriormente mencionadas, por 5 días más. El peso fresco (mg) y la longitud de raíz primaria (cm) de las plántulas se obtuvieron en una escala analítica y los valores

obtenidos representan las medias de siete grupos constituidos por tres plántulas por línea (n=21). Para la medición de la longitud de raíz primaria se utilizó el software IMAGE J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

8.2. Determinación y cuantificación de clorofila

Para el análisis de la cuantificación de clorofila total ($\mu\text{g/g}$ FW), se usaron plántulas de 12 días de edad de la línea silenciante-*adc* y su parental *Ws*. Cada muestra (cinco plántulas) fue pesada y colocada en tubos eppendorf de 1.5 mL conteniendo 0.7 mL de N-N, dimetilformamida (DMF). Los tubos fueron incubados en agitación constante a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad por 24 h. Posteriormente, 100 μL de cada extracto fueron colocados por triplicado en microplacas transparentes y cuantificados usando un lector Epoch 2 (Biotek Instruments, Winnoski, EE.UU.) y fueron estimados a las longitudes de onda de 647 y 664 nm. Se cuantificaron tres repeticiones biológicas ($n=3$) con sus respectivas repeticiones técnicas. Los experimentos se repitieron al menos dos veces con resultados similares.

9. Análisis de los parámetros de crecimiento de la raíz primaria en plántulas

9.1. Aclaración por el método de yoduro de sodio

Para realizar el análisis del meristemo apical de la raíz primaria, las plántulas de 8 días de edad de ambas líneas, silenciante-*adc* y *Ws* crecidas en MS 0.5 x fueron usadas. Las plántulas fueron transferidas a placas de cultivo transparentes conteniendo una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PIPES 0.025 M, durante 24 horas. Posteriormente, la solución fue reemplazada con una solución que contenía NaI 4.2 M y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 8 mM preparada en glicerol al 65% (v / v) suplementado con NaI al 2%, a temperatura ambiente por 24 horas. Finalmente, la parte aérea de cada plántula fue retirada y las raíces fueron montadas en portaobjetos con la solución de glicerol al 65% (v / v) suplementado con NaI al 2% (Dubrovsky, et al. 2009).

9.2. Aclaración de primordios de raíces laterales

Las plántulas de ambas líneas fueron clareadas mediante un método de metanol acidificado (Malamy y Benfey, 1997) con algunas modificaciones por Dubrovsky et al., 2006. El material vegetal fue embebido en una solución fijadora de paraformaldehído al 2% en PIPES al 0.025M a una temperatura de 4 °C por 24 horas. A continuación, las plántulas fueron enjuagadas con agua destilada e incubadas a 62 °C en una solución de HCl (0.24 N) en metanol al 20% por 60 min. Después, se colocaron en 1mL de solución básica de NaOH al 0.7% en etanol al 60% a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente, se efectuó una deshidratación gradual con soluciones de etanol (40, 20 y 10%), incubando durante 48h por cada una. Finalmente, a la última solución se le agregó 1 mL de glicerol al 50% y se incubó por 48 h más. Las raíces fueron montadas en portaobjetos con glicerol al 50%.

Las determinaciones fueron realizadas mediante el uso de un microscopio Axiovert 200 M Zeiss equipado con dispositivos ópticos para contraste diferencial de interferencia (Oberkochen, Germany).

9.3 Parámetros relacionados con crecimiento celular de la raíz primaria (RP)

La determinación de la longitud celular se realizó mediante el promedio del tamaño de diez células continuas del córtex, ubicadas en la misma fila celular. A continuación, se determinó el tamaño. Posteriormente, para determinar el tamaño del meristemo apical de la RP se cuantificó el número de células corticales en una sola fila continua del dominio de proliferación en función de la longitud abarcada.

9.4. Parámetros relacionados a ciclo celular

La tasa de producción celular por su parte se determinó colectando datos de manera individual para cada raíz de las últimas 24 horas previas al procesamiento de las plántulas, y la longitud celular promedio de células diferenciadas del córtex. Estos datos se sustituyeron en la fórmula $P=V/le$ (Ivanov & Dubrovsky, 1997), en donde V es la tasa de crecimiento de la raíz y le es el promedio de la longitud de diez células corticales completamente alongadas.

La duración del ciclo celular fue determinada mediante los datos de la tasa de crecimiento de las últimas 24 h previas al procesamiento de las plántulas, la longitud celular promedio de células diferenciadas del córtex y el número de células correspondiente al tamaño del dominio de proliferación. Estos datos se sustituyeron en la fórmula $T = \ln 2 Nm / le / V$ (Ivanov y Dubrovsky, 1997), en donde Nm corresponde al número de células meristemáticas en un solo tejido, le representa la longitud promedio de células completamente elongadas y V es la tasa de crecimiento de la raíz. Los datos utilizados corresponden a los análisis de cada raíz individual por línea y tratamiento. Para la foto-documentación del meristemo, se utilizó una cámara a color CoolSNAPcf (Valley International Corporation, Austin, TX, USA)

Por su parte, se efectuó el análisis de raíces laterales (RL) de las líneas silenciadas *adc* y *Ws* aclaradas por el método de metanol acidificado. En el caso de estimación de la densidad de PRL's, esta se realizó mediante el siguiente cálculo: $d = N_{PRL} L^{-1}$ (Dubrovsky et al, 2009), en donde N_{PRL} es el número de primordios en la "zona de formación de raíces laterales" (zona que abarca desde el primordio iniciado más distal a la raíz lateral emergida más distal) y L es la longitud de esta misma zona. A continuación, se calculó el índice de iniciación de RL, dado por la siguiente fórmula: $IRLI = 100 d / le$ (Dubrovsky et al, 2009) en donde d es el número de primordios iniciados en la "zona de formación de raíces laterales" y le es la longitud promedio de células diferenciadas del córtex, calculado para cada raíz individual. Finalmente se observaron y cuantificó la cantidad de primordios en sus diferentes etapas (I-II, III-IV y V-VII) según Malamy & Benfey (1997) por cada raíz primaria individual.

9.5. Aclaración de las plántulas y análisis histoquímico de la actividad de GUS

La localización histoquímica de la actividad de GUS en las plántulas de siete días de edad de las líneas reporteras de *A. thaliana* *CyCB1:amiRadc* fue realizada en acorde a lo reportado por Jefferson (1987). Después de los pre-tratamientos con PAs, las plántulas fueron incubadas en una solución buffer de reacción para GUS (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronidasa 0.5 mg/mL en fosfato de sodio 100 mM, pH 7), en oscuridad y a 37 °C por un periodo de 12 horas. Posteriormente, las plántulas fueron aclaradas mediante un método de metanol acidificado (Malamy y

Benfey, 1997). En este sentido el material vegetal fue incubado a 55 °C en 1 mL de una solución de HCl 0.24 N en metanol al 20%. A continuación, esta solución es sustituida por 1 mL de NaOH al 7% en etanol al 60%. Posteriormente, la solución fue retirada y remplazada de forma gradual por soluciones de etanol (40, 20 y 10%) cada hora. Transcurrido el tiempo de la última incubación, se adiciono 1 mL de glicerol al 50% y la preparación se incubo a temperatura ambiente por una hora más. Finalmente, las raíces fueron montadas en portaobjetos con glicerol al 50%. Se analizaron 15 plántulas de cada línea bajo cada tratamiento. Las imágenes fueron generadas mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) (microscopio Zeiss Axio Imager M2/3525000525) bajo una magnificación de 10X.

10. Análisis estadístico

Para evaluar la significancia estadística en este trabajo se emplearon los análisis de varianza de una y de dos vías (ANOVA), así como el análisis de prueba de t de Student no apareado. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.0b (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). Los datos fueron representados por la media \pm SE. Las diferencias con valores de $p < 0.05$ se consideraron significativas.

Anexo 2

Publicaciones

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, 300. DOI: 10.3389/fpls.2016.00300

Chávez-Martínez, A. I., Jasso-Robles, F. I., Rodríguez-Kessler, M., Sarvajeet, S. G., Becerra-Flora, A., B. & Jiménez-Bremont, J. F. (2018). Down-regulation of arginine decarboxylase gene-expression results in reactive oxygen species accumulation in Arabidopsis. *Biochemical and biophysical research communications*, 506(4), 1071-1077. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.165

Chávez-Martínez, A. I., Ortega-Amaro, M. A., Torres, M., Serrano, M., & Jiménez-Bremont, J. F. (2020). Arabidopsis adc-silenced line exhibits differential defense responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 494-503. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.09.035