

03072 )  
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado  
Colegio de Ciencias y Humanidades**

**Instituto de Biotecnología**

**Dpto. de Biol. Mol. de Plantas**

**RESPUESTA DE DEFENSA DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A LA  
INFECCION CON LA BACTERIA *Xanthomonas campestris* pv.  
*phaseoli*.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA  
EN BIOTECNOLOGIA**

**Presenta el**

**BIOL. JOSE ALBERTO CAMAS REYES**

**Cuernavaca, Mor.**

**1993**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## RESUMEN.

La enfermedad de la planta de frijol conocida como "tizón fuscoso" es inducida por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (*Xpf*). En la presente investigación se realizó una caracterización de variedades de frijol resistentes y susceptibles a la infección por este patógeno. En las interacciones de la planta de frijol con otras especies de bacterias patógenas, la respuesta resistente de una variedad se asocia a cambios transitorios en las actividades enzimáticas de la fenilalanina amonio liasa (FAL) y de la chalcona sintasa (CHS) y a la producción concomitante de fitoalexinas en la zona danada por la infección. Se compararon las respuestas de cuatro variedades mexicanas a la infección por *Xpf*. Se siguió el crecimiento bacteriano dentro del tejido vegetal y se realizó un curso temporal de la actividad de FAL en tejido infectado colectado a distintos días después de la inoculación con una suspensión bacteriana. También se sometieron extractos de tejido infectado a un análisis por cromatografía líquida de alta resolución para detectar las fitoalexinas (flavonoides) producidas. Se caracterizó a las variedades "Negro Puebla" y "Cacahuete-72" como variedades resistentes y a las variedades "Alubia chico" y "Bayocel" como susceptibles. En las variedades resistentes el crecimiento bacteriano dentro del tejido es menor que en las variedades susceptibles, en donde la población del patógeno mostró un crecimiento sostenido durante 6 a 8 días después de la inoculación. Se determinó que la actividad de FAL es inducida al poco tiempo después de la inoculación en las variedades resistentes, mientras que en las susceptibles esta actividad se detectó tres días más tarde. Así también se obtuvieron diferencias temporales en los perfiles cromatográficos de los flavonoides y en la cantidad de los mismos producida entre ambos tipos de variedades.

# INDICE .

I.- INTRODUCCION .	1
I.A GENERALIDADES.	
I.B PATOGENICIDAD DE BACTERIAS.	
I.C GENES DE VIRULENCIA ( <i>hrp</i> ) EN BACTERIAS FITOPATOGENAS.	
I.D GENES DE AVIRULENCIA ( <i>avr</i> ) EN BACTERIAS FITOPATOGENAS.	
II.- ANTECEDENTES .	23
II.A INDUCCION DE LA EXPRESION DE FENILALANINA AMONIO LIASA (FAL) Y DEL METABOLISMO FENILPROPANOIDE EN FRIJOL.	
II.B EXPRESION DE ISOFORMAS DE FAL Y SU RELACION CON LA RESPUESTA A LA INFECCION.	
II.C DISTRIBUCION DE LOS GENES DE FAL EN LOS TEJIDOS DE LA PLANTA DE FRIJOL.	
II.D ENSAYO DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LAS FITOALEXINAS.	
III.- JUSTIFICACION .	34
IV.- OBJETIVOS .	36
IV.A OBJETIVO GENERAL.	
IV.B OBJETIVOS PARTICULARES.	
V.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .	36
VI.- MATERIALES Y METODOS .	37
VI.A VARIEDADES DE FRIJOL Y CEPA BACTERIANA UTILIZADA.	
VI.B GERMINACION Y CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE FRIJOL.	
VI.C INOCULACION DE LAS PLANTAS.	
VI.D CRECIMIENTO DE LA POBLACION BACTERIANA EN EL TEJIDO.	
VI.E EXTRACCION ENZIMATICA Y ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE FAL.	
VI.F EXTRACCION DE FLAVONOIDES.	
VI.G ANALISIS DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR).	
VI.H ANALISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE EXTRACTOS DE FLAVONOIDES.	
VII.- RESULTADOS.	43
VIII.- DISCUSION.	75
IX.- CONCLUSIONES.	81
X.- LITERATURA CITADA.	82
XI.- APENDICE.	88

**A LORENA Y  
A JOSE MARTIN**

## I.- INTRODUCCION .

### I.A GENERALIDADES.

Las plantas se encuentran sujetas permanentemente a un sin número de factores de estres ambientales y biológicos. Estas condiciones pueden interferir con su crecimiento y desarrollo normal, y contribuyen a disminuir el rendimiento y la calidad alimenticia de las que son económicamente importantes.

Las plantas responden sintetizando diferentes juegos de proteínas durante diversas condiciones estresantes como en el ahogamiento, en alta concentración salina, en luz ultravioleta (Sachs y Tuan-Hua, 1986), en sequía, en la exposición a metales pesados y en la infección inducida por patógenos (Cowling y Horsfall, 1979).

Las condiciones ambientales físicas y biológicas que causan estres producen alteraciones en la expresión de los genes induciendo nuevas proteínas y reprimiendo alguna o algunas que son normalmente expresadas. Por lo tanto, podría decirse que las proteínas inducidas por el estres permiten a las plantas realizar ajustes bioquímicos y estructurales que las capacitan, para resistir o tolerar tales condiciones (Sachs y Tuan-Hua, 1986).

Los factores biológicos se consideran como patógenos vegetales cuando tienen capacidad de inducir enfermedades en las plantas. La enfermedad o patogénesis resulta siempre y cuando una o mas funciones vitales de un hospedero vegetal son afectadas continuamente (Cowling y Horsfall, 1979).

A la capacidad de una planta para contender con o evadir la infección y el daño subsecuente en cualquier grado, se le puede considerar como resistencia. En su sentido mas amplio la resistencia es la capacidad para escapar de o excluir la infección, o bien para suprimir de manera eficiente la invasión de un agente patógeno en un hospedero.

La susceptibilidad y la resistencia se evalúan midiendo el grado de la enfermedad en términos del daño directo al hospedero, como por ejemplo la intensidad de los síntomas, la extensión de la lesión, la marchitez, la pudrición, etc.

La susceptibilidad del hospedero a ser infectado depende bastante de su edad y de su estado de desarrollo, así como de la presencia y grado de exposición de estructuras que favorezcan la invasión por parte del patógeno.

Las plantas tienen mecanismos de resistencia a la invasión de un patógeno, los cuales pueden ya estar presentes antes de la infección (preformados) o pueden ser inducidos durante la interacción con el patógeno. Las bases biológicas de estos mecanismos se encuentran a niveles morfológicos y fisiológicos; dentro del nivel morfológico tenemos a los mecanismos morfológicos de escape, las barreras mecánicas preformadas y las barreras mecánicas inducidas. En el nivel fisiológico de la resistencia se encuentran las barreras químicas preformadas y las barreras químicas inducidas.

Los mecanismos morfológicos de escape se refieren al crecimiento espacial de las plantas, ya que una planta que crece con bastante densidad es más propensa a una infección que una que crece de manera más dispersa.

Las barreras mecánicas preformadas se refieren a la estructura de tejidos que pueden funcionar como protectores externos del hospedero tal como el grueso de la cutícula y de las paredes de las células epidérmicas. Este tipo de barreras pueden diferenciar entre variedades resistentes o susceptibles de un hospedero dependiendo de si las presenta o no.

Dentro de las barreras mecánicas inducidas tenemos estructuras morfológicas que pueden reducir o evitar la colonización por patógenos y que podrían desarrollarse como una respuesta a la infección.

Las paredes celulares de hojas infectadas u otros órganos como los tallos, frutos y raíces, tienden a engrosarse como una reacción a la infección en las plantas resistentes; por tanto, el parásito que queda confinado a estas células no llega a establecerse en los espacios intercelulares como en los cultivares susceptibles. Esto se logra mediante la aposición de nuevos carbohidratos como callosa y celulosa; mediante la formación de proteínas estructurales, de ligninas y de ácidos fenólicos de pared celular y también mediante la secreción de gomas.

Se ha observado que en la planta de frijol ocurre un engrosamiento hasta de cinco veces el ancho normal de la pared celular por aposiciones de callosa alrededor de las lesiones causadas por virus, posiblemente para bloquear los plasmodesmos y así evitar su paso entre las células.

Las aposiciones de carbohidratos podrían combinarse con materiales fenólicos como ligninas, taninos o melaninas para formar una barrera mas efectiva.

De las barreras químicas preformadas se sabe que son sustancias ya existentes en las células vegetales previas al ataque de patógenos y que actúan directamente sobre ellos, o indirectamente en los microorganismos asociados. Ejemplos de estas sustancias son los exudados de raíces, los fenoles, el ácido málico, los polifenoles, el ácido quínico, los glicósidos o los aminoácidos no proteicos.

Las raíces de algunas plantas producen aldehidos terpenoides y poliactilenos como exudados, los cuales son tóxicos principalmente a los nemátodos, mientras que en la corteza de otras se producen estilbenos y elagitaninos que actúan como fungicidas. Las saponinas y los alcaloides de las solanáceas también pueden intervenir en la resistencia a las plagas.

#### 1.a.1 BARRERAS QUIMICAS INDUCIDAS.

Las plantas frecuentemente muestran un aumento en los niveles de la resistencia a la enfermedad inmediatamente después de tener una invasión por patógenos o de tratamiento con metales pesados que causan lesiones o necrosis. A este proceso que se le llama resistencia inducida puede ser producido por hongos, bacterias, virus y nemátodos, así como también por ciertos factores físicos y químicos (Bell, 1981).

Aunque la resistencia química inducida podría ocurrir en todas las familias de plantas, se ha estudiado principalmente en las solanáceas, rosáceas, leguminosas y gramíneas.

Una necrosis en el sitio de infección y una localización de la lesión es probablemente el principal resultado de la resistencia inducida. El nivel alcanzado y la duración de la resistencia inducida, es directamente proporcional a la cantidad de inóculo del patógeno inductor.

La magnitud de la resistencia inducida puede variar entre diferentes especies, cultivares, y también a causa del tipo de agente inductor. De gran importancia dentro de este tipo de resistencia es el papel desempeñado por el metabolismo fenilpropanoide, en particular en la producción de fitoalexinas (Bell, 1981).

## 1.a.2 FITOALEXINAS.

Las observaciones experimentales de la defensa química de las plantas ante el ataque microbiano se registran desde principios de siglo. Sin embargo, la primera propuesta formal formulada como la teoría de las fitoalexinas fue dada a conocer en 1940 por Möller y Borger. Ellos sugirieron esta teoría para explicar que la restricción del desarrollo fúngico en los tejidos vegetales era debida a la acumulación localizada de un principio químico tóxico (fitoalexina) en las células de plantas infectadas (Smith y Banks, 1986a).

Desde que se publicó el aislamiento de la pisatina, una fitoalexina isoflavonoide de la planta de chícharo en 1960, diversas clases químicas de fitoalexinas se han identificado y se les ha definido como compuestos tóxicos de bajo peso molecular que se forman en las células del hospedero en respuesta a diversos estímulos químicos, físicos y biológicos. Se sabe que estas sustancias frecuentemente se producen en niveles basales o están ausentes en los tejidos sanos, pero que su síntesis aumenta después de dañar al tejido, acumulándose en y alrededor de los sitios de infección.

La acumulación de estas fitoalexinas es catalizada por enzimas que son sintetizadas *de novo* cuando las plantas son expuestas a los microbios.

El hecho de que las fitoalexinas se acumulen en los sitios de infección microbiana y de que después de la penetración del patógeno aumenten en cantidades suficientes para inhibir el crecimiento de hongos y de bacterias; indica que poseen una función de defensa y que podrían actuar para evitar infecciones en la planta (Smith y Banks, 1986a).

Las fitoalexinas son sustancias complejas que constituyen un grupo químicamente heterogéneo. Actualmente se conocen mas de 150 fitoalexinas que se distribuyen entre isoflavonoides, terocarpanos, estilbenos, sesquiterpenos, diterpenos, poliacetilenos, dihidrofenantrenos y otras clases de compuestos. Se encuentran en al menos 16 familias de plantas, principalmente distribuidas en las dicotiledóneas y en menor proporción entre las monocotiledóneas y las gimnospermas, y al parecer no se encuentran en las plantas no vasculares.

Las fitoalexinas isoflavonoides y terocarpanos predominan en la familia de las leguminosas, así como los sesquiterpenoides en las solanáceas (Ebel, 1986).

### 1.a.3 FITOALEXINAS ISOFLAVONOIDES.

Los isoflavonoides difieren de los flavonoides en tener un esqueleto 1,3-difenilpropano opuesto al 1,2-difenilpropano de aquellos y ocurren principalmente en el estado libre más que en forma de glucosidos como sucede con los compuestos fenólicos. Se asume principalmente que se originan a partir de precursores remotos debido a la lentitud de su acumulación y a la ausencia frecuente de precursores inmediatos. Al igual que los flavonoides, las diferentes clases de isoflavonoides son determinadas por cambios en el nivel de oxidación de los anillos heterocíclicos. La variación adicional es conferida por la elaboración de grupos arilo mediante reacciones secundarias: hidroxilación, metilación y prenilación (tabla 1).

La estructura molecular esencial C<sub>15</sub> de flavonoides e isoflavonoides se deriva de una convergencia de dos vías metabólicas, la del metabolismo general fenilpropanoide y la del acetato-malonato (Smith and Banks, 1986a). Las fitoalexinas isoflavonoides suelen poseer alguna hidroxilación antes de llegar a la etapa isoflavonoide en donde pueden sufrir más hidroxilaciones.

En la etapa isoflavonoide también pueden presentar alguna sustitución con otro radical en la posición 4' del anillo B (numeración isoflavonoide). Este sitio corresponde a la posición 4 del ácido hidroxicinámico precursor.

La hidroxilación en la posición 2' del anillo B ocurre en la etapa isoflavonoide.

Algunas fitoalexinas isoflavonoides como kievitona y wighteona de frijol y *Glycine wightii* respectivamente, presentan una hidroxilación en la posición 5 del anillo A, pero la mayoría de las fitoalexinas isoflavonoides como la faseolina carecen del grupo hidroxil en esta posición (tabla 1). Por lo que se propone la existencia de dos vías de síntesis alternas para explicar la formación de ambos tipos de fitoalexinas (5-hidroxi y 5-desoxi).

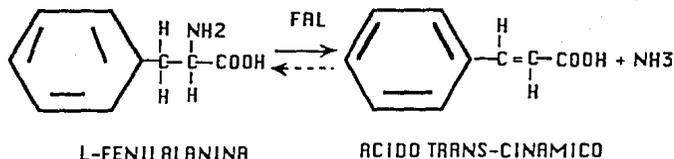


Fig. 3. Reacción que cataliza la fenilalanina amonio liasa desaminando la fenilalanina para dar ácido cinámico, siendo el primer paso de la vía general fenilpropanoide.

La enzima clave para la biosíntesis de flavonoides en frijol y otras leguminosas es la enzima Chalcona Sintasa (CHS) que desempeña una función múltiple. Actúa en diferentes vías de ramificación que conducen a la producción de derivados de flavonas e isoflavonas, así como a la generación de isoflavonoides 5'-desoxi y 5'-hidroxi (Hahlbrock K and D Schell, 1989).

La CHS cataliza la formación de una molécula de chalcona a partir de malonil CoA. La estructura  $C_6C_3$  forma el anillo B y el anillo A es formado por condensación de 3 unidades acetato derivados de malonil-coenzima A.

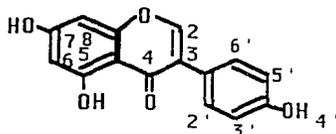
El peso molecular de CHS por SDS-PAGE y por sedimentación a equilibrio se ha calculado en 77000 y el análisis del tamaño del ARNm sugiere que la enzima consiste de 2 subunidades idénticas. Se ha elucidado que la reacción inicial de la CHS procede al descarboxilar al Malonil CoA antes de llevar a cabo la condensación, intercambiando  $^{14}C$  entre  $CO_2$  y Malonil CoA, en la ausencia de 4-cumaroil CoA.

En frijol se ha detectado la síntesis *de novo* de al menos 9 isopéptidos de CHS inducidos por tratamientos con patógenos y por daño mecánico. Esta enzima es codificada por una familia de genes organizados en una agrupación de 6-8 miembros. Ello ha llevado a proponer que un juego de genes de CHS codifica polipéptidos idénticos o similares que se ubican en diferentes vías regulatorias para dar respuestas precisas a toda una gama de estreses ambientales (Hahlbrock y Scheel, 1989).

TABLA I. ESTRUCTURA Y FUENTE DE ISOFLAVONOIDES POSTINFECCION EN LEGUMINOSAS

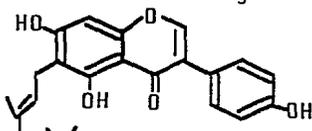
GRUPO QUIMICO NOMBRE COMUN ESTRUCTURA ESPECIE

ISOFLAUNA GENISTEINA



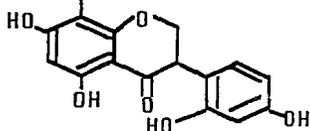
*Phaseolus vulgaris*

ISOFLAUNA WIGHTEONA



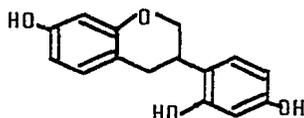
*Glycine wightii*

ISOFLAUNONA KIEUITONA



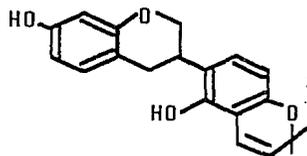
*Phaseolus vulgaris,*  
*Vigna sinensis*

ISOFLAUNO DESTITOL



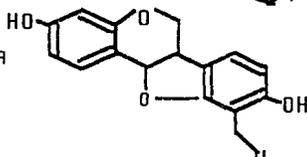
*Lotus corniculatus*

ISOFLAUNO FASEOLINA ISOFLAUNO



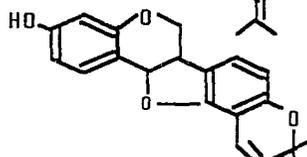
*Phaseolus vulgaris*

TEROCARPANO FASEOLIDINA



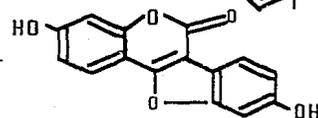
*Phaseolus vulgaris,*  
*Vigna sinensis*

TEROCARPANO FASEOLINA



*Phaseolus vulgaris,*  
*Vigna sinensis*

TEROCARPANO CUMESTROL



*Phaseolus vulgaris*  
*Medicago sativa*

### 1.a.4 METABOLISMO GENERAL FENILPROPANOIDE.

El metabolismo general fenilpropanoide es una secuencia de reacciones encaminadas a convertir al aminoácido fenilalanina en cumaroil-CoA y en ésteres derivados de este metabolito (Fig. 1). En esta vía participan varias enzimas cuyos productos metabólicos son precursores de una serie de compuestos fenilpropanoides como los flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, terpenos, ligninas y estilbencenos que se han asociado al mecanismo de defensa de las plantas.

Las enzimas involucradas en el metabolismo fenilpropanoide son la Fenilalanina amonio liasa (FAL) la primera enzima de la vía, la 4-hidroxilasa del ácido cinámico (CA4H) y la 4-Cumarato-CoA ligasa (4CL) representadas en la misma figura 1. En la conexión entre el metabolismo fenilpropanoide y la vía específica para la síntesis de los isoflavonoides participa una chalcona intermediaria, cuya formación es catalizada por una enzima que requiere como sustratos al cumaroil-CoA, producto final del metabolismo general fenilpropanoide y 3 moléculas de Acetil-CoA proporcionados a través de la vía del acetato-malonato (Fig. 2).

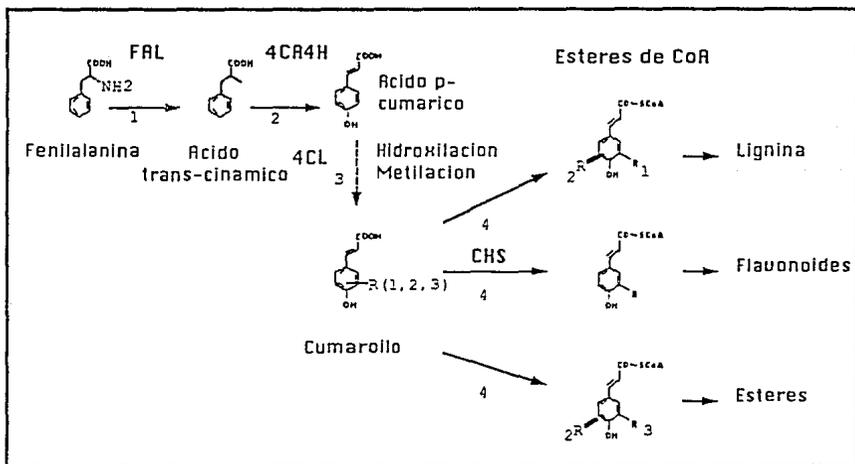
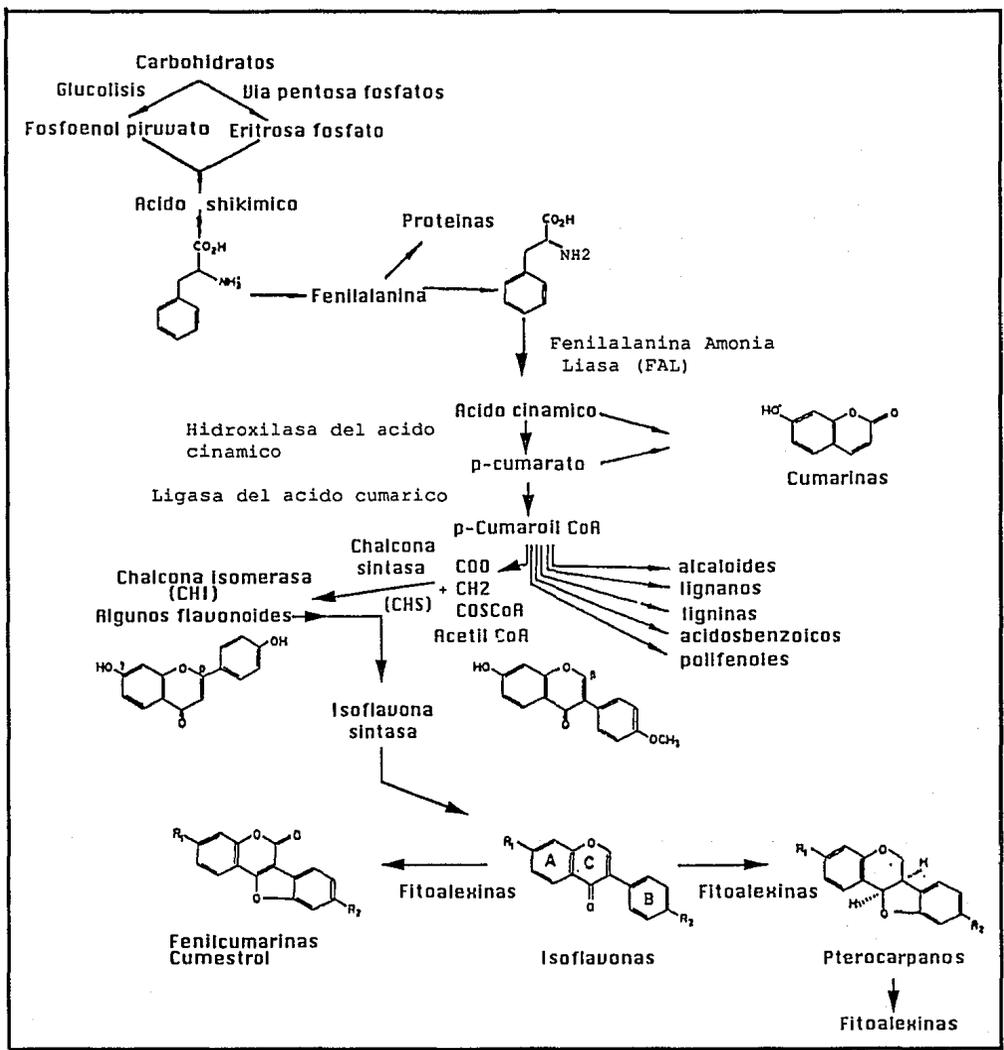


Fig.1. Vía general fenilpropanoide (1,2 y 3) y ramificación hacia la síntesis de derivados fenilpropanoides (4). En cada uno de los pasos intervienen las enzimas FAL, 4CL, 4CL y CHSsecuencialmente.



Modificado de Rolfe BR. 1988. Biofactors, 1(1):3-10.

Fig. 2 Vía general fenilpropanoide conectada con la vía de síntesis de isoflavonoides a través de una chalcona intermediaria que es catalizada por la chalcona sintasa que requiere de Cumaroil CoR (producto final de la vía general fenilpropanoide) y de 3 moléculas Acetil CoR que provienen de la vía del acetato malonato.

La tabla I resume las estructuras y la fuente vegetal de los derivados isoflavonoides mas importantes formados en las leguminosas después de una infección. La genisteína y la 2-hidroxigenisteína se acumulan junto con la faseolina y la kievitona en tejidos de *Phaseolus vulgaris*. Las dos primeras isoflavonas sirven como precursores de la fitoalexina kievitona.

El cumestrol es considerado como fitoalexina y tiene una actividad biológica antibacteriana mas que antifúngica; se acumula junto con cumestanos relacionados y con las fitoalexinas isoflavonoides en varias leguminosas como *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa*. Los esteres de los ácidos cumárico y cafeico son precursores en la biosíntesis de flavonoides (como antocianinas y taninos condensados), isoflavonoides y ácido clorogénico; mientras que los esteres de los ácidos ferúlico y sinápico son precursores de las ligninas (Figs. 1 y 2). La lignificación es una respuesta de defensa importante en muchas especies vegetales.

La L-Fenilalanina amonio liasa (EC 4.3.1.5) que emplea fenilalanina como sustrato cataliza la primera reacción en la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos fenilpropanoides como ligninas, cumarinas, esteres de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, isoflavonoides y terocarpanos. Las fitoalexinas, que son moléculas con actividad antimicrobiana son formadas en los tejidos vegetales en respuesta al ataque microbiano y resultan ser un factor importante en la resistencia a las enfermedades de las plantas. El primer paso comprometido en la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides es catalizado por esta enzima; la acumulación de fitoalexinas isoflavonoides inducidas por la infección fúngica es precedida por aumentos en la actividad extraíble de esta enzima. Las fluctuaciones en los niveles de FAL son un elemento clave en el control de la biosíntesis fenilpropanoide y por consiguiente de las fitoalexinas isoflavonoides. En la reacción ocurre la eliminación del amonio de la L-fenilalanina para producir ácido trans-cinámico (Fig. 3)

## I.B PATOGENICIDAD DE BACTERIAS.

Las bacterias fitopatógenas forman un grupo pequeño de géneros relacionados taxonómicamente, dentro de los cuales encontramos a *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Tabla II). Estas bacterias inducen diferentes tipos de síntomas en los hospederos, tales como la pudrición blanda del tejido, el marchitamiento, la producción de agallas o la necrosis entre otros. Géneros como *Pseudomonas* y *Xanthomonas* producen polisacáridos extracelulares, los cuales son liberados al medio y se les atribuyen funciones durante la patogénesis tales como la inducción de pústulas acuosas, la oclusión de los haces vasculares o la de barrera de protección contra algunas moléculas de defensa de las plantas (Daniels, 1989).

TABLA II

### PRINCIPALES GRUPOS DE BACTERIAS PATOGENAS DE VEGETALES

GENERO	TIPO DE ENFERMEDAD
<u>GRAM NEGATIVAS:</u>	
<i>Agrobacterium</i>	Hipertrofia (agallas)
<i>Erwinia</i>	Pudrición blanda, marchitez, necrosis
<i>Pseudomonas</i>	Mancha de la hoja, hipertrofia, pudrición su: marchitez
<i>Xanthomonas</i>	Mancha de la hoja, marchitez
<u>GRAM POSITIVAS</u>	
<i>Clavibacter</i>	Cancro, marchitez
<i>Curtobacterium</i>	Marchitez
<i>Rhodobacterium</i>	Hipertrofia

### 1.b.1 PATOGENICIDAD Y SEÑALES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCION.

La enfermedad en las plantas es la excepción mas que la regla, pues muchos patógenos vegetales son virulentos únicamente en un intervalo definido de especies que son hospederas. Los patógenos que son inoculados en una especie no hospedera carecen de la capacidad para crecer e infectar a la planta o bien se encuentran con un mecanismo de resistencia bastante exitoso.

La interacción con las especies que sí son hospederas exhibe una variedad de especificidades que depende de la estrategia del patógeno.

Hay patógenos no especializados (necrotroóficos) que dañan a la planta por medio de la producción de toxinas o de enzimas. Este tipo de patógenos frecuentemente están equipados con mecanismos que inactivan o evaden las defensas del hospedero.

Los patógenos especializados (biotroóficos) evitan dañar seriamente al hospedero, al menos en las primeras etapas de la infección y a diferencia de los no especializados, llegan a activar de manera específica las defensas del hospedero.

Se ha sugerido la existencia de grupos distintos de genes que intervienen en el proceso de infección y de patogenicidad. Se ha estimado que mas de 100 genes podrían ser requeridos para la patogenicidad de bacterias y para la elaboración de estructuras diferenciadas durante la infección tanto en hongos como en bacterias.

La infección exitosa por los patógenos requiere de factores que les permitan la unión a la superficie vegetal, de la formación de estructuras de penetración a la célula, de la degradación de la cutícula y de la pared celular del hospedero, así como de la producción de toxinas y antígenos específicos de la superficie celular en las bacterias; además también requieren de vías metabólicas para la secreción de enzimas extracelulares, las cuales se han identificado por análisis de complementación de mutantes y por mutagénesis a través de transposones.

Los genes que codifican para la elaboración de cutinasas, enzimas pecticas (pectinasas y poligalacturonidasas), celulasas, polisacáridos extracelulares y de toxinas (incluidos dentro de los genes conocidos como *hrp* ), conforman lo que se llama el paquete de compatibilidad básica de los microorganismos patógenos con su complemento vegetal. Ellos facilitan la infección y el crecimiento de los patógenos en el hospedero y les son útiles para evitar los mecanismos de defensa de las plantas; constituyen por sí mismos los requerimientos mínimos (básicos) para que exista la patogenicidad y la virulencia. Por tanto, los microorganismos requieren de información genética única para colonizar los tejidos vegetales y establecer relaciones simbióticas o relaciones parásitas.

En la tabla III se resumen los principales determinantes de patogenicidad y las especies de bacterias que los poseen.

TABLA III  
DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD

<u>ENZIMAS</u>		
(DEGRADAN PARED CELULAR)	PECTINASAS	<i>Erwinia crysanthemii</i> <i>Xanthomonas campestris</i>
	POLIGALACTURONASAS	<i>Erwinia carotovora</i>
	CELULASAS	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Xanthomonas spp.</i> <i>Erwinia crysanthemii.</i>
	AMILASAS	<i>E. c. pv. carotovora</i>
	PROTEASAS	<i>E. crysanthemii</i> <i>X. campestris</i>
<u>TOXINAS</u>		
(CAUSAN CLOROSIS)	CORONATINA	<i>Pseudomonas syringae</i>
	FASEOLOTOXINA	<i>P. s. pv. phaseolicola</i>
	SIRINGOTOXINA	<i>P. s. pv. syringae</i>
	TABTOXINA	<i>P. s. pv. tabaci</i>
<u>EXOPOLISACARIDOS</u>		
(CAUSAN MARCHITAMIENTO)		<i>X. campestris</i> <i>E. stewartii</i> <i>P. solanacearum</i>

### 1.b.2 CUTINASAS.

En la interacción de *Fusarium solani f. sp. pisi* un hongo patógeno del chicharo, la espora de este produce constitutivamente la enzima cutinasa y al estar en contacto con las células vegetales libera monómeros de cutina que inducen la cutinasa a niveles mas altos de actividad; sin embargo esta esterasa extracelular no es esencial para la patogenicidad del hongo ya que mutantes deficientes en la enzima no son alteradas en su patogenicidad y virulencia con respecto a la silvestre (Stahl y Schafer, 1992).

### 1.b.3 PECTINASAS.

Las pectinasas, enzimas que degradan pectinas de pared celular también son inducidas de la misma manera, así como otras enzimas pueden ser inducidas por distintas señales conforme la pared es progresivamente degradada. Al respecto, resulta de interés la observación de que durante este proceso, los fragmentos pécticos reliberados de las células del hospedero también podrían actuar como señales para la inducción de los mecanismos de defensa.

Actualmente se han clonado varios genes que codifican para la expresión de enzimas pécticas en *Erwinia chrysanthemi* como los genes *pel A*, *pel B*, *pel C*, *pel D* y *pel E*. Dentro de ellos el producto del gen E es mas efectivo en causar la pudrición suave del tejido de la planta del Crisantemo. Bacterias mutantes *pel A*<sup>-</sup> presentan virulencia muy reducida, lo que ocasiona un retardo en la aparición de los síntomas en el tejido infectado. Mutantes *pel D*<sup>-</sup>, *pel E*<sup>-</sup> y *pel D-E*<sup>-</sup> resultan avirulentas y solo causan ligera pudrición en las hojas de tabaco (Daniels *et al.*, 1988).

### 1.b.4 POLIGALACTURONIDASAS.

En la bacteria *Pseudomonas solanacearum* se ha caracterizado una endopoligalacturonasa (endoPG). El gen que codifica esta enzima (*pgl A*) ha sido clonado y las cepas con una mutación en este gen (*pgl A*<sup>-</sup>) si bien redujeron su virulencia en el fruto del tomate, se concluyó que este gen es importante pero no absolutamente necesario para la patogénesis.

### 1.b.5 CELULASAS.

Se han clonado varios genes que codifican para las enzimas endo- $\beta$ -1,4-glucanasas (celulasas) de varios géneros de bacterias fitopatógenas como *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Las Mutantes *egl*<sup>-</sup> de *Pseudomonas solanacearum* no se afectaron en su capacidad de producir polisacáridos extracelulares y en la actividad de poligalacturonidasa extracelular pero fueron significativamente menos virulentas cuando se ensayaron en jitomate comparadas con la cepa silvestre. Otros genes *egl* de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* también han sido clonados y las bacterias con genes *egl*<sup>-</sup> revelan un papel no muy significativo de endoglucanasas extracelulares en la patogenicidad, aunque el fenotipo *egl*<sup>-</sup> es ligeramente menos virulento que el de la cepa silvestre (Daniels *et al.*, 1988).

### 1.b.6 POLISACARIDOS EXTRACELULARES.

Los polisacáridos extracelulares (EPS) producidos por las bacterias fitopatógenas son parte importante de la patogenicidad. Existe considerable evidencia de la función de estos en la virulencia de *Erwinia stewartii* que causa el marchitamiento y el tizón de la hoja de la planta de maíz; en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (productora de la goma xantana) las mutantes que carecen de la producción de xantana son fácilmente aisladas por la alteración que sufren las colonias en medios que contienen azúcares. La inoculación de estas mutantes a plantas de la familia de las crucíferas requieren mayores cantidades de inóculo que las requeridas por la cepa silvestre para causar los síntomas de la enfermedad (Daniels *et al.*, 1988).

### 1.b.7 TOXINAS.

Cuatro toxinas bacterianas han sido las mas estudiadas desde el punto de vista genético molecular: coronatina, faseolotoxina, siringotoxina y tabtoxina. La coronatina es producida por varios patovares de *P. syringae* y algunos de los genes de esta toxina se encuentran contenidos en plásmidos. Las mutantes de *P. s.* pv. *tomato* inducidas con Tn5 que carecen de la toxina se reproducen en menor cantidad y producen lesiones necróticas mas pequeñas en hojas de jitomate infectadas que las bacterias de la cepa silvestre.

La faseolotoxina causa clorosis en plantas de frijol infectadas con *P. s. pv. phaseolicola*. Esta toxina es de tipo peptídica y su blanco es la ornitina carbamoiltransferasa (OCTasa). *P. s. pv. syringae* también produce toxinas de tipo peptídico entre las que se encuentran siringomicina y siringotoxina. Las cepas mutantes que no producen siringotoxina son severamente atenuadas en su virulencia y las mutantes de *P. s. pv. tabaci* que no producen tabtoxina pierden la capacidad de producir clorosis en las hojas de tabaco; aunque puedan multiplicarse en el tejido, su población nunca alcanza los niveles de la cepa silvestre (Daniels *et al.*, 1988).

#### 1.b.8 PATOGENICIDAD DE *Xanthomonas* .

Todos los xantomonadidos son bacilos (0.4-0.7 x 0.7-1.8  $\mu\text{m}$ ) gram-negativos, aeróbicos y con un flagelo polar. Producen colonias mucoides y convexas sobre placas de medio NGA o YDC agar (Fig. 4) y poseen pigmentos amarillos ligados a la membrana que son insolubles en agua (Schaad y Stall, 1988).

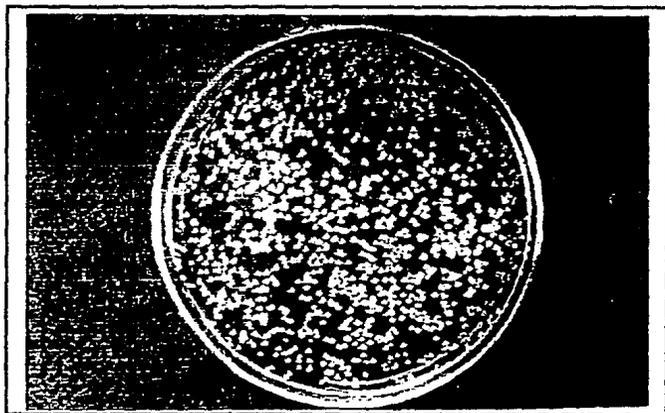


Fig. 4. Colonias de *Xanthomonas campestris* *pv. phaseoli* var. *fuscans* en placa de PYGA/Rifampicina .

Las cinco especies que componen al género *Xanthomonas* son fitopatógenas siendo la mas estudiada *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que produce la pudrición negra de las crucíferas. Estas especies infectan a las plantas penetrando a través de heridas o aberturas naturales como los hidátodos o los estomas de las hojas; invaden los espacios intercelulares y obstruyen los haces vasculares produciendo la necrosis típica de la pudrición en el tejido infectado. Cuando estas bacterias son inoculadas en una planta que no es un hospedero natural inducen rápidamente una respuesta de resistencia, en la cual únicamente las células del área afectada se colapsan y se desecan en un período de 24 hr.

**1.b.9 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (*Xanthomonas phaseoli fuscans* o *Xpf* en este texto).**

Esta bacteria produce la enfermedad conocida como "tizón fuscoso" en el frijol.

Los síntomas de la enfermedad al igual que en el "tizón común" se inician en el envés de la lámina foliar con la presencia de puntos acuosos de color verde claro ("deshidratación"), los cuales aumentan de tamaño de forma irregular. Conforme avanza la enfermedad el tejido se torna flácido y se rodea de un halo de color amarillo, el cual finaliza de color café necrótico.

Los síntomas de la enfermedad son típicos pero podrían confundirse con los síntomas causados por sequía, daño químico, tizón de halo, y otras enfermedades en la vaina y en la hoja. *Xpf* permanece en la semilla y la diseminación en el campo ocurre por medio de vectores activos y pasivos tales como los animales, la maquinaria, el agua de irrigación, el viento, el rastreo, y otras especies vegetales. El control del tizón común es logrado principalmente sembrando semilla certificada y de calidad fundación (Claflin *et al.*, 1987).

Este patovar produce un exopolisacárido que ha sido relacionado a la patogénesis y se ha sugerido que juega una función crítica en la producción de las lesiones y que la severidad de los síntomas depende de la cantidad del mismo. Este hecho apoya los datos reportados en donde las colonias que varían en la producción de polisacárido presentan distinto grado de virulencia, siendo mas virulentas las que los producen en mayor cantidad (Corey y Starr, 1957).

## I.C GENES DE VIRULENCIA (*hrp*) DE BACTERIAS FITOPATOGENAS.

Las interacciones planta-bacteria se pueden clasificar en dos categorías, compatibles e incompatibles. En las compatibles existe un crecimiento bacteriano intercelular y se desarrollan los síntomas de enfermedad en el hospedero; en las incompatibles no se observa ningún síntoma de la enfermedad.

Las poblaciones bacterianas en las interacciones compatibles aumentan dramáticamente dentro de las 48 h de incubación y el número celular final puede aumentar hasta 5 veces sobre los niveles de inóculo inicial. En las plantas que no son el hospedero natural (llamadas non-host en inglés), sucede que la interacción incompatible correlaciona frecuentemente con la inducción de la respuesta hipersensible (HR) cuando el número de bacterias introducidas al tejido es mayor que  $10^6$  u.f.c. (unidades formadoras de colonias) por mililitro. Debajo de estas cantidades no se logra ver una reacción macroscópica en la planta, normalmente vista en las interacciones incompatibles.

El nivel del crecimiento bacteriano en los espacios intercelulares del tejido foliar incompatible es limitado, encontrándose que las poblaciones finales permanecen entre 10 y 100 veces el inóculo inicial dentro de las primeras 48 h de incubación. Mientras que la introducción de bacterias no patógenas como *E. coli*, dentro del tejido no se multiplican en cualquier nivel de inóculo en las plantas y no se ve ninguna respuesta de hipersensibilidad.

Para el mejor entendimiento de los mecanismos biológicos que afectan a la interacción planta-patógeno, en muchos laboratorios se ha tomado como estrategia el análisis mutacional de las bacterias fitopatógenas.

Se han aislado mutantes que resultan en un solo evento mutacional afectadas tanto en la patogenicidad como en la inducción de HR. Los genes asociados a la virulencia de las bacterias que definen estas propiedades y cuya expresión es necesaria para inducir varios fenotipos de interacción planta-patógeno se han denominado *hrp*, de reacción hipersensible y de patogenicidad (hypersensitive reaction and pathogenicity) y se encuentran arreglados formando agrupaciones en el cromosoma de la bacteria como sucede en *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Hsiou-Cheng *et al.*, 1991) o bien en plásmidos como en *Pseudomonas solanacearum* (Arlat *et al.*, 1992).

Originalmente los genes *hrp* fueron descritos para *P.s. pv. phaseolicola*, el agente del tizón de halo en *Phaseolus vulgaris*. La inactivación de los genes *hrp* por inserción con transposon tiene efectos pleiotrópicos, es decir, se ve afectada en varios procesos: la bacteria mutante pierde la capacidad de inducir HR en plantas no hospederas como el tabaco, además de ser severamente atenuada en su capacidad para producir la enfermedad en su propio hospedero y se le daña en su capacidad para colonizar plantas (Willis *et al.*, 1991).

Desde su descubrimiento los genes *hrp* o mutaciones tipo *hrp* se han descrito en varios patovares de *Pseudomonas syringae* como *P.s. pv. tomato*, *P.s. pv. pisi* y *P.s. pv. tabaci*. También se han descrito en patovares de *P.s. pv. glycinea* y de *P.s. pv. syringae*.

Asimismo se han descrito en otras especies como *P. solanacearum*, *Xanthomonas campestris* (Osbourn *et al.*, 1990; Ingyu-Hwang *et al.*, 1992). *E. stewartii* (Coplín *et al.*, 1992) y *Erwinia amylovora* (Zhong-Min *et al.*, 1992).

## 1.D GENES DE AVIRULENCIA.

### 1.d.1 INTERACCION GENE-POR-GENE.

El fenotipo de la resistencia a la enfermedad en una interacción planta-bacteria es tipificada por la respuesta de defensa vegetal conocida como reacción hipérsensible (HR), esta reacción puede observarse como una necrosis rápida de las células del mesófilo de la hoja en el lugar de la invasión. Existe variación en la capacidad del patógeno para inducir esta respuesta en la planta dependiendo del tipo de variedad de que se trate; es decir, una cepa podría causar enfermedad (ser virulenta) en un cultivar pero podría inducir la respuesta hipérsensible de resistencia (ser avirulenta) en un cultivar distinto de la misma especie (Staskawicz *et al.*, 1987).

De esta manera, el término avirulento es usado para describir un patógeno virulento en potencia pero que es incapaz de inducir los síntomas de la enfermedad en todas las variedades de una especie y solo lo hace en variedades específicas. Por lo tanto, el fenotipo de avirulencia es una expresión condicional, ya que un patógeno que resulta avirulento en una variedad, puede ser virulento en otra (Napoli y Staskawicz, 1987).

Las variantes naturales de un patógeno que inducen HR o enfermedad en cultivares diferentes de una misma especie se agrupan en razas.

La existencia de cultivares de soya con respuesta diferencial a razas distintas de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* conforman un buen ejemplo de lo que se ha conocido como la hipótesis interacción gene-por-gene (gene-for-gene). Esta hipótesis propone que en una interacción gene por gene, la expresión de la resistencia a la enfermedad es específica y simultáneamente determinada por el genotipo del hospedero y por el genotipo del patógeno y que frecuentemente es controlada por un solo locus dominante en ambas partes. El locus dominante en la planta es referido generalmente como un gen de resistencia y el locus dominante en el patógeno ha sido denominado como un gen de avirulencia.

En términos generales se supone que el gen de avirulencia condiciona o controla la capacidad de una raza específica de un patógeno para inducir la respuesta de defensa HR solamente en cierta variedad vegetal, la cual contiene un gen de resistencia específico correspondiente. De otra manera, si una raza particular de un patógeno no contiene un gen de avirulencia específico o si el hospedero posee alelos recesivos en el locus de resistencia, esta no es inducida y por tanto el resultado es la enfermedad.

De este modo, las diferentes combinaciones de genes de avirulencia en el patógeno y de genes de resistencia por parte de la planta resultan en un patrón de especificidad raza-variedad que se ha observado para diferentes especies vegetales estudiadas.

Debido a que estos fenotipos son controlados por las partes que conforman la interacción, los términos de reacción incompatible o incompatibilidad (expresión de resistencia a la enfermedad) y de reacción compatible o compatibilidad (expresión de susceptibilidad a la enfermedad) se han introducido para describir la interacción que resulta cuando interactúan una planta y un patógeno (Staskawicz *et al.*, 1987).

La raza 6 de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (P.s.g.) el agente causal del tizón de la soya, posee un gene que controla la expresión de la virulencia del patógeno en cultivares de soya específicos. En la tabla IV se presenta la relación de compatibilidad (C)/incompatibilidad (I) entre tres razas de la bacteria y diferentes variedades de soya:

TABLA IV.

Tipo de reacción con las variedades de soya Harosoy Acme Peking Norchief Flambeau Centennial						
Razas de <i>p. s. g.</i>						
Raza 4	C	C	C	C	C	C
Raza 6	I	I	I	I	I	I
Raza 8	I	-	-	-	-	C

C = Compatibilidad.  
 I = Incompatibilidad  
 - = No ensayada.

#### 1.d.2 EL CONCEPTO UN GENE-POR-UN GENE COMO MODELO PARA PROGRAMAS DE FITOMEJORAMIENTO.

El enfoque un gene-por-un gene (GFG) en las interacciones planta-patógeno ha tenido una importante influencia como un modelo en el establecimiento de programas agrícolas. El concepto GFG se ha constituido en una herramienta útil en la biología evolutiva y en los esquemas de fitomejoramiento, pues sugiere vías muy específicas en las cuales interactúan un par de especies y es a su vez, el enfoque más simple de la genética de interacciones específicas. Sin embargo actualmente existe polémica debido al carácter poligénico de las interacciones GFG (Thompson y Burdon, 1992).

## II.- ANTECEDENTES .

### II.A INDUCCION DE LA EXPRESION DE FENILALANINA AMONIO LIASA (FAL) Y DEL METABOLISMO FENILPROPANOIDE EN FRIJOL.

Cuando se tuvo el conocimiento de que la acumulación de faseolina, una fitoalexina isoflavonoide era inducida en *Phaseolus vulgaris* por macromoléculas de inductor fúngico y también por moléculas de ARNasa autoclaveada, y de que esta acumulación era acompañada por aumentos notables en la actividad de FAL, Lamb y Dixon (1978) pensaron que esta actividad podría provenir de la síntesis *de novo* mediante la traducción de los ARNm que codifican para esta enzima. Para probarlo emplearon la técnica de marcaje de proteína por densidad con  $^2\text{H}$  de  $^2\text{H}_2\text{O}$  induciendo cultivos celulares en suspensión de *Phaseolus vulgaris* con ARNasa autoclaveada.

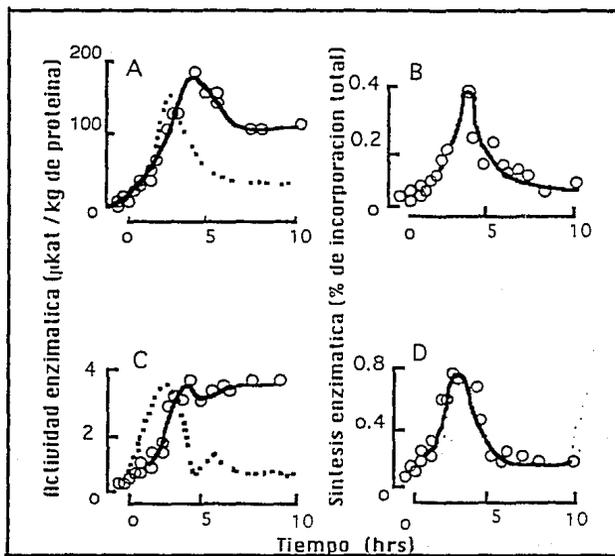
Encontraron que en todas las etapas la FAL extraída a partir de los cultivos celulares tratados con ARNasa era mas densa que la FAL obtenida de los cultivos control; por lo que concluyeron que el tratamiento con ARNasa conducía a un aumento en la velocidad de la síntesis *de novo* de FAL.

Aunque estos resultados eran evidentes, faltaba comprobar que la síntesis de fitoalexinas también era aumentada estimulando la transcripción de los genes que codificaban para esta enzima.

Lawton et al., (1983a) propusieron el marcaje de las enzimas con isótopos radiactivos seguido de inmunoprecipitación específica para estudiar los cambios en la velocidad de síntesis de FAL y de chalcona sintasa (CHS) *in vivo*. El estudio se centró principalmente en las etapas tempranas de la respuesta y en la coordinación de la síntesis de estas dos enzimas. (Las inmunoprecipitaciones se realizaron con antisueros para FAL y CHS de *Petroselinum hortense*, Perejil).

Sus experimentos fueron conducidos con cultivos celulares de *Phaseolus vulgaris* inducidos con ARNasa autoclaveada y con inductor obtenido de paredes celulares de *Colletotrichum lindemuthianum* liberado por calor (60  $\mu\text{g}$  de equivalentes de glucosa/ml).

Después de que los cultivos eran tratados con inductor se registraban aumentos rápidos aunque transitorios en la velocidad de síntesis de las subunidades de FAL y de CHS concomitantes con la fase de aumento en las actividades enzimáticas respectivas (Fig. 5).



(Lawton, M. 1983.EJB. 129: 593-601)

Fig. 5. Comparación de la cinética de inducción de la actividad de la fenilalanina amonio liasa (A), síntesis de la fenilalanina amonio liasa (B), actividad de chalcona sintasa (C) y síntesis de chalcona sintasa (D) por inductor liberado de las paredes celulares de *C. lindemuthianum*. Las líneas punteadas en los paneles A y C denotan cambios respectivos en la síntesis enzimática.

Las máximas tasas de actividad de síntesis eran encontradas alrededor de las 3 h después del tratamiento; subsecuentemente las velocidades de síntesis decaían rápidamente a niveles cercanos a los del control. La máxima inducción de la síntesis de FAL se lograba con 20  $\mu\text{g/ml}$  de inductor. Una respuesta similar era obtenida para la síntesis de CHS, aunque la máxima inducción de la síntesis de CHS se observaba únicamente a concentraciones muy altas de inductor.

Concluyeron que la síntesis *de novo* de estas enzimas reflejaba aumentos transitorios en las actividades de los ARNm que las codifican.

Una vez que se comprobaron los cambios inducidos por inductor en las tasas de síntesis de las proteínas FAL y CHS por inmunoprecipitación directa con ( $^{35}\text{S}$ )-Metionina, se utilizó un sistema de traducción *in vitro* para examinar los cambios en las actividades de los ARNm que subyacen a la síntesis de estas enzimas (Lawton *et al.*, 1983 b).

Se encontró que la actividad del ARNm polisómico aumenta rápidamente alrededor de los 30' después del tratamiento con inductor. Presentándose las actividades máximas entre las 3 y las 4 h, que correlacionaban con la fase de rápido aumento en la actividad enzimática. Los aumentos en las actividades de los ARNm polisómicos que codifican para FAL y CHS eran acompañados por aumentos en las actividades de los ARNm para estas dos enzimas en relación al ARNm celular total.

Para descartar si los cambios en la actividad del ARNm traducible reflejaba aumentos en los niveles de ARNm o en la activación de formas inactivas preexistentes, es decir, un aumento selectivo de las actividades de ARNMs ya presentes en las pozas de ARNm celular total, (Ryder *et al.*, 1984) construyeron una librería de ADNc complementaria a ARNm poli(A) presente en células de *Phaseolus vulgaris* tratadas con inductor; de esta librería se identificaron clonas con secuencias que codificaban para la CHS. Estas secuencias de ADNc se usaron para medir por hibridización Northern la cinética de la inducción del ARNm de CHS.

Se detectaron aumentos rápidos y marcados, pero transitorios en el ARNm de CHS a través de hibridización tipo Northern con las secuencias de la sonda de CHS. La inducción del ARNm de CHS sostuvo la tasa de síntesis de la enzima en toda la fase de aumento rápido en su actividad y, por lo tanto, se consideró a la transcripción como un evento temprano en la expresión de la respuesta de defensa. Las máximas inducciones de estos mensajeros se obtuvieron entre las 3 y las 4 h después de la inducción.

Mientras que toda la investigación previamente citada fue realizada usando cultivos celulares, en los cuales se obtenían respuestas muy tempranas, los resultados de la infección directa del patógeno *in planta* presentaron tiempos diferentes :

En los hipocotilos de la variedad Kievitsboon koekoek infectados con, esporas de hongos de la raza incompatible  $\beta$  de *Colletotrichum lindemuthianum* la actividad de los ARNm se presentó aproximadamente después de las 40 hrs con actividades máximas alrededor de las 80 hr. El establecimiento de la síntesis de fitoalexinas se observó aproximadamente a las 72 hr. Por el contrario, cuando se infectaron con esporas de la raza y compatible, las actividades de los ARNm se detectaron alrededor de las 120 hr con el establecimiento de la acumulación de fitoalexinas por las 130 hrs después de la infección (Fig 6).

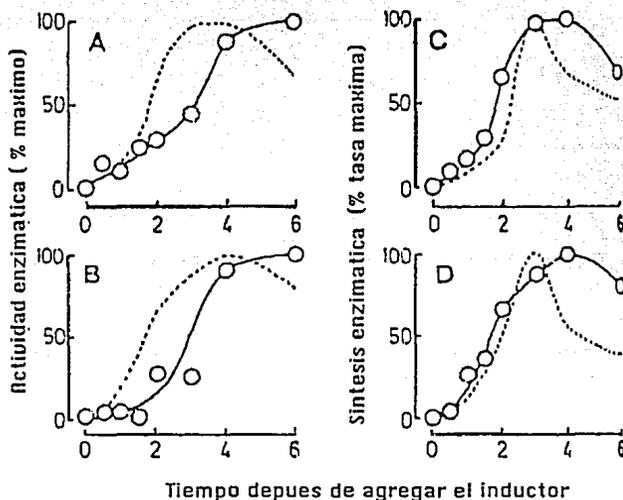


Fig. 6. Cambios temporales en los niveles de actividad de fenilalanina amonio liasa (A) y de chalcona sintasa (B), y las actividades de ARNm polisómico que codifica para FAL (C) y CHS (D) en respuesta al inductor liberado de las paredes celulares del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*. Las líneas punteadas en (A) y en (B) denotan los cambios en la actividad del ARNm y en (C) y (D) en la tasa de síntesis enzimática in vivo expresada sobre una base similar.

(Lawton y Dixon. 1983. EJB. 130:134-139)

Durante la interacción  $\beta$  incompatible se observó un aumento en la síntesis de ARNm localizado en el sitio inicial de la infección previo al establecimiento de la acumulación de fitoalexinas; por el contrario, en la interacción  $\gamma$  compatible no hubo inducción de la síntesis en las primeras etapas de la infección, sino que existió una respuesta bastante retrasada en tiempo, asociada con el intento de limitación de la lesión.

Los aumentos altamente coordinados en la síntesis de FAL y CHS ya habían sugerido que un mecanismo similar de inducción podría operar para las dos enzimas. Sin embargo hasta entonces solamente se habían podido seguir los mensajeros de CHS por hibridización Southern.

Posteriormente, la inducción del ARNm de FAL pudo ser seguida en células de frijol tratadas con inductor con una sonda de ADNc construida específicamente para FAL (Edwards *et al.*, 1985).

Los aumentos en el ARNm de FAL se observaron desde los 30' después de la inducción del cultivo y la acumulación máxima ocurrió entre las 3 y las 4 h posteriores al tratamiento. El ARNm decayó rápidamente a niveles relativamente bajos y no fue acumulado en las células control. Se comprobó también que existiera correlación estrecha entre los cambios en ARNm hibridizable, la actividad de ARNm traducible y la síntesis de FAL *in vivo*. Las máximas actividades de FAL se obtuvieron después de las 24 h.

Resumiendo; con el uso de secuencias de ADNc específicas en experimentos de hibridación tipo Northern para medir cantidades de ARNm de las enzimas de síntesis de fitoalexinas en extractos de tejidos de frijol infectados o incitados, se ha demostrado una correspondencia estrecha entre el tiempo de inducción de la síntesis de enzimas *in vivo*, el nivel de ARNm traducibles y la cantidad de ARNm hibridizables.

Además los cambios en las cantidades de ARNm que codifican para estas enzimas son debidos a aumentos transitorios en las velocidades de transcripción de los genes correspondientes (Cramer *et al.*, 1985b), lo cual sugiere que la activación de la expresión de los genes es un control de la respuesta de defensa.

Por otra parte, las formas múltiples de las enzimas (FAL, CHS, 4CL) y la degradación parcial controlada de las subunidades de FAL (Bolwell *et al.*, 1986) proporcionan mecanismos postranscripcionales y postraduccionales que intervienen en el control diferencial de las vías biosintéticas regulando la distribución de los productos del metabolismo general fenilpropanoide en diferentes vías específicas.

## 11.B EXPRESION DE ISOFORMAS DE FAL Y SU RELACION CON LA RESPUESTA A LA INFECCION.

(Bolwell *et al.*, 1985) encontraron que la FAL presenta 4 isoformas en cultivos celulares tratados con inductor y que son inducidas diferencialmente. Las cuatro isoformas presentan un peso molecular idéntico pero diferentes valores de  $pI$  para cada una: 5.4, 5.2, 5.05 y 4.85. Las formas individuales despliegan cinéticas Michalis-Menten con valores de  $K_m$  de 0.077 mM, 0.0122 mM, 0.256 mM y 0.302 mM.

Los pesos moleculares de las subunidades se registraron entre 77 000 Da y 70 000 Da. El tratamiento de los cultivos celulares con inductor y el cromatofoco indicaron que el aumento en la actividad extraíble (mas de 10 veces en 8.0 h) estuvo asociada con la aparición diferencial de las formas de alto punto isoeléctrico y bajas  $K_m$ . Esta inducción diferencial fue confirmada por inmunoblots de extractos crudos después de electrofoque.

La relación exacta entre las 4 formas de FAL nativa y las múltiples subunidades no es clara; FAL es tetramérica y se asume que sus cuatro subunidades son idénticas, ya que son del mismo peso, aunque se ha pensado en la posibilidad de que cada isoforma de FAL conste de subunidades mezcladas. Las 11 formas de subunidades de FAL que se han detectado podrían reflejar la elaboración de alguna modificación postraducciona además de la formación de múltiples tipos de productos primarios de traducción.

En resumen, se puede decir que la forma predominante en cultivos sin tratar tiene una  $K_m$  alta, mientras que el tratamiento con inductor fúngico produce formas de  $K_m$  mas baja.

En el caso de la variedad Inmuna la subunidad de 77 000 esta asociada a las formas enzimáticas con  $PI$  de 5.5 y 5.05, mientras que las subunidades de 70 y 53 000 se asocian principalmente a las formas de 5.2 y 4.85.

## 11.C EXPRESION DE LOS GENES DE FAL EN LOS TEJIDOS DE LA PLANTA.

Además de las diferencias en su respuesta a distintos estímulos ambientales los genes de FAL también difieren en su distribución en distintos tejidos durante el desarrollo de la planta (Bevan *et al.*, 1989).

Para el estudio de la regulación transcripcional de los genes de FAL *in vivo* en plantas maduras de tabaco y papa Bevan *et al.*, (1989) construyeron un gen quimérico para usarlo como reportero, fusionando el promotor de FAL2, un miembro de la familia de los tres diferentes genes que codifican para FAL en frijol, con el gen GUS. Se condujeron experimentos de daño mecánico en tejido de tubérculo de papa de plantas transformadas con FAL2-GUS.

En los tubérculos de papa dañados mecánicamente, la actividad FAL-GUS fué observada alrededor del sitio dañado en las células del peridermo formado después de la lesión.

La regulación diferencial de los genes de FAL durante el desarrollo de la planta y por diferentes factores ambientales fue estudiada por (Liang *et al.*, 1989). Los experimentos realizados consistieron en la protección al ataque de ARNasa por sondas específicas para cada uno de los genes de FAL.

Los tres genes fueron inducidos por daño mecánico en hipocotilos, pero la infección fúngica solo activó a FAL1 y FAL2 y no a FAL3.

## 11.D ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FITOALEXINAS.

A pesar de que el mecanismo por el cual las fitoalexinas detienen el crecimiento de las células no es actualmente bien entendido, existen evidencias que sugieren que alteran las membranas plasmáticas y que inhiben la fosforilación oxidativa.

El ensayo de toxicidad de una fitoalexina puede ser complicado debido a la capacidad que tienen los organismos de metabolizarlas y por tanto de detoxificar las fitoalexinas. Además muchas fitoalexinas parecen ser agentes estáticos mas que tóxicos. La gliceolina, fitoalexina de la planta de soya, detiene el crecimiento celular del hongo patógeno *Phytophthora megasperma* var. *sojae* al parecer sin matar a las células. Además también detiene el crecimiento de bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas glycinea*, *Rhizobium trifolii* y de *Rhizobium japonicum*. Se requiere de aproximadamente 25 µg/ml de gliceolina para inhibir el 50% y de 100 µg/ml para inhibir el 100 % del crecimiento de estos organismos (Albersheim y Valent, 1978).

Se han empleado diferentes tipos de bioensayos para determinar los efectos de isoflavonoides. Estos han incluido estudios sobre la germinación de esporas fúngicas, crecimiento de los tubos germinales, acumulación de peso seco en medios de cultivo líquidos y de crecimiento micelial en superficies de agar en el caso de los hongos.

La actividad antibacteriana de los isoflavonoides ha sido evaluada de diversas maneras: dispersando las fitoalexinas en el agar previo al estrío del inóculo, aplicando la fitoalexina en solvente orgánico a agar sembrado con bacterias o impregnando discos para ensayo de antibióticos con fitoalexina antes de colocarlos sobre cajas de agar plaqueadas con las bacterias. Así también se han realizado introduciendo fitoalexinas a medios líquidos y monitoreando el crecimiento bacteriano por densidad óptica (Smith y Banks, 1986a).

Sin embargo la experiencia ha mostrado que algunas condiciones especiales llegan a requerirse para tener éxito en los bioensayos, ya que la composición y el pH de los medios o la etapa de crecimiento o desarrollo del organismo a ensayar podrían tener notables efectos sobre el grado de inhibición observada. Por ejemplo, la toxicidad de la kievitona es reducida en condiciones alcalinas y, mientras la medicarpina tiene efectos inhibitorios sobre la germinación de esporas fúngicas no inhibe el crecimiento del micelio. En otros casos los medios para bioensayos han tenido que complementarse en algunos casos con componentes de tejidos vegetales relevantes (Smith y Banks, 1986a).

También deben probarse distintos métodos ya que a veces los resultados dependen de una elección adecuada de éste. Por ejemplo, la aplicación en discos de la fitoalexina cumestrol a placas de agar sembradas con *Pseudomonas* spp. no mostró ninguna evidencia de inhibición, sin embargo cuando el bioensayo se realizó en medio líquido el crecimiento bacteriano se detuvo durante 36 a 48 hr.

Otra consideración pertinente acerca de la eficiencia de los isoflavonoides es el uso frecuente de organismos patógenos de plantas en los bioensayos, los cuales poseen mecanismos de tolerancia hacia las fitoalexinas. Por tanto, puede ser que la toxicidad de los extractos flavonoides no sea detectada o subestimada.

Aunque existe menos conocimiento acerca de la destoxificación de las fitoalexinas por las bacterias, es sabida la capacidad de estas para destoxificarlas pues sin llegar a disminuir el número de bacterias viables presentes en un cultivo, reasumen las tasas de crecimiento normal (Darvill y Albersheim, 1984) después de ser expuestas a concentraciones de fitoalexinas capaces de inhibir totalmente el crecimiento de las bacterias (Weinstein *et al.*, 1981).

Los géneros de bacterias Gram-negativas (que incluyen a todas las especies fitopatógenas) son frecuentemente menos sensibles a los antibióticos que los géneros de Gram-positivas y esta generalización también parece extenderse a las fitoalexinas flavonoides e isoflavonoides: kievitona, faseolina y 7-hidroxi-flavano inhibieron el crecimiento de 6 especies Gram-positivas a una concentración que resultó inocua para el mismo número de aislados Gram-negativos.

Otra generalidad obtenida de los bioensayos es que las fitoalexinas isoflavonoides no parecen ser especialmente tóxicas y presentan dosis efectivas entre 10 y 100  $\mu\text{M}$  (Smith y Banks, 1986a). En otros reportes se menciona que las fitoalexinas no son antibióticos muy efectivos ya que podrían requerirse concentraciones milimolares para inhibir a los microbios y que sobre una base molar muchos pesticidas comerciales son antibióticos mas efectivos que las fitoalexinas (Darvill y Albersheim, 1984). Sin embargo estos datos se deben tomar con precaución ya que cuando se tiene el interés de evaluar la relevancia de las fitoalexinas en la resistencia natural no hay que perder de vista que las concentraciones efectivas relacionadas a una situación de enfermedad pueden ser diferentes a las condiciones *in vitro* y el diseño de los bioensayos siempre debería tomar esto en cuenta.

En resumen, debido a que diversas variables podrían afectar las estimaciones de la actividad de las fitoalexinas *in vitro*, un bioensayo debería representar un sistema modelo que proporcione información en ciertas condiciones específicas, por lo que idealmente las fitoalexinas deberían ser bioensayadas en diferentes sistemas y contra distintos organismos antes de hacer conclusiones finales acerca de su naturaleza inhibitoria (Smith y Banks, 1986a).

Además de que pueden ser compuestos tóxicos para hongos, bacterias, nemátodos, insectos y para virus, las fitoalexinas también afectan la respiración y el crecimiento de cultivos de células y de tejidos vegetales, inhiben la germinación y retardan el crecimiento de la raíz (Smith y Banks, 1986b).

En este sentido se ha observado que el crecimiento de cultivos de suspensión celular de frijol tratados con faseolina, llegan a ser inhibidos al inicio del tratamiento aunque eventualmente logran un crecimiento sustancial. Estos resultados a su vez, permiten pensar en la posibilidad de que existan células que escapen a los efectos fitotóxicos o bien que logren la conversión metabólica de las fitoalexinas a compuestos no tóxicos, aunque también podrían existir otras explicaciones.

Sin embargo, el hecho de que el crecimiento de células o tejidos vegetales sea inhibido *in vitro* por aplicaciones externas de fitoalexinas, hace posible especular que las fitoalexinas provocan una muerte celular localizada en los sitios de infección y que esta limitación de la lesión a una región determinada en el tejido invadido podría ser parte de una "estrategia" de la planta para detener el avance del patógeno e imposibilitarlo para invadir el tejido sano (Bell, 1981; Smith y Banks, 1986a y b).

Si bien esto podría suceder, también habría que tomar en cuenta que la aplicación exógena de isoflavonoides a tejidos vegetales que sintetizan fitoalexinas no necesariamente refleja de manera precisa los eventos que ocurren naturalmente.

Por último, cabría señalar que el rango de organismos a los cuales pueden afectar y los diversos cambios fisiológicos y citológicos que provocan, sugieren que poseen un efecto tóxico celular no específico al cual existe una sensibilidad o tolerancia diferencial de las diversas cepas de fitopatógenos.

### III.- JUSTIFICACION.

Si bien la mayoría de las investigaciones acerca de la expresión de la vía fenilpropanoide en las respuestas de defensa a patógenos publicadas con frijol se han realizado con cultivos celulares incitados por inductores o con filtrados de cultivos celulares del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, estas investigaciones arrojan resultados diversos cuyo análisis debe tomar en cuenta los siguientes puntos :

- 1) La inducción obtenida es diferente si se realiza con fragmentos de pared celular de peso molecular alto o pequeño.
- 2) El tipo de fitoalexinas inducidas depende de la variedad de frijol usada.
- 3) En este tipo de experimentos el daño mecánico a las células no existe y,
- 4) Diferentes tipos de inductor expresan genes distintos de FAL .

Por otra parte, las bacterias como causantes de enfermedades han sido relativamente menos estudiadas que otros grupos de patógenos y a pesar de que constituyen un problema en los cultivos de países tropicales como el nuestro, debido a sus altos requerimientos de humedad y de temperatura, su investigación se encuentra muy poco desarrollada.

El metabolismo fenilpropanoide y su función en los mecanismos de defensa contra los patógenos del cultivo de frijol han sido estudiados principalmente con el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* que produce la antracnosis, y no existe mucha información respecto a su interacción con sistemas bacterianos.

Además, si bien es cierto que el uso de los cultivos celulares ha resultado en un sistema excelente para el estudio molecular y bioquímico de respuestas metabólicas rápidas a estímulos ambientales en los vegetales, en pocos trabajos se ha empleado tejido inducido *in vivo* como es el caso del uso de hipocotilos de frijol aislados, y aunque los niveles de expresión de los genes de FAL también se han investigado en hipocotilos inducidos por infección fúngica, aún en estos casos el desarrollo de la enfermedad no ha procedido *in planta*.

Debido a que existen pocos trabajos (Lyon y Wood, 1975; Gnanamanickam y Patil, 1977 Roebuck *et al.*, 1978 ) que se hayan enfocado a reproducir la interacción frijol-bacteria *in planta*, a que no existe un estudio reproducible de la interacción con *Xanthomonas phaseoli fuscans* que implique a la vez el conocimiento de la vía fenilpropanoide y a que no hay mucha información de la expresión de FAL en hoja afectada por patógenos, se planteó realizar el estudio de este sistema.

Finalmente, debido además a que los cultivos celulares no exhiben la respuesta específica de variedad raza característica de la interacción de una especie vegetal hospedera con un patógeno, también se propuso comparar la respuesta *in situ* de plantas de variedades resistentes con plantas de variedades susceptibles a la enfermedad.

## IV.- OBJETIVOS .

### IV.A OBJETIVO GENERAL.

En la presente investigación se planteó conocer las características bioquímicas del metabolismo fenilpropanoide en la planta del frijol durante la interacción con la bacteria *Xanthomonas phaseoli fuscans* (*Xpf*).

### IV.B OBJETIVOS PARTICULARES.

-Medir la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (FAL) que es la enzima clave del metabolismo fenilpropanoide y que es conocida como una de las enzimas inducidas *de novo* en la planta de frijol durante la interacción con patógenos.

-También se propuso determinar si esta actividad podría asociarse con las características de resistencia o de susceptibilidad de las plantas de frijol a la infección con la bacteria, y finalmente,

-Aislar y caracterizar alguna fitoalexina que se acumulara durante el proceso de infección, determinando su relación con las características de resistencia o de susceptibilidad de las plantas de frijol.

### U.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .

- 1) Identificar diversas variedades de frijol tanto resistentes como susceptibles a la infección por *Xpf*.
- 2) Estudiar las actividades enzimáticas del metabolismo fenilpropanoide en las diferentes variedades de frijol durante el proceso de infección.
- 3) Por técnicas cromatográficas identificar los principales compuestos flavonoides acumulados durante el proceso de infección.

## UI.- MATERIALES Y METODOS .

### UI.A VARIETADES DE FRIJOL Y CEPA BACTERIANA UTILIZADA.

Las variedades de frijol usadas fueron "Alubia chico", "Bayocel", "Cacahuete-72" y "Negro Puebla", obtenidas del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Edo. de México.

Se usó una cepa de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (*Xanthomonas phaseoli fuscans*, Xpf ).

### UI.B GERMINACION Y CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS.

Semillas de estas variedades fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial al 10% durante 10' y enjuagadas inmediatamente con 4 lavados sucesivos de agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas se colocaron en charolas entre 2 capas de papel absorbente estéril y se les permitió germinar en condiciones de oscuridad a 25 °C.

Una vez germinadas las semillas, de tres a cuatro plantas fueron crecidas en macetas en el invernadero. Las plantas se regaron con agua corriente y cada tercer día con solución nutritiva.

### UI.C INOCULACION DE LAS PLANTAS.

Las plantas de dos a tres semanas de edad de las cuatro variedades fueron inoculadas por infiltración con una jeringa en el mesófilo de la primera hoja trifoliada con una suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente  $10^8$  cel/ml. Las hojas de las cuatro variedades fueron inoculadas simultáneamente con la misma cantidad de inóculo para minimizar las diferencias en la cantidad inoculada así como en las condiciones de ambientales para la inoculación. Las bacterias inoculadas fueron cultivadas en medio PYG (ver apéndice) durante toda la noche. Mitades de hoja que fueron inoculadas únicamente con agua destilada estéril sirvieron como control.

Los sitios de la hoja inoculados se colectaron con un horador de tapones del número 5 (6 mm de diámetro) a diferentes intervalos de tiempo (2, 24, 28, 72 hrs) después de la infección. Este material fue utilizado en los siguientes experimentos (cuando el tejido no fue usado inmediatamente se conservó en congelación a -70 °C).

## VI.D CRECIMIENTO DE LA POBLACION BACTERIANA DENTRO DEL TEJIDO.

Seis círculos de tejido infectado cortados con el horador se tomaron al azar de hojas de diferentes plantas en los tiempos indicados previamente después de la infección con la bacteria; los círculos se homogenizaron inmediatamente en un mortero con 10 ml de agua destilada estéril y después de una serie de diluciones, 0.1 ml de la dilución final se platearon en cajas Petri con medio de cultivo PYG- agar conteniendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de rifampicina para el conteo de colonias viables. Las cajas se incubaron a 29 °C y el número de colonias por placa se determinó a los 3 días de incubación.

## VI.E EXTRACCION ENZIMATICA Y ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE FAL.

La actividad enzimática de FAL se ensayó a partir del extracto crudo de tejido (Zucker, 1965; Rahe *et al.*, 1970; Lamb, Merrit y Butt, 1979). Se homogenizaron 0.500 g de tejido inoculado y tejido control (sin inocular), directamente en un mortero en 4.0 ml de amortiguador de boratos 0.1 M (Koukol y Conn, 1961; King, 1971) con un pH de 8.8, 2.0 mM de mercaptoetanol, 5 mM de ácido ascórbico y 0.1 g de PVPP (polivinilpolipirrolidona insoluble). El homogenizado se pasó por una gasa doble y se centrifugó a 14 000 rpm durante media hora. El sobrenadante se recuperó (aprox. 2.0 ml) en un tubo de diálisis y fue dializado durante 3.0 h contra un volumen de 1.0 litro del mismo amortiguador de extracción a la mitad de su fuerza iónica. El volumen del dializado fue recuperado y se utilizó como preparación enzimática en la mezcla de reacción.

El ensayo de la actividad de FAL se realizó por un método espectrofotométrico (Zucker, 1965; Erez, 1973), el cual se basa en la detección del ácido trans-cinámico (Rahe *et al.*, 1970; Zucker 1965) que es el producto de la reacción de esta enzima.

La mezcla de reacción contuvo 0.5 ml del extracto crudo dializado, 300  $\mu\text{M}$  de buffer de boratos pH 8.8, 30  $\mu\text{M}$  de fenilalanina y agua para completar a 3.0 ml. Mezclas de reacción similar pero con la preparación enzimática hervida durante 10 minutos o bien sin el sustrato de la enzima fueron utilizadas como control.

La cinética de la actividad de FAL fue seguida en un espectrofotómetro Beckman DU-65 a 40 °C durante 2.0 h. La detección espectrofotométrica a 302 nm del ácido cinámico (Fig. 7) producido en la reacción fue utilizada como indicador de la actividad de FAL.

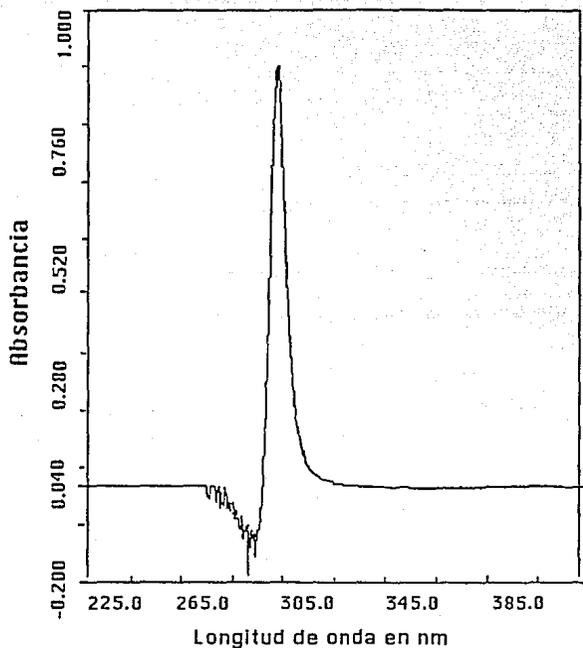


Fig. 7. Espectro de Absorbancia de una solución 100 nM de ácido trans-cinámico en amortiguador de boratos 0.1 M pH 8.0 para determinar su  $\lambda$  nm óptima.

## VI.F EXTRACCION DE FLAVONOIDES.

Con el fin de optimizar los procedimientos de separación de mezclas complejas de metabolitos secundarios solubles se han evaluado una gran variedad de solventes y de protocolos de extracción.

La extracción en metanol o etanol acuosos, o bien la extracción secuencial en hexano, acetona, metanol y agua da resultados efectivos. Sin embargo, la extracción en alcoholes acuosos es sencilla y da rendimientos excelentes de la mayoría de los metabolitos con un rango de polaridades bastante completo.

Con la extracción de 0.1 g de tejido de soya inoculado con *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (P.m.g. ) fresco o congelado en 400 µl de etanol 80 % se obtuvieron rendimientos cercanos al 100 % de los metabolitos individuales. Una vez extraídas las muestras son muy estables a cualquier cambio si se conservan congeladas en contenedores sellados bajo atmósfera de nitrógeno o con un mínimo espacio de aire. La variabilidad encontrada entre inyecciones de el mismo extracto así como la variabilidad debida al procedimiento de extracción con etanol fueron muy pequeñas (Graham, 1991a).

Para la extracción de fitoalexinas se siguió el método usado por Graham (1991a y b) : 0.1 g de tejido de hoja de las variedades "Alubia", "Bayocel", "Cacahuate" y "Negro Puebla" inoculado con bacterias y de tejido control (únicamente inoculado con agua) colectados a distintos intervalos de tiempo (0.0 a 72.0 h) después de la inoculación, fueron homogenizados en frío con 400 µl de metanol 80 % grado CLAR en un homogenizador "Polytron" a 500 rpm aproximadamente.

El homogenizado fue recuperado en tubos Eppendorf y centrifugado en una microfuga a 4000 rpm durante 5' para eliminar restos del tejido. El sobrenadante se pasó por filtros "Gingivax Millipore" de 0.22 µm de tamaño de poro antes de inyectarlo a la columna.

Siempre que fue necesario los extractos se conservaron en congelación a -70 °C.

## VI.6 ANALISIS DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

El nivel de cualquier metabolito puede ser medido por medio de cualquier procedimiento cromatográfico de fracciones o de purificaciones parciales de extractos de las sustancias de interés.

Un método para cuantificar metabolitos de manera directa en mezclas complejas es el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para la cual se han desarrollado procedimientos que facilitan obtener los perfiles de un amplio rango de metabolitos aromáticos secundarios en extractos sin fraccionar a partir de cantidades de tejido muy pequeñas.

Concentraciones tan bajas como 100 femtomolas de un metabolito dado pueden ser detectadas partiendo de extractos de 1 mg de peso húmedo de tejido. Lo sencillo de esta técnica permite procesar grandes números de muestras y su efectividad ha sido comprobada en muchos sistemas vegetales y microbianos.

Cuando este método se usa con muestras de tejido tomadas a diferentes tiempos después de aplicado algún estímulo se puede obtener un panorama que represente una dinámica espacio temporal de las vías metabólicas implicadas en ciertas poblaciones celulares (Graham and Graham, 1991).

La CLAR se ha aplicado con buenos resultados en el análisis de flavonoides inducidos en soya por *P.m.g.* Ha permitido obtener información acerca de la función biológica de derivados flavonoides que participan en eventos espaciales discretos, temporales y de desarrollo. Así, con el uso de perfiles de flavonoides se puede determinar la respuesta diferencial de los distintos tejidos infectados y de diversas variedades en la resistencia específica.

Aunque los metabolitos secundarios aromáticos son diversos en polaridad pueden ubicarse dentro de un rango de pesos moleculares. Como son predominantemente no iónicos el uso de cromatografía en columnas de fase orgánica combinado con una buena técnica de elución y un buen protocolo de extracción resultan en el método de elección que permite cubrir con gradientes convenientes un amplio espectro de polaridades y una resolución razonable y reproducible de los compuestos individuales (Graham, 1991a y b).

En este trabajo se utilizó un sistema CLAR "LKB" en fase reversa que consistió de una columna "Bondapak C-18" y de elución isocrática (un solo solvente) en combinación con un gradiente de elución lineal.

La cromatografía se realizó bajo el siguiente esquema que de acuerdo a Castele (1982), que empleó condiciones experimentales casi idénticas a las usadas en este trabajo para separar flavonoides, los tiempos de retención de estos ( $t_R$ ) se localizan entre 10.05 y 27.39 min:

Se utilizaron dos solventes: A, ácido fórmico-agua (5:95 v/v); B, methanol absoluto. El perfil de elución fue: 0-4 min, 7-0 % B en A (isocrática); 4-16 min, 7-15 % (gradiente lineal); 16-24 min 15-75 % B en A (gradiente lineal); 25-27 min B en A 75-80 % (gradiente lineal); 27-30 min B en A 80 % (isocrática). La temperatura fue establecida a temperatura ambiente y la velocidad de flujo se estableció en 1.0 ml/min. (Todos los solventes usados fueron grado CLAR).

El detector UV (ultravioleta) fue establecido en 280 nm.

#### VI.1.1 ANALISIS DE LA ACTIUIDAD BIOLOGICA DE EXTRACTOS DE FLAVONOIDES.

Extractos etanólicos puros de las cuatro variedades que fueron obtenidos de las hojas de plantas no tratadas y de hojas de plantas inoculadas fueron bioensayados a los mismos intervalos de tiempo después de la infección que las muestras tomadas para el análisis de flavonoides.

Se homogenizó 1.0 gr de tejido en etanol al 80 % y después de centrifugación los sobrenadantes se usaron para realizar los bioensayos en cultivos bacterianos de la manera siguiente:

Tubos de ensayo 12 mm de diámetro x 144 mm de L fueron llenados con 2.5 ml de medio de cultivo PY (ver apéndice) líquido e inoculados con 0.2 ml de un cultivo bacteriano fresco crecido durante toda la noche con una concentración de  $A_{620 \text{ nm}} = 0.05$ . Estos tubos con cultivo fueron bioensayados con un máximo de 25  $\mu\text{l}$  de los extractos etanólicos puros de tejido infectado muestreado a los intervalos de tiempo mencionados antes.

El crecimiento bacteriano fue seguido midiendo las unidades de absorbancia del cultivo a 580 nm.

Tubos similares sin extracto y tubos con 25  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto sirvieron como controles.

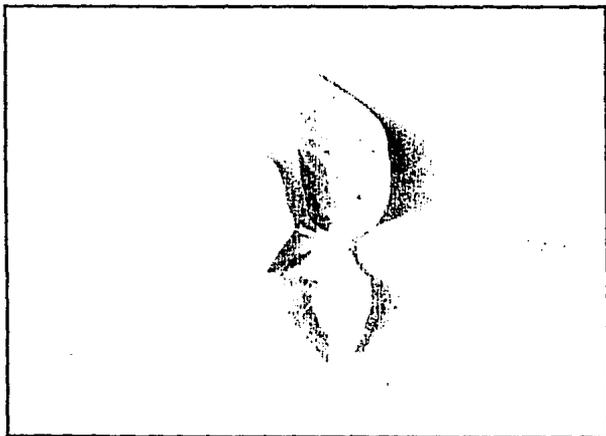
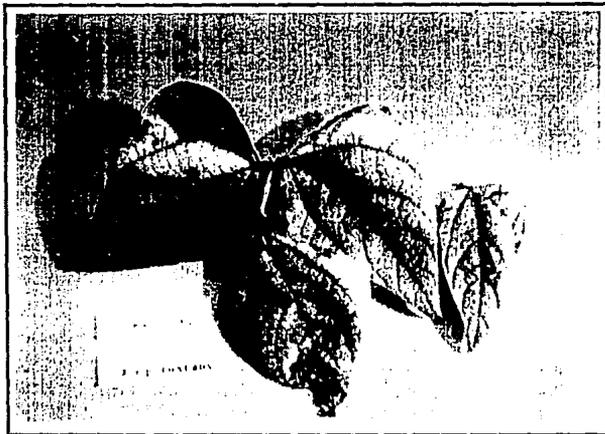
### VII.- RESULTADOS.

Después de haber ensayado múltiples condiciones y métodos de inoculación en diversas variedades, se caracterizaron dos respuestas a la infección en las cuatro variedades ensayadas. Las variedades "Negro Puebla" y "Cacahuate" fueron caracterizadas como variedades resistentes mientras que, "Alubia" y "Bayocel" como variedades susceptibles.

Las variedades fueron clasificadas de esta manera de acuerdo a la evaluación visual del sitio infectado, tanto en el tiempo de aparición de la respuesta, como en el tipo de daño causado (Fig 8).

El seguimiento del crecimiento bacteriano dentro del tejido de la hoja cuantificado a diferentes días después de la infección también se utilizó como un criterio determinante para dicha clasificación.

En los cultivares resistentes el crecimiento bacteriano es menor que en las variedades susceptibles, las cuales muestran un crecimiento sostenido durante 6 a 8 días después de la inoculación (Figs. 9 y 10).



**FIG. B.A.** Expresion de los sintomas de ifeccion presentes en la hoja de frijol similar al proceso de infeccion que se presenta naturalmente (arriba) y las respuestas opuestas que presentan una variedad resistente (izquierda) y una susceptible (derecha) a la misma cepa de *Xanthomonas phaseoli fuscans*.

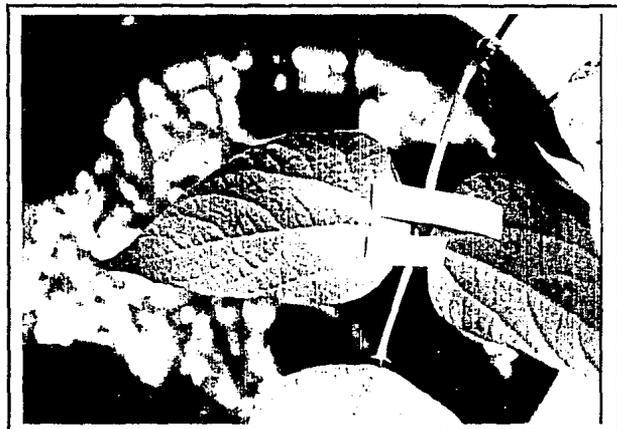
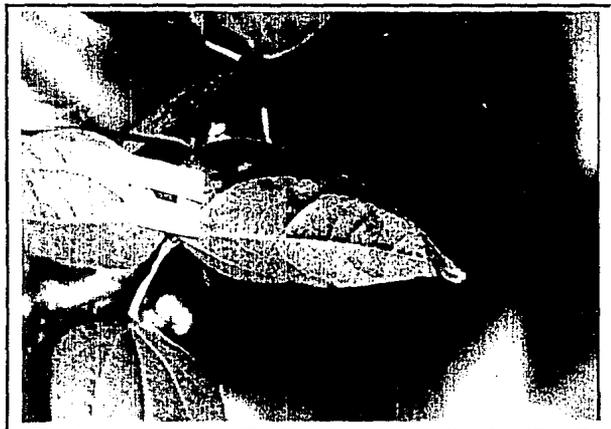
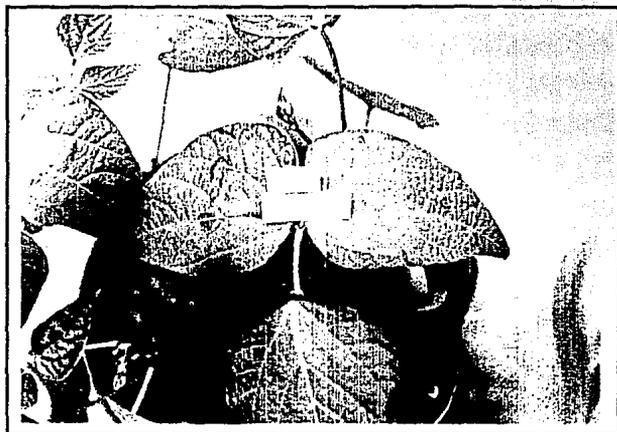


FIG. 8.A.1. Curso temporal de los síntomas de infección en los sitios inoculados con *X. phaseoli fuscans* de las variedades Negro Puebla y Cacahuete.

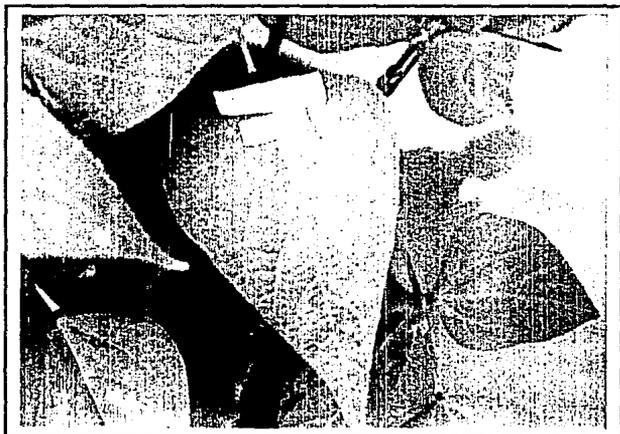
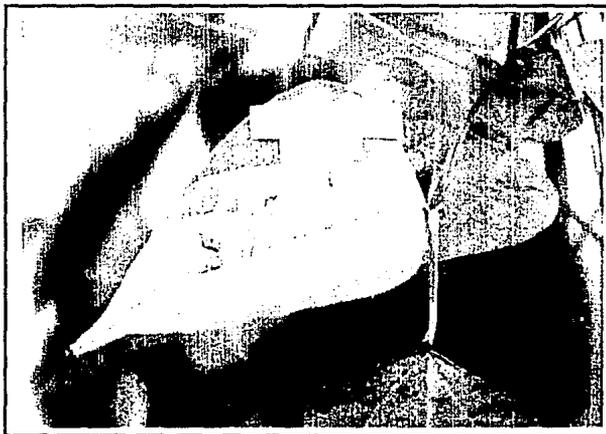
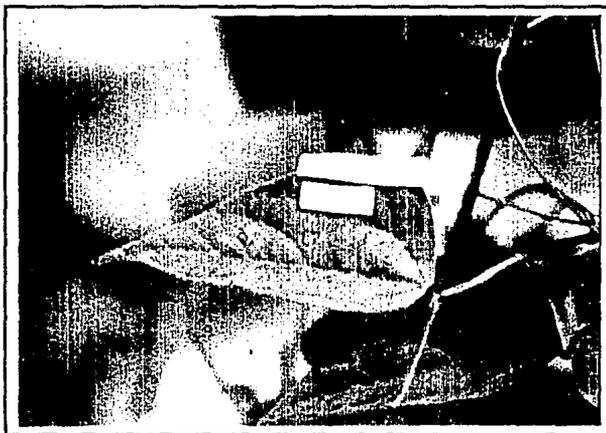


FIG. 8.A.2. Curso temporal de los síntomas de infección en los sitios inoculados con *x. phaseoli fuscans* de las variedades Negro Puebla y Cacahuate.

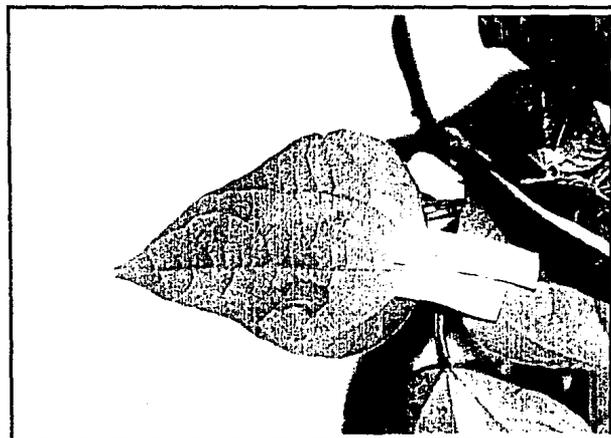
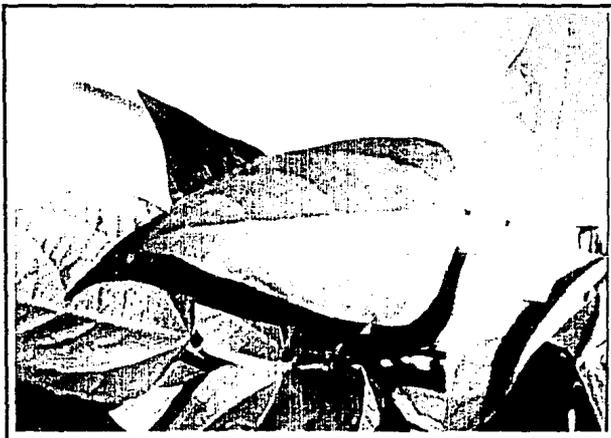
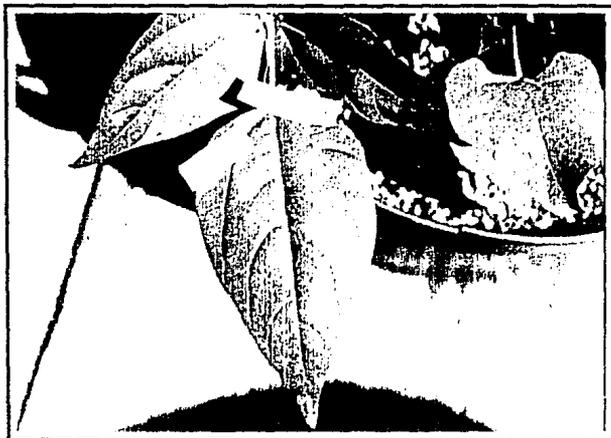


FIG. 8.A.3. Curso temporal de los síntomas de infección en los sitios inoculados con *X. phaseoli fuscans* de las variedades Bayocel y Alubia.

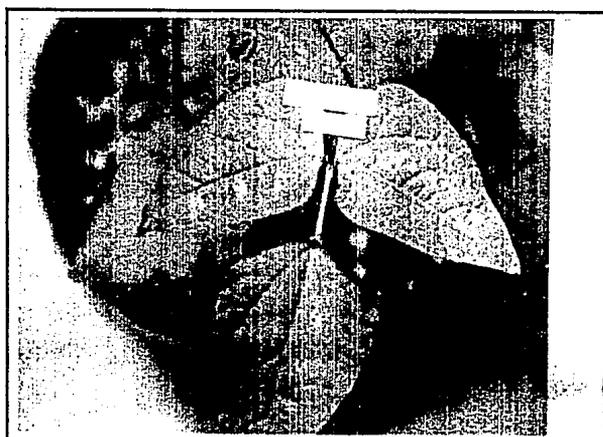
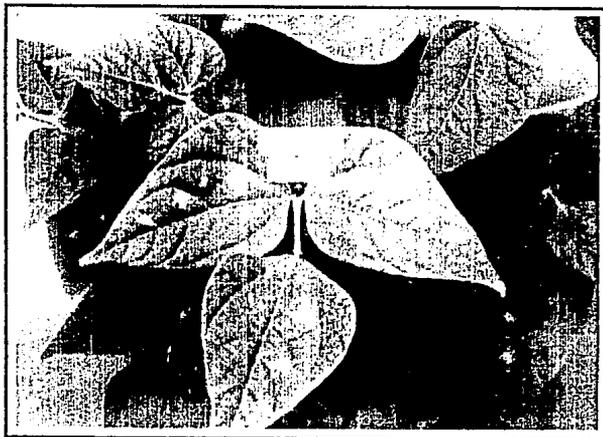
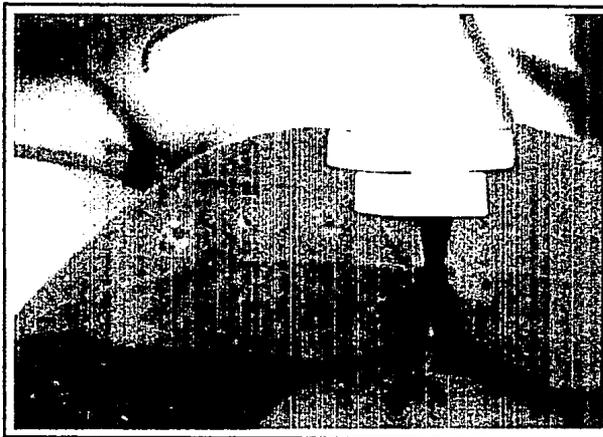
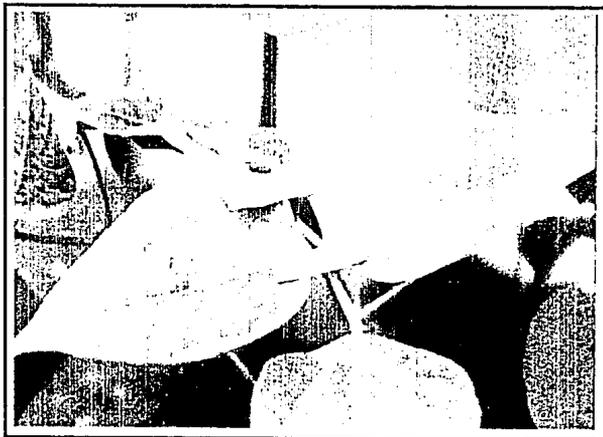
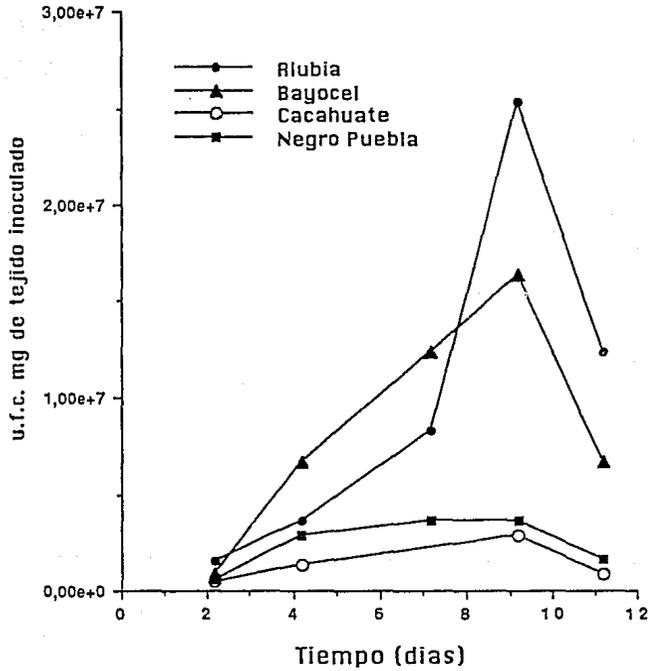


FIG. 8.A.4. Curso temporal de los síntomas de infección en los sitios inoculados con *X. phaseoli fuscans* de las variedades Bayocel y Alubia.

Fig.9. Crecimiento de *Xanthomonas phaseoli* fuscans en el sitio de inoculación



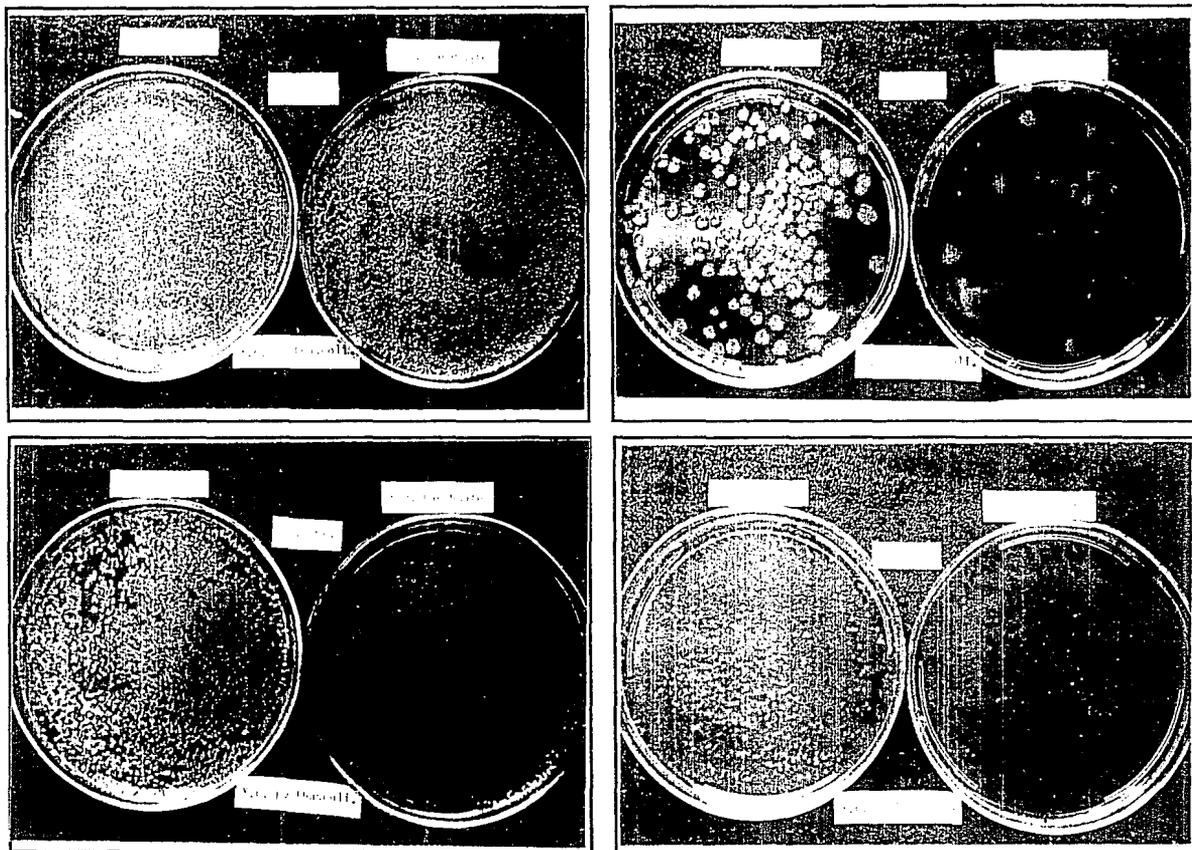


FIG. 10.A.1. Comparacion del crecimiento bacteriano en el tejido de hoja inoculado con *X.phaseoli fuscans* entre las variedades Bayocel y Cacahuete.

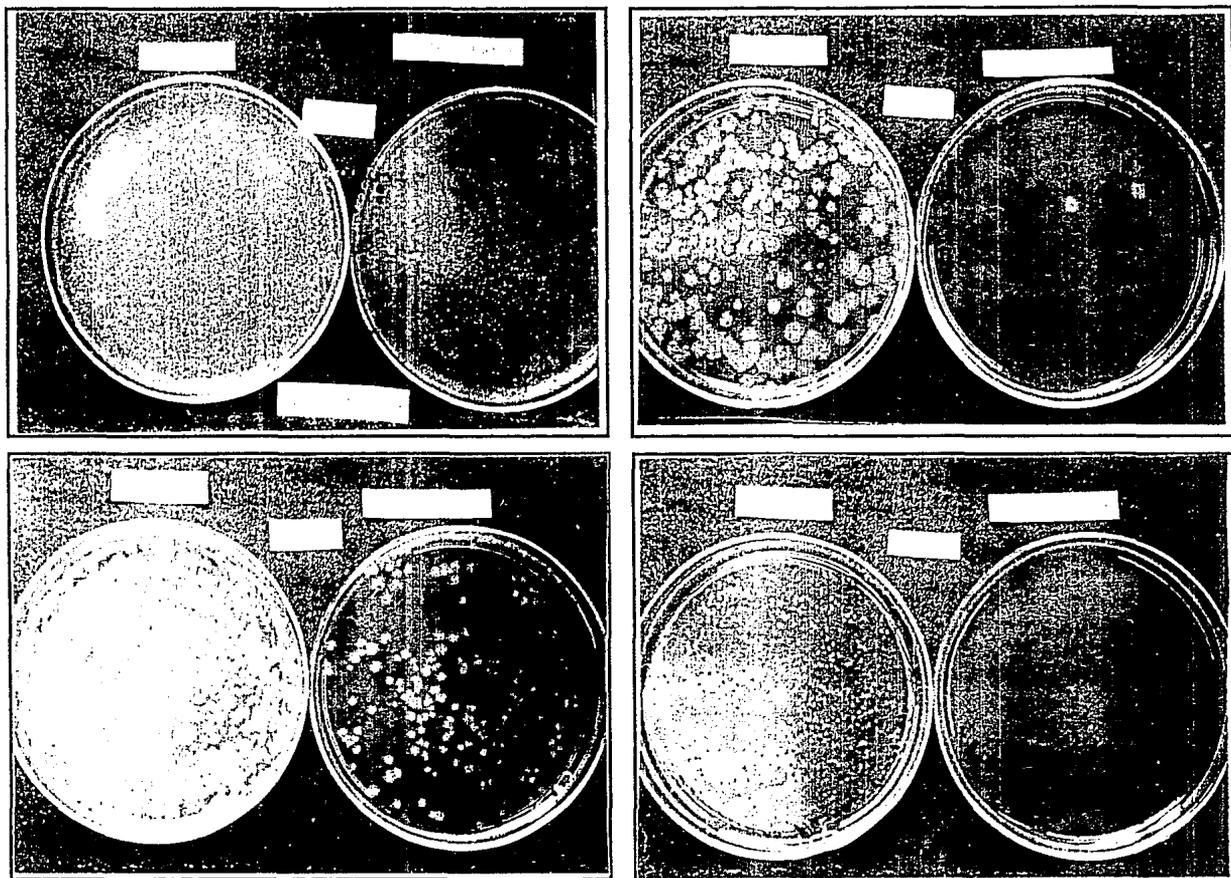


FIG. 10.A.2. Comparacion del crecimiento bacteriano en el tejido de hoja inoculado con *X.phaseoli fuscans* entré las variedades Negro Puebla y Alubia.

Por otra parte, la actividad de la enzima Fenilalanina amonio liasa es inducida en la variedad "Negro Puebla", registrándose actividad extraíble de la enzima en las horas subsecuentes a la infección, así como el aumento gradual de la misma durante los primeros días, obteniéndose su actividad máxima a las 48.0 h (Fig 11).

En la variedad "Cacahuete" no hay aumento en la actividad extraíble de la enzima en las horas siguientes a la infección, pero sí se detecta a las 24 y 48 h, al igual que en la variedad resistente (Fig 12).

En la variedad susceptible "Alubia" no hay actividad enzimática registrable en las primeras horas posteriores a la infección y solo existe una pequeña actividad hacia las 72 h después de infectado el tejido (Fig 13); lo mismo sucede con la variedad susceptible "Bayocel" (Fig. 14).

En la Fig. 15 se comparan las actividades específicas de FAL de las cuatro variedades. En esta figura se puede apreciar claramente la actividad específica en dos grupos asociados a la resistencia y la susceptibilidad a la infección con *Xpf*.

Fig. 11. ACTIVIDAD DE FENILALANINA AMONIO LIASA EN HOJAS DE LA var. Negro Puebla DESPUES DE LA INOCULACION CON *X. phaseoli fuscans*.

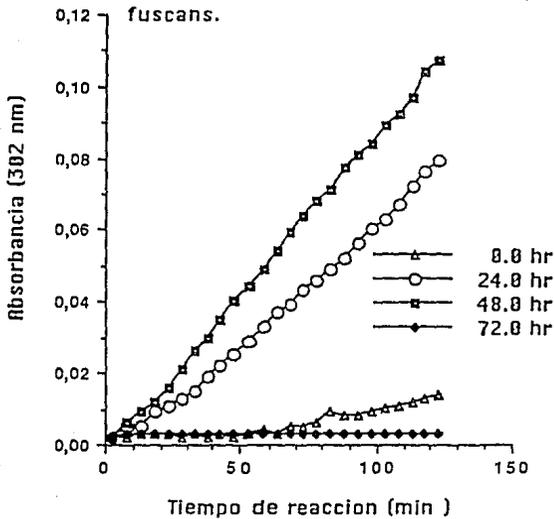


Fig. 12. ACTIVIDAD DE FENILALANINA AMONIO LIASA EN HOJAS DE LA var. Cacahuete DESPUES DE LA INFECCION CON *X. phaseoli fuscans*.

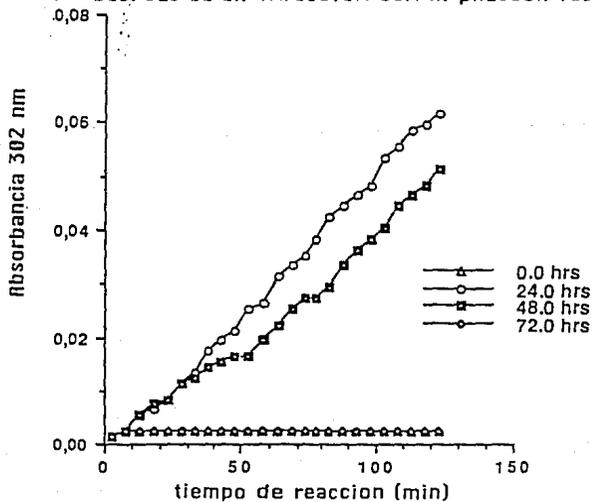


FIG. 13. ACTIVIDAD DE FENILALANINA AMONIO LIASA EN HOJAS DE LA var. Alubia DESPUES DE LA INFECCION CON *X. phaseoli fuscans*.

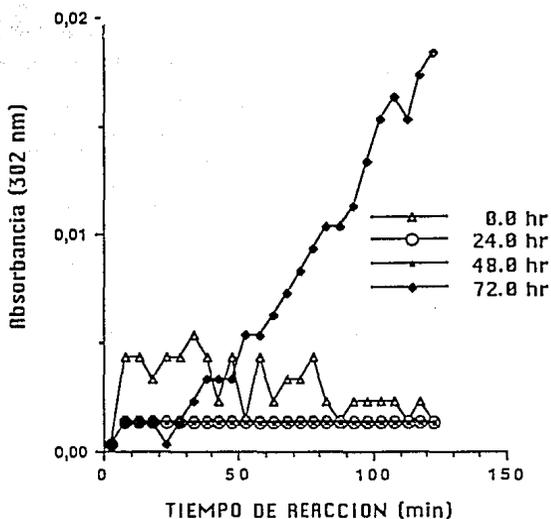
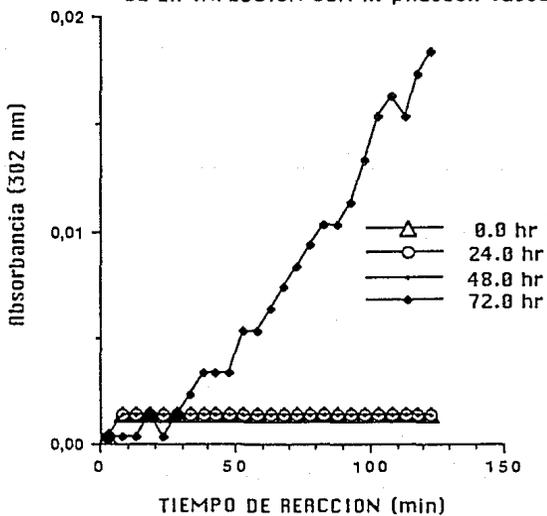


Fig. 14. ACTIVIDAD DE FENILALANINA AMONIO LIASA EN HOJAS DE LA var. Bayocel DESPUES DE LA INFECCION CON *X. phaseoli fuscans*.



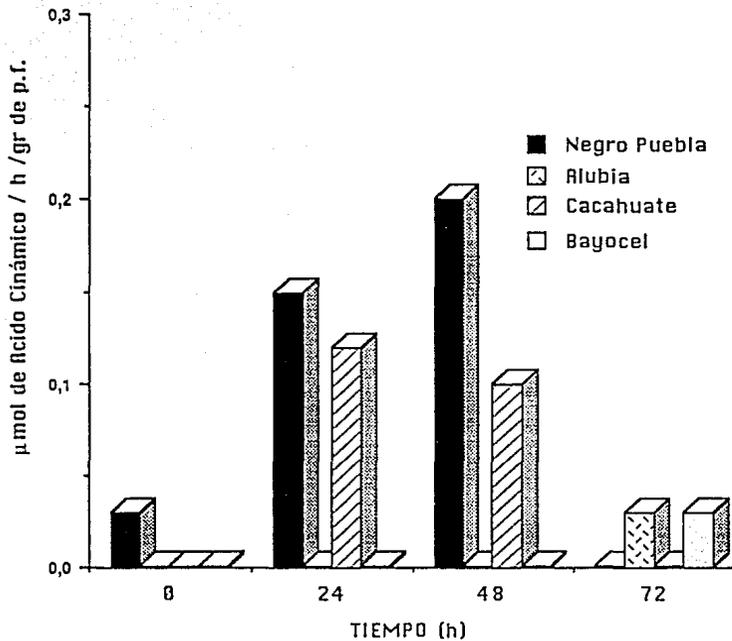
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE FENILALANINA  
AMONIO LIASA

Fig. 15. Comparación de las Actividades específicas de FAL de extractos de tejido inoculado de las cuatro variedades a distintos tiempos después de la infección.

Se observa que aunque en la variedad "Cacahuete" también se presenta actividad en los primeros dos días después de la infección, la actividad específica de FAL presentada por esta variedad es menor que la encontrada en la variedad "Negro Puebla".

Estos resultados pueden explicar las diferencias existentes entre el comportamiento de los cultivares, ya que ellos correlacionan bien con los resultados de la evaluación visual de los síntomas y del crecimiento de la población en el tejido infectado.

En cuanto a la detección de compuestos de tipo flavonoide se realizaron análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de extractos de tejido infectado de las cuatro variedades de frijol, encontrándose algunos picos interesantes que correlacionan con las características de resistencia o de susceptibilidad ya mencionadas.

Se presenta el patrón cromatográfico de extractos de flavonoides de los cuatro cultivares. Estos tienen casi los mismos patrones cromatográficos. Los compuestos se encuentran presentes en la planta antes de ser infectada, sin embargo los patrones varían después de la inoculación y sobretodo en las plantas susceptibles esto es muy notorio. (Figs. 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Para poder analizar más fácilmente los patrones cromatográficos, se seleccionaron los picos A, B, C, D, E y F señalados en las figuras anteriores y se compararon sus niveles de acuerdo al área integrada debajo de los mismos. En las gráficas de columnas de las siguientes figuras se presenta el área de cada pico de las diferentes variedades contra el tiempo de inoculación desde 0.0 hr (muestra tomada 2.0 hr después de la inoculación) hasta las 72.0 hr. Las muestras de tejido control inoculadas con agua fueron colectadas hasta el tiempo indicado en cada figura.

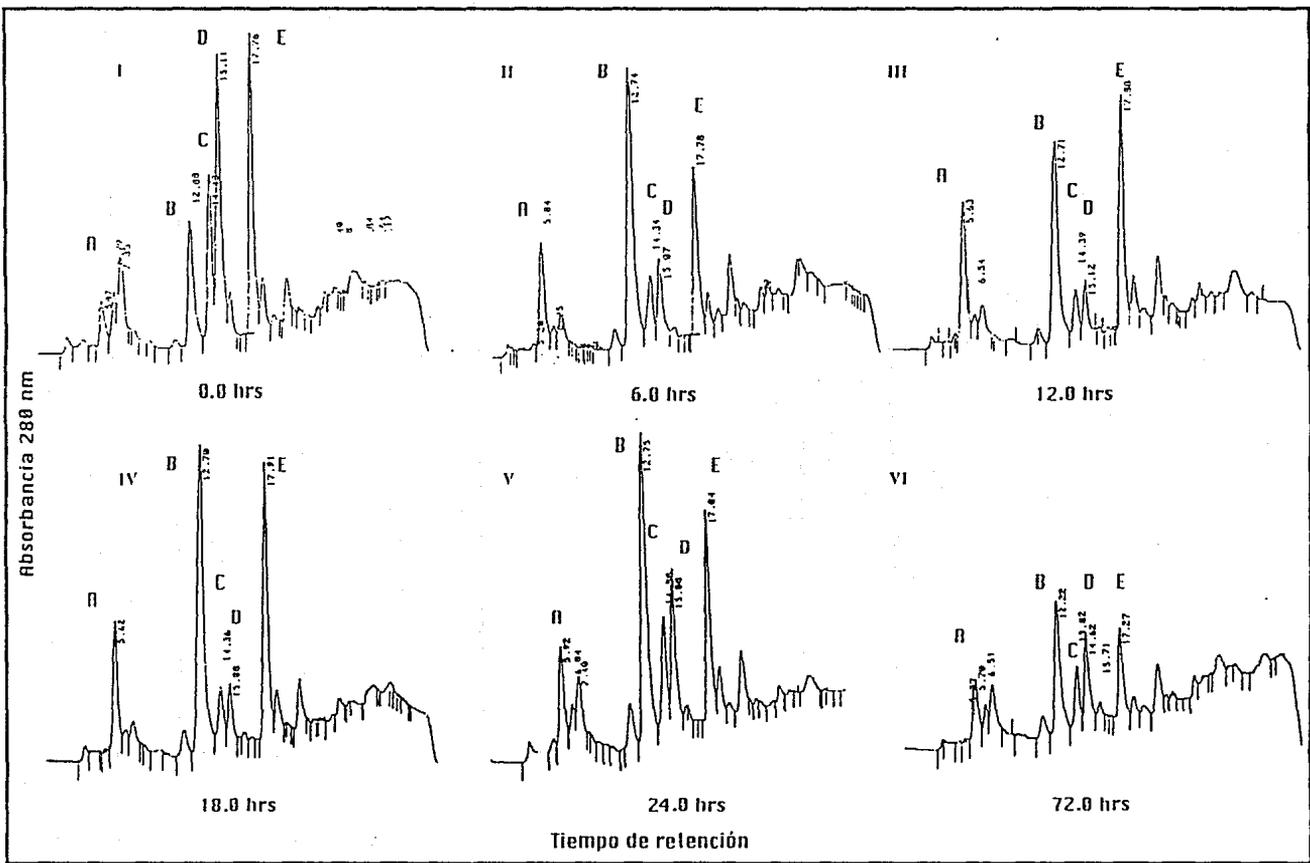


Fig. 16. Cromatogramas de extractos de flavonoides de la variedad NEGRO PUEBLA a diferentes tiempos después de la inoculación con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II, III, IV, V y VI.

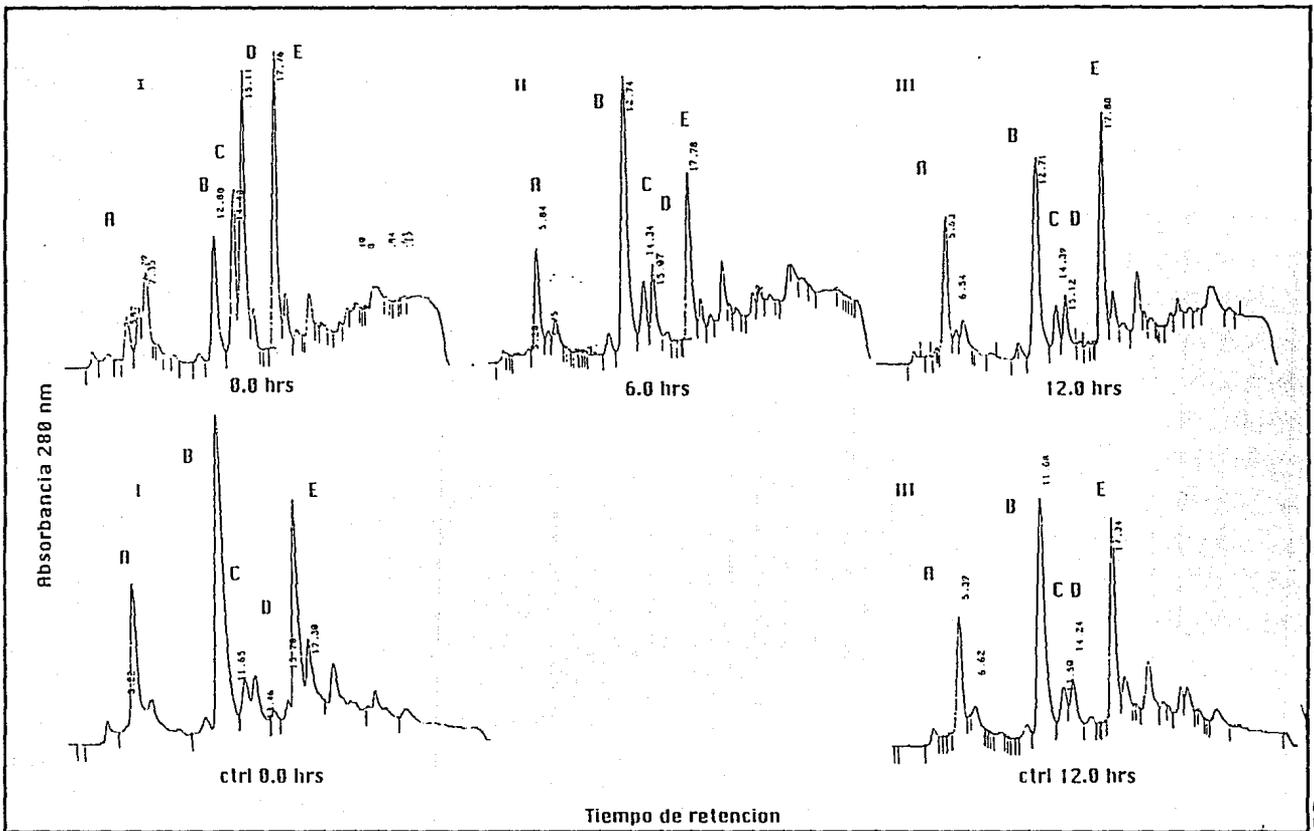


Fig.17. Cromatogramas de extractos de flavonoides de la variedad NEGRO PUEBLA obtenidos a diferentes tiempos despues de la inoculacion con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II y III comparados con los controles inoculados con agua destilada esteril .

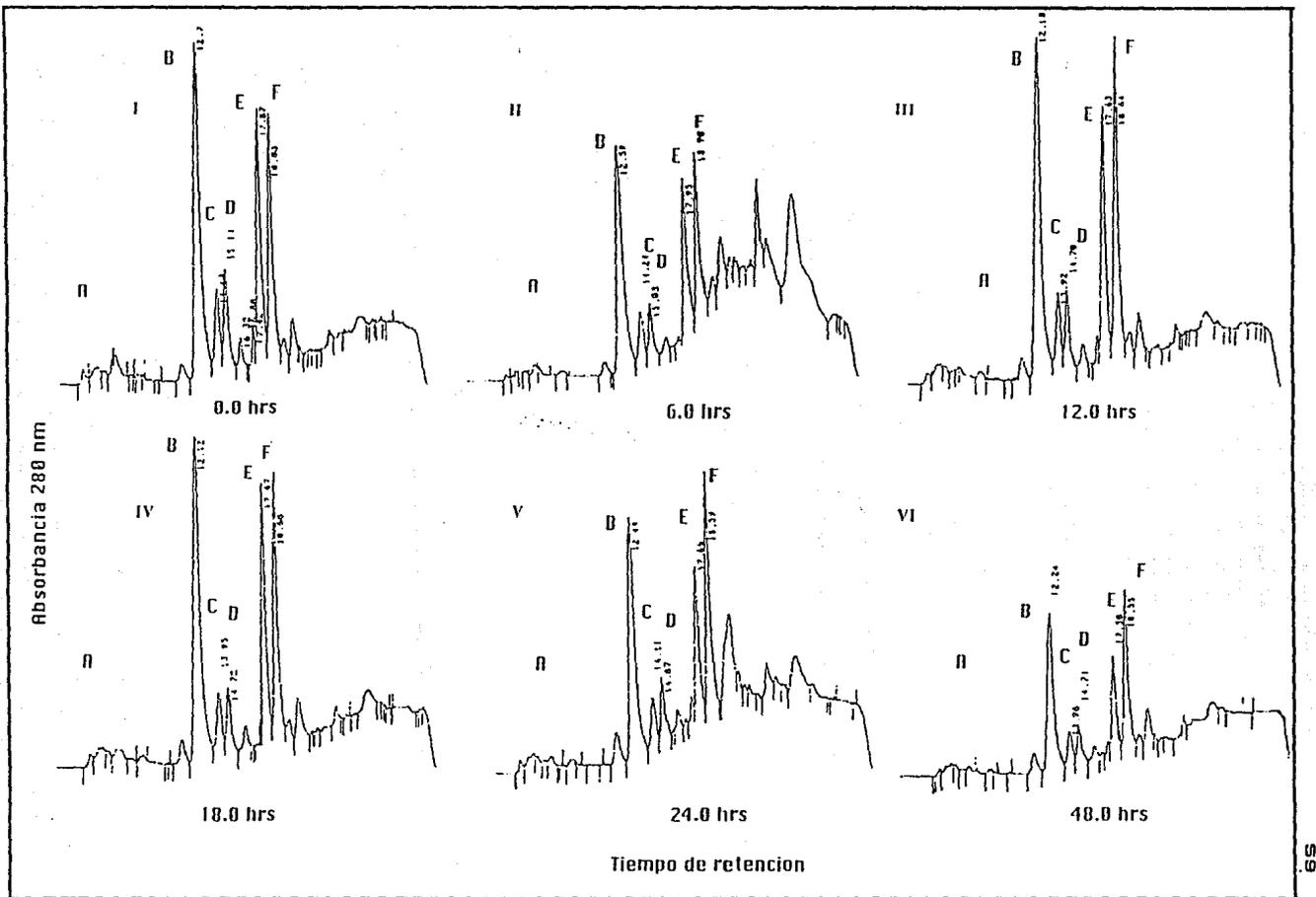


Fig. 18. Cromatogramas de extractos de flavonoides de la variedad CACAHUITE obtenidos a diferentes tiempos despues de la inoculacion con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II, III IV, V y VI.

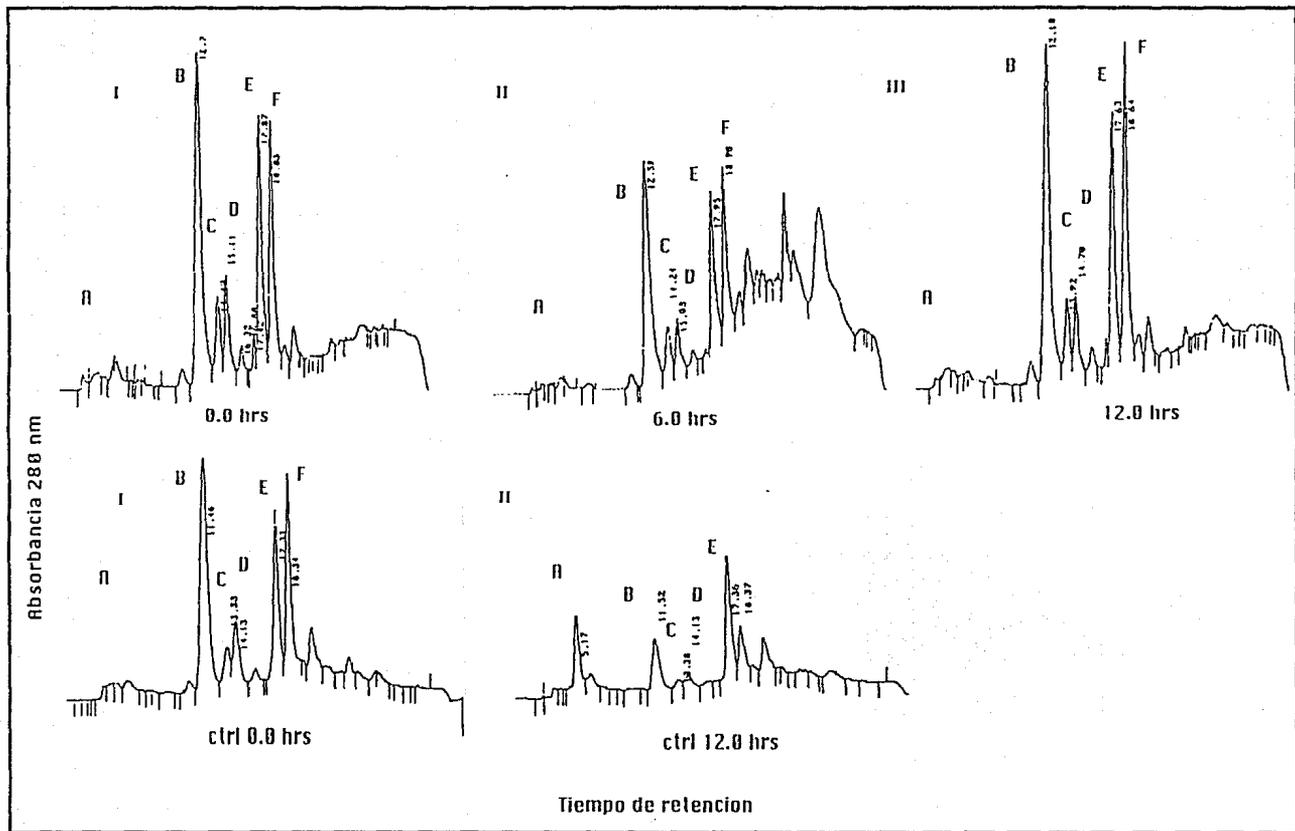


Fig.19. C romatogramas de extractos de flavonoides de la variedad CACHIHUATE obtenidos a diferentes tiempos despues de la inoculacion con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II y III comparados con los controles inoculados con agua destilada esteril.

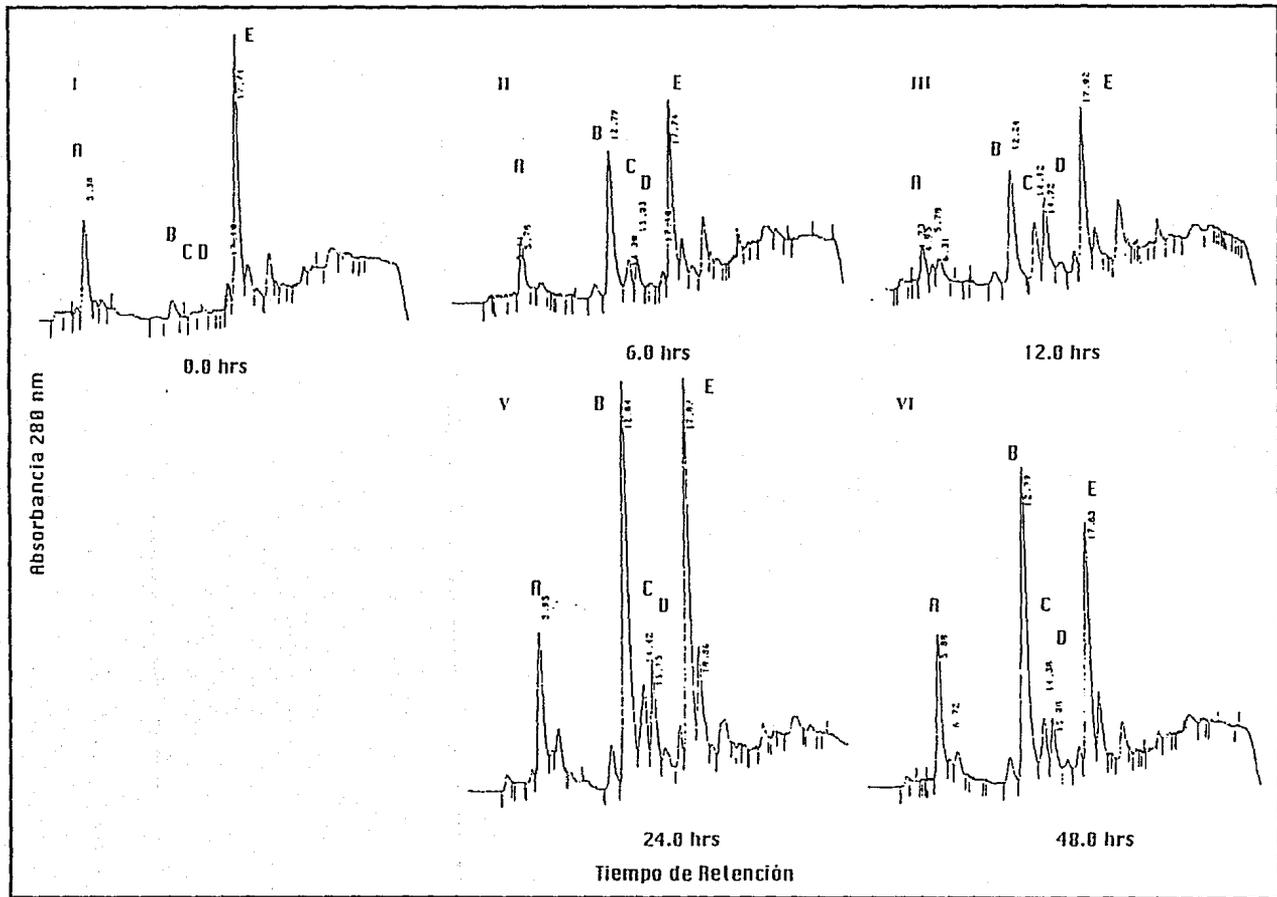


Fig. 20. Cromatogramas de extractos flavonoides de la variedad BRYOCEL obtenidos a distintos tiempos después de la inoculación con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II, III, IV, V y VI.

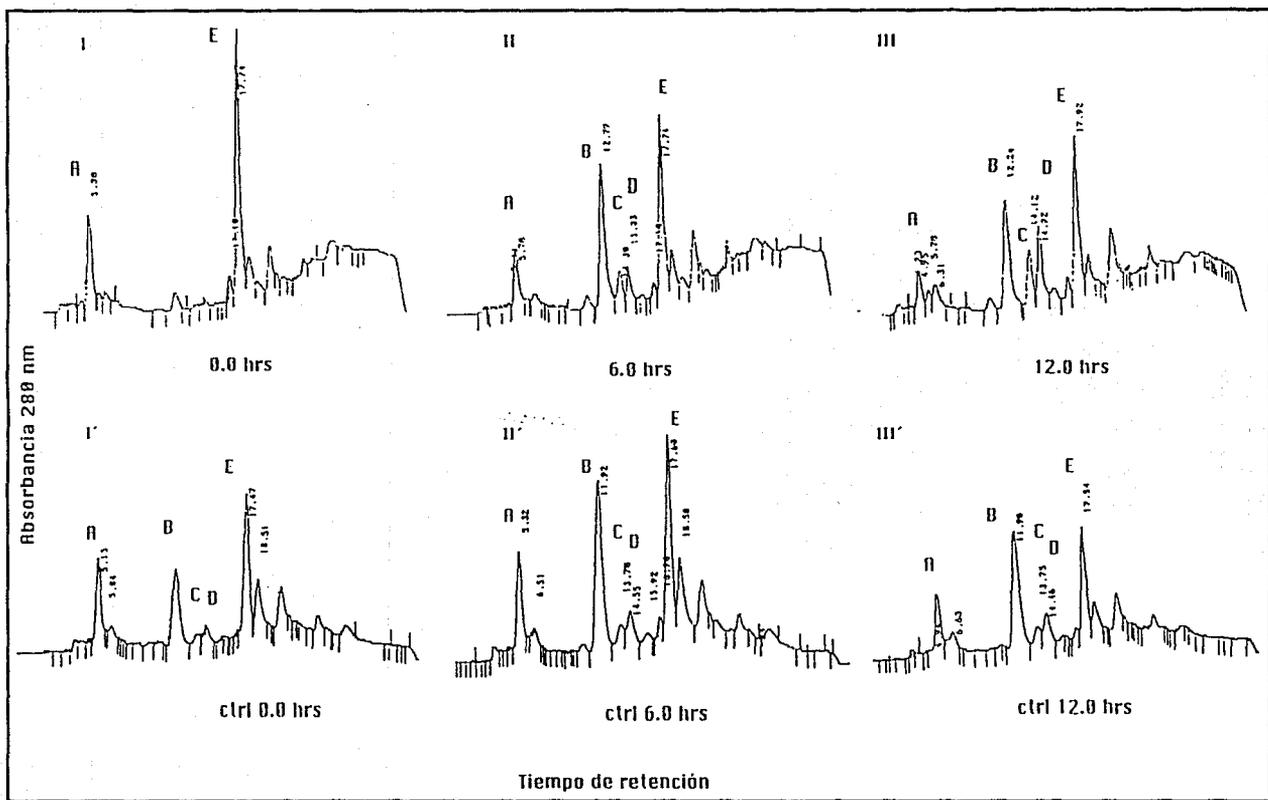


Fig. 21. Cromatogramas de extractos de flavonoides de la variedad BAYOCEL obtenidos a diferentes tiempos después de la inoculación con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II y III, comparados con los controles inoculados con agua destilada estéril.

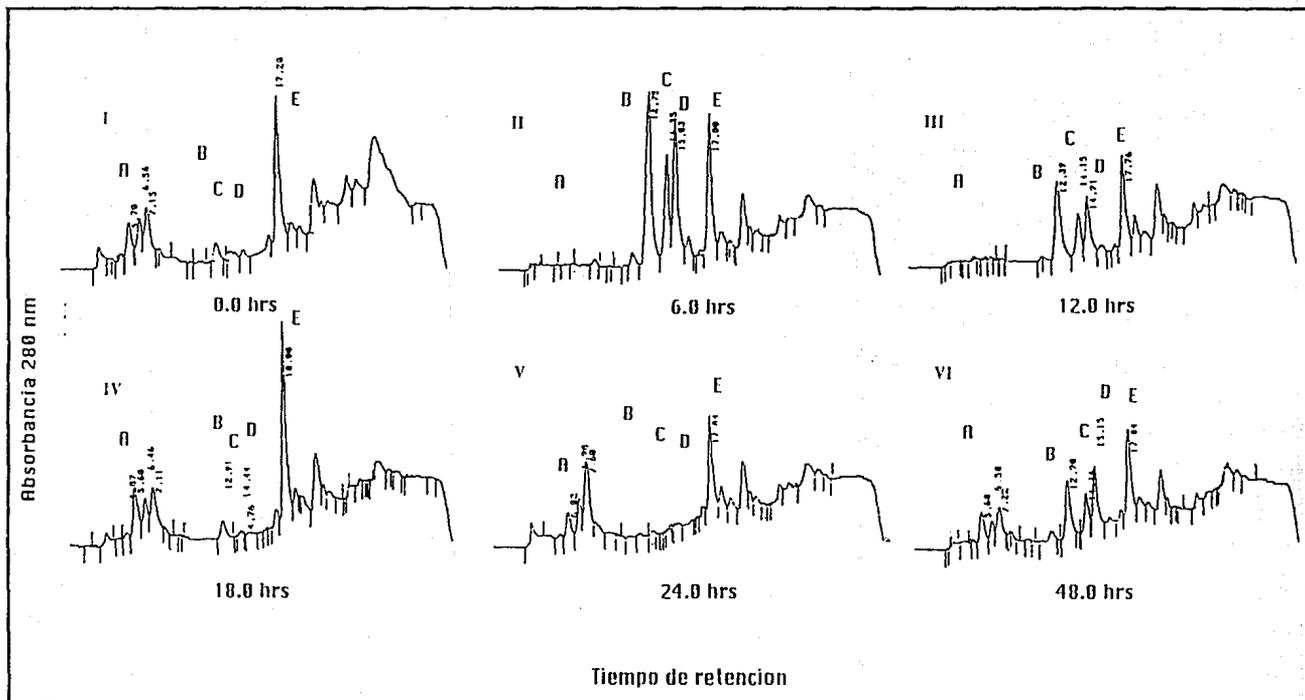


Fig. 22. Cromatogramas de extractos de flavonoides de la variedad ALUBIA obtenidos a diferentes tiempos después de la inoculación con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II, III, IV, V y VI.

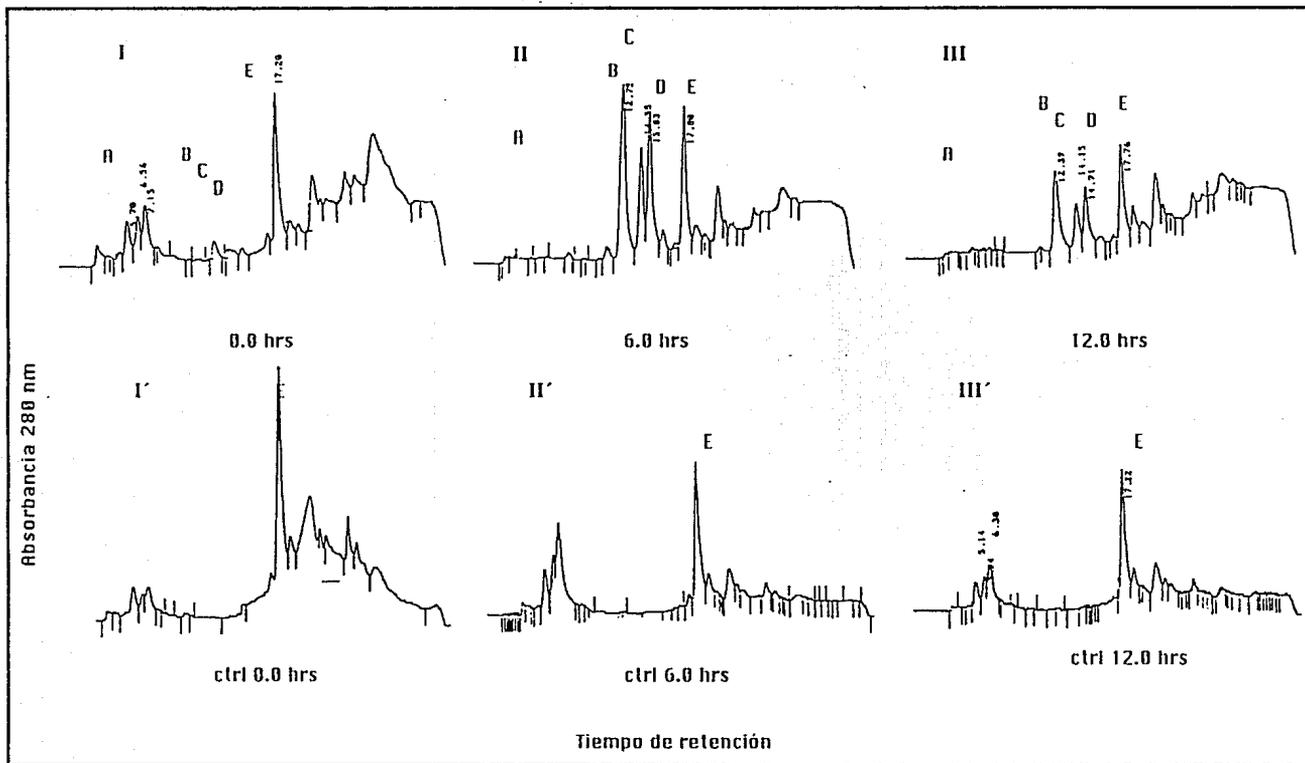


Fig. 23. Cromatogramas de extractos de flavonoides de la variedad ALUBIA a diferentes tiempos después de la inoculación con *Xanthomonas phaseoli fuscans* en I, II y III comparados con los controles inoculados con agua destilada estéril.

Fig. 24 R. Curso temporal de los niveles del pico B del perfil cromatográfico antes y después de la inoculación de hojas de frijol con *Xanthomonas phaseoli fuscans*.

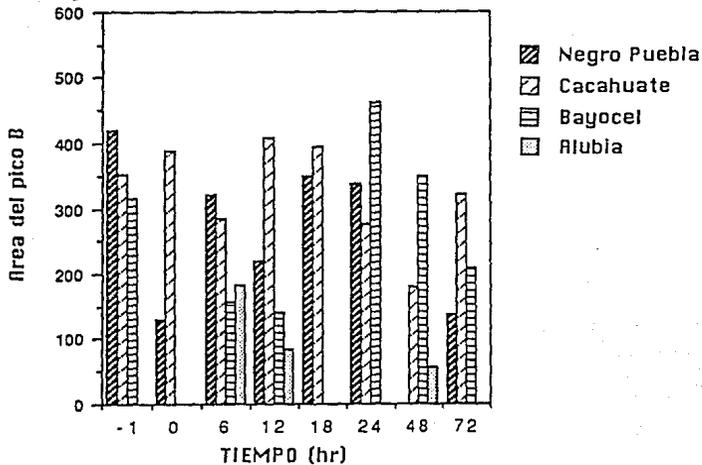


Fig. 24 B. Control con agua del pico B

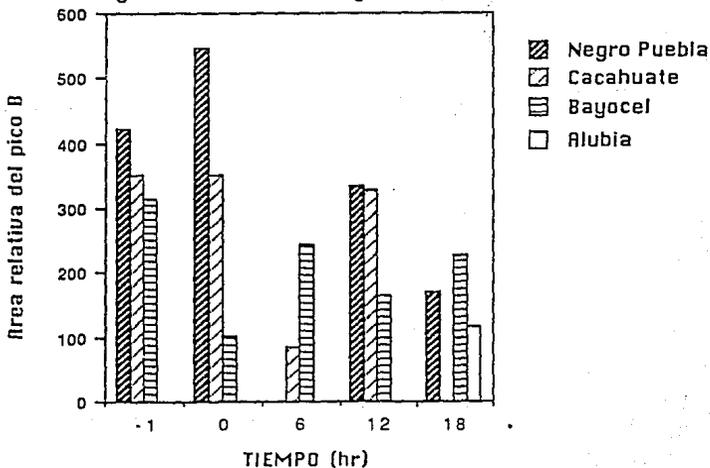


Fig. 25 A. Curso temporal de los niveles del pico C del perfil cromatográfico antes y después de la inoculación de hojas de frijol con *Xanthomonas phaseoli* fuscans.

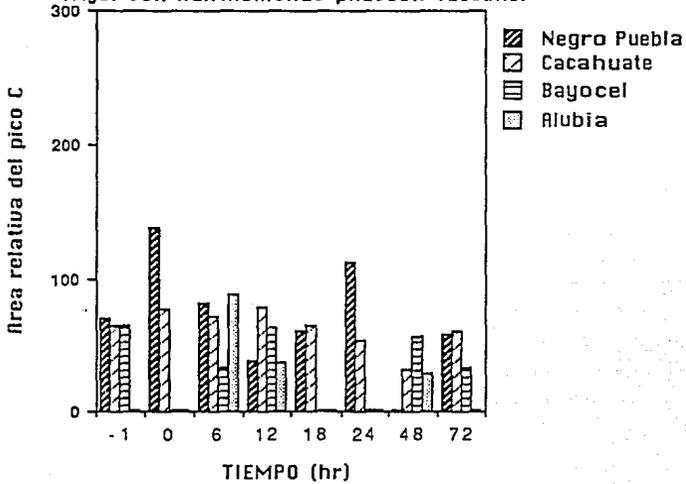


Fig. 25 B. Control con agua del pico C

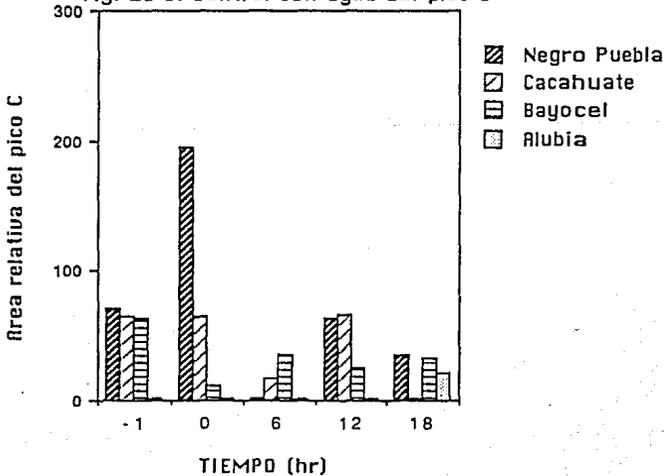


Fig. 26 A. Curso temporal de los niveles del pico D del perfil cromatográfico antes y después de la inoculación de hojas de frijol con *Xanthomonas phaseoli fuscans*

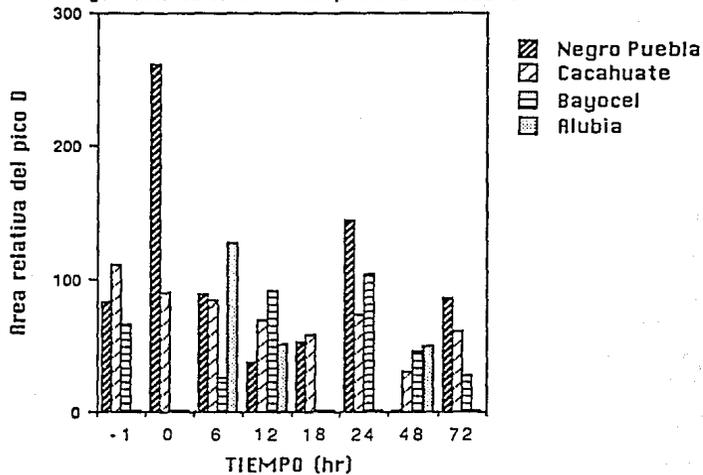


Fig. 26 B. Control con agua del pico D

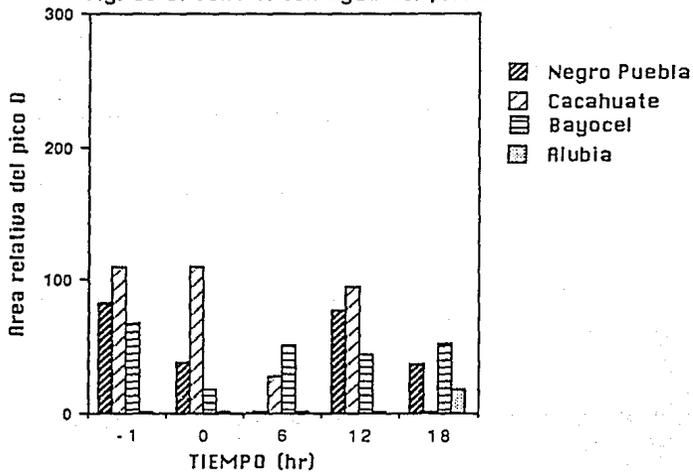


Fig. 27 B. Curso temporal de los niveles del pico E del perfil cromatográfico antes y después de la inoculación de hojas de frijol con *Xanthomonas phaseoli* fuscans.

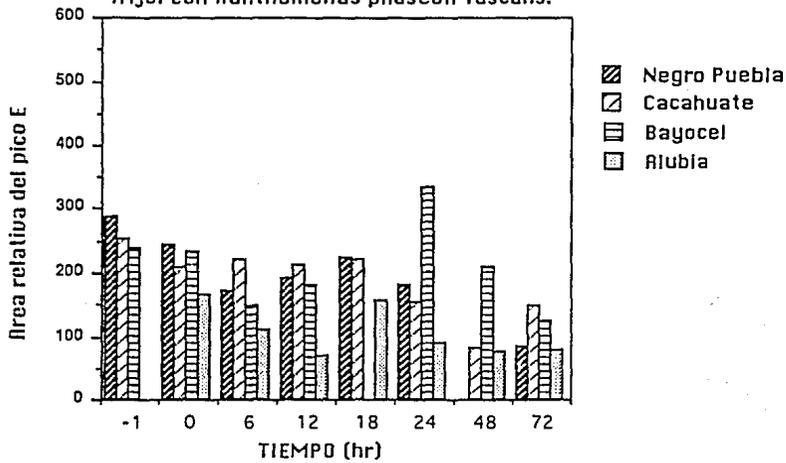


Fig. 27 B. Control con agua del pico E

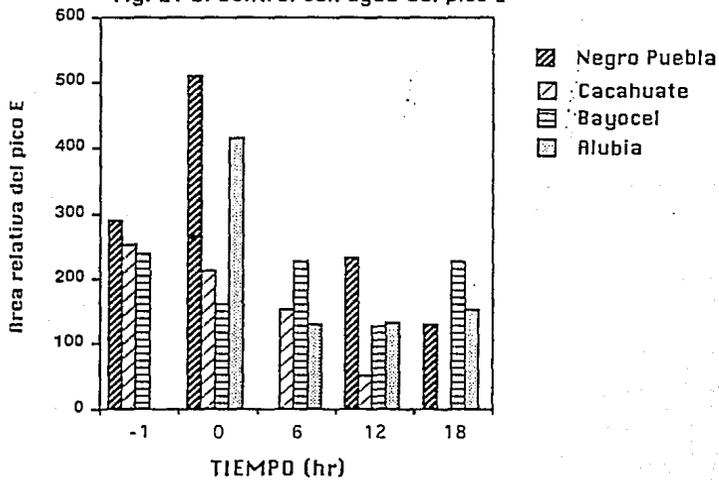
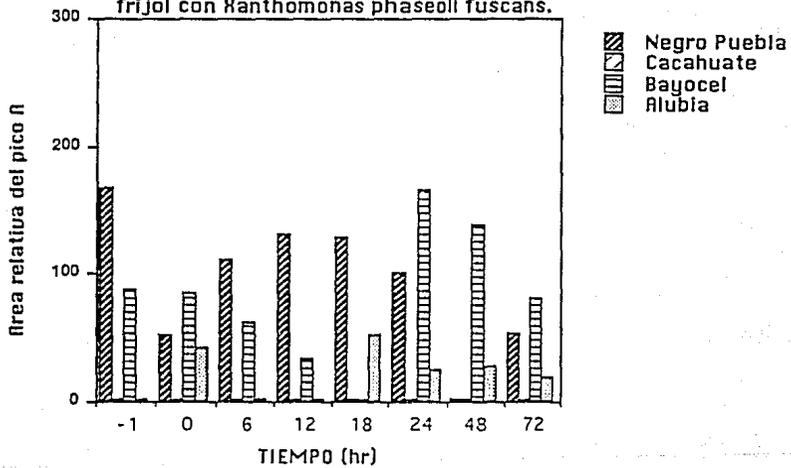


Fig. 28. Curso temporal de los niveles del pico R del perfil cromatográfico antes y después de la inoculación de hojas de frijol con *Xanthomonas phaseoli* fuscans.



Se considera que principalmente los picos B, C, y D podrían estar asociados a la respuesta de defensa. Esta observación es apoyada por el hecho de que estos picos no son detectados en las variedades susceptibles (0.0 hr) después de la inoculación con la bacteria. Mientras que en las variedades resistentes siguen presentes después de ser inoculadas con la bacteria mas allá de las 72.0 hr analizadas, aunque en cantidades diferentes. Sin embargo los niveles de C y D son los mas bajos respecto a los demás picos.

En "Alubia" los niveles de estos compuestos son muy bajos a no detectables durante las 72.0 hr después de la infección. En la variedad "Bayocel" no se detectan al inicio de la inoculación (0.0 hr), pero sí se inducen posteriormente durante todo el período de infección.

De acuerdo con la discusión de que las fitoalexinas no estan presentes en el tejido sano o que lo estan en niveles basales, y que son inducidas después del contacto con el patógeno, se esperaba que en el tejido control inoculado solamente con agua destilada estéril los picos B, C y D no fueran detectados.

En efecto, en la variedad susceptible "Alubia" estos picos no se detectaron en las muestras control de 0, 6 y 12 hr después de haber sido inoculadas con agua. En "Bayocel", "Cacahuete" y Puebla, el pico B si se detecta de manera notable, pero los niveles de los picos C y D son muy bajos.

Ya que estos picos estuvieron presentes en las variedades resistentes 2.0 hr después de inocular las bacterias y en las variedades susceptibles no se detectaron, se preguntó si en realidad también en el tejido sano estaban presentes, de tal manera que efectivamente la infección por el patógeno causara su inducción únicamente en las variedades resistentes.

Para ello se colectó tejido de plantas sanas intactas de las cuatro variedades mantenidas en las mismas condiciones y se analizaron por CLAR sus perfiles correspondientes, que aparecen señalados en las columnas como tiempo -1. Los resultados mostraron que los picos estan presentes en las plantas intactas de las cuatro variedades.

Por tanto, la ausencia de estos picos en las plantas susceptibles después de la inoculación con la bacteria podría deberse a algún efecto del tratamiento con el patógeno.

La disminución de nivel de los mismos picos en los controles podría deberse a un efecto de dilución de su concentración debido al agua infiltrada.

Por otra parte, para determinar cual de los picos resulta ser el mas importante en cuanto a la cantidad total producida durante todos los tiempos muestreados despues de la inoculacion del tejido, se sumaron las areas relativas de cada pico obtenidas en los cromatogramas correspondientes al periodo de 0.0 hrs hasta 72.0 hrs despues de la inoculacion. En la fig. 29 se compara el valor total de las areas de cada pico de las cuatro variedades en donde se observa que el pico B es el que contiene el flavonoide producido en mayor cantidad.

Ademas, para tener una idea de si la cantidad total de flavonoides producida por cada una de las variedades podria relacionarse con el comportamiento de resistencia o de susceptibilidad presentada de manera respectiva, el conjunto de las areas de todos los picos de A a E (de 0.0 hrs a 72.0hrs) de cada variedad fueron contrastados entre si (Fig. 30). En esta figura se observa que la variedad Negro Puebla (resistente) contuvo la mayor cantidad de flavonoides y la variedad Alubia (susceptible) la menor cantidad mostrando correspondencia con los resultados en general encontrados en este trabajo.

En cuanto al ensayo de la actividad biologica no se observó un efecto estático de extractos de flavonoides sobre el crecimiento celular cuando las bacterias fueron crecidas en medio de cultivo complejo PY-glicerol pero sí en medio mínimo M9 (Apéndice).

Cuando se uso el medio minimo M9, existio una reducción en la tasa del crecimiento bacteriano en el cultivo que se prolongo durante 6.0 h, retomando la misma velocidad de crecimiento que los controles después de las 10.0 h (Fig 31). La suspensión bacteriana incubada con los extractos isoflavonoides obtenidos de la variedad susceptible "Alubia" no presentan este efecto (datos no mostrados).

Fig. 29. Cantidad de flavonoide producida por pico (suma de las areas relativas individuales correspondientes a los tiempos de 0.0 a 72.0 hrs despues de la inoculacion).

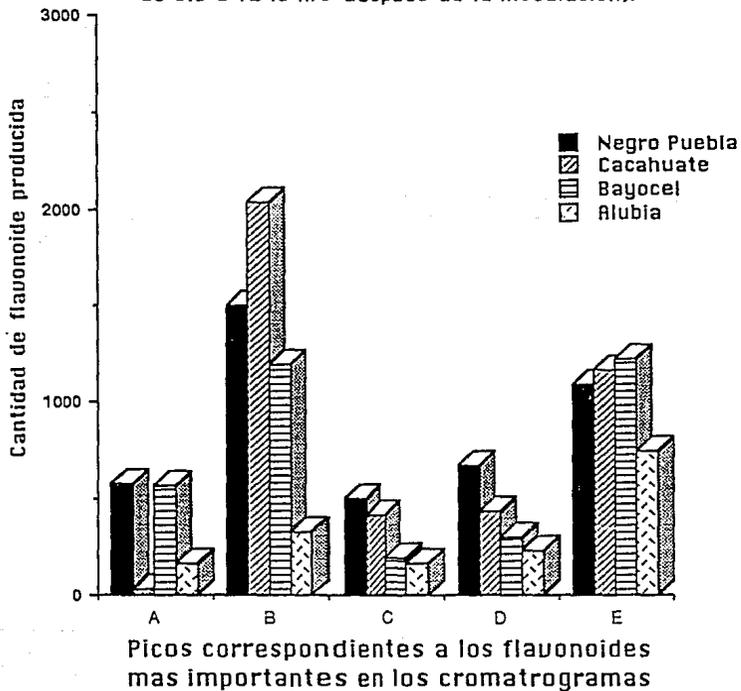
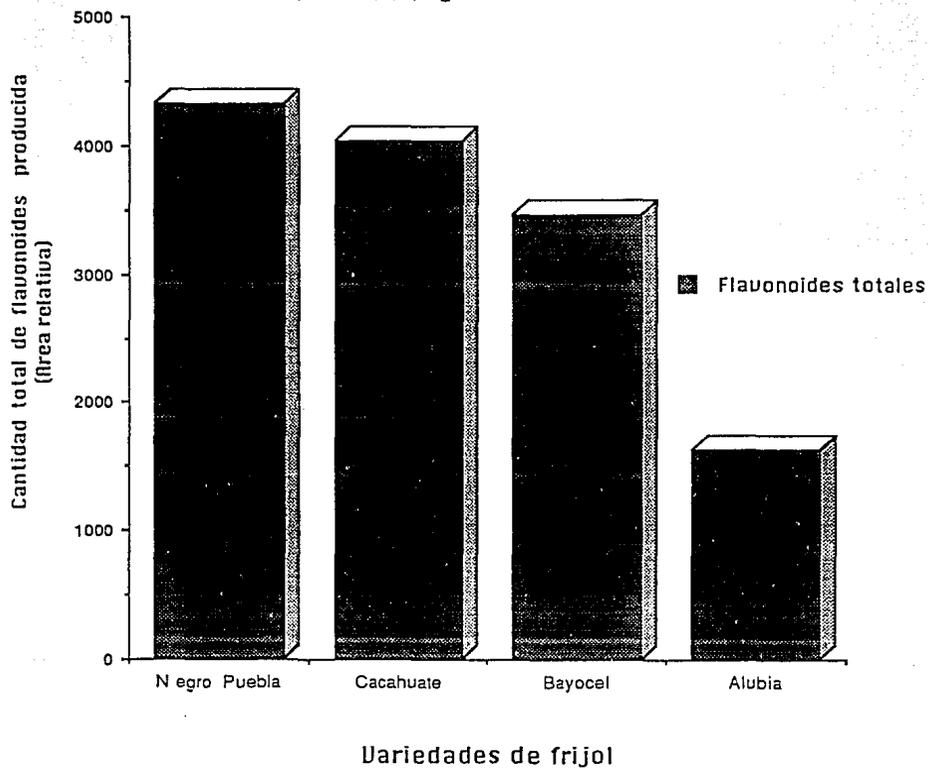


Fig. 38. Relacion de la cantidad total de flavonoides producida por variedad (total de las areas del conjunto de los picos A,B,C,D y E de 0.8 a 72.8 hrs).



BIDENSAYO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE  
FLAVONOIDES DE LA var. Negro Puebla EN  
CULTIVO LÍQUIDO DE *X. phaseoli*.

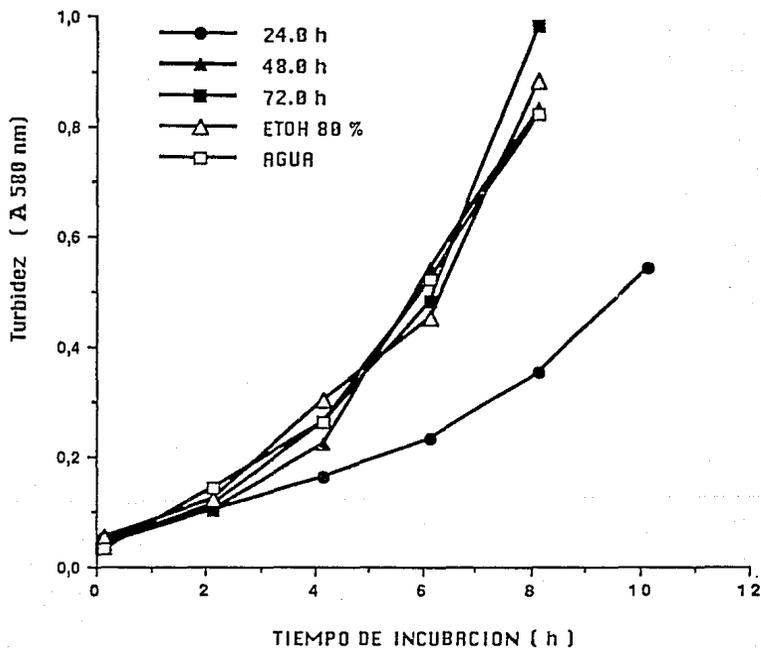


FIG. 31. Efecto de varios extractos flavonoides sobre el crecimiento de *Xanthomonas phaseoli fuscans*. Los símbolos representan extractos obtenidos a diferentes tiempos después de la infección. Los experimentos se describen en materiales y métodos.

### VIII.- DISCUSION .

La observación de los síntomas desarrollados después de la inoculación con *X. phaseoli fuscans* en las variedades resistentes y susceptibles en el presente trabajo concuerdan con el comportamiento exhibido por la interacción entre *Pseudomonas phaseolicola* o *Pseudomonas syringae* con *Phaseolus vulgaris*, en donde la respuesta hipersensible típicamente aparece entre las 18.0 h y las 24.0 h y el colapso y la desecación del tejido procede hasta las 72.0 h después de la inoculación. La necrosis en los cultivares susceptibles también se desarrolla entre los 3 y los 5 días después de la inoculación tanto en frijol, como en las plantas de chile y de algodón, y entre 1 y 2 días después en el tabaco (Bell, 1981).

Se ha reportado que el tiempo de acumulación de fitoalexinas ocurre 40.0 h después de la inoculación de hipocotilos de frijol con una raza incompatible del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*; y que esta acumulación es concomitante con la máxima expresión de los genes que sintetizan las enzimas de las vías fenilpropanoide e isoflavonoide.

La actividad de FAL no fue detectada en plantas intactas (no inoculadas) de las variedades resistentes o susceptibles, por lo que se comprobó que su actividad es inducida durante la interacción con *Xpf*.

El tiempo en que se puede apreciar visualmente la respuesta hipersensible (necrosis del tejido inoculado) correlaciona con el tiempo en que se presenta la actividad de FAL en todas las variedades. La necrosis y la actividad de FAL son detectadas dentro de las primeras 24.0 hr siguientes a la infección en las variedades resistentes "N. Puebla" y "Cacahuate", mientras que en las variedades susceptibles "Alubia" y "Bayocel" la necrosis y la actividad de FAL se presentan 72.0-120.0 hr mas tarde. Además tanto la respuesta de necrosis como la actividad de FAL son menos intensas en las variedades susceptibles; la reacción de más intensidad la presenta la variedad "Negro Puebla".

El nivel de actividad de FAL y el tiempo diferencial en la aparición de la necrosis y en la acumulación de posibles fitoalexinas entre las variedades resistentes y susceptibles en los tiempos iniciales después de la infección, sugiere que existen diferencias genéticas y fisiológicas en estas variedades de frijol que son expresadas de manera específica en la interacción con *Xanthomonas phaseoli fuscans*. Esta respuesta, por tanto coincide con la teoría fitopatológica de la interacción de un gen de avirulencia por parte de la bacteria que es reconocido de manera específica por un receptor (un gen de resistencia) vegetal que es llevado únicamente por las variedades resistentes.

En el análisis de flavonoides se ha encontrado que los compuestos B, C y D pueden ser fitoalexinas que participan activamente asociadas a la respuesta de defensa en las interacciones incompatibles. La presencia de estos compuestos en las variedades resistentes o la ausencia y/o bajos niveles en las plantas susceptibles durante las primeras 24.0 hr de infección con *Xpf* podrían ser parte de la diferencia de respuesta entre variedades compatibles e incompatibles. El pico B resultó ser el más importante tanto por su nivel de concentración, como por su comportamiento.

Por tanto, es posible que en "N. Puebla" y "Cacahuate" la presencia de estos compuestos a tiempos tempranos después de la infección estén relacionados con la respuesta de resistencia y la rápida aparición de la necrosis en los dos comportamientos resistentes. Ya que después de las 24.0 hr tienden a disminuir por debajo de los niveles alcanzados en la variedad "Bayocel".

Los compuestos B, C y D que no se detectan en "Bayocel" al tiempo de la inoculación con *Xpf*, aumentan gradualmente hasta que al llegar las 24.0 hr en adelante rebasan en algunos casos a los niveles encontrados en las variedades resistentes, lo cual precede a la aparición de la necrosis en esta variedad hacia las 72.0 - 120.0 hr.

La presencia de los picos B, C y D en el tejido sano en las cuatro variedades, la ausencia de los mismos en "Bayocel" y "Alubia" y la disminución de su nivel inmediatamente después de la infección en "N. Puebla" sugieren un efecto de supresión de la síntesis de las enzimas que los sintetizan, o de inactivación de la molécula por parte de las bacterias. Sería posible entonces que también algunas enzimas de la vía de biosíntesis de estos compuestos pudiesen ser suprimidas (Whitehead et al., 1982). Whitehead y colaboradores encontraron que al inocular hipocotilos y cotiledones de *Phaseolus vulgaris* con fracciones de fragmentos de pared celular de *C. lindemuthianum* la actividad de FAL fué suprimida.

Estos mecanismos permitirían a la bacteria aumentar más fácilmente su población en la planta, lo cual se demuestra por el mayor crecimiento alcanzado en las variedades "Bayocel" y "Alubia" siendo esta última la más sensible a la supresión o inactivación de su respuesta flavonoide.

Recientemente Jakobek *et al.*, (1993) encontraron que las cepas compatibles NPS3121 y Pp14 de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* suprimen la transcripción de los genes correspondientes a FAL, CHS y CHI así como la acumulación de fitoalexinas en *Phaseolus vulgaris* cuando las plantas son infiltradas con suspensiones de  $10^8$  cel/ml. Al respecto resultaría interesante saber si existiría una supresión de los transcritos para FAL, CHS y CHI en el presente sistema.

A pesar de que las plantas intactas poseen flavonoides en niveles semejantes a los de las plantas infectadas (excepto en "Alubia") y de que las plantas testigo de las variedades resistentes inculadas con agua presentan niveles muy por encima de las plantas susceptibles inculadas con bacteria, no se presenta necrosis del tejido en ambos casos.

Al igual que en "Bayocel", en la variedad "Alubia" estos picos no existen a las 0.0 hr y los niveles alcanzados a las 6.0 y a las 48.0 hr de infección no llegan a ser suficientes de modo que indiquen estar relacionados a la respuesta de necrosis, incluso tampoco se detectan a las 72.0 hr (datos no mostrados).

Estas observaciones podrían sugerir que si bien la presencia en altos niveles o la ausencia de estos compuestos posiblemente estén asociadas a la respuesta de resistencia o de susceptibilidad, respectivamente, la respuesta de necrosis en estas variedades de frijol no necesariamente correlaciona con la presencia o ausencia de estos compuestos.

De tal forma que la necrosis asociada con la respuesta temprana de defensa en las variedades resistentes, y la necrosis tardía presentada por las variedades susceptibles posiblemente no dependa de manera directa de los niveles de flavonoides.

Este evento no resulta raro ya que en trabajos elaborados recientemente por Jakobek *et al.*, (1993) las fitoalexinas son producidas en plantas de *Phaseolus vulgaris* independientemente de que sean inculadas con cepas fitopatógenas incompatibles silvestres o mutantes *hrp*<sup>-</sup> de *P. s.* pv. *tabaci*, y con cepas no fitopatógenas como *E. coli* o *P. fluorescens*; en ambos casos el tiempo en el que se producen las fitoalexinas después de la inoculación no correlaciona con la respuesta hipersensible (tiempo de aparición de la necrosis). Por lo que sugieren que la activación de la reacción hipersensible usa una vía de señales de transducción distinta a la de la biosíntesis de fitoalexinas inducidas por los patógenos bacterianos, pudiendo ser parte de eventos relacionados pero con mecanismos diferentes.

Por otra parte, el hecho de usar agua como inóculo control en la hoja de todas las variedades ensayadas podría diluir el nivel de flavonoides comparado con el de la planta intacta, lo cual se observa en todos los casos y, en la "Alubia" en particular, podría suprimir aun mas el de por sí ya bajo nivel de sus flavonoides producidos durante las primeras 12.0 hrs después de la infiltración de agua. Una vez que el estatus de agua vuelve a la normalidad hacia las 18.0 hr los picos vuelven a ser detectables.

El pico E aparentemente debe intervenir en la respuesta pues aunque es un flavonoide cuyo nivel permanece relativamente constante en todas las variedades (excepto en "Bayocel") antes y después de ser infectadas, sus niveles junto con los del pico B son los de mayor concentración.

De manera interesante el pico F únicamente resulta significativo en la variedad "Cacahuete" en donde siempre permanece en altos niveles y muy probablemente contribuya en esta variedad a conferirle resistencia.

El pico A por el contrario no es presentado por la variedad "Cacahuete" y es muy bajo en "Alubia". Únicamente en "N. Puebla" y "Bayocel" sigue un patrón de inducción similar al B, por lo que probablemente podría estar asociado a la respuesta de resistencia, ya que sus niveles aunque son mas bajos comparados a los del pico B, son mas altos que los de C y D.

La identificación de los 6 picos seleccionados como los principales que aparecen en la cromatografía de extractos flavonoides obtenidos en las variedades estudiadas contribuiría definitivamente a confirmar o a refutar los aspectos aquí discutidos.

En cuanto a los resultados obtenidos de los experimentos para el bioensayo de la actividad biológica *in vitro* de extractos crudos de isoflavonoides aplicados a cultivos en suspensión de *X. phaseoli fuscans* se pudo observar una disminución significativa en la tasa de crecimiento del cultivo únicamente con el extracto de 24.0 hr (Fig. 29) probablemente debido a la actividad de una (o varias) posible fitoalexina que podría ser aislada en fracciones del extracto a través del monitoreo de su actividad. Los extractos correspondientes a los otros tiempos no presentan algún efecto posiblemente debido a la capacidad de este patógeno para metabolizar las fitoalexinas. A pesar de partir de bastante cantidad de tejido infectado podría no haberse obtenido una cantidad suficiente de fitoalexina para haber podido observar un efecto espectacular pues las cantidades requeridas para inhibir el crecimiento en un ensayo *in vitro* necesitan ser bastante altas (Weinstein et al., 1981).

Al respecto se ha concluido a partir de muchos estudios que las bacterias parecen ser mas resistentes que los hongos, ya que las cantidades de fitoalexinas usadas en estos han sido evadidas por las capacidades de destoxicación de relativamente un gran número de células bacterianas. Por tanto, si el título de bacterias en un ensayo es suficientemente grande, las bacterias pueden rápidamente catabolizar la fitoalexina en la solución de ensayo y por tanto evitar el efecto estático de la misma. Es así que para los patógenos que pueden destoxicarlas, el observar el efecto de una fitoalexina puede depender del tiempo del ensayo (Darvill and Albersheim, 1984).

En cambio, la reducción o el aumento del crecimiento bacteriano observados en las hojas inoculadas de las plantas resistentes y susceptibles, respectivamente, podría resultar de una conjugación de dos factores: uno de ellos puede ser el hecho de la desaparición gradual natural de las fitoalexinas aun en ausencia del patógeno y el otro, que el patógeno catalice esta tasa de desaparición y aun mas reduzca los niveles máximos de fitoalexinas acumuladas; de tal manera que una combinación de las enzimas de la planta y del microbio sea la que determine la velocidad de síntesis y la velocidad de degradación de las fitoalexinas y por consiguiente la que explica si una infección es contenida por la planta o si el patógeno la coloniza de manera exitosa (Darvill and Albersheim, 1984).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo acerca de la susceptibilidad diferencial entre la variedad "Negro Puebla" y la variedad "Alubia", podrían explicarse ademas por el reconocimiento específico como patógeno que poseen las variedades resistentes respecto de una cepa de microorganismo a la cual responden aumentando su síntesis de flavonoides de manera rápida.

En el caso de la variedad "Negro Puebla" la resistencia probablemente estaría dada por la presencia durante los tiempos iniciales de la infección de altos niveles de isoflavonoides con posible propiedad de fitoalexina y por la rápida activación del metabolismo fenilpropanoide para sintetizar flavonoides *de novo* que en conjunto se acumulan en cantidades suficientes para detener el crecimiento del patógeno, pero además también porque este no suprime la síntesis de flavonoides en esta variedad.

Mientras que la ausencia inicial después de la infección, la inducción lenta y los bajos niveles en la síntesis *de novo* de flavonoides tóxicos y una supresión o inactivación de flavonoides específica de variedad por parte de *Xpf* después de la infección, conducen a las variedades "Alubia" y "Bayocel" a ser susceptibles a la enfermedad.

Por tanto, la rápida recuperación de síntesis de flavonoides lograda por el tejido de las variedades resistentes a tiempos tempranos después de la infección puede ganar a la capacidad de destoxificación de la bacteria cuando ésta aun no logra un aumento sustancial en su población en el medio ambiente vegetal a diferencia de la cantidad de extracto que se utiliza para observar un efecto de retraso del crecimiento bacteriano en los bioensayos realizados *in vitro*.

## 18.- CONCLUSIONES.

1.- La respuesta de resistencia expresada por las variedades "N. Puebla" y "Cacahuate", se encuentra asociada al rápido aumento en los niveles de actividad de la enzima FAL y por tanto a la activación del metabolismo fenilpropanoide.

2.- La expresión tardía de la actividad de FAL se manifiesta en las variedades que desarrollan los síntomas de la enfermedad ("Alubia" y "Bayocel" ) asociada al tiempo de aparición de la necrosis.

3.- Entre más rápida es la aparición de la necrosis en el área infectada menor es el tiempo en que se registran los aumentos de actividad de FAL en las plantas resistentes. Lo inverso sucede con las variedades susceptibles.

4.- Existen compuestos de tipo flavonoide (probablemente fitoalexinas) cuya presencia podría asociarse a la respuesta de resistencia y su ausencia o bajos niveles de producción podría asociarse también a la respuesta de susceptibilidad.

5.- Es probable que *Xanthomonas phaseoli fuscans* posea mecanismos de supresión de la síntesis o de inactivación de la respuesta de defensa que actúe impidiendo la inducción de flavonoides de manera inmediata después de la infección. A su vez existen variedades de frijol mas sensibles a estos mecanismos, logrando una respuesta diferencial en la interacción de las variedades con la bacteria y estableciendose un tipo de reconocimiento variedad raza específico con bacterias compatibles.

6.- Debido a que se requieren dosis altas de flavonoides para poder observar algún efecto de toxicidad en estas bacterias cuando se cultivan *in vitro*, es posible que *in vivo* existan otros mecanismos que en conjunto con la síntesis de flavonoides conforman la respuesta hipersensible de resistencia.

## X. LITERATURA CITADA.

Albersheim, P. and B.S. Valent. (1978). Host-Pathogen Interactions in Plants. Plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *The Journal of Cell Biology*, 78: 627-643.

Arlat M, C.L. Gough, C. Zischelc, P.A. Barberis, A. Trigalet, and C.A. Boucher. (1992). Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5 (2): 187-193.

Bell, A.A. (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32: 21-81.

Bevan, M., D. Shufflebottom, K. Edwards, R. Jefferson, and W. Schuch. (1989). Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *The EMBO Journal*, 8 (7): 1899-1906.

Bolwell, G.P., J. Sap, C.L. Cramer, C.J. Lamb, W. Schuch, and R.A. Dixon. (1986). L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: partial degradation of enzyme subunits in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 881: 210-221.

Bolwell, G.P., J.N. Bell, A. Cramer, W. Schuch, and C.J. Lamb. (1985). L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*. Characterization and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Eur. J. Biochem.*, 149: 411-419.

Bolwell, G.P., M.P. Robbins, and R.A. Dixon. (1985). Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. Enzymic responses associated with rapid changes in cell wall components. *Eur. J. Biochem.*, 148: 571-578.

Castele, K.V., H. Geiger, and C.F. Van Sumere. (1982). Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 240: 81-94.

Clafin, L.E., A.K. Vidaver, and M. Sasser. (1987). MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology*, 77: 730-734.

Coplin, D.L., R.D. Frederick, D.R. Mjerczak, and L.O. Tuttle.(1992). Characterization of a gene cluster that specifies pathogenicity in *Erwinia stewartii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(1): 81-88.

Corey, R.R., and M.P. Starr. (1957). Colony types of *Xanthomonas phaseoli*. *Phytopathology*, 74: 137-140.

Cowling, E.B., and J.G. Horsfall. 1979. Prologue: How pathogens induce disease. Chapter 1. *Plant disease*, vol IV., Academic Press. pp 1-21.

Cramer, C.L., J.N. Bell, T.B. Ryder, J.A. Bailey, W. Schuch, G.P. Bolwell, M.P. Robbins, R.A. Dixon, and C.J. Lamb. (1985a). Co-ordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The EMBO Journal*, 4 (2): 285-289.

Cramer, C.L., T.B. Ryder, J.N. Bell, and C.J. Lamb. (1985b). Rapid switching of plant gene expression induced by fungal elicitor. *Science*, 227: 1240-1242.

Daniels, M.J., J.M. Dow, and A.E. Osbourn. (1988). Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 285-312.

Daniels, M.J. (1989). Pathogenicity of *Xanthomonas* and related bacteria towards plants. Chap. 17., Section V. DA Hopwood and KF Chater (eds.). In *Genetics of Bacterial Diversity.*, Academic Press., London. pp. 351-371.

Darvill, A.G., and P. Albersheim. (1984). Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 243-275.

Dixon R.A., P.M. Dey, and C.J. Lamb. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 55: 1-35.

Ebel, J. (1986). Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24: 235-264.

Edwards, K., C.L. Cramer, G.P. Bolwell, R.A. Dixon, W. Schuch, and C.J. Lamb. (1985). Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 6731-6735.

Erez, A. (1973). Possible errors in quantitative determination of phenylalanine ammonia-lyase activity by spectrophotometric methods. *Plant Physiol.*, 51: 409-411.

Gnanamanickam, S.S. and S.S. Patil. (1977). Accumulation of antibacterial isoflavonoids in hypersensitively responding bean leaf tissues inoculated with *Pseudomonas phaseolicola*. *Physiological Plant Pathology*, 10: 159-168.

Graham, T.L., and M.Y. Graham. (1991). Cellular coordination of molecular responses in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4 (5): 415-422.

Graham, T.L. (1991). A rapid, high resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial aromatic secondary metabolites. *Plant Physiol.*, 95: 584-593.

Graham, T.L. (1991). Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.*, 95: 594-603.

Hahlbrock, K., and D. Scheel. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 347-369.

Hsiou-Chen, H., et al. (1991). Characterization of the *hrp* cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 and *TnphoA* tagging of genes encoding exported or membrane-spanning *hrp* proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4 (5): 469-476.

Ingyu, H., S.M. Lim, and P.D. Shaw.(1992). Cloning and characterization of pathogenicity genes from *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Journal of Bacteriology*, 174 (6): 1923-1931.

Jakobek and Lindgren (1993b). Suppression of bean defense responses by *P. syringae*. *Plant Cell*, 5: 57-63.

Jakobek, Smith, and Lindgren. (1993a). Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *Plant Cell*, 5: 49-56.

King, E.E. (1971). Extraction of cotton leaf enzymes with borate. *Phytochemistry*, 10: 2337-2341.

Koukol, J. and E.E. Conn. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine daminase of *hordeum vulgare*. *The Journal of Biological Chemistry*, 236 (10): 2692-2698).

Lamb, C.J., and R.A. Dixon. (1978). Stimulation of de novo synthesis of L-phenylalanine ammonia-lyase during induction of phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *FEBS LETTERS*, 94 (2): 277-280.

Lamb, C.J., T.K. Merritt, and V.S. Butt. (1979). Synthesis and removal of phenylalanine ammonia-lyase activity in illuminated discs of potato tuber parenchyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 582: 196-212.

Lawton, M.A., R.A. Dixon, K. Hahlbrock, and C.J. Lamb. (1983a). Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. *Eur. J. Biochem.*, 129: 593-601.

Lawton, M.A., R.A. Dixon, K. Hahlbrock, and C.J. Lamb. (1983b). Elicitor induction of mRNA Activity. *Eur. J. Biochem.*, 130: 131-139.

Liang, X., Dron M., C.L. Cramer, R.A. Dixon, and C.J. Lamb. (1989). Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (24): 14486-14492.

Lyon, F.M., and R.K.S. Wood. (1975). Production of phaseollin, coumestrol and related compounds in bean leaves inoculated with *Pseudomonas* spp. *Physiological Plant Pathology*, 6: 117-124.

Napoli, C. and B., Staskawicz. (1987). Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Journal of Bacteriology*, 169 (2): 572-578.

Osbourn, A.E., et al. (1990). Identification and DNA sequence of a pathogenicity gene of *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3 (5): 280-285.

Rahe, J.E., J. Kuc', and C. Chien-Mei. (1970). Cinnamic acid production as a method of assay for phenylalanine ammonia-lyase in acetone powders of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 9: 1009-1015.

Roebuck, P. R. Sexton, and J.W. Mansfield. (1978). Ultrastructural observations on the development of the hypersensitive reaction in leaves of *Phaseolus vulgaris* cv. Red Mexican inoculated with *Pseudomonas phaseolicola* (race 1). *Physiological Plant Pathology*, 12: 151-157.

Ryder, T.B., C.L. Cramer, J.N. Bell, M.P. Robbins, R.A. Dixon, and C.J. Lamb. (1984). Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 5724-5728.

Sachs, M.M., and D.H. Tuan-Hua. (1986). Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37: 363-376.

Schaad, N.W. and R.E. Stall. *Xanthomonas*. In laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. (2nd Ed.). Schaad NW (ed.). Academic Press. USA. pp 81-94.

Smith, D.A. and S.W. Banks. (1986a). Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. *Phytochemistry*, 25 (5): 979-995.

Smith, D.A. and S.W. Banks. (1986b). Formation and biological properties of isoflavonoid phytoalexins. In *Plant Flavonoids In Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, Alan R. Liss, Inc., pp 113-124.

Stahl, D.J., and W. Schafer. (1992). Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *The Plant Cell*, 4 : 621-629.

Staskawicz, B., D. Dahlbeck, N. Keen, and C. Napoli. (1987). Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Journal of Bacteriology*, 169 (12): 5789-5794.

Thompson, J.N., and J.J. Burdon. (1992). Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature*, 360: 121-125.

Weinstein, L.I., M.G. Hahn, and P. Albersheim. (1981). Host-Pathogen Interactions. XVIII. Isolation and biological activity of glycinol, a pterocarpan phytoalexin synthesized by soybeans. *Plant Physiol.*, 68: 358-363.

Whitehead, I.M., P.M. Dey, and R.A. Dixon. (1982). Differential patterns of phytoalexin accumulation and enzyme induction in wounded and elicitor-treated tissues of *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 154: 156-164.

Willis, D.K., J.J. Rich, and M. Habrak. (1991). *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4 (2): 132-138.

Zhong-Min, W., W. Zhong-Min, B.J. Sneath, and S.U. Beer. (1992). Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli. *Journal of Bacteriology*, 174 (6): 1875-1882.

Zucker, M. (1965). Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, 40 (5): 779-784.

## XI. APENDICE.

### MEDIO PYG(A)

	gr/l
Peptona de Caseína	5.0
Extracto de levadura	3.0
	ml/l
Glicerol 50 %	40.0
(Agar)	1.6 %

### MEDIO M9

Na <sub>2</sub> HP04	6.0 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 gr
NaCl	0.5 gr
NH <sub>4</sub> CL	1.0 gr

Aforar a 1000 ml con agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con NaOH 0.1N, esterilizar en autoclave a 15 lb de presión por 20 minutos y adicionar:

1 M MgS04	2 ml
20% Glucosa	10 ml
1 M CaCl <sub>2</sub>	0.1 ml

La glucosa puede esterilizarse separadamente por filtración.