



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03088  
5

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

T E S I S

“CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA RESPUESTA  
A ESTRES DE LA ACETIL CoA CARBOXILASA  
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A :

281358

BERENICE GARCIA PONCE DE LEON

Julio del 2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas, del Instituto de Biotecnología de la U. N. A. M., bajo la dirección del Dr. Mario Rocha Sosa y la supervisión del comité tutorial integrado por: la Dra. Alejandra Covarrubias Robles, el Dr. Carlos Arias Ortiz y el Dr. David Rmero Camarena.

La tesis fue revisada por los miembros del jurado, los Dres: Miguel Lara Flores, Mario Rocha Sosa, Esperanza Martínez Romero, Gladys Cassab López, José Luis Puente García, Mario Soberón Chávez y Lorenzo Segovia Forcella.

La realización de este proyecto fue apoyado por los donativos de CONACyT (No. 0133P-N9505) y de DGAPA-UNAM (No. IN200296), así como el programa PADEP-DGEP (No. 030520). Además fui becaria del CONACyT durante la maestría y de DGAPA en el doctorado.

*Le dedico esta tesis*

*a mis padres, Carlos y Sara*

*y a mis hermanos, Omar y Ulises*

*a quienes amo. Por su apoyo incondicional,*

*les estoy completamente agradecida.*

Mi agradecimiento,

A Mario por su apoyo, por todo lo que me enseñó y por las largas discusiones.

A mis amigos que estuvieron a mi lado en las buenas y en las malas durante estos años. Sin ustedes no me habría sido posible hacer este doctorado.

A mi abuelita, quien me permitió vivir en su casa todos estos años.

A José Sánchez Serrano y a Pilar Paredes de la Fuente, por su ayuda en la cuantificación del JA.

A Ivonne Toledo, por enseñarme a extraer fitoalexinas.

A Marta Trujillo, Adriana Monserrat y a Lourdes Cazadero, por su buena disposición y el facilitar mi trabajo.

A Patricia Rueda, por su ayuda técnica.

## ÍNDICE

RESUMEN	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>ii</i>
ABREVIATURAS	<i>iii</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
<b>1.1 El ácido jasmónico</b>	
1.1.1 Descubrimiento y funciones en el desarrollo de la planta	2
1.1.2 Biosíntesis de oxilipinas	4
1.1.3 Analogía entre la síntesis del JA en plantas y la síntesis de prostaglandinas en animales	8
1.1.4 Participación del JA y su interacción con otros fitorreguladores en la respuesta a herida	10
1.1.5 Participación del JA en la respuesta a patógenos y elicitores	12
1.1.6 Interacción del JA con otros fitorreguladores en la respuesta a patógenos	14
<b>1.2 Respuesta de defensa de las plantas al ataque de microorganismos</b>	
1.2.1 La respuesta hipersensible	16
1.2.2 Producción de fitoalexinas en leguminosas	19
1.2.3 La fenilalanina amonio liasa y la chalcona sintasa, enzimas de la vía de fenilpropanoides	20
II. ANTECEDENTES	
<b>2.1 La enzima acetil CoA carboxilasa</b>	23
<b>2.2 Objetivos del proyecto</b>	26
III. METODOLOGÍA	
<b>3.1 Crecimiento de plantas</b>	27

<b>3.2 Elicitor de levadura y <i>Pseudomonas syringae</i></b>	27
<b>3.3 Otros tratamientos</b>	28
<b>3.4 Protección contra ribonucleasas</b>	29
<b>3.5 Obtención de fitoalexinas</b>	29
<b>3.6 Cuantificación del JA endógeno en hojas infiltradas con Pst</b>	29

#### IV. RESULTADOS

<b>4.1 Resultados: primera parte (artículo)</b>	30
<b>4.2 Resultados: segunda parte</b>	
4.2.1 Cinética de acumulación del ARNm de la ACCasa en respuesta JA en cultivos de células en suspensión de frijol	31
4.2.2 Secuencia y <i>Southern blot</i> del fragmento de 1.2 kb obtenido por RT-PCR	33
4.2.3 Expresión órgano específica de la ACCasa y la ChS	35
4.2.4 Acumulación del ARNm de la ACCasa en respuesta a herida y ABA	36
4.2.5 Papel del etileno en la regulación del gen de la ACCasa	38
4.2.6 Acumulación de fitoalexinas en respuesta a Pst y JA	40
4.2.7 Cuantificación de JA en hojas infiltradas con Pst	41

#### V. DISCUSIÓN

<b>5.1 Expresión de la ACCasa y la ChS en respuesta a estrés</b>	43
<b>5.2 Participación de las oxilipinas en la respuesta a patógenos</b>	44
<b>5.3 Acumulación de fitoalexinas</b>	47
<b>5.4 Otros fitorreguladores involucrados en la expresión de la ACCasa</b>	48

#### VI. CONCLUSIONES

#### VII. PERSPECTIVAS

#### VIII. BIBLIOGRAFÍA

## RESUMEN

Las plantas contienen con el estrés ambiental induciendo diferentes mecanismos de defensa. En el laboratorio estamos interesados en estudiar la respuesta a nivel molecular de la planta al ataque por patógenos o a la herida mecánica. Para ello, decidimos buscar en un inicio genes que se indujeran en un cultivo de células en suspensión de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al adicionarle el fitorregulador ácido jasmónico (JA), el cual, es una oxilipina que se le ha implicado en la cadena de transducción de señales que lleva a la inducción de genes de defensa en respuesta a estos tipos de estrés en otras plantas.

Con la técnica del *differential display*, obtuvimos una clona potencialmente inducible por metil jasmonato, cuya secuencia codifica para la enzima acetil CoA carboxilasa (ACCasa) del tipo multifuncional. Esta enzima participa en la vía de los fenilpropanoides para la síntesis de fitoalexinas del tipo flavonoide.

En este trabajo demostramos que el ARN mensajero de la ACCasa se acumula en cultivos de células en suspensión y plantas de frijol en respuesta al JA, a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst) y a un elicitor derivado de levadura, de forma similar a otra enzima de la vía que sintetiza flavonoides, la chalcona sintasa (ChS). Así mismo, damos evidencia de que el ARNm de la ACCasa se acumula por la herida mecánica y por otros fitorreguladores relacionados con el estrés, como el etileno y el ácido abscísico.

Por otra parte, proponemos un modelo en el que alguna oxilipina, así como el etileno, participan como mediadores en la cadena de transducción de señales que inducen los genes de la ACCasa y la ChS, en la respuesta a patógenos.

Nuestros resultados aportan evidencia de que el JA *per se* no es el fitorregulador involucrado en la producción de fitoalexinas flavonoides en la planta de frijol, con base en que no se acumula durante la respuesta hipersensible en presencia de Pst y su adición no promueve la acumulación de las fitoalexinas. La relevancia de este trabajo, es el de abrir otras posibilidad de modelos en la transducción de señales que participan en la inducción de la vía de los fenilpropanoides, diferente a lo establecido en la literatura.



# Molecular characterization of the bean (*Phaseolus vulgaris*) acetyl-CoA carboxylase in response to stress.

## ABSTRACT

In plants, one response to pathogen attack is *de novo* synthesis of a number of small molecular weight molecules called phytoalexins. Jasmonic acid (JA), has been implicated as a mediator during the signal transduction pathway that promotes the expression of the enzymes which produced these compounds.

In this work, we isolated a cDNA fragment of the multifunctional acetyl-CoA carboxylase (ACCase) by differential display using RNA from a bean cell suspension culture treated with methyl-jasmonate (MeJA). This enzyme, is implicated in the phenylpropanoid pathway that produced flavonoid phytoalexins in legumes.

We demonstrated that the ACCase mRNA accumulated in response to MeJA, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* and yeast elicitor. Also it is induced by wounding, abscisic acid and ethephon treatments.

We give evidence that the octadecanoic pathway as well as ethylene are implicated as mediators in the expression of the ACCase and the chalcone synthase genes in response to a pathogen.

We concluded on one hand that the ACCase gene is regulated in a similar manner as other enzymes of the phenylpropanoid pathway in response to stress. On the other hand, JA *per se* might not be the hormone implicated during the signal transduction pathway that promotes the ACCase and the ChS gene expression, because we could not detected its accumulation during the hypersensitive response. Instead, another oxylipin could be participating in the expression of the flavonoid enzymes, since different kind of the octadecanoic pathway inhibitors, reduced both enzymes expression in the presence of Pst.

## ABREVIATURAS

Nota: Las siglas de las abreviaturas en este trabajo, se mantuvieron en el idioma original (inglés o español), dependiendo de su frecuente utilización en vocabulario científico. De ser siglas en inglés, la traducción correspondiente se pone entre paréntesis.

ABA:	abscisic acid (ácido abscísico)
ACCasa:	acetil coenzima A carboxilasa
AOC:	allene oxide cyclase (aleno óxido ciclasa)
AOS:	allene oxide synthase (aleno óxido sintasa)
Asp:	aspirina
<i>avr</i> :	avirulence (avirulencia)
BC:	biotin carboxylase (biotín-carboxilasa)
BCCP:	biotin carboxyl carrier protein (proteína biotinada acarreadora del carboxilo)
C4H:	cinnamic acid 4-hydroxylase (cinamato 4-hidroxilasa)
ChS:	chalcone synthase (chalcona sintasa)
4CL:	4-coumarate: coenzyme A ligase (4-cumarato: coenzima A ligasa)
<i>coil</i> :	coronatine insensitive (insensible a coronatina)
<i>def1</i> :	defenseless (sin defensa)
$\omega$ 3-DES:	-desaturase (-desaturasa)
DES:	divinyl ether synthase (divinil eter sintasa)
DIECA:	diethyldithio-carbamic acid (ácido dietilditio-carbámico)
<i>dnd</i> :	defense with no HR cell death (defensa sin la muerte celular durante la respuesta hipersensible)
<i>ein</i> :	ethylene insensitive (insensible a etileno)
<i>fad</i> :	fatid acid desaturase (desaturasa de ácidos grasos)
Gal:	n-propil galato
HMGR:	3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase (3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A reductasa)
HPL:	hydroperoxide lyase (hidroperóxido liasa)
13-HPLA:	-hydroxyperoxylinolenic acid (ácido 13-hidroxiperoxilínolénico)

HR:	hypersensitive response (respuesta hipersensible)
hrp:	hypersensitive response and pathogenesis (proteínas de la respuesta hipersensible y patogenicidad)
JA:	jasmonic acid (ácido jasmónico)
<i>jar1-1</i> :	jasmonic acid resistant (resistente al ácido jasmónico)
LOX:	lipoxygenase (lipoxigenasa)
MeJA:	methyl jasmonate (metil jasmonato)
NBD:	2,5-norbornadiene (-norbornadieno)
OPC-8:0:	3-oxo-2(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid (ácido 3-oxo-2(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico).
OPDR:	12-oxo-PDA reductase (ácido 12-oxo-fitodienóico reductasa)
<i>pad</i> :	phytoalexin-deficient (deficiente en fitoalexinas)
Pal:	phenylalanine ammonia-lyase (fenilalanina amonio liasa)
PDA:	phytodienoic acid (ácido fitodienóico)
Pin:	proteinase inhibitor (inhibidor de proteasas)
PR:	pathogenesis related (relacionadas con la patogenicidad)
Prx:	piroxicam
PS:	prostaglandin synthase (prostaglandina sintasa)
Pst:	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
R:	resistance (resistencia)
SA:	salicylic acid (ácido salicílico)
SAR:	systemic acquired resistance (resistencia sistémica adquirida)
SHAM:	salicylhydroxamic acid (ácido salicilhidroxámico)
STS:	silver thiosulfate (tiosulfato de plata)
TC:	transcarboxylase complex (complejo de transcarboxilación)
TMV:	tobacco mosaic virus (virus del mosaico del tabaco)
UFC:	unidades formadoras de colonia
VSP:	vegetative storage protein (proteína de almacenamiento vegetativo)

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas así como muchos microorganismos, poseen la capacidad de producir una gran cantidad de compuestos que no participan directamente en las actividades de crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo, funciones a las que se les ha llamado metabolismo primario. Estas moléculas, hasta el momento más de 100 000 identificadas, corresponden a grupos con estructuras químicas diferentes tales como alcaloides, isoprenoides y fenilpropanoides, entre otros. Las vías de síntesis de estos compuestos, se les ha incluido dentro del llamado metabolismo secundario (Heldt H.W., 1997; Wink M., 1999).

Los metabolitos secundarios participan en: a) la defensa de las plantas contra herbívoros, microbios y virus; b) la atracción de polinizadores, animales dispersores de semillas, bacterias simbiotes, organismos predadores de parásitos, etc. y c) la protección contra estreses de tipo físico, como rayos ultravioleta (UV), deficiencias nutricionales, frío, etc. (Wink M., 1999).

En las plantas, la regulación de la producción de estos compuestos es muy compleja y está determinada en espacio y tiempo. Inclusive, las diferentes familias vegetales se han especializado en producir cierto tipo de compuestos de defensa que pueden llegar a variar entre individuos debido a otros fenómenos ambientales.

Como se mencionó, los metabolitos secundarios son parte de los complejos sistemas de defensa de las plantas que les permiten contender con el estrés ambiental. Los fitorreguladores tienen un papel primordial en la inducción de éstos mecanismos, sin embargo, el estudio de todos ellos y sus interrelaciones en conjunto no es posible de llevarse a cabo. En este capítulo, describiré principalmente el papel del ácido jasmónico tanto en el desarrollo, como en la defensa de las plantas en respuesta a dos

tipos de estrés, la herida mecánica y el ataque por patógenos. Así mismo, describiré brevemente a los flavonoides, un tipo de compuesto de defensa que producen las leguminosas y las enzimas que participan en su síntesis.

## 1.1 El ácido jasmónico

### 1.1.1 Descubrimiento y funciones en el desarrollo de la planta:

Los fitorreguladores u hormonas vegetales son compuestos orgánicos biológicamente activos a bajas concentraciones que participan en procesos fisiológicos de la planta, tales como el crecimiento y el desarrollo. Algunas de estas hormonas como las auxinas, giberelinas, citocininas y el ácido abscísico (ABA), han sido caracterizadas a lo largo de 50 años. Más recientemente, se han aislado muchos otros compuestos que también han sido clasificados como hormonas vegetales tales como los jasmonatos, brasinoesteroides, el etileno y el ácido salicílico (Creelman R. y J. Mullet, 1997).

El ácido jasmónico (JA), cuya fórmula es: 3-oxo-2-[2'-cis-pentil]-ciclopentano-1-acetato y su metil éster (MeJA), son compuestos ciclopentanos derivados del ácido linolénico (18:3). El MeJA es conocido desde 1967 como el componente odorífero de la esencia del jazmín (*Jasmonium grandiforum*) y en 1971, el jasmónico libre fue aislado por primera vez a partir de un cultivo del hongo *Lasiodiplodia theobromae*, como un inhibidor del crecimiento de las plantas (Meyer A. y col., 1984; Ueda J. y K. Miyamoto, 1994). Diferentes estudios han demostrado que el JA está ampliamente distribuido en el reino vegetal y se le ha encontrado preferencialmente en los órganos jóvenes de las plantas (Meyer A. y col., 1984; León J. y J. Sánchez-Serrano, 1999).

Al ácido jasmónico se le ha relacionado con muchas funciones en el desarrollo de la planta especialmente por su efecto cuando es agregado exógenamente (Tabla I).

Tabla I: Efectos de los jasmonatos en procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas.

Crecimiento longitudinal de la plántula	inhibición
Crecimiento de la raíz	inhibición
Crecimiento de micorrizas	inhibición
Crecimiento/diferenciación de cultivos celulares	inhibición/estimulación
Embriogénesis	inhibición
Formación de raíces adventicias	estimulación
Germinación de semillas	inhibición
Rompimiento de la dormancia	promoción
Germinación del polen	estimulación/inhibición
Formación de botones florales	inhibición
Maduración del fruto	promoción
Senescencia del pericarpio	promoción
Senescencia de la hoja	promoción
Abscisión de la hoja	promoción
Formación del tubérculo	promoción
Enroscamiento de zarcillos	inducción
Cerrado de estomas	promoción
Disrupción de microtúbulos	inducción
Biosíntesis de carotenoides	inhibición
Degradación de clorofila	promoción
Biosíntesis de Rubisco	inhibición
Actividades fotosintéticas	inhibición
Respiración	promoción
Biosíntesis de etileno	estimulación
Síntesis de proteínas de defensa (Pin, Lox, Pal, ChS, VSP, etc.)	inducción/promoción

(Sembdner G. y B. Parthier, 1993; Creelman R. y J. Mullet, 1995; Creelman R. y J. Mullet, 1997). Sin embargo, la producción del polen viable es el único proceso del desarrollo de la planta (fenotípicamente visible) donde se ha demostrado la participación directa del JA. El análisis de plantas mutantes de *Arabidopsis* insensibles a JA como *coil* o plantas que no biosintetizan JA, como la triple mutante *fad3-2 fad7-2 fad8* se observó que son macho estériles y en ésta última, el efecto de

la mutación es reversible por la adición exógena de JA (Feys B. J. F. y col., 1994; McConn M. y J. Browse, 1996).

### 1.1.2 Biosíntesis de oxilipinas:

La vía de octadecanoides como se le llama a la vía de síntesis del JA, comienza con la liberación del ácido linolénico (18:3) de las membranas por una fosfolipasa posiblemente del tipo  $A_2$ . El ácido linolénico, es convertido a 13-hidroxiperoxilínolénico (13-HPLA) por la acción de una 13-lipoxigenasa (13-LOX). Este es sustrato de la aleno óxido sintasa (AOS) que produce un intermediario inestable que es convertido por la aleno óxido ciclasa (AOC) al ácido 12-oxo-fitodienónico (12-oxo-PDA). 12-oxo-PDA es saturado en el doble enlace entre los carbonos 10,11 por la 12-oxo-PDA-10,11-reductasa (OPDR) para dar el ácido 3-oxo-2(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanónico (OPC-8:0), que finalmente pasa por tres ciclos de  $\beta$ -oxidación para dar el ácido jasmónico (Vick B. A. y D.C. Zimmerman, 1984).

Las enzimas que participan en la biosíntesis del JA se han aislado y caracterizado. Existen diferentes tipos de lipoxigenasas localizadas en cloroplasto, vacuola o citoplasma, pero sólo de la cloroplástica se tiene evidencia directa de que participa en la síntesis de JA. Al hacer plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el gene *AtLOX2*, el cuál tiene un péptido característico de transporte a cloroplasto, una de ellas que presentó co-supresión, no incrementaba sus niveles de JA en respuesta a herida, sin embargo, los niveles basales de la hormona no se veían afectados (Bell E. y col., 1995). A este respecto existen dos posibles explicaciones, una es que la co-supresión no funcionara al 100%, la otra, es que existan más LOX que participen en la síntesis de JA. En el banco de secuencias se ha reportado recientemente la existencia de otra LOX cloroplástica (número de acceso AJ249794). Los cDNAs correspondientes a AOS que se han aislado de *Arabidopsis* y lino, presentan una

secuencia amino terminal con características de un péptido de tránsito plastídico (Song W.C. y col., 1993; Laudert D. y col., 1996). Plantas transgénicas de papa que sobre-expresan AOS, tienen niveles más elevados de JA, lo que una vez más indica que la primera parte de la síntesis de JA se lleva a cabo en el cloroplasto (Harms H. y col., 1995). La AOC fue recientemente clonada y al igual que la AOS se localiza en el cloroplasto (Ziegler J. y col., 2000). Debido a que el producto de la AOS es muy inestable, se piensa que estas dos enzimas se encuentran asociadas (León J. y J. J. Sánchez-Serrano, 1999).

Por otra parte, la enzima OPDR purificada de un cultivo de *Corydalis sempervirens* y el ADNc de Arabidopsis, revelaron que es una proteína que se localiza en el citoplasma (Schaller F. y E.W. Weiler, 1997a; Schaller F. y E.W. Weiler, 1997b). Por último, los ciclos de  $\beta$ -oxidación muy posiblemente se den en los peroxisomas ya que son los organelos especializados para llevar a cabo la degradación de ácidos grasos. Con estas evidencias, se ha postulado que la síntesis de JA involucra al menos tres subcompartimentos celulares: el cloroplasto, el citoplasma y los peroxisomas (fig. 1).



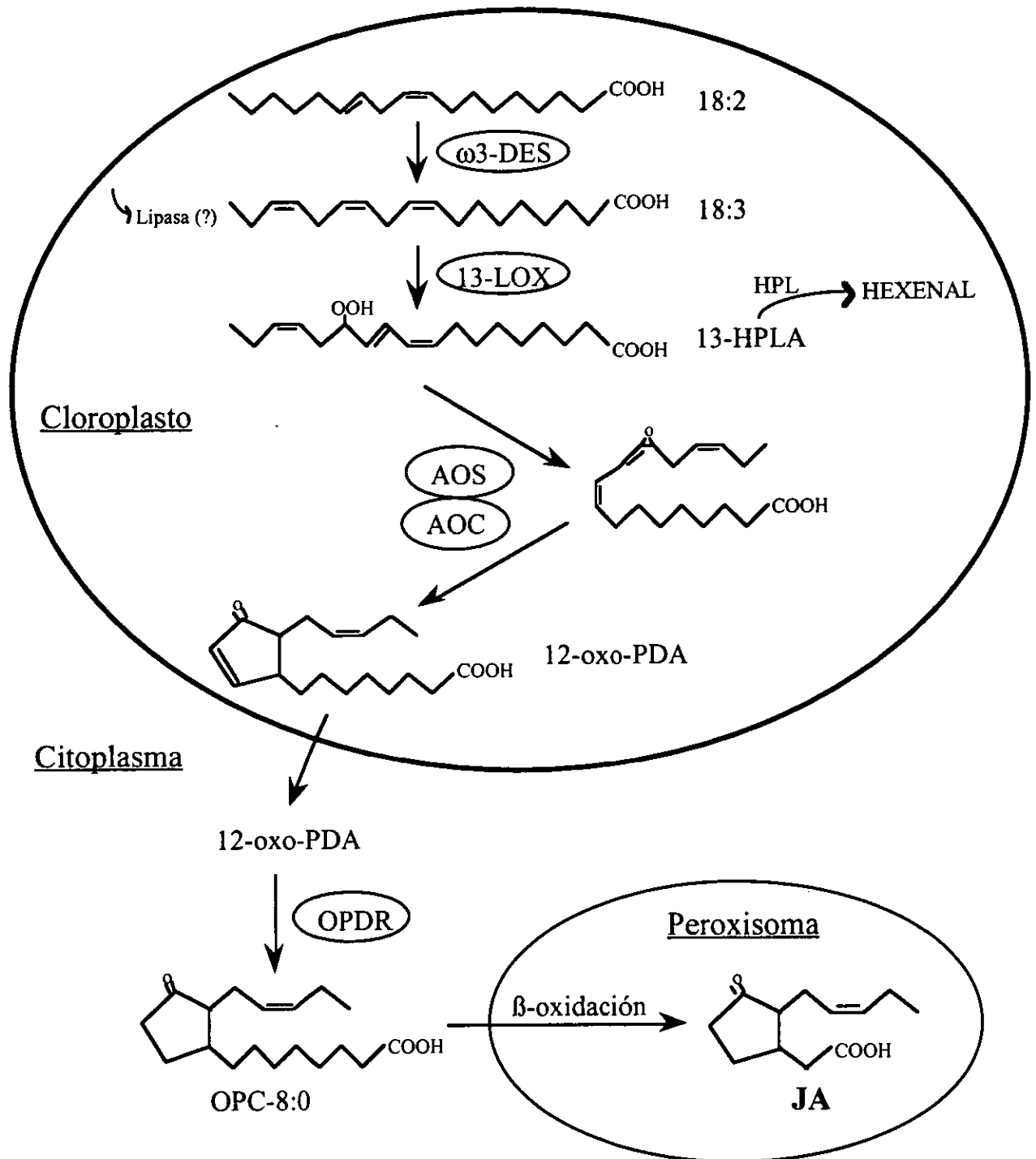


Fig. 1: Esquema de la biosíntesis del ácido jasmónico donde se muestran los organelos celulares donde se lleva a cabo (León J. y J. J. Sánchez-Serrano, 1999). La descripción de la figura está en el texto.

Es de hacerse notar, que el JA no es el único producto de la vía de los octadecanoides con actividad biológica. Actualmente se sabe, que el 13-HPLA se puede fragmentar por la acción de una hidroperóxido liasa (HPL) para dar aldehídos volátiles que activan genes de defensa, o puede actuar una peroxidasa (POX) y una reductasa para dar ácidos grasos hidroxipoli-insaturados, que tienen actividad antimicrobiana. Ácidos grasos vinil eter poli-insaturados derivados también del 13-HPLA, como el ácido colnelénico (que se induce durante la infección con un patógeno), son sintetizados por la divinil-eter sintasa (DES). Por último, se ha demostrado que el 12-oxo-PDA, producto de la acción de la AOS y la AOC, participa en la inducción del metabolismo secundario por sí mismo. A este conjunto de compuestos junto con el JA, se les denomina oxilipinas (fig. 2), (Blechert S. y col., 1995; Bate N. J. y S.J. Rothstein, 1998; Weichert H. y col., 1999).

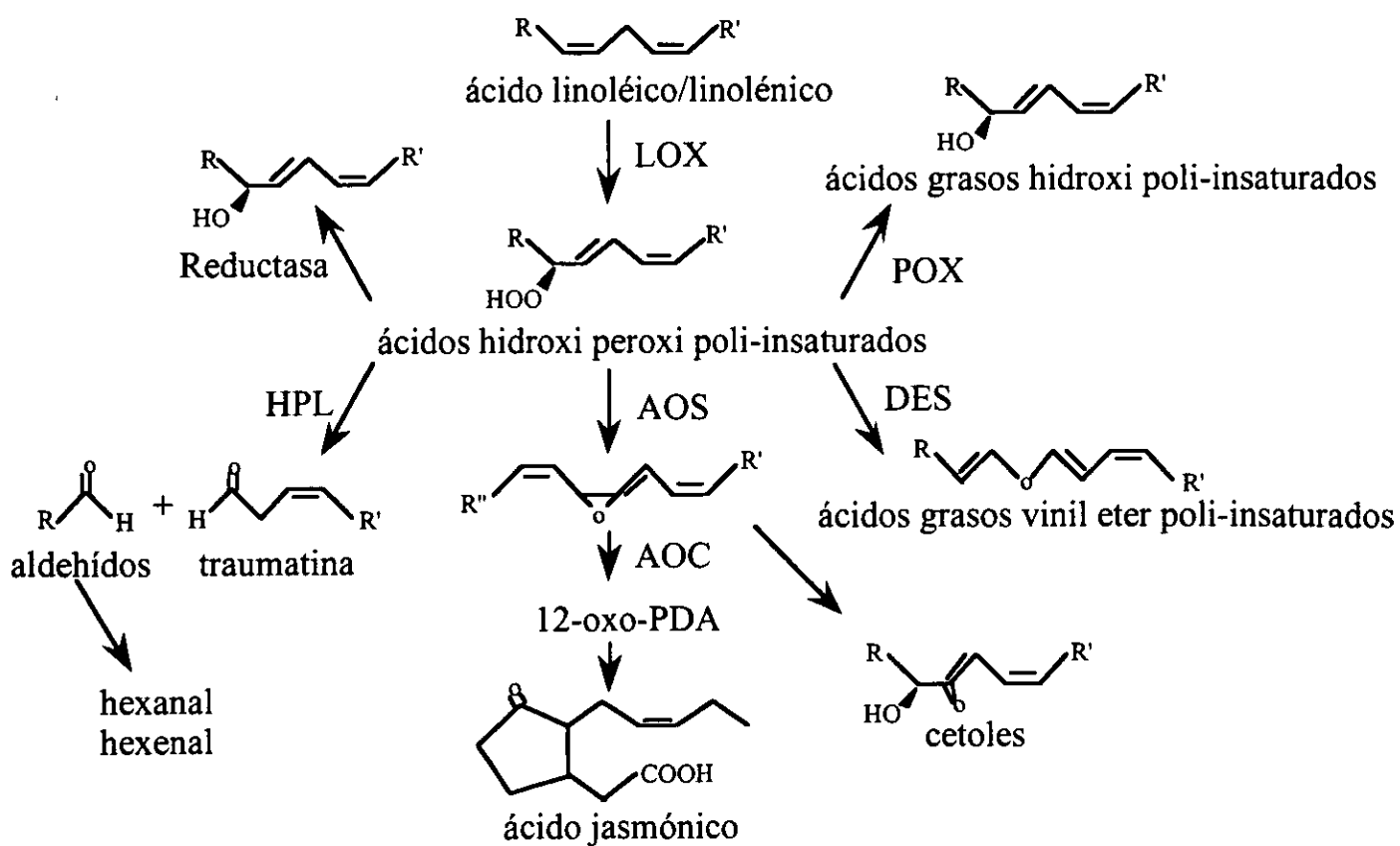


Fig. 2: Conjunto de oxilipinas derivadas de ácidos hidroxiperoxi poli-insaturados. Ver descripción en el texto.

### 1.1.3 Analogía entre la síntesis del JA en plantas y la síntesis de prostaglandinas en animales:

En animales al igual que en plantas se sintetizan hormonas derivadas de ácidos grasos poli-insaturados llamados eicosanoides. Las prostaglandinas y los leucotrienos, implicadas entre otras cosas en las respuestas inflamatorias ante lesiones o infecciones, se sintetizan a partir del ácido araquidónico (20:4) por la acción de la prostaglandina sintasa (PS) o una lipoxigenasa (LOX), respectivamente (Stryer L., 1988). A pesar de que las plantas no sintetizan ácido araquidónico, existe un elevado parecido estructural entre el JA y sus precursores con estos eicosanoides (Bergey D.R. y col., 1996). Inclusive, se ha demostrado que las lipoxigenasas de las plantas pueden aceptar como substrato al ácido araquidónico y que tanto la actividad de LOX como de AOS pueden inhibirse por compuestos que afectan a sus análogos en mamíferos tales como: el piroxicam (Prx), ZK 139817, SHAM, la aspirina (Asp), el ácido salicílico (SA) y el n-propilgalato (Gal) (fig. 3), (Peña-Cortés H. y col., 1993).

Por lo antes descrito, se ha postulado que la vía de octadecanoides y la vía de eicosanoides pudieran haber tenido un ancestro común anterior a la diversificación entre plantas y animales, o bien que su similitud es producto de una convergencia evolutiva (Bergey D.R. y col., 1996; Wasternack C. y B. Parthier, 1997).

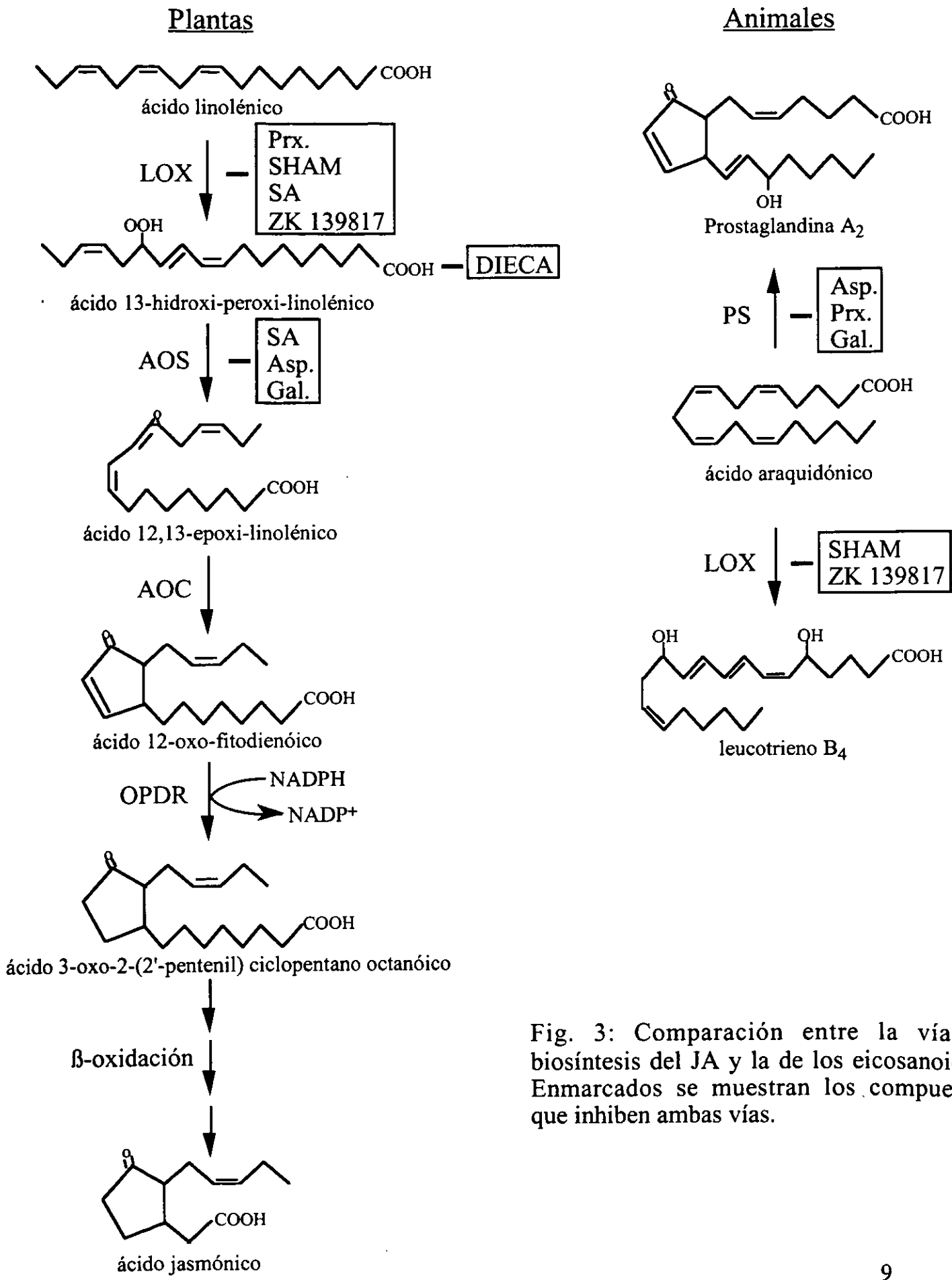


Fig. 3: Comparación entre la vía de biosíntesis del JA y la de los eicosanoides. Enmarcados se muestran los compuestos que inhiben ambas vías.

#### 1.1.4 Participación del JA y su interacción con otros fitorreguladores en la respuesta a herida:

Las plantas responden al ataque de herbívoros y a la herida mecánica induciendo genes que codifican para proteínas: *i*) propiamente de defensa; inhibidores de serina, cisteína y aspartil proteinasas y la polifenol oxidasa. Estas proteínas, interactúan con proteínas y proteinasas del tracto digestivo de herbívoros afectando de esta forma la proteólisis de la comida ingerida y retardando así, el crecimiento y desarrollo de éstos. *ii*) Proteínas que participan en la transducción de señales para contrarrestar el ataque, como pro-sisteminina, lipoxigenasas, calmodulina y cinasas. *iii*) Proteínas asociadas con proteólisis; leucina aminopeptidasas, carboxipeptidasas, cisteína y aspartil proteinasas y ubiquitinasas y *iv*) otras proteínas como las asociadas con la síntesis de fenilpropanoides, una treonin desaminasa y otras de función aún desconocida (Bergey D.R. y col., 1996).

Existen claras evidencias de que el JA participa en la transducción de señales que lleva a la inducción de los genes antes mencionados. Por una parte, la adición exógena de este fitorregulador induce la acumulación de sus transcritos (Farmer E. E. y C. A. Ryan, 1990). Por otra parte, los niveles endógenos del fitorregulador, así como los del precursor ácido linolénico y el intermediario PDA se incrementan en respuesta a herida y correlacionan con la activación de genes de defensa y la producción de metabolitos secundarios como la nicotina en tabaco (Albretch T. y col., 1993; Conconi A. y col., 1996; Baldwin I.T. y col., 1997). Más aún, la adición de inhibidores de la síntesis de JA evita la expresión del gene que codifica para el inhibidor de la serina proteínasa (*pin2*) en respuesta a herida (Peña-Cortés H. y col., 1993).

Con la generación de plantas mutantes, se observó que *def1*, una planta de tomate afectada en la biosíntesis de JA presentaba niveles muy disminuídos de los transcritos de genes de defensa y a su vez, el doble y hasta el triple de aumento en el

peso y tamaño de las larvas de *Manduca sexta* que comieron de estas plantas con respecto a las plantas silvestres (Howe G.A. y col., 1996). La triple mutante en desaturasas *fad3-2 fad7-2 fad8* de *Arabidopsis* incapaz de producir JA, muere a causa del daño causado por las larvas de la mosquita *Bradysia impatiens*, en comparación con las plantas silvestres donde la larva no tiene un efecto significativo (McConn M. y col., 1997).

Sin embargo, JA no es el único fitorregulador que participa en la respuesta a herida. En plantas solanáceas como tomate y papa, la sistemina, una hormona de origen peptídico y el ABA, se encuentran por arriba del JA en la línea de transducción de señales que lleva a la inducción de los genes de defensa. De esta forma, plantas insesibles a ABA, son incapaces de inducir *pin2* al herirlas o agregarles sistemina, pero el efecto es revertido al añadirles JA (Hildman T. y col., 1992; Peña-Cortés H. y col., 1995). Tanto la herida como el JA inducen la síntesis de etileno en tomate y se ha demostrado que los dos de forma conjunta, participan en la expresión de *pin2* (O'Donnell P.J. y col., 1996; Sivasankar S. y col., 2000).

En *Arabidopsis*, se han aislado dos diferentes conjuntos de genes que se expresan en respuesta a herida: uno cuya vía de señalización interviene JA y otro en el que participan oligosacáridos derivados de la pared celular. Este último grupo se expresa en la planta insensible a JA *coil*, por efecto de dicho estrés. Así mismo, existe una comunicación cruzada entre estas vías, ya que los oligosacáridos inducen la producción de etileno el cual, a diferencia de los que sucede en tomate, inhibe la expresión de los genes de defensa inducidos por la vía de JA (Titarenko E. y col., 1997; Rojo E. y col., 1999).

Posiblemente existan otras vías de señalización en respuesta a herida en las que participe etileno independientemente de JA, ya que hay muchos genes que se sabe se expresan tanto por herida como por etileno, pero no se ha analizado qué otros factores participan en las cadenas de transducción de señales.

### 1.1.5 Participación del JA en la respuesta a patógenos y elicitores:

Las respuestas de las plantas al ataque de bacterias, hongos y virus son muy diversas y complejas. Al JA se le ha implicado principalmente como mediador en un tipo de respuesta general en el que se inducen proteínas de defensa y metabolitos secundarios, llamados fitoalexinas (ver 1.2.2). Existen diversas evidencias que apoyan esto.

Por una parte, la adición del jasmónico o su precursor PDA inducen la acumulación de diferentes tipos de fitoalexinas, tales como: terpenoides, flavonoides, antraquinonas y alcaloides en más de 36 especies de plantas probadas en cultivo de tejidos (Gundlach H. y col., 1992). Por citar algunos ejemplos, la adición de metil jasmonato (MeJA) a cultivos de: *Nicotiana tabacum*, conlleva la producción de las cumarinas escopoletina y escopolina (Sharan M y col., 1998); en *Oryza sativa* a la síntesis de momilactona A (Nojiri H. y col., 1996) y en *Catharanthus roseus* a la acumulación del alcaloide ajmalicina (Gantet P. y col., 1998). Así mismo, plántulas de soya (*Glycine max*) tratadas con MeJA acumulan antocianinas (Franceschi V. R. y H. D. Grimes, 1991).

Por otra parte, se ha demostrado que los cultivos de células en suspensión de especies pertenecientes a diferentes subdivisiones taxonómicas, por ejemplo: *Taxus baccata* (gimnosperma), *Agrostis tenuis* (monocotiledonia) y *Phaseolus vulgaris*, *Eschscholtzia californica* y *Rauvolfia canescens* (dicotiledonias), incrementan la concentración del JA endógeno en respuesta a un elicitador obtenido de extracto de levadura (Gundlach H. y col., 1992; Mueller M. J. y col., 1993). Además, células en suspensión de tabaco tratadas con un elicitador (ver 1.2.2) derivado de *Phytophthora parasitica*, así como las plantas de tabaco inoculadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* promueven la acumulación de JA (Rickauer M. y col., 1997; Kenton P. y col., 1999). Inclusive, se ha visto que los ARN mensajeros de LOX en tabaco y AOS en Arabidopsis, se acumulan en respuesta a *Phytophthora*

*parasitica* y *Erwinia carotovora*, respectivamente (Véronési C. y col., 1996; Norman C. y col., 1999).

Ambos fenómenos anteriormente descritos, la inducción de fitoalexinas por la adición de JA y la acumulación de JA en respuesta a elicitores y patógenos han sido asociados para establecer que el JA es uno de los mediadores en la respuesta a este tipo de estrés. Se determinó que únicamente aquellos elicitores que inducían la acumulación de JA en cultivos de células de *Eschscholtzia californica*, podían hacer que el cultivo acumulara posteriormente alcaloides y no así, los que no elevaban la concentración de JA (Mueller M. J. y col., 1993). En cultivos de *Oryza sativa* y *Catharanthus roseus* la utilización de inhibidores de la síntesis de JA, disminuye drásticamente la acumulación de fitoalexinas en respuesta a elicitores (Nojiri H. y col., 1996; Gantet P. y col., 1998).

El JA exógeno induce la acumulación de ARN mensajeros que codifican para proteínas de defensa contra microorganismos tales como: glucanasas, quitinasas, defensinas, proteínas ricas en hidroxiprolina, etc. (Rickauer M. y col., 1997; Thomma B. P. H. J. y col., 1998). Así mismo, el JA induce a las proteínas involucradas en la síntesis de fitoalexinas como: la fenilalanina amonio liasa (Pal), la 4-cumarato:CoA ligasa (4CL), la chalcona sintasa (ChS) y la bergaptol metiltransferasa, proteínas que participan en la síntesis de fenilpropanoides (ver sección 1.2.3), (Gundlach H. y col., 1992; Ellard-Ivey M. y C. J. Douglas, 1996); la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), proteína que interviene en la síntesis de isoprenoides (Choi D. y col., 1994) y la *berberine bridge enzyme* que participa en la síntesis de alcaloides (Blechert S. y col., 1995).

Al igual que sucede en respuesta herida, la acumulación del ARNm de algunas de estas proteínas (Pal, 4CL y una glucanasa) en respuesta a un elicitore, disminuye al utilizar inhibidores de la lipoxigenasa, lo que confirma que el JA o alguna otra



oxilipina participa al menos parcialmente, en la inducción de dichos genes (Ellard-Ivey M. y C. J. Douglas, 1996; Rickauer M. y col., 1997).

Por último, se ha observado que plantas mutantes en la síntesis o percepción del JA *fad3-2 fad7-2 fad8* y *jar1-1* respectivamente, son más susceptibles al hongo de suelo del género *Pythium* (Staswick P. y col., 1998; Vijayan P. y col., 1998) así como la mutante *coi1-1*, que es más sensible al ataque de los hongos *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinerea* que las plantas silvestres (Thomma B. P. H. J. y col., 1998). Por lo tanto, en ciertas interacciones con patógenos, el JA está involucrado en la respuesta de defensa de la planta.

A pesar de la amplia evidencia que existe sobre la participación de JA en este tipo de respuesta a estrés, también existen datos que sugieren que en algunas interacciones planta-patógeno, el JA no está involucrado. Por ejemplo: cebada y arroz al ser expuestos a los hongos *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* y *Magnaporthe grisea* respectivamente, no tienen un incremento en la acumulación endógena de JA (Hause B. y col., 1997; Schweizer y col., 1997). El que JA no participe en estas interacciones no descarta que en estas mismas plantas esté involucrado en la defensa contra otros patógenos. Arabidopsis por ejemplo, requiere de la acumulación de JA para defenderse de *Botrytis cinerea* pero no para contender con *Peronospora parasitica*, por lo que es posible que la inducción de JA sea específica de la interacción planta-patógeno que se establezca (Thomma B. P. H. J. y col., 1998).

Es claro, que existen otras moléculas involucradas en la transducción de señales que participan en la respuesta de defensa contra patógenos, como se explica en la siguiente sección.

#### 1.1.6 Interacción del JA con otros fitorreguladores en la respuesta a patógenos:

La participación del ácido salicílico (SA) y el etileno en las respuestas de defensa de la planta ante el ataque de patógenos, están ampliamente documentadas.

El primero, está directamente implicado en la respuesta sistémica adquirida (SAR) que confiere "inmunidad" a la planta contra sucesivos ataques de otros patógenos (Ward E. R. y col., 1991). El etileno por su parte, tiene un efecto en la expresión de genes de defensa y proteínas involucradas en la producción de fitoalexinas (Ecker J. R. y R. W. Davis, 1987). Plantas mutantes en una u otra vía de señalización son capaces de activar genes de defensa en respuesta al otro fitorregulador.

El JA exógeno, es un inductor de la síntesis de etileno (O'Donnell P. J. y col., 1996), por lo que originalmente se postuló que éste se encontraría por debajo del JA en la cadena de transducción de señales. Posteriormente, la mutante de *Arabidopsis* en JA *coil* y la mutante en etileno *ein2-1* son capaces de sintetizar etileno y JA respectivamente en respuesta a la inoculación con *Alternaria brassicicola*, con lo que se demostró que su biosíntesis no depende el uno del otro. Sin embargo, se ha observado que se requiere de ambas vías intactas para la inducción de al menos un gene que codifica para una defensina (*PDF1.2*) en respuesta a *A. brassicicola*, ya que estas mismas mutantes no pueden inducir su expresión aún adicionando uno u otro fitorregulador. Con estas evidencias se ha establecido un modelo en el que JA y etileno actúan de forma paralela y sinérgica en la expresión de genes de defensa (Penninckx I. A. M. A. y col., 1998; Alonso J. M. y col., 1999).

La interrelación del SA con el JA no ha quedado clara. Por una parte, se piensa que el SA es un antagonista del JA debido a que la adición de SA inhibe tanto la producción de JA como su efecto (Peña-Cortés H. y col., 1993; Doares S. H. y col., 1995; Sivasankar S. y col., 2000). Además, la sobre expresión de la proteína Pal en tabaco y por lo tanto de la producción de SA, conduce a una mayor resistencia de estas plantas al virus del mosaico del tabaco (TMV), pero también, a una mayor sensibilidad a larvas de *Heliothis virescens*. Cuando se suprime la producción de Pal se ve el efecto contrario. Como el JA participa en la respuesta de defensa a

herbívoros, es posible que el incremento o decremento de SA regule la acción del JA (Felton G. W. y col., 1999).

Por otra parte, se ha visto que ambos fitorreguladores y los genes de defensa que son inducidos por JA o SA, pueden coexistir en *Arabidopsis* al ser atacada por el hongo *Alternaria brassicicola* (Penninckx I. A. M. A. y col., 1996; Thomma B. P. H. J. y col., 1998). Inclusive se ha observado que la inducción de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) por SA o por etileno, puede incrementarse si uno u otro de estos fitorreguladores se adiciona en combinación con JA (Xu Y. y col., 1994). Esto nos indica, que los procesos de defensa son muy complejos y que las posibilidades combinatorias de estos fitorreguladores pueden variar dependiendo de relación planta-microorganismo de la que se trate.

## **1.2 Respuesta de defensa de las plantas al ataque de microorganismos**

### **1.2.1 La respuesta hipersensible:**

Las plantas reconocen y resisten a muchos de los fitopatógenos invasores induciendo una respuesta de defensa rápida llamada, respuesta hipersensible (HR). La HR resulta en la muerte celular localizada en el sitio de la infección, lo que impide el avance de los patógenos (Baker B. y col., 1997). Se ha establecido, que la HR es un tipo de muerte celular programada que responde a la interacción gene a gene entre planta y microorganismo (Greenberg J. T., 1996). Es decir, a un gene de avirulencia (*avr*) del patógeno corresponde un gene de resistencia (R) de la planta y sólo cuando existe interacción entre ambos se establece la HR; en el caso contrario, cuando falta alguna de las partes, entonces avanza la infección. Por ejemplo, las plantas de tomate que tienen el gene R llamado *Cf9*, son resistentes específicamente a las razas del hongo *Cladosporium fulvum* que tienen el gene *avr9* (Staskawicz B. J. y col., 1995).

La función primaria de los genes *avr* no es la de inducir la respuesta de defensa en la planta. Por el contrario, posiblemente sean importantes para la adaptación y/o patogenicidad de la bacteria y pueden actuar como genes de virulencia cuando no exista el gene R en el hospedero, en este sentido, plantas y patógenos han coevolucionado (Yang y col., 1997). Sin embargo en plantas resistentes, el producto de los genes *avr* funciona como un elicitor (ver sección 1.2.2). Todos los genes *avr* bacterianos aislados hasta el momento son dependientes de los genes *hrp* que codifican para el sistema de secreción tipo III que utiliza el patógeno para translocar al elicitor a la célula vegetal. La excepción es el gene *avrD* de *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* que codifica para una proteína que participa en la síntesis de elicitores siringolípidos y que no requiere de *hrp* para inducir la HR en plantas (He S. Y., 1996; Baker B. y col., 1997).

De los genes de resistencia aislados hasta el momento, todos son receptores membranales o intracelulares. Todos (excepto Pto) tienen en común la presencia de secuencias repetidas ricas en leucina, adicionalmente existen subgrupos: Pto y Xa-21 funcionan como proteín-quinasas; los receptores citoplásmicos tienen además un sitio de unión a un nucleótido posiblemente GTP o ATP; otros tienen un *zipper* de leucina en el amino terminal o bien un dominio similar a Toll o interleucina 1 de *Drosophila* y mamífero respectivamente (Parker J. E. y M. J. Coleman, 1997).

Una vez que interactúan *avr-R*, se desencadenan diversos procesos celulares durante la HR. Aún no queda claro si la muerte celular es causa o consecuencia de muchos de ellos. Uno de los acontecimientos más rápidos, es la producción de especies reactivas de oxígeno ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ), acompañado de modificaciones en las actividades de la ATPasa de calcio y de protones, así como la apertura de canales iónicos (Blumwald E. y col., 1998). A continuación, se fortalece la pared celular, se incrementan los niveles de las hormonas como SA y JA, se inducen genes de defensa (PR) y proteínas que participan en la síntesis de fitoalexinas (Hammond-Kosack K.

E. y J. D. G. Jones, 1996; McDowell J. M. y J. L. Dangl, 2000). Un ejemplo de la temporalidad de dichos eventos se esquematiza en la figura 4.

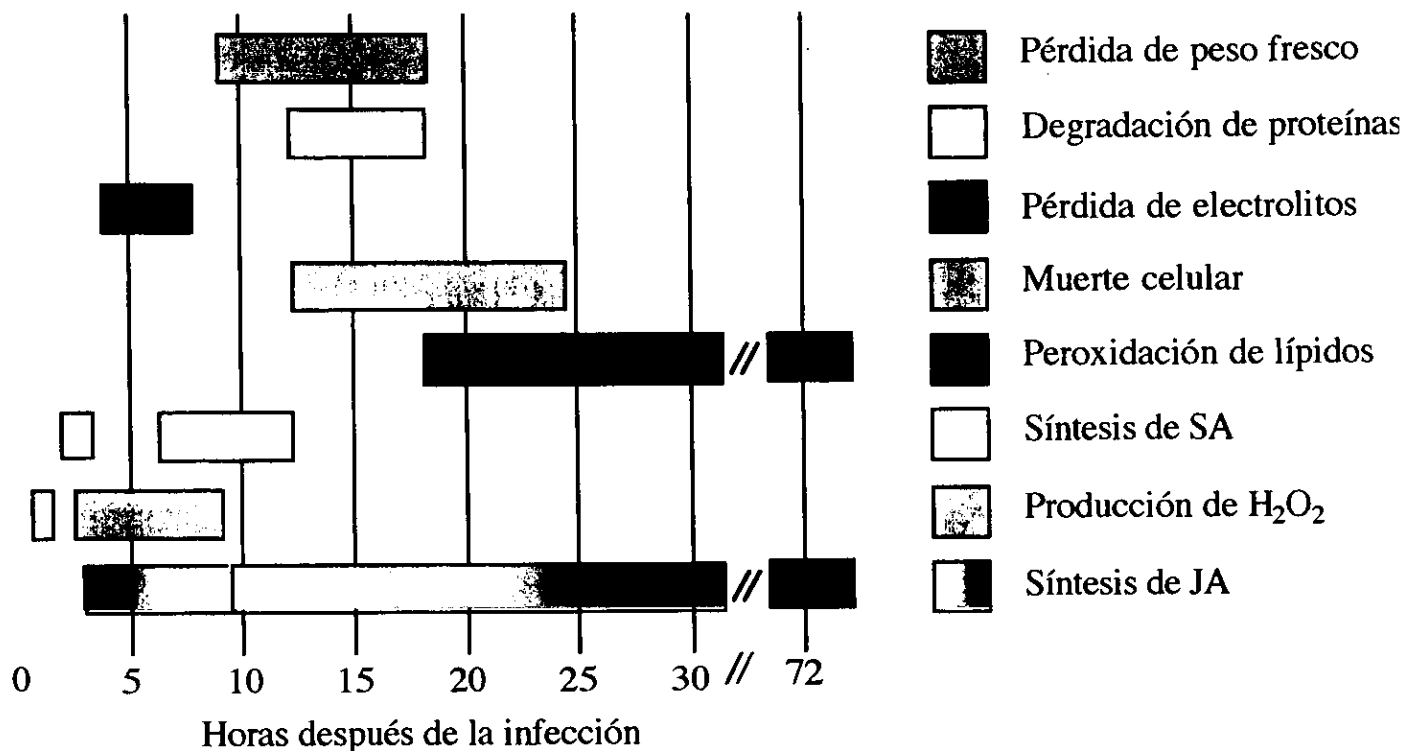


Fig. 4: Temporalidad de eventos que suceden durante la respuesta hipersensible en tabaco (Kenton P. y col., 1999).

Aunque la HR contempla todos los procesos antes mencionados no se sabe exactamente qué es lo que detiene la expansión del patógeno. La muerte celular vegetal correlaciona directamente con el término del crecimiento del patógeno (Naton B. y col., 1996). Sin embargo, la mutante *dnd1* de *Arabidopsis* que no presentan muerte celular al ser atacada con una cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* sintetiza SA, expresa PRs y puede restringir el crecimiento del patógeno (Yu y col., 1998). Por otra parte, plantas mutantes en la producción de camalexina (*pad*), la fitoalexina más abundante de *Arabidopsis*, son capaces de inducir la HR y contener con el patógeno (Ausubel F. M. y col., 1995). Es posible, que la falta de un

tipo de defensa sea compensada por las otras, como la mutante *dnd1* que tiene una mayor concentración de SA que la planta silvestre.

### 1.2.2 Producción de fitoalexinas en leguminosas:

A las sustancias de defensa producidas en respuesta a una infección, se les llama fitoalexinas (del griego *alekein*, defender). Como se mencionó anteriormente las fitoalexinas provienen de diferentes vías metabólicas y sus estructuras pueden ser tan variadas como isoprenoides, flavonoides o estilbenos. La mayoría de las fitoalexinas actúan como antibióticos contra un espectro amplio de bacterias y hongos. En cada caso, los promotores de la síntesis de un tipo de fitoalexina son "sustancias" distintivas, llamadas *elicitores*. Los elicitores, pueden ser proteínas secretadas por el patógeno para atacar a la planta, por ejemplo: enzimas que degradan la pared celular. En otros casos, pueden ser segmentos de oligosacáridos, productos de la degradación de la pared celular de la planta por la acción del patógeno o por el contrario, fragmentos de la pared celular del microorganismo por acción de enzimas provenientes de la planta. Estos elicitores, se unen a receptores que desencadena la transducción de señales que finalmente induce la transcripción de genes que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de fitoalexinas. Los elicitores, también son causantes de la HR como se mencionó anteriormente (Heldt H. W., 1997).

Las familias vegetales se han especializado en producir ciertos tipos de fitoalexinas, de tal forma que, las especies de la familia Solanaceae sintetizan comúnmente terpenoides, la familia Orchidaceae produce fenantrenos y la familia Fabaceae (o Leguminosae) produce principalmente isoflavonoides (Bell E. A., 1981).

Los isoflavonoides, junto con las chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas componen una clase de compuestos llamados flavonoides. Estos a su

vez, corresponden a uno de los productos de una vía metabólica más amplia conocidos como fenilpropanoides.

Los fenilpropanoides tienen en común que son compuestos derivados de fenilalanina y en su base estructural todos tienen un anillo fenólico con una cadena lateral de propano (C<sub>3</sub>) de ahí que se les diera ese nombre (Heldt H. W., 1997). En la figura 5, se muestra un esquema general de las clases de compuestos derivados de esta vía.

### 1.2.3 La fenilalanina amonio liasa y la chalcona sintasa, enzimas de la vía de fenilpropanoides:

Ebel J. y K. Hahlbrock (1977), dividieron a las enzimas que participan en la vía de fenilpropanoides en dos grupos con base en sus cinéticas de actividad en respuesta a la irradiación con luz blanca (que contenía luz UV) de un cultivo de células en suspensión de perejil. El grupo I, lo conforman la fenilalanina amonio liasa (Pal), la cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y la cumarato-4: CoA ligasa (4CL) que van a dar lugar a la síntesis de compuestos diversos como SA, lignina, cumarinas, etc. El grupo II, corresponde a todas las enzimas que participan en la síntesis de flavonoides. De todas las enzimas que participan en ambos grupos, dos han sido ampliamente estudiadas: la Pal, que cataliza la primera reacción del metabolismo general de fenilpropanoides y la chalcona sintasa (ChS), considerada como la enzima regulatoria de la vía de los flavonoides (Dixon R. A. y N. L. Paiva, 1995).

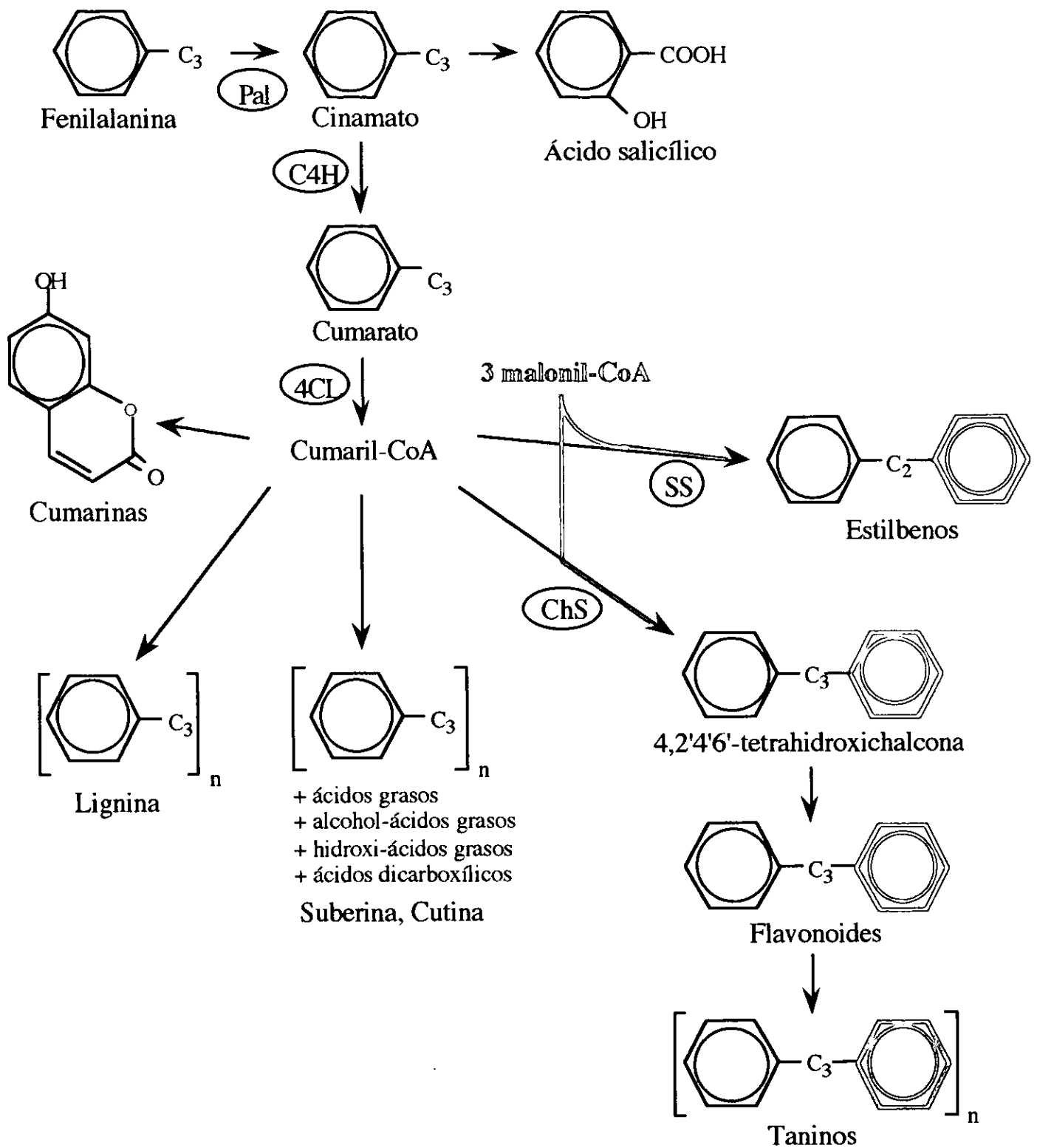


Fig. 5: Esquema de la vía de síntesis de los fenilpropanoides. La chalcona sintasa (ChS) en leguminosas y la estilbeno sintasa (SS) en la vid, requieren de una molécula de cumaril-CoA y de tres moléculas de malonil-CoA (en rojo), para sintetizar los primeros flavonoides y estilbenos respectivamente.



Las enzimas que participan en la síntesis de fenilpropanoides estudiadas hasta al momento, son solubles y durante los procesos de purificación aparecen junto con las proteínas citoplasmáticas. Sin embargo, existe evidencia de que se encuentran asociadas entre ellas formando metabolones que a su vez están unidos a lado externo (Hrazdina G. y col., 1987; Burbulis I. E. y B. Winkel-Shirley, 1999). Se encuentran localizadas en la epidermis de las hojas y son reguladas en forma conjunta en respuesta a estrés. Las enzimas del grupo II, además tienen una clara expresión órgano específica relacionada al requerimiento de flavonoides. Por ejemplo, existe una mayor expresión constitutiva en la raíz y en las flores.

La Pal, está codificada por una familia de genes que va desde 1 a 5 copias por genoma haploide, a excepción de la papa que tiene más de 40. La ChS, también puede variar en número desde 1-9 genes. El frijol tiene 3 genes que codifican para la Pal y 7 para la ChS (Cramer C. L. y col., 1989; Hotter G. S. y col., 1995). La expresión de dichas isoenzimas puede variar según el desarrollo, el órgano y el estímulo, pero muchas veces son redundantes. Se ha visto, que tanto la Pal como la ChS responden a herida y luz UV en todas las familias de plantas estudiadas, pero la ChS no responde a patógenos en Arabidopsis, ya que esta planta no sintetiza fitoalexinas del tipo flavonoide (Kubasek W. L. y col., 1992). Sin embargo, es interesante que plantas transgénicas de tabaco en las que se metió un promotor de la ChS de una leguminosa fusionado al gene de la  $\beta$ -glucoronidasa, éste sí es capaz de responder a un patógeno (Stermer B. A. y col., 1990), lo que quiere decir que existen vías similares de señalización.

Se ha demostrado que existe una relación directa entre la síntesis de fenilpropanoides y una mayor actividad de estas dos enzimas. Así mismo, se ha establecido que el incremento en la actividad es el resultado de la transcripción y traducción de sus mensajeros y no de una modificación post-traducciona, aunque

poco se sabe de su recambio y estabilidad (Edwards K. y col., 1985; Reinold S. y K. Hahlbrock, 1996).

Existen diferencias en las cinéticas de acumulación de los ARN mensajeros de Pal y ChS dependiendo de la interacción planta-patógeno que se establezca. En una interacción incompatible, su inducción es más rápida que en la interacción compatible, lo que posiblemente permite que se extienda la infección, en esta última (Bell J. N. y col., 1986). Sin embargo, también pueden inducirse aún en la ausencia de HR o incluso por bacterias no fitopatógenas, por lo que se considera que la inducción de estos genes corresponde a un mecanismo general de defensa (Jakobek J. L. y P. B. Lindgren, 1993).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 La enzima acetil CoA carboxilasa

Como se mencionó en la introducción, el JA tiene un papel importante en los procesos de defensa de la plantas, particularmente en la inducción de proteínas de defensa o que participan en la síntesis de metabolitos secundarios.

En el laboratorio, estamos interesados en conocer el papel del ácido jasmónico en la vía de transducción de señales en la respuesta a estrés de frijol (*Phaseolus vulgaris*), por lo que en una primera etapa, utilizamos la técnica de *differential display* para buscar genes que se expresaran diferencialmente en un cultivo de células en suspensión al que se le adicionó MeJA.

poco se sabe de su recambio y estabilidad (Edwards K. y col., 1985; Reinold S. y K. Hahlbrock, 1996).

Existen diferencias en las cinéticas de acumulación de los ARN mensajeros de Pal y ChS dependiendo de la interacción planta-patógeno que se establezca. En una interacción incompatible, su inducción es más rápida que en la interacción compatible, lo que posiblemente permite que se extienda la infección, en esta última (Bell J. N. y col., 1986). Sin embargo, también pueden inducirse aún en la ausencia de HR o incluso por bacterias no fitopatógenas, por lo que se considera que la inducción de estos genes corresponde a un mecanismo general de defensa (Jakobek J. L. y P. B. Lindgren, 1993).

## II. ANTECEDENTES

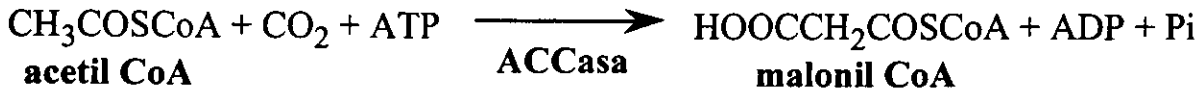
### 2.1 La enzima acetyl CoA carboxilasa

Como se mencionó en la introducción, el JA tiene un papel importante en los procesos de defensa de la plantas, particularmente en la inducción de proteínas de defensa o que participan en la síntesis de metabolitos secundarios.

En el laboratorio, estamos interesados en conocer el papel del ácido jasmónico en la vía de transducción de señales en la respuesta a estrés de frijol (*Phaseolus vulgaris*), por lo que en una primera etapa, utilizamos la técnica de *differential display* para buscar genes que se expresaran diferencialmente en un cultivo de células en suspensión al que se le adicionó MeJA.

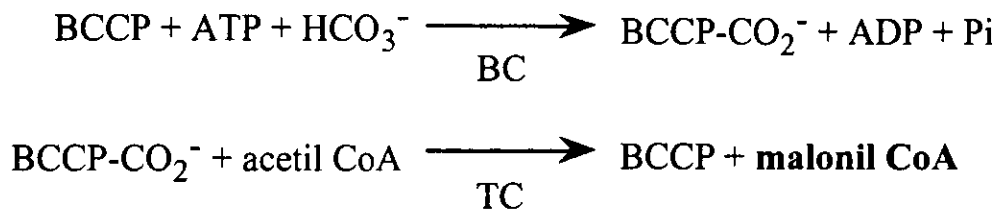
Una de las clonas obtenidas resultó ser el homólogo del gene de la acetil CoA carboxilasa (ACCasa) del tipo eucariótico (ver sección IV, 1a parte).

La ACCasa es una enzima biotinada que cataliza la carboxilación, ATP dependiente, del acetil CoA para sintetizar malonil-CoA.



El malonil-CoA es requerido en todos los organismos para la síntesis de ácidos grasos.

En los organismos procariontes, esta enzima se compone de 4 subunidades disociables: el péptido que une covalentemente la biotina (BCCP), la subunidad que une el CO<sub>2</sub> y carboxila a la biotina (BC) y un complejo de dos subunidades α y β que unen el acetil CoA y lo carboxila para producir malonil CoA (TC). Este proceso se desarrolla en dos reacciones:



(Sasaki, Y. y col., 1995).

La ACCasa de mamíferos, levaduras y otros eucariontes, no es un complejo multipéptidico, sino un solo péptido multifuncional de aproximadamente 250 KDa, que se encuentra igualmente biotinado y que es funcionalmente activo al formar un homodímero de 500 KDa (Sasaki, Y. y col., 1995). En animales, la ACCasa se localiza tanto en el citoplasma donde se sintetizan los ácidos grasos, como en la mitocondria donde regula la degradación de éstos (Abu-Elheiga L. y col., 2000).

En todas las plantas excepto gramíneas, existen los dos tipos de ACCasa. La del tipo procariótico se localiza solamente en el cloroplasto y la del tipo eucariótico, puede estar tanto en el citosol como en el cloroplasto. Durante la evolución de las plantas no solo hubo un desplazamiento de los genes cloroplásticos hacia al núcleo, por ejemplo, únicamente la subunidad  $\beta$ -TC de la ACCasa procariótica se codifica en el genoma del cloroplasto; sino que se dio un desplazamiento de la ACCasa multi-peptídica por la ACCasa multifuncional. En *Brassica napus*, se han encontrado ambos tipos de enzimas en el cloroplasto y las plantas gramíneas carecen de la ACCasa del tipo procariótico y la enzima del tipo eucariótico está presente tanto en el cloroplasto como en el citoplasma (Konishi T. y col., 1996a; Schulte W. y col., 1997).

En animales y levadura, la ACCasa es regulada por fosforilación/desfosforilación, por citrato y por el palmitoil-CoA. En plantas, la ACCasa multifuncional no es regulada por ninguno de ellos (Roesler K. R. y col., 1996).

La síntesis de ácidos grasos en las plantas se lleva a cabo en el cloroplasto, por lo que se le buscaron otras funciones a la ACCasa citosólica. Se descubrió que ésta última produce el malonil-CoA que sirve: en la elongación de ácidos grasos mayores a 18 carbonos, en la malonilación de aminoácidos y glucósidos y en la síntesis de compuestos flavonoides y estilbenos (Dakora F. D. y col., 1993; Konishi T y col., 1996b; Bao X. y col., 1998).

Existen evidencias que apoyan la participación de la ACCasa de tipo eucariótico en la síntesis de flavonoides y su conjugación. Por una parte, se considera que las membranas biológicas son impermeables al malonil CoA y como la ChS necesita de tres moléculas de malonil CoA para sintetizar el primer compuesto flavonoide, se requiere de la ACCasa citosólica para que aporte éste substrato (Yanai, Y. y col., 1995). Por otra parte, esta enzima sólo se localiza en el tejido epidérmico

(Alban C. y col., 1994), al igual que la Pal y la ChS y su ARNm así como la actividad enzimática se incrementan en un cultivo de células en suspensión de alfalfa en respuesta a elicitores (Shorosh, B. y col., 1994).

Desde 1977, Ebel J. y K. Hahlbrock colocaron a la ACCasa eucariótica dentro del grupo II de las enzimas que participan en la vía de fenilpropanoides por su incremento en actividad en respuesta a luz (ver sección 1.2.3) y posteriormente se observó que también existe un aumento en la cantidad de proteína por exposición de plántulas de chícharo a luz UV (Konishi T. y col., 1996b).

Para nosotros resulta importante el estudio de la ACCasa de tipo eucariótico de frijol, ya que las fitoalexinas que se sintetizan en esta planta como respuesta de defensa a estrés, son del tipo flavonoide y en este sentido, la regulación de esta enzima en la que podría estar participando el JA no ha sido estudiada.

## **2.2 Objetivos del proyecto**

- 1) Analizar la expresión de la ACCasa al someter cultivos de células en suspensión y plantas de frijol a estrés.
  
- 2) Conocer el papel que tiene el ácido jasmónico y su relación con otros fitorreguladores posiblemente involucrados en la transducción de señales que regulan la inducción de la ACCasa en frijol.

### III. METODOLOGÍA

A continuación se describirán únicamente las metodologías que no están expuestas en los resultados (1a parte).

#### 3.1 Crecimiento de plantas

Para la realización de este trabajo se utilizaron plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro Jamapa. En algunos casos las plantas fueron crecidas en maceta con vermiculita regadas con solución nutritiva (Somerville C. R. y W. L. Ogren, 1982) al 50% durante 13 días post-embibición (cuando se utilizaron hojas embrionarias), o 23 días (cuando se utilizaron hojas maduras). En otros casos, las plantas se crecieron en un sistema de hidroponía con la misma solución pero al 100% por 23 d. Por último, se utilizó un sistema de crecimiento *in vitro*, donde las plantas se desarrollan en condiciones estériles en medio MS, por 10 días.

#### 3.2 Elicitor de levadura y *Pseudomonas syringae*

20 g de extracto de levadura (Difco) disueltos en 100 ml de agua esteril se precipitaron dos veces sucesivas con un volumen igual de etanol al 80% (por 4 días cada vez) a -20 °C. La pastilla final se resuspendió en 80 ml de agua. La concentración final de glucosa se determinó por la reacción con un reactivo de antrona a que se midió a 620 nm (Maldonado M. T., 1996). Se utilizó a una concentración final de 70 µg equivalentes de glucosa por ml.

Las bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst), fueron crecidas a 28 °C en medio King y se monitorió su densidad a una absorbancia de 600 nm (King E. y col., 1954). Se centrifugaron a 1410 x g, se lavaron y se diluyeron en MgSO<sub>4</sub> 6 mM. Se utilizaron a una concentración final de 1 X 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, para infectar el cultivo de células en suspensión y a 1 X 10<sup>8</sup> UFC/ml para infiltrar con una jeringa de 1 ml el envés de las hojas.

### 3.3 Otros tratamientos

La herida mecánica se realizó aplicando pinzas de diálisis perpendicularmente a la vena central de las hojas por los tiempos indicados en la fig. 9A.

El ABA (Sigma) se disolvió en etanol absoluto para obtener una solución *stock* de 100 mM. Para el cultivo de células en suspensión, se utilizó a una concentración final de 100 µM. Para las plantas, se agregó a la solución nutritiva del sistema en hidroponía a una concentración final de 50 µM.

El etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico de Sigma) se disolvió en fosfato de sodio 0.5 M, pH 7.2 y se agregó a las plantas crecidas *in vitro*, a una concentración final de 100 µM.

El tiosulfato de plata (STS), se obtuvo al mezclar una solución de tiosulfato de sodio 400 mM y una solución de nitrato de plata 100 mM (1:1). Para los experimentos, se utilizó una concentración de 1 mM de plata final. El STS al igual que los inhibidores de la síntesis del JA, se adicionó al cultivo 2 horas antes de agregar el elicitor.

El 2,5-norbornadieno (NBD) se utilizó a una concentración final del gas de 5 ml / litro. Las plantas para este experimento se metieron en cajas transparentes a las que se les adicionó el piroxicam y/o el NBD 24 horas antes de la infiltración con Pst.



Una vez que fueron inoculadas, se volvieron a meter en la atmósfera correspondiente por otras 12 horas.

### **3.4 Protección contra ribonucleasas**

Este ensayo se realizó según Gilman M. (1995) con las siguientes modificaciones: la transcripción *in vitro* se llevó a cabo en la presencia de GMP 5 mM, la sonda de ARN correspondiente a la ACCasa de frijol y la sonda del 28S de *Camptotheca acuminata* (Maldonado-Mendoza I. E. y col., 1996), se utilizaron simultáneamente a  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^5$  cpm respectivamente. El ARN total con el que se hibridaron fue pre-tratado con DNasa I.

### **3.5 Obtención de fitoalexinas**

Las fitoalexinas se obtuvieron siguiendo el protocolo de Toledo-García I. I. (1998). 1 g de tejido congelado y pulverizado se extrajo primero con etanol y luego con acetato de etilo. Para su separación, se utilizó una cromatografía en capa fina (TLC-C18 sílica, Sigma) que corrió en un sistema de solventes cloroformo-metanol 25/1 (v/v) a 4 °C. Para su visualización, ya que las fitoalexinas fluorescen con luz U. V., se expuso la placa a un transiluminador (Theodorou M. K. y col., 1982). El cumestrol que se utilizó como marcador fue purificado por Ivonne Toledo en el laboratorio de la Dra. Esperanza Martínez (C. I. F. N.).

### **3.6 Cuantificación del JA endógeno en hojas infiltradas con Pst**

Para éste experimento, la mitad de cada hoja embrionaria de plantas de 13 días crecidas en maceta, se infiltraron con sulfato de magnesio 6 mM o con Pst a una

concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. La cuantificación del JA se hizo tanto de la mitad de la hoja infiltrada directamente, como de la otra mitad, a la que se le llama sistémica. Para cada tratamiento y tiempo de la cinética, se utilizaron 6 plantas, pero se realizó una medición del conjunto de éstas. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo al igual que en Royo J. y col., 1999, en el laboratorio del Dr. José Sánchez Serrano del Centro Nacional de Biotecnología, de Madrid. El anticuerpo monoclonal contra JA, lo obtuvieron en ese mismo laboratorio.

#### IV. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se dividieron en dos secciones: una primera parte, que incluye la publicación de los datos sobre la regulación de la ACCasa en respuesta a JA, elicitador y *Pseudomonas syringae*, así como, el papel del JA en la respuesta de defensa a este tipo de estrés y una segunda parte, donde se muestran datos complementarios de la participación del JA y otros fitorreguladores en la regulación de ésta enzima y en la producción de fitoalexinas.

##### **4.1 Resultados: primera parte**

concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. La cuantificación del JA se hizo tanto de la mitad de la hoja infiltrada directamente, como de la otra mitad, a la que se le llama sistémica. Para cada tratamiento y tiempo de la cinética, se utilizaron 6 plantas, pero se realizó una medición del conjunto de éstas. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo al igual que en Royo J. y col., 1999, en el laboratorio del Dr. José Sánchez Serrano del Centro Nacional de Biotecnología, de Madrid. El anticuerpo monoclonal contra JA, lo obtuvieron en ese mismo laboratorio.

#### IV. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se dividieron en dos secciones: una primera parte, que incluye la publicación de los datos sobre la regulación de la ACCasa en respuesta a JA, elicitador y *Pseudomonas syringae*, así como, el papel del JA en la respuesta de defensa a este tipo de estrés y una segunda parte, donde se muestran datos complementarios de la participación del JA y otros fitorreguladores en la regulación de ésta enzima y en la producción de fitoalexinas.

##### **4.1 Resultados: primera parte**



Plant Science 000 (2000) 000–000

PLANT  
SCIENCE

www.elsevier.com/locate/plantsci

# The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multi-functional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)<sup>☆</sup>

Berenice García-Ponce, Mario Rocha-Sosa \*

*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico*

Received 10 December 1999; received in revised form 17 April 2000; accepted 20 April 2000

## Abstract

A partial cDNA clone corresponding to the multi-functional acetyl-CoA carboxylase (ACCCase, EC 6.4.1.2) was isolated using RNA extracted from methyl jasmonate (MeJA)-induced common bean cell cultures. Most of this clone corresponds to the 3' untranslated region and it showed high identity to alfalfa and soybean ACCCase sequences. Southern hybridization revealed one copy of this gene in the common bean genome. In addition to being induced by MeJA in cell cultures and leaves, ACCCase mRNA accumulated after yeast elicitor or *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* treatment. Inhibitors of the octadecanoid pathway severely reduced ACCCase mRNA and protein accumulation induced by yeast elicitor or *P. syringae* pv *tabaci*, indicating that jasmonates or a precursor mediate ACCCase induction after pathogen infection. These results provide a role for the eukaryotic ACCCase during the defense response to pathogens in common bean. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Acetyl-CoA carboxylase; Differential display; Elicitor; Jasmonic acid; *Phaseolus vulgaris*; *Pseudomonas syringae*

## 1. Introduction

Acetyl-CoA carboxylase (ACCCase, EC 6.4.1.2) synthesizes malonyl-CoA in an ATP-dependent carboxylation of acetyl-CoA. Two types of ACCCase have been reported in plants: the so-called 'prokaryotic' multi-subunit form, built by three dissociable polypeptides present in the chloroplast of most higher plants and involved in fatty acid biosynthesis, and the multi-functional or 'eukaryotic' form, a homodimer of  $\approx 250$  kDa, which has

been localized both in the cytosol of all plants analyzed and in the chloroplast of Gramineae and *Brassica napus* [1–3]. The function of the cytosolic isoform seems to be the elongation of the fatty acid chain [4] and the synthesis of flavonoids [5] and stilbenes [6], since malonyl-CoA is one of the chalcone synthase and stilbene synthase substrates.

In plants, one response to pathogen attack is the de novo synthesis of a number of small molecular weight compounds with antimicrobial activity, called phytoalexins. These compounds contain different chemical structures: phenylpropanoids, isoprenoids and alkaloids. Phytoalexins synthesized by legumes belong to the phenylpropanoid (flavonoid) group. In common bean whole plants and cell cultures, the accumulation of phytoalexins is induced by pathogens [7] or elicitor treatment [8]. In parallel with the rise of phytoalexin production, there is an increased accumulation of the

<sup>☆</sup> The nucleotide sequence of ACCCase cDNA has been deposited in the EMBL/GenBank/DBJ Nucleotide Sequence Databases under the accession number AF007803.

\* Corresponding author. Tel.: +52-7-3112952; fax +52-7-3172388.

E-mail address: rocha@ibt.unam.mx (M. Rocha-Sosa)

transcripts and the corresponding enzymes involved in the synthesis of flavonoids. In common bean, the expression pattern of key flavonoid biosynthetic enzymes, such as chalcone synthase (ChS) and phenylalanine ammonia lyase (PAL), in response to pathogen infection or elicitor treatment, has already been well documented [7,9–11]. ChS [12] and PAL [13] genes in soybean and naringenin-7-*O*-methyltransferase in rice [14] are also induced by jasmonic acid (JA) treatment, suggesting a role for JA as a mediator in flavonoid synthesis. There is evidence involving this growth regulator or its precursor 12-oxophytodienoic acid (PDA) in plant defense against pathogens. JA or PDA causes an increase in the synthesis of phytoalexins in plant cell cultures [13,15,16]. In addition, elicitor treatment of a number of different plant cell suspension cultures induces an increase of JA [13,16] or PDA [17] levels. Strong support on the role of JA in the defense mechanism in plants has come from the analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants affected in JA synthesis or perception. These mutants also have an altered response to pathogen attack [18–20].

In spite of ACCase importance in flavonoid biosynthesis, little is known about its response to pathogen, elicitor or JA treatments. It has been reported that alfalfa cell suspension cultures accumulate ACCase mRNA when yeast or *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor is added to the culture media [21]. However, the role of phytohormones proposed to be mediators in the signal transduction pathway between pathogen attack and ACCase gene expression has not been investigated.

In this paper, we report the isolation of a cDNA fragment of the bean multi-functional ACCase, obtained by differential display using RNA from a cell suspension culture treated with 10  $\mu$ M MeJA. This transcript also accumulated as a result of yeast elicitor or *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Pst) treatment. Inhibitors of JA synthesis reduced substantially ACCase mRNA accumulation in response to yeast elicitor in common bean cell suspension cultures. In *Phaseolus vulgaris* embryonic leaves, ACCase mRNA levels increased in response to MeJA or Pst. Pathogen-induced ACCase transcript and protein accumulation in leaves is partially blocked by the application of piroxicam, an inhibitor of JA synthesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Plants of common bean, *P. vulgaris* L. cv Negro Jamapa, were grown in vermiculite in a growth chamber under 16 h light and 8 h dark cycles and 12 000 lux at 25°C until 13 days after imbibition.

Bean cell suspension cultures were obtained as described by León et al. [22]. Cultures (50 ml) were maintained in Shenk and Hildebrandt medium (modified by León et al. [22]) on a rotary shaker (150 rpm) in the dark at 25°C. Each induction was performed 3 days after subculture.

### 2.2. Assay conditions

Methyl jasmonate (MeJA) purchased from Apex Organics, Leicester, UK (>90% pure) and salicylic acid (SA), salicylhydroxamic acid (SHAM) and piroxicam (prx) purchased from Sigma, St. Louis, MO, were dissolved in *N,N*-dimethylformamide stock solutions. For common bean cell culture, MeJA and the JA synthesis inhibitors were used at 10 and 20  $\mu$ M final concentration, respectively. Diethylthio-carbamic acid (DIECA) was dissolved in water and used at 500  $\mu$ M final concentration. Seedlings were both sprayed and watered with 50  $\mu$ M MeJA or 100  $\mu$ M prx containing solutions.

Bean cell cultures were exposed to yeast-derived elicitor at 70  $\mu$ g glucose equivalents per millilitre, final concentration. Pst inoculation was performed at  $\approx 1 \times 10^7$  or  $1 \times 10^8$  colony-forming units (CFU) per millilitre, for cell culture and seedlings, respectively. Leaves were infiltrated on the underside using a 1-ml plastic syringe without a needle.

### 2.3. RNA extraction

For common bean cell culture, the extraction buffer contained: 5 M guanidine-thiocyanate, 0.5% *N*-lauroylsarcosine, 50 mM sodium citrate pH 7 and 72 mM 2-mercaptoethanol (98% pure) and the procedure was as Ref. [23]. For leaves, the extraction buffer and procedure was the same as in Logemann et al. [24].

### 2.4. Differential display

Differential display was performed essentially as

described by Liang et al. [25]. Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) (DNA-free) from control and 6 h MeJA-treated common bean cell cultures was reverse-transcribed using a mix of three degenerate anchored oligonucleotides (dT)<sub>11</sub>MC (Operon Technologies Inc., Alameda, CA) and later amplified by PCR using an arbitrary decamer (Operon, OPM-07) with the sequence 5'-CCGTGACTCA. cDNA fragments were cloned in the pKS II<sup>+</sup> vector. One of the clones, J2-b, was selected for further analysis.

### 2.5. Sequencing and alignment

DNA was sequenced by the dideoxy chain termination method using a Sequenase II kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Computer analysis was performed with the Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI.

### 2.6. Southern blot hybridization

Genomic DNA (12  $\mu\text{g}$ ) from *P. vulgaris* was digested with the enzymes indicated in Fig. 2. The DNA was electrophoresed and blot transferred to nylon membrane (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) as described by Sambrook et al. [26]. Hybridization was performed in PSE buffer: 0.3 M sodium phosphate pH 7.2, 7% SDS, 1 mM EDTA at 65°C and the blot was washed at high stringency with 0.2 M sodium phosphate pH 7.2, 0.67% SDS, two times at 55°C and another at 65°C for 15 min each. Membranes were exposed overnight to X-ray film (Kodak XAR-5).

### 2.7. RNA analysis

Northern blot analysis was performed with 30 or 50  $\mu\text{g}$  of total RNA per lane from common bean leaves and cell culture, respectively, gel was transferred to nylon membrane (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) and fixed both in a gel drier at 80°C for 2 h and with 0.05 M NaOH for 5 min. Hybridization was done in PSE buffer. Blots that were hybridized with the ACCase (J2-b) probe were washed at low stringency with 1 M sodium phosphate pH 7.2, 0.67% SDS. Blots that were hybridized with the ChS [9] and 28S rRNA probes were washed at high stringency as the Southern blot.

### 2.8. RT-PCR

In order to obtain a larger ACCase fragment, 5  $\mu\text{g}$  of total RNA extracted from *Pst* infiltrated plants was subjected to RT-PCR. RNA was reverse transcribed with the antisense primer 5'-CA-GAGTCCTTTAACCAAGTACC (which contains the stop codon) and amplified in combination with the sense primer 5'-ATCCTCGTGCTGC-CATTTTC. PCR was carried out according to the Boehringer expand high fidelity PCR system manufacturer protocol. Annealing was for 30 s at 55°C, and elongation for 2 min at 72°C in each cycle. One band of the expected 1.2 kb was obtained and cloned. Partial sequencing showed that this clone corresponds to the region encoding the ACCase carboxy terminus.

### 2.9. Protein analysis

Leaves were homogenized at 4°C in 3X extraction buffer [27] and centrifuged at 13 000  $\times g$  for 20 min. Protein content from each supernatant was measured by the method of Bradford et al. [28], using a Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), with bovine serum albumin (Sigma) as standard. One volume of Laemmli 2X loading buffer was added to the extracts and boiled for 4 min. Total protein (7  $\mu\text{g}$ ) per lane was subjected to SDS-PAGE containing 7.5% polyacrylamide [29]. Separated proteins were blotted onto nitrocellulose membranes. These were treated as described in Ref. [27], prior to being probed with streptavidin conjugated to peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech). Blots were developed with an enhanced chemiluminescence kit (ECL kit; Amersham Pharmacia Biotech).

## 3. Results

### 3.1. Isolation of a multi-functional ACCase cDNA fragment

Our interest is in the characterization of common bean molecular responses to pathogen attack and other stresses. Therefore, we decided to search for genes induced by MeJA, one of the compounds postulated to serve as an intermediate between these stimuli and gene expression. Using the differential display technique [25] with RNA

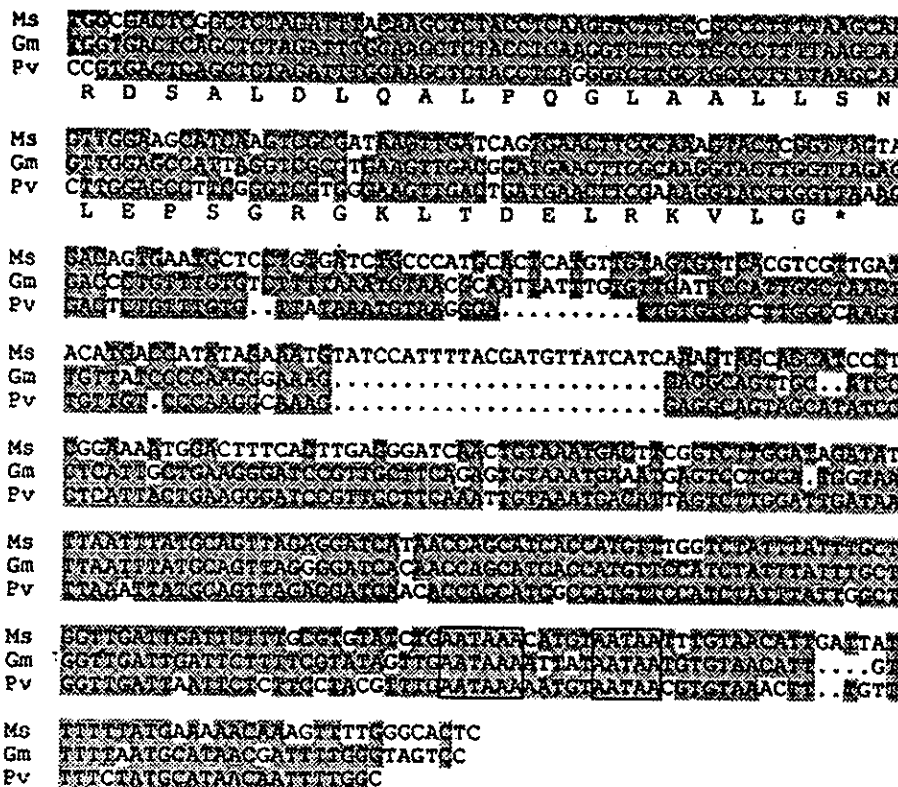


Fig. 1. Sequence alignment of the *Phaseolus vulgaris* cDNA fragment (Pv) with the multi-functional type ACCase DNA sequences of *Medicago sativa* (Ms) and *Glycine max* (Gm). The deduced amino acid sequence for the *P. vulgaris* sequence is shown in the bottom line. The stop codon is indicated by \* and the putative polyadenylation signals are boxed.

extracted from control or 10 μM MeJA-treated common bean cell suspension cultures, we were able to isolate a number of cDNA fragments present only in conditions where MeJA was applied. These fragments were cloned into the vector Bluescript pKS II<sup>+</sup> and sequenced. The nucleotide sequence of one 415 bp clone, termed J2-b, showed 69.6% identity to the *Medicago sativa* multi-functional ACCase cDNA [21] and 87% identity to the *Glycine max* genomic multi-functional ACCase DNA [30] (Fig. 1).

### 3.2. A single multi-functional ACCase gene in the *P. vulgaris* genome

Southern blot hybridization using the ACCase cDNA (J2-b) fragment as a probe for total *P. vulgaris* DNA digested with either *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III or *Bgl*II showed a single hybridization band (Fig. 2). Because J2-b clone corresponds mostly to the 3' untranslated region (Fig. 1), a 1.2-kb fragment containing the region encoding for the carboxy terminus of ACCase was obtained by RT-PCR, using oligonucleotides derived from

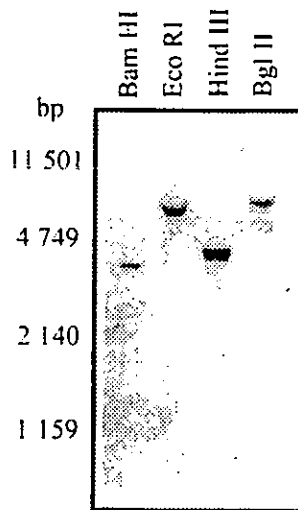


Fig. 2. Southern blot of *P. vulgaris* genomic DNA hybridized with the ACCase cDNA fragment. Genomic DNA (12 μg per lane) was digested with the enzymes indicated at the top, resolved on a 0.8% agarose gel, transferred to a nylon membrane and probed with the ACCase 'differential display' fragment (J2-b). On the left, the molecular markers are indicated.

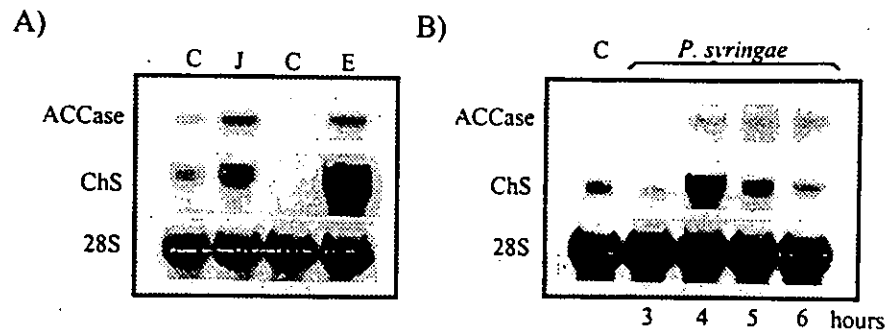


Fig. 3. ACCase and ChS transcript accumulation in common bean cell cultures after yeast-elicitor, MeJA or *P. syringae* pv *tabaci* application, detected by Northern blot. (A) Comparison of the ACCase and the ChS mRNA accumulation after 6 h of 70  $\mu$ g glucose equivalents per millilitre yeast-derived elicitor (E) or 10  $\mu$ M MeJA (J) induction. (B) Time course of the ACCase and ChS mRNA accumulation after exposure to Pst ( $\approx 1 \times 10^7$  CFU/ml) for the treatment periods indicated below the figure. Untreated culture is indicated as (C). Each lane contains 50  $\mu$ g of total RNA. Membrane hybridization against 28S-rRNA probe was used as a RNA loading control.

the ACCase soybean sequence (5') and the J2-b sequence (3'). This DNA fragment was used as probe in a Southern blot and only one hybridization band was detected (data not shown). Therefore, it is likely to be a single gene encoding for the multi-functional ACCase in the *P. vulgaris* genome, in contrast to what is found in other plant species where at least two genes are present.

### 3.3. MeJA-induced the accumulation of the ACCase mRNA

The isolation of a MeJA-induced ACCase cDNA fragment from bean suspension cultures was preliminary evidence for the regulation of the ACCase expression by this phytohormone. To obtain a time course for MeJA-induced ACCase mRNA accumulation in bean suspension cultures, we added 10  $\mu$ M MeJA and took samples at different times. RNA was extracted and analyzed. ACCase mRNA starts to accumulate 2–4 h after MeJA addition, reaches a maximum at 6 h and declines at 8 h (not shown). In Fig. 3A the accumulation of ACCase mRNA at 6 h is shown.

We analyzed ChS mRNA levels by Northern blot with the same membranes previously hybridized with the ACCase probe to see if ACCase mRNA accumulation correlates with the induction of mRNA levels of other enzymes involved in the synthesis of phytoalexins. As shown in Fig. 3A, ChS transcripts also increased in common bean suspension culture after 6 h of MeJA treatment.

To see whether we could detect similar patterns in plants treated with MeJA, RNA was extracted from embryonic leaves of 13-day plants treated

with 50  $\mu$ M MeJA. ACCase transcript accumulation in bean leaves is shown in Fig. 4. In this case, in contrast to the cell culture, maximal transcript accumulation occurred 12 h after the addition of the phytohormone and a re-induction occurred after 48 h treatment. ChS mRNA levels increased by 3 h after MeJA application and remained constant until 72 h. (Fig. 4). From the above results

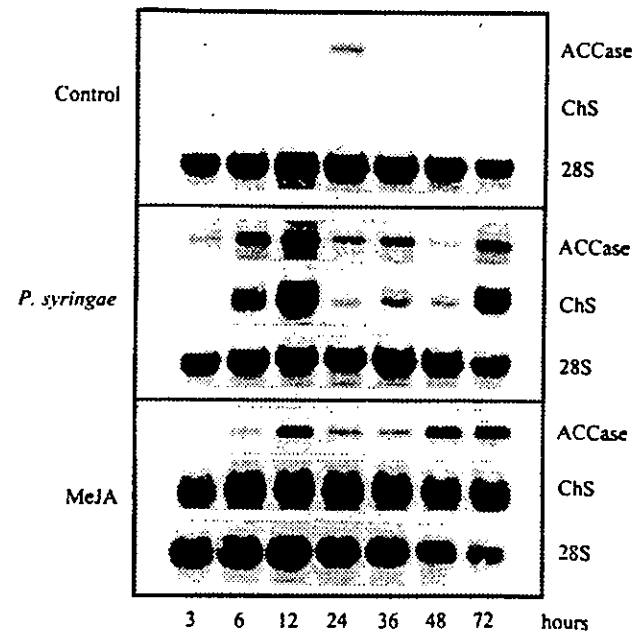


Fig. 4. Time course of ACCase and ChS transcript accumulation in leaves from 13-day-old seedlings treated with MeJA or infiltrated with *P. syringae* pv *tabaci*. ACCase and ChS mRNA were detected by northern blot in 30  $\mu$ g of total RNA from leaves treated with either  $\text{MgSO}_4$  (mock-infiltrated control),  $1 \times 10^8$  CFU/ml Pst or 50  $\mu$ M MeJA for the times indicated below. The same blots were hybridized with 28S-rRNA probe as an RNA loading control.



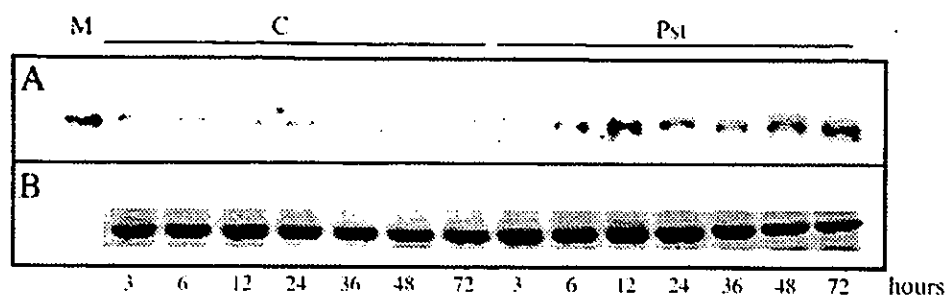


Fig. 5. Time course of ACCase protein accumulation in leaves infiltrated with *P. syringae* pv *tabaci*. Protein extracts from the same plants infiltrated with Pst, used in Fig. 4, were subjected to SDS-PAGE electrophoreses (7  $\mu$ g total protein per lane was loaded in a 7.5% polyacrylamide gel). (A) Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes and the ACCase biotinylated-polypeptide and the 200-kDa myosin-biotinylated protein (M) were detected by streptavidin conjugated to peroxidase. Bands were developed with an enhanced chemiluminescence kit. (B) Rubisco protein from the stained gel with Brilliant blue G-colloidal concentrated (Sigma) is shown as a loading control.

we demonstrated that in two different systems, common bean cell cultures and intact leaves, exogenous MeJA is able to induce the accumulation of mRNAs of two enzymes involved in flavonoid biosynthesis, suggesting a role of this phytohormone in the regulation of this pathway.

#### 3.4. ACCase mRNA accumulates in response to yeast elicitor or Pst treatments

Pathogen attack or fungal elicitor application induces the production of phytoalexins by stimulating the accumulation of the transcripts and corresponding enzymes responsible of phytoalexin synthesis [7,9,10]. Common bean suspension cultures were treated with 70  $\mu$ g glucose equivalents per millilitre of the elicitor and the cells were collected after 6 h of treatment, to address the question whether common bean ACCase mRNA accumulates in response to the application of a yeast-derived elicitor, as has been reported for alfalfa [21]. As seen in Fig. 3A, after elicitor treatment ACCase mRNA accumulated to levels similar to those obtained by MeJA application. However, ChS mRNA was more abundant in elicitor-treated than in MeJA-treated cell suspension cultures.

Common bean cell cultures were treated with  $1 \times 10^7$  CFU/ml Pst, to explore whether a non-compatible interaction would induce ACCase mRNA accumulation. The kinetics of appearance of this transcript after the addition of the bacteria was analyzed by Northern blot (Fig. 3B). A weak but reproducible induction of ACCase mRNA accumulation occurred after 4 h of treatment and was maintained until 6 h. ChS mRNA peaked at 4 h and decreased afterwards.

To examine the accumulation of ACCase mRNA in common bean leaves in response to Pst, 13-day old embryonic leaves infected with the pathogen ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) were collected at different times and ACCase transcript was analyzed by Northern blot. ACCase mRNA started to accumulate 3 h after bacterial infiltration and reached a peak 12 h after infection. Similar to MeJA treatment, a re-induction occurred at 72 h. CHS mRNA paralleled ACCase mRNA accumulation pattern (Fig. 4). In addition, we wanted to analyze whether the accumulation pattern of the ACCase protein corresponded to the mRNA kinetics. Total protein was extracted from the same plants treated with Pst and the biotinylated proteins were analyzed by Western blot using streptavidin conjugated to peroxidase (only ACCase protein is shown in Fig. 5). The basal ACCase protein level increased after Pst infiltration. The pattern of accumulation is similar to the one obtained for the corresponding transcript, except for the small amount of ACCase mRNA detected in mock-infiltrated plants at 24 h (Fig. 4), that was not evident at the protein level. This result indicated that during Pst and common bean interaction, the ACCase is not regulated at the translational level. This is the first evidence that ACCase mRNA and protein accumulate after pathogen infection in common bean plants.

#### 3.5. The octadecanoid pathway is required for ACCase induction in response to Pst

The experiments described above showed that in common bean, ACCase transcript accumulated in response to MeJA, elicitor or Pst treatments.

However, it was not clear if JA or a precursor mediates this response. To explore this possibility, common bean suspension cultures were treated with several inhibitors of the octadecanoid pathway 2 h before the addition of yeast elicitor. Six hours after the addition of the elicitor, cells were collected and the accumulation of ACCase mRNA was analyzed. All inhibitors tested strongly reduced ACCase transcript levels induced by the elicitor (Fig. 6). One of the inhibitors, piroxicam (prx), was chosen for the plant experiments in response to Pst, because it was not toxic to bacteria (data not shown) and was very effective in reducing ACCase mRNA accumulation in cell cultures in response to elicitor (see Fig. 6). Prx was both sprayed and added to the irrigation solution 24 h before Pst infiltration and ACCase transcript and protein accumulation was analyzed in leaves infected for 6 and 72 h, respectively. Prx effectively reduced ACCase mRNA and protein levels at both times tested (Fig. 7). These results indicate that oxylipins are required for a complete induction of ACCase mRNA and protein accumulation. Application of oxylipin synthesis inhibitors to cell cultures or embryonic leaves also reduced ChS mRNA accumulation induced by elicitor or Pst.

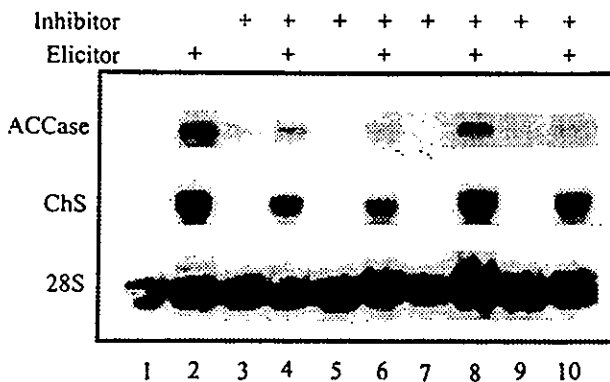


Fig. 6. Reduction of the elicitor-induced ACCase and ChS mRNA accumulation by oxylipin synthesis inhibitors in bean cell culture. Total RNA (50 µg) extracted from each of the following conditions were hybridized with the ACCase, ChS and 28S-rRNA probes in a Northern blot. At the top, inhibitor and/or elicitor application is depicted by (+). Lane 1, untreated cell culture; lane 2, elicitor induction; lanes 3-4, DIECA application; lanes 5-6, prx; lanes 7-8, SA; and lanes 9-10, SHAM. All samples were taken after 8 h of treatment with inhibitors and 6 h after inoculation.

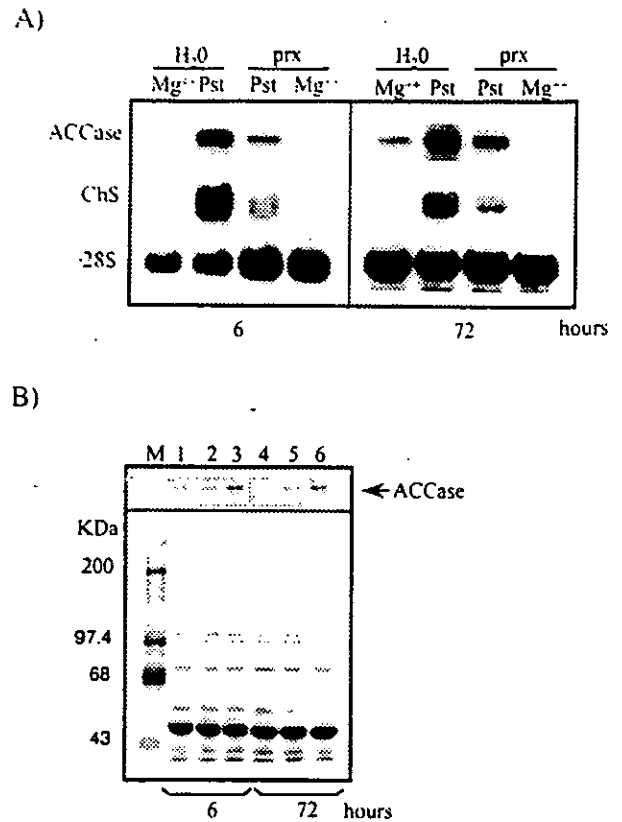


Fig. 7. Piroxicam reduction of *Pseudomonas*-induced ACCase mRNA and protein levels in common bean embryonic leaves. (A) ACCase and ChS detected mRNAs by Northern blot in 30 µg of total RNA extracted from leaves pre-treated with either water or 100 µM prx for 24 h before mock or Pst infiltration for the times indicated below. Same blots were hybridized with 28S-rRNA probe as an RNA loading control. (B) Protein extracts from the same plants used in A were electrophoresed in a SDS-PAGE. At top, proteins were blotted onto nitrocellulose membranes and the ACCase biotin-detected protein by a streptavidin conjugated to peroxidase is shown. Underneath, the corresponding stained gel. Lanes are in the following order: Lanes 1 and 4, Plants pre-treated with prx containing solution/magnesium infiltrated; lanes 2 and 5, plants pre-treated with prx/Pst induced; lanes 3 and 6, Pst infiltration. Mock or Pst infiltration periods are indicated below.

#### 4. Discussion

We report in this paper the isolation of a common bean ACCase partial cDNA clone that responds to MeJA in cell cultures as well as in intact plants. This is the first evidence indicating that the expression of this gene is regulated by this hormone. Two facts suggest that the enzyme encoded by this cDNA belongs to a eukaryotic, or multi-functional type of ACCase: first, the similarity of this cDNA to the *M. sativa* and *G. max* genes

encoding the respective multi-functional ACCase (Fig. 1); and second, the size of the mRNA ( $\approx 8$  kb, not shown) detected by probing Northern blots with this clone, since the mRNAs corresponding to the prokaryotic ACCase subunits are smaller.

In bean cell suspension cultures, ACCase mRNA starts to accumulate 2–4 h after MeJA addition, reaches a maximum at 6 h and declines at 8 h (not shown). In embryonic leaves the induction of the accumulation of this transcript is slightly different. There is a peak at 12 h, after which ACCase mRNA level is reduced, a re-induction occurs at 48 h (Fig. 4). The increase in ACCase transcript accumulation after elicitor treatment of common bean cell suspension cultures is comparable to the increase induced by MeJA after the same time treatment (Fig. 3A). Accumulation of ACCase mRNA is induced also by Pst addition to the cell culture (Fig. 3B). Furthermore, ACCase transcript and protein increase their levels after Pst infiltration in embryonic leaves (Figs. 4 and 5). It is interesting that in a long-term treatment where the stimulus is present all the time, a re-induction at the transcriptional level is detected. Since JA can induce its own synthesis [31], this could explain the second peak of ACCase and ChS mRNA accumulation. These results support the idea that ACCase regulation is part of the plant defense response to pathogen attack. Since this enzyme provides the substrate for ChS, ACCase gene expression could be a key regulatory step in flavonoid biosynthesis.

One could expect that genes encoding enzymes involved in the same pathway respond to similar effectors. Evidence in favor of a coordinate regulation between ACCase and other enzymes of the phenylpropanoid pathway has been reported earlier [5,32]. Therefore, we also analyzed the accumulation of the common bean ChS mRNAs. We found that levels of ChS and ACCase mRNAs increase in response to the same treatments.

ACCase and ChS mRNA accumulation in *P. vulgaris* in response to MeJA or to yeast elicitor and Pst could take place through separate pathways. However, there is a possibility that JA and/or a precursor are mediators in the response to pathogen attack. To test the latter, oxylipin synthesis was inhibited prior to elicitor or Pst treatments. At least three types of inhibitors have been used to block the octadecanoid pathway in plants:

(i) drugs interfering with the cyclooxygenase activity of the prostaglandin endoperoxide H synthase such as SA, aspirin, piroxicam and ibuprofen, because of the similarity of the octadecanoid pathway to the pathway leading to prostaglandin synthesis in animals. In plants the targets for these compounds are either lipoxygenase (LOX) [33] or allene oxide synthase (AOS) [34], the first and the second enzymes respectively in the biosynthetic pathway to JA from linolenic acid. Additional sites of inhibition by SA, downstream to AOS activity [35] or after-JA synthesis [36] have been proposed as well. (ii) LOX inhibitors such as *n*-propyl gallate or SHAM [37]. (iii) DIECA, a strong reducing agent, which provokes the reduction of 13(S) hydroperoxylinolenic acid, the LOX product, preventing its subsequent conversion to JA [38]. The application of these compounds prior to wounding or elicitor treatment effectively blocks plant responses to these stimuli [16,36,38–41], suggesting a role for JA or a precursor as mediator in the plant response to these stresses. Although the activity of these inhibitors is not specific, for instance, SHAM is also an inhibitor of alternative oxidase [42]; and SA alter  $H^+/K^+$  transport at the plasma membrane [43], the fact that inhibitors of the three types were able to partially block ACCase and ChS mRNA accumulation in response to elicitor treatment (Fig. 6) strongly supports that the cause of this effect is the inhibition of the octadecanoid pathway.

Prx also effectively reduced ACCase mRNA and protein levels in leaves at 6 and 72 h as shown in Fig. 7. All these results strongly suggest that an oxylipin mediates ACCase and ChS gene induction in common bean in response to pathogen attack. In common bean during an incompatible interaction, phytoalexins and ChS or PAL transcripts accumulate only in the infected tissue where the hypersensitive response occurs [44]. Also JA only accumulates in the hypersensitive response lesions and not in adjacent tissue in tobacco leaves [45]. Therefore, JA may participate only as a local signal during the defense response to pathogens. However, we cannot discard the possibility that an intermediate as PDA could be involved in this response.

None of the oxylipin synthesis inhibitors in our conditions could totally block either Pst or yeast elicitor induced mRNA accumulation. One possibility is that the inhibitors used do not completely

block oxylipin synthesis in common bean plants and cell cultures: the other possibility is that additional signals participate. As has been suggested by Penninckx et al. [46], ethylene could act in parallel with JA in the pathogen response of *Arabidopsis* plants.

In conclusion, we have demonstrated that AC-Case mRNA and ChS mRNA accumulate in parallel both under stress conditions (elicitor or pathogen induction) and MeJA application, which supports the idea that both enzymes from the phenylpropanoid pathway are regulated in a coordinated manner. Furthermore, we give evidence that oxylipins are involved in signal transduction during the defense response to pathogens in common bean.

#### Acknowledgements

We are grateful to Patricia Rueda-Benítez for excellent technical support and to Alejandra Covarrubias, Lorenzo Segovia and Stewart Gilmore for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from CONACyT (Grant No. 0133P-N9505) and DGAPA-UNAM (Grant No. IN200296). B. G-P was a recipient of CONACyT and DGAPA-UNAM fellowships.

#### References

- [1] Y. Sasaki, T. Konishi, Y. Nagano, The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants, *Plant Physiol.* 108 (1995) 445–449.
- [2] T. Konishi, K. Shinohara, K. Yamada, Y. Sasaki, Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than Gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme, *Plant Cell Physiol.* 37 (1996) 117–122.
- [3] W. Schulte, R. Töpfer, R. Stracke, J. Schell, N. Martini, Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by a multi-gene family: Indication for plastidic localization of at least one isoform, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 3465–3470.
- [4] X. Bao, M. Pollard, J. Ohlrogge, The biosynthesis of erucic acid in developing embryos of *Brassica rapa*, *Plant Physiol.* 118 (1998) 183–190.
- [5] J. Ebel, K. Hahlbrock, Enzymes of flavone and flavonolglycoside biosynthesis. Coordinated and selective induction in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*, *Eur. J. Biochem.* 75 (1977) 201–209.
- [6] G. Schroder, J.W. Brown, J. Schroder, Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase, *Eur. J. Biochem.* 172 (1988) 161–169.
- [7] J.N. Bell, R.A. Dixon, J.A. Bailey, P.M. Rowell, C.J. Lamb, Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant-pathogen interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3384–3388.
- [8] R.A. Dixon, C.J. Lamb, Stimulation of de novo synthesis of L-phenylalanine ammonia-lyase in relation to phytoalexin accumulation in *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-treated cell suspension cultures of french bean (*Phaseolus vulgaris*), *Biochim. Biophys. Acta* 586 (1979) 453–463.
- [9] T.B. Ryder, C.L. Cramer, J.N. Bell, M.P. Robbins, R.A. Dixon, C.J. Lamb, Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 5724–5728.
- [10] M.A. Lawton, C.J. Lamb, Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 335–341.
- [11] J.L. Jakobek, P.B. Lindgren, Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction, *Plant Cell* 5 (1993) 49–56.
- [12] R.A. Creelman, M.L. Tierney, J.E. Mullet, Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4938–4941.
- [13] H. Gundlach, M.J. Müller, T.M. Kutchan, M.H. Zenk, Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 2389–2393.
- [14] S. Tamogami, R. Rakwal, O. Kodama, Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid, *FEBS Lett.* 412 (1997) 61–64.
- [15] S. Bleichert, W. Brodschelm, S. Hölder, L. Kammerer, T.M. Kutchan, M.J. Mueller, Z.-Q. Xia, M.H. Zenk, The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 4099–4105.
- [16] H. Nojiri, M. Sugimori, H. Yamane, Y. Nishimura, A. Yamada, N. Shibuya, O. Kodama, N. Murofushi, T. Omori, Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells, *Plant Physiol.* 110 (1996) 387–392.
- [17] S. Parchmann, H. Gundlach, M.J. Mueller, Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures, *Plant Physiol.* 115 (1997) 1057–1064.
- [18] I.A.M.A. Penninckx, K. Eggermont, F.R.G. Terras, B.P.H.J. Thomma, G.W. De Samblanx, A. Buchala, J.-P. Métraux, J.M. Manners, W.F. Broekaert, Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway, *Plant Cell* 8 (1996) 2309–2323.
- [19] B.P.H.J. Thomma, K. Eggermont, I.A.M.A. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Vogelsang, B.P.A. Cammue, W.F. Broekaert, Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15107–15111.

- [20] P. Vijayan, J. Shockey, C.A. Lévesque, R.J. Cook, J. Browse, A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 7209-7214.
- [21] B.S. Shorrosh, R.A. Dixon, J.B. Ohlrogge, Molecular cloning, characterization, and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from alfalfa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 4323-4327.
- [22] P. León, F. Planckaert, V. Walbot, Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture, Plant Physiol. 95 (1991) 968-972.
- [23] Y. Kai-Wun, J. Rong-Huay, S. Jong-Ching, A rapid and efficient method for RNA isolation from plants with high carbohydrate content, Focus 13 (1991) 102-103.
- [24] J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer, Improved method for the isolation of RNA from plant tissues, Anal. Biochem. 163 (1987) 16-20.
- [25] P. Liang, A.B. Pardee, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, Science 257 (1992) 967-971.
- [26] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T.A. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [27] A.R. Ashton, C.L.D. Jenkins, P.R. Whitfield, Molecular cloning of two different cDNAs for maize acetyl CoA carboxylase, Plant Mol. Biol. 24 (1994) 35-49.
- [28] M.M. Bradford, A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.
- [29] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680-685.
- [30] J.V. Anderson, S.M. Lutz, B.G. Gengenbach, J.W. Gronwald, Genomic sequence for a nuclear gene encoding acetyl-coenzyme A carboxylase in soybean, Plant Physiol. 109 (1995) 338.
- [31] K. Harms, I. Ramírez, H. Peña-Cortés, Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid, Plant Physiol. 118 (1998) 1057-1065.
- [32] J. Ebel, W.E. Schmidt, R. Loyal, Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation, Arch. Biochem. Biophys. 232 (1984) 240-248.
- [33] T.L. Peever, V.J. Higgings, Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaves tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum*, Plant Physiol. 90 (1989) 867-875.
- [34] Z. Pan, D. Camara, H.G. Gardner, R.A. Backhaus, Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide synthase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase, J. Biol. Chem. 273 (1998) 18139-18145.
- [35] D. Laudert, E.W. Weiler, Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signaling, Plant J. 15 (1998) 675-684.
- [36] S.H. Doares, J. Narváez-Vásquez, A. Conconi, C.A. Ryan, Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid, Plant Physiol. 108 (1995) 1741-1746.
- [37] T.K. Park, J.C. Polacco, Distinct lipoxygenases species appear in the hypocotyl/radicle of germinating soybean, Plant Physiol. 90 (1989) 285-290.
- [38] E.E. Farmer, D. Caldelari, G. Pearce, M.K. Walker-Simmons, C.A. Ryan, Diethylthiocarbamic acid inhibits the octadecanoid signaling pathway for the wound induction of proteinase inhibitors in tomato leaves, Plant Physiol. 106 (1994) 337-342.
- [39] J. Piel, R. Atzorn, R. Gäbler, F. Kühnemann, W. Boland, Cellulysin from the plant parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatil biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signaling cascade, FEBS Lett. 416 (1997) 143-148.
- [40] F.L.H. Menke, S. Parchmann, M.J. Mueller, J.W. Kijne, J. Memelink, Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indol alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*, Plant Physiol. 119 (1999) 1289-1296.
- [41] H. Peña-Cortés, T. Albrecht, S. Prat, E.W. Weiler, L. Willmitzer, Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis, Planta 191 (1993) 123-128.
- [42] L. McIntosh, Molecular biology of the alternative oxidase, Plant Physiol. 105 (1994) 781-786.
- [43] A.D.M. Glass, Influence of phenolic acids on ion uptake, Plant Physiol. 54 (1974) 855-858.
- [44] B.M. Meier, N. Shaw, A.J. Slusarenko, Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death, Mol. Plant-Microbe Interact. 6 (1993) 453-466.
- [45] P. Kenton, L.A.J. Mur, R. Atzorn, C. Wasternack, J. Draper, Jasmonic acid accumulation in tobacco hypersensitive response lesions, Mol. Plant-Microbe Interact. 12 (1999) 74-78.
- [46] I.A.M.A. Penninckx, B.P.H.J. Thomma, A. Buchala, J.P. Métraux, W.F. Broekaert, Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*, Plant Cell 10 (1998) 2103-2113.

## 4.2 Resultados: segunda parte

### 4.2.1 Cinética de acumulación del ARNm de la ACCasa en respuesta a JA en cultivos de células en suspensión de frijol:

Para confirmar que el producto del *differential display* se indujera por MeJA, lo primero que se hizo fue una cinética contra tiempo del cultivo de células en suspensión de frijol tratado con MeJA 10  $\mu$ M, y se analizó la expresión del gene de la ACCasa mediante la técnica de protección contra ribonucleasas. En la figura 6A se muestra, que el ARNm de la ACCasa empieza a acumularse a partir de las 4 horas, tiene un máximo de acumulación a las 6 horas del tratamiento y decae a las 8 horas de la adición de MeJA. En el mismo experimento de protección, se incluyó la ribsonda del 28S de *Camptotheca acuminata* como control constitutivo de la reacción. La acumulación del ARNm de la ChS se observó por *northern blot* con los mismos ARN totales que se utilizaron para la protección. Como se ve en la figura 6B, el mensajero de la ChS se acumula desde la hora que se adicionó el JA, tiene un máximo a las 4 horas de tratamiento y disminuye a las 6 horas.

En el artículo, se demostró que el ARNm de la ACCasa y la ChS, también se inducen en la plantas tratadas con MeJA.

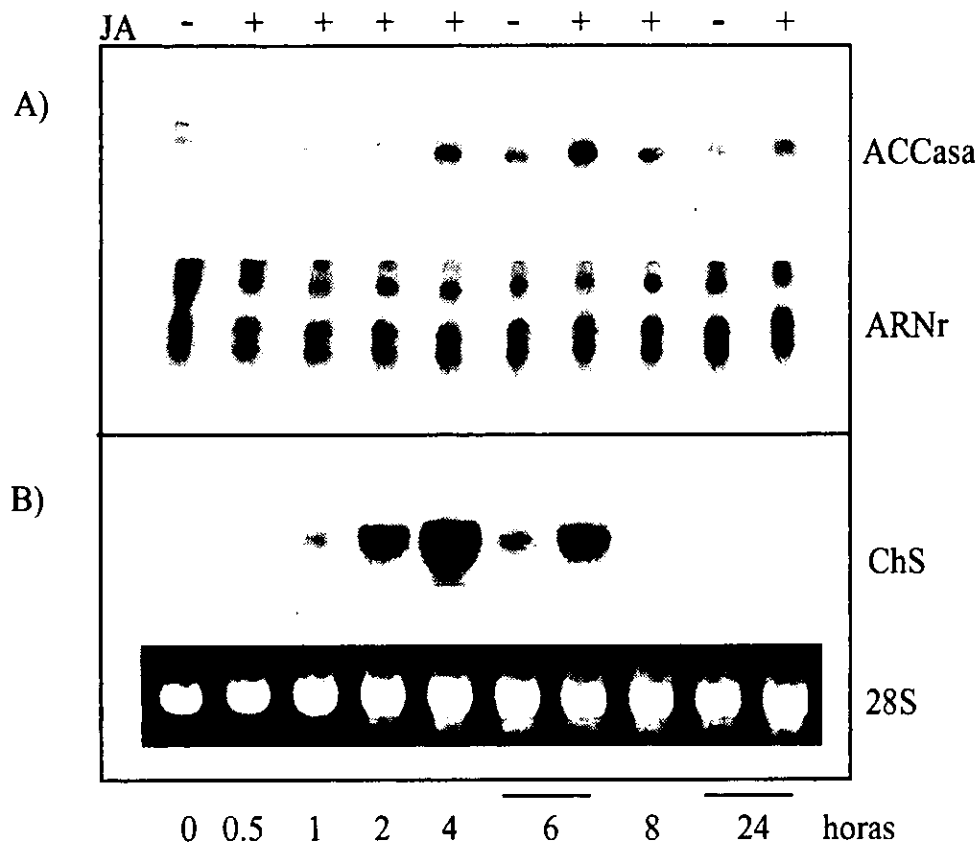


Fig. 6: Cinética de acumulación del ARNm de la ACCasa y la ChS en el cultivo de células en suspensión de frijol en respuesta a MeJA. A) Protección contra ribonucleasas de las sondas J2-b, del gen de la ACCasa de frijol y un fragmento del 28S ribosomal de *Camptotheca acuminata* (ARNr, control constitutivo); hibridadas con el ARN total extraído de cultivos de células en suspensión de frijol sin tratar (-), o tratado con MeJA (+). B) Northern blot con el mismo ARN que en (A), hibridado contra la sonda de la ChS. El 28S ribosomal se muestra como control de carga del gel. En la parte inferior de la figura, se indica los periodos del tratamiento.

#### 4.2.2 Secuencia y *Southern blot* del fragmento de 1.2 kb obtenido por RT-PCR:

El fragmento designado J2-b que se obtuvo del *differential display*, corresponde en su mayor parte al extremo 3' no traducido del gene de la ACCasa. Al utilizar este fragmento como sonda en una hibridación tipo *Southern* contra el genoma de frijol digerido con enzimas restricción, se obtuvo una sola banda (ver sección 4.1). Sin embargo, resultaba difícil concluir que sólo existía una copia de este gene en el genoma del frijol, ya que generalmente, ésta región es específica para cada uno ellos. Decidimos obtener un fragmento de ADNc que estuviera dentro de la región codificante. Utilizando la técnica de RT-PCR, se obtuvo un fragmento de 1.2 kb que corresponde al extremo carboxilo del gene de la ACCasa.

Al comparar la secuencia del fragmento de 1.2 kb (fig. 7A) con ACCasas de otras plantas, se obtuvo una identidad del 93.6% y 89.7% con la ACCasa de soya y alfalfa, respectivamente.

En el *Southern* genómico utilizando como sonda el fragmento de 1.2 kb, sólo hibridó una banda, lo que confirma la existencia de una copia del gene de la ACCasa en el genoma del frijol (fig. 7B).



A)

```

P R A A I S G T L D G N G R W L G G I F D K D S F V E T L E
ATCCTCGTGTGCCATTCTGGAACCCCTGGATGGTAATGGAAGATGGCTGGGAGGCATCTTTGACAAGGACAGCTTTGTGGAGACACTGGAG 92
G W A R T V V T G R A K L G G I P V G I V A V E T Q T V M Q I I
GGATGGGCTAGAACAGTTGTTACAGGAAGGGCAAAGCTTGGAGGAATCCCTGTGGAAATGTTGCTGTAGAAACACAGACAGTAATGCAAATAATA 188
P A D P G Q L D S H E R V V P Q A G Q V W F P D S A T K T A Q A
CCTGCTGATCCCGGTCAGCTCGATTCTCATGAGAGGGTTGTTCTCAAGCTGGGCAAGTCTGGTTTCTGATTCTGCAACCAAGACAGCCCAAGCA 284
I L D F N R E E L P L F I L A N W R G F S G G Q R D L F E G I L
ATATGGATTTC AATAGAGAAGAAC TCCCGCTTTTCAITCTCGCAAATGGAGAGGCTTTTCAGGAGGCCAAAGGGACCTTTTGAAGGAATCTTT 380
Q A G S T I V E N L R T Y K Q P I F V Y I P M M G E L R G G A W
CAGGCTGGTTCAACTATTGTGAAAACCTTAGAACATACAAGCAGCCCATATTGTGTACATCCCAATGATGGGTGAACCTCCGAGGTGGTGCATGG 476
V V V D S Q I N S D H I E M Y A D R T A K G N V L E P E G M I E
GTGGTTGTGACAGTCAAATCAATTCAGACCACATTGAAATGATGCTGATCGAACAGCTAAAGGTAATGTCCTTGAGCCAGAAGGAATGATTGAG 572
I K F R S R E L L E C M G R L D Q Q L I T Q K A K L Q E A K S N
ATCAAATTCAGATCAAGGGAATGTTGGAGTGTATGGGTAGACTTGATCAACAGTTGATAACTCAGAAGGCAAAAACCTCAGGAAGCCAAAGAGTAAC 668
R D L A A F E S L Q Q Q I K S R E K Q L L P V Y T Q I A T K F A
AGGGACCTTGCCGCCCTTGAATCCCACAGCAGCAGATTAAATCCCGTGAGAAACAGCTTTTGCCCTGTGTATACCCAGATAGCTACGAAGTTTGCT 764
E L H D T S L R M A A K G V I R E V L D W R N S R A V F Y Q R L
GAACTGCATGACTTCCTTAAGAATGGCTGCCAAGGGTGTAAATAGGGAAGTTCTGGACTGGCGTAACCTCCCGGGCTGCTTCTACCAGAGACTT 860
H R R I G E Q S L I N S V R D A A G D H L S H A S A M N L L K E
CACCGAAGAATGGAGAGCAGTCACATGATCAACAGTGTGAGAGATGCTGCTGGTGATCATTTGTCACATGCATCTGCAATGAACTTGC TCAAGAA 956
W Y L N S D I A N G R E D A W L D D E A F F K W K N N P A H Y E
TGGTATTGAAATCTGATATTGCCAATGGTAGAGAAGATGCGTGGTTGGATGATGAAGCCCTTCTCAAATGGAAAAATAATCCTGCACATTACGAG 1052
N K L K E L R V Q K V L L Q L T N I G D S A L D L Q A L P Q G L
AATAAAC TAAAGGAAGCTGCGTGTGCAGAAAGTGTACTTCAATGACAACATGGGTGACTCAGCTCTAGATTGCAAGCTCTACCTCAGGGTCTT 1148
A A L L S N L E P S G R G K L T D E L R K V L G .
GCTGCCCTTTTAAAGCAACTTGGAGCCTTCGGGTCGTGGGAAGTTGACTGATGAACCTCGAAGGTAAGTGGTTAAAGGACTCTGTTGTGTTATAA 1244
ATGTAAGGGATGTGTCCCTTGCCCAAGTTGTTGTC CCAAGGCAAAGGAGGCAGTAGCATATCCCTCATTACTGAAGGGATCCGTTGCTTCAAATT 1340
GTAATGACATTAGTCTTGGATTGATAAATAAATTATGCASTTAGAGGATCAACACCAGCATCGCCATGTTCCATCTATTIATITGGCTGGTTGATT 1436
AATTCCTCTCCTACGTTTGAATAAAAAATGTAATAACGTGTAACCTTTGTTTTTCATGCATAACAATTTTGGCAAAAAA 1520

```

B)

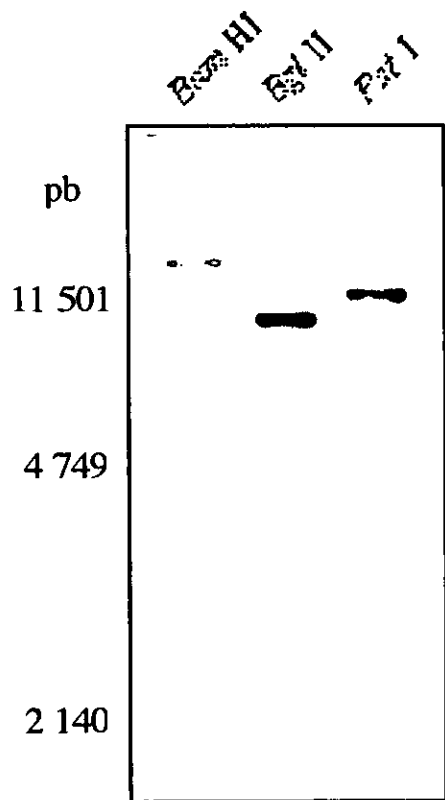


Fig. 7: Secuencia de la ACCasa de frijol y *Southern blot* hibridado con el fragmento de 1.2 kb. A) La secuencia nucleotídica y de aminoácidos correspondiente al fragmento de 1.2 kb obtenido por RT-PCR (enmarcada), más el fragmento llamado J2-b del *differential display* (en azul). B) *Southern blot* de 12  $\mu$ g de ADN genómico de frijol digerido con las enzimas de restricción que se indican, e hibridado contra el fragmento de 1.2 kb. A la izquierda se muestran los tamaños de las bandas del marcador.

#### 4.2.3 Expresión órgano específica de la ACCasa y la ChS:

En los resultados publicados, nosotros dimos evidencia de que la ACCasa del tipo eucariótico se regula de forma similar a otra enzima de la vía de los fenilpropanoides, la ChS. Un dato adicional que apoya lo anterior, es la expresión órgano específica del ARNm de la ACCasa. Como se observa en la figura 8, tanto la ACCasa como la ChS se expresan abundantemente donde la síntesis de flavonoides es constitutiva, en la raíz y en las flores.

Es interesante comparar la expresión del ARNm de la ACCasa y la ChS en hojas maduras (23 d.) y senescentes (57 d.), ya que se observó una re-inducción de los ARNm en éstas últimas.

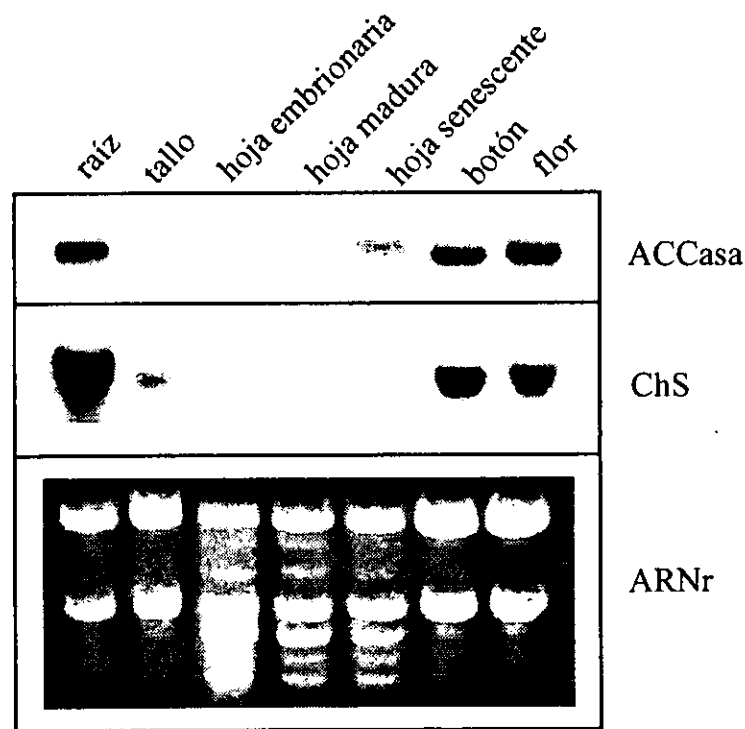


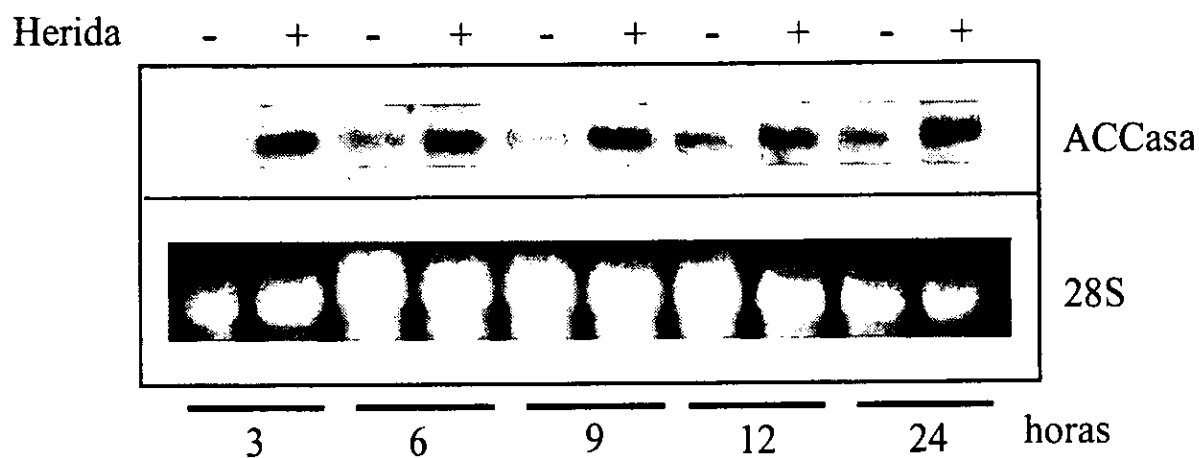
Fig. 8: Acumulación del ARNm de la ACCasa y la ChS en los diferentes órganos de la planta de frijol. Hibridación tipo *northern* de las sondas J2-b y la ChS contra ARN extraído de: raíces, tallos y hojas maduras, de plantas de 23 d.; hojas embrionarias de plantas de 10 d. y hojas senescentes de plantas de 57 d. En la parte inferior se muestran los ARN ribosomales teñidos con bromuro de etidio

#### 4.2.4 Acumulación del ARNm de la ACCasa en respuesta a herida y ABA:

En este trabajo, además de analizar la expresión de la ACCasa en respuesta a un estrés de tipo biótico, también observamos su expresión al someter a la planta a un estrés físico, como es la herida mecánica. En la figura 9A, se muestra la cinética de acumulación del ARNm de la ACCasa en plantas de 23 d de edad que fueron heridas. Desde las 3 hasta las 24 horas, se ve una inducción del mensajero con respecto a los controles.

El ABA participa como uno de los mediadores en la inducción de genes de defensa en respuesta a herida en plantas solanáceas, por lo que nosotros quisimos ver si el ARNm de la ACCasa se acumulaba en respuesta a éste fitorregulador. La ACCasa presentó dos picos de acumulación, uno entre las 6-9 horas y otro a las 24 horas (fig. 9B). A diferencia de la ACCasa, la ChS casi no aumentó su acumulación sobre el basal (dato no mostrado).

A)



B)

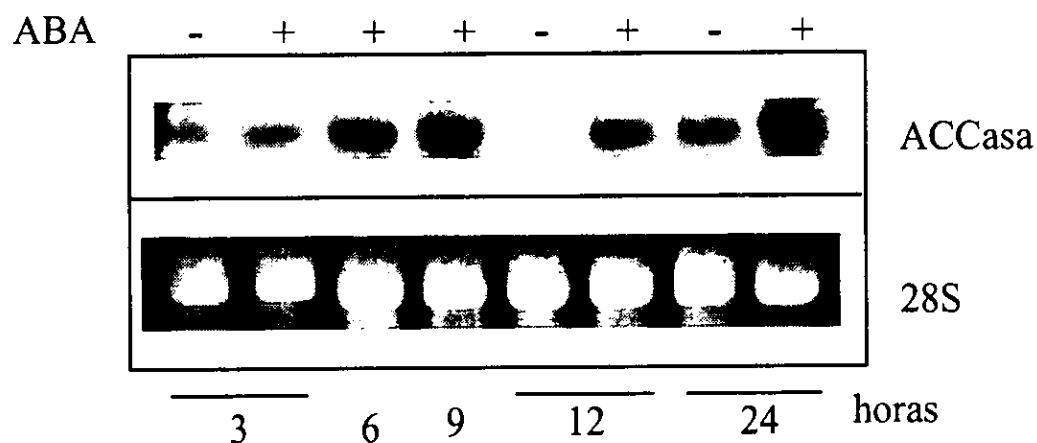


Fig. 9: Cinética de acumulación del ARNm de la ACCasa en plantas heridas (A); o a las que se les adicionó ABA (B). Hibridación tipo *northern* utilizando como sonda el fragmento J2-b, contra ARN total extraído a los tiempos indicados para ambos tratamientos. Los controles se denotan con (-) y la herida o la adición del ABA con (+). El ribosomal 28S, se muestra como control de carga.

#### 4.2.5 Papel del etileno en la regulación del gene de la ACCasa:

Como se estableció en la introducción, el etileno es un fitorregulador que está involucrado en la expresión de genes de defensa, tanto en respuesta a patógenos como a herida.

Cuando las plantas fueron tratadas con etefón, un compuesto que en solución libera etileno, se promovió la acumulación del ARNm de la ACCasa (fig. 10).

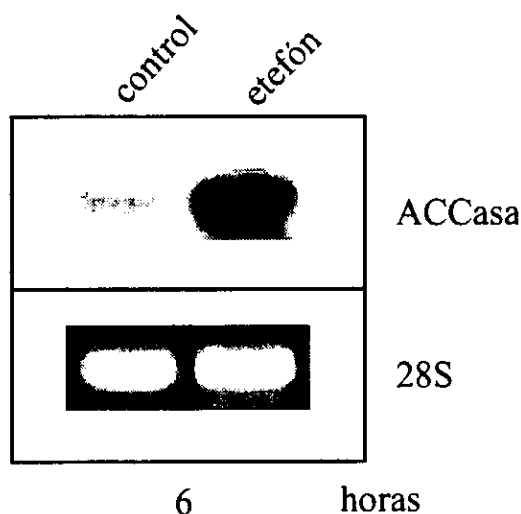
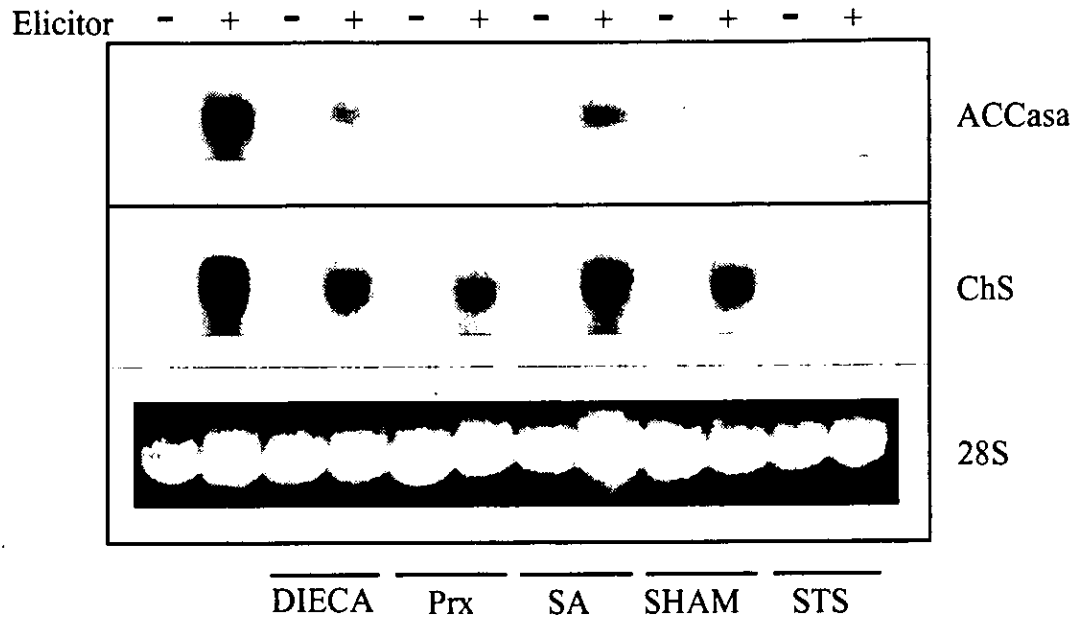


Fig. 10: Efecto del etefón sobre la acumulación del ARNm de la ACCasa. *Northern blot* en el que se hibridó la sonda J2-b contra ARN extraído de hojas de plantas cultivadas *in vitro* sin tratar (control), o a las que se les adicionó el etefón durante 6 horas. El ribosomal 28S, se muestra como control de carga.

Así mismo, al usar inhibidores de la acción del etileno, como el tiosulfato de plata (STS) antes de someter el cultivo de células en suspensión al elicitor y el norbornadieno (NBD) antes de la inoculación de las hojas con *Pst*, se inhibió la expresión de la ACCasa y hasta cierto punto también de la ChS. En el último carril de la figura 11A, se muestra que el STS bloqueó la acumulación de ambos mensajeros, incluso en mayor medida que los inhibidores de JA (DIECA, prx, SA y SHAM). En la figura 11B, se muestra que el prx y el NBD, tienen un efecto sinérgico inhibitorio sobre la acumulación de los ARNm de estas enzimas.

A)



B)

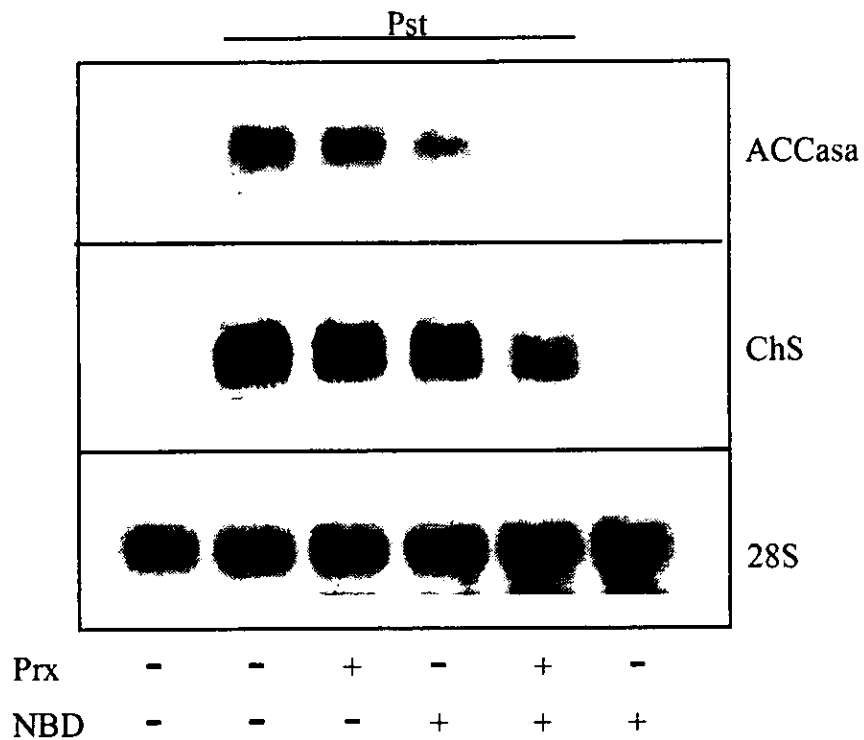


Fig. 11: Efecto de los inhibidores de la síntesis de JA o de la acción del etileno sobre la acumulación del ARNm de la ACCasa y la ChS inducida por el elicitor en el cultivo de células en suspensión (A); o por Pst en hojas (B) de frijol. Hibridación tipo *northern* de las sondas J2-b y ChS contra ARN total del cultivo y de hojas, respectivamente.

De esta forma demostramos que el etileno, además de las oxilipinas, participa como mediador en la inducción de genes de defensa en respuesta a elicitores y Pst.

#### 4.2.6 Acumulación de fitoalexinas en respuesta a Pst y JA:

Como se mencionó, las plantas producen compuestos antifúngicos y antimicrobianos llamados fitoalexinas y en las leguminosas, éstas son de origen flavonoide. Ya que Pst, así como el JA inducen la acumulación de las enzimas de la vía de los fenilpropanoides (hasta ahora estudiadas) tanto a nivel transcripcional como traduccional, quisimos analizar la producción de fitoalexinas.

Las fitoalexinas producidas en hojas de frijol, se observaron por una cromatografía en capa fina expuesta a luz U. V. (fig. 12). Solamente en aquellos extractos de las plantas que fueron infiltradas con Pst, se vio su acumulación (fig. 12A). También se analizó, si el JA inducía éstos compuestos y para nuestra sorpresa, encontramos que al tratar las plantas con MeJA 50  $\mu$ M, las fitoalexinas no se acumulan. En la figura 12B se puede comparar la acumulación de las fitoalexinas a las 72 horas de haber inoculado con Pst, o de haber agregado el MeJA. Experimentos del mismo tipo se realizaron durante 6 y 12 horas pero en ninguno se observó una inducción por JA.

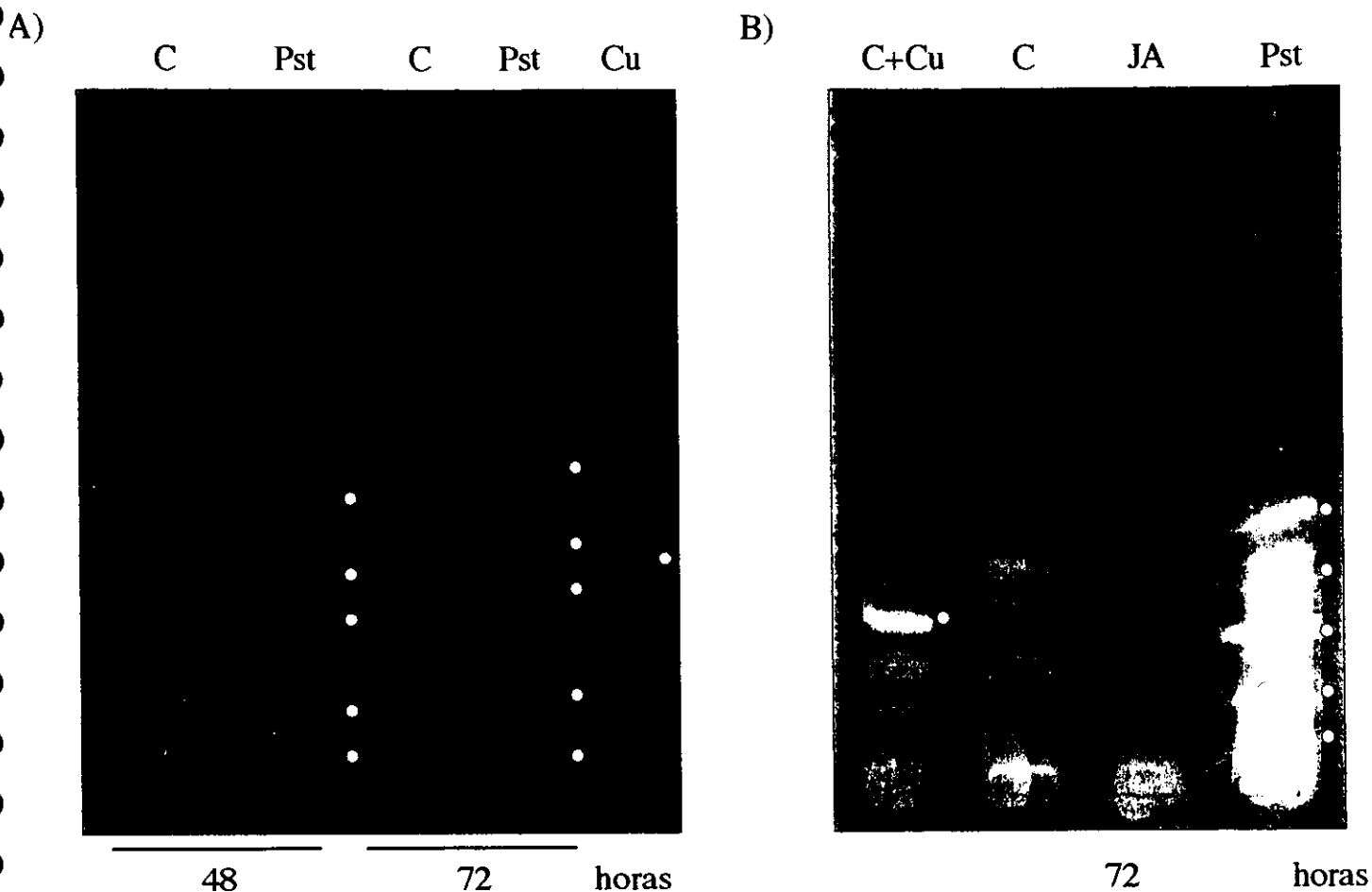


Fig. 12: Cromatografía en capa de las fitoalexinas (marcadas) extraídas de hojas de frijol. A) Extractos de hojas maduras infiltradas con  $MgSO_4$  (control) o Pst, durante los tiempos indicados. B) Acumulación de fitoalexinas en hojas embrionarias infiltradas con Pst o asperjadas con JA. A la muestra control se le adicionó cumestrol puro.

#### 4.2.7 Cuantificación de JA en hojas infiltradas con Pst:

Con los experimentos en los que utilizamos inhibidores de la síntesis de oxilipinas demostramos que alguna de ellas participa en la transducción de señales en la respuesta de defensa a elicitador y a patógenos. A continuación, cuantificamos la concentración endógena del JA a diferentes tiempos de haber inoculado con sulfato de magnesio (control) o con Pst, así como sus contrapartes sistémicas (Fig. 13). Encontramos que el JA se acumulaba en respuesta a la herida provocada por la inoculación, pero no en respuesta a Pst, a excepción de las muestras de una hora,



donde se midió más JA en las plantas inoculadas con Pst que las control. Además, observamos que existe una inducción sistémica del JA. Es decir, que la mitad de la hoja que no fue infiltrada incrementa los niveles de JA, especialmente en la hojas que fueron inoculadas solamente con magnesio y se reprime cuando fueron infiltradas con el patógeno.

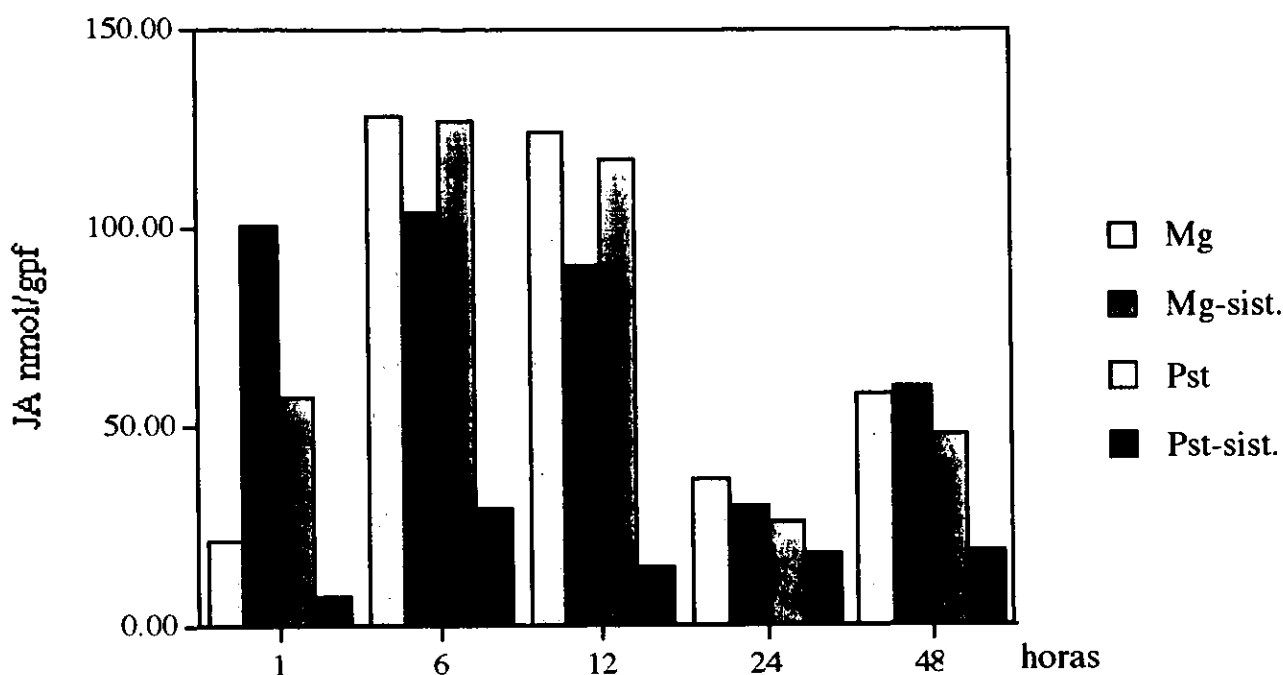


Fig. 13: Cuantificación del JA endógeno en hojas de frijol infiltradas con Pst. La medición se hizo tanto de la mitad de la hoja infiltrada con  $MgSO_4$  o Pst, como de la otra mitad que no se infiltró (Mg/Pst-sist.). La concentración del JA está dada en nmol/ gramo de peso fresco (gpf).

## V. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la expresión a nivel del ARNm de la ACCasa de frijol en respuesta a estrés, así como el efecto de Pst y de JA sobre la acumulación de la proteína.

Por otra parte, se analizó el papel de las oxilipinas como mediadores de la respuesta de defensa inducida por el ataque de *P. syringae* o por un elicitor, y por último, se aportaron datos de algunos otros fitorreguladores que pudieran estar implicados en la regulación de la ACCasa y la ChS.

### 5.1 Expresión de la ACCasa y la ChS en respuesta a estrés

Como se mencionó en los antecedentes, la ACCasa es una enzima que había sido estudiada desde el punto de vista de la síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto, pero se le había puesto poca atención a la enzima citoplásmica. Ya se sabía, que es una enzima que participaba en la síntesis de flavonoides, ya que la inducción de su actividad correlacionaba con la actividad de las enzimas del grupo II de la vía de fenilpropanoides al estimular con luz cultivos de perejil, y porque se inducía en respuesta a *Colletotrichum* y a un elicitor en alfalfa (Ebel J. y K. Hahlbrock, 1977; Shorrosh, B. y col., 1994). Sin embargo se sabía poco acerca de su regulación en respuesta a otro tipo de estrés y a los fitorreguladores que podrían estar participando en dicha regulación.

En este trabajo, demostramos que el ARNm de la ACCasa se acumula en respuesta a herida y a un patógeno bacteriano donde se establece una interacción

incompatible con el frijol. La adición de JA, etileno o ABA, también inducen la expresión de éste mensajero.

A nivel de la acumulación de la proteína, la ACCasa se acumula en respuesta a Pst y a JA (éste último no mostrado).

## 5.2 Participación de las oxilipinas en la respuesta a patógenos

El ácido jasmónico ha sido la oxilipina más estudiada y se le ha postulado como el inductor de la síntesis de diferentes tipos de fitoalexinas, en respuesta a: luz, elicitores, patógenos o herida. Sin embargo, cada vez existe más evidencia de que no es el JA el que necesariamente participa como mediador en las respuesta de defensa, sino algún otro de los componentes de ésta familia.

Nosotros demostramos que diferentes tipos de inhibidores de la síntesis de JA reprimen la expresión de la ACCasa y la ChS, en respuesta a un elicitor y a Pst. Datos semejantes existen para Pal y 4CL pertenecientes al grupo I de la vía de fenilpropanoides, cuyos transcritos se reprimen por *n*-propilgalato en respuesta a elicitor en un cultivo de perejil (Ellard-Ivey M. y C. J. Douglas, 1996). Estos datos, permiten concluir que miembros de la familia de los octadecanoides están involucrados en la expresión de los genes de ésta vía.

Se ha observado, que los fitorreguladores que participan como mediadores en la respuesta a estrés, presentan en general, un incremento en su concentración endógena durante la presencia del estímulo. Un ejemplo de esto, es el caso de tabaco donde se observa un claro incremento del JA endógeno en respuesta a *P. syringae* pv *phaseolicola* (ver fig. 4) (Kenton P. y col., 1999). Nosotros no observamos un incremento de ésta naturaleza en nuestro sistema. De hecho, únicamente a la hora de haber inoculado con la bacteria existe un incremento de la concentración de JA con respecto a la hoja inoculada con magnesio, sin embargo, éste no supera la

concentración obtenida en el control sistémico (fig. 13). Por lo tanto, podemos decir que el JA no es (o no es el único) responsable de la activación de los genes de defensa durante la interacción incompatible del frijol variedad Negro Jamapa con *P. syringae* pv *tabaci*.

Esta conclusión se debe de tomar con la reserva de que el JA fue cuantificado por un ensayo de ELISA utilizando un anticuerpo que no había sido probado anteriormente con extractos de leguminosas y es posible que exista algún componente que interfiera en la reacción. Para verificar este resultado, tendríamos que utilizar otra técnica como la cromatografía de gases. Sin embargo, puesto que una gráfica similar se obtuvo de una segunda medición con extractos diferentes (no mostrado), pensamos que esto no se debe a un comportamiento aleatorio.

Para explicar que la inhibición de la síntesis de JA tenga un efecto sobre la acumulación de los ARN mensajeros de la ACCasa y la ChS y sin embargo, no se observe un incremento en la concentración de este fitorregulador, existen varias posibilidades. Una, es postular lo mismo que Schweizer P. y colaboradores (1997), quienes estudiaron un caso similar al nuestro. Ellos encontraron por una parte, que genes de defensa (PR) que son inducidos tanto por la adición de JA exógeno como por *P. syringae* pv *syringae* en arroz, son reprimidos por el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de JA. Por la otra parte, tampoco detectan un incremento en la concentración de JA. Su explicación, es que la concentración basal de JA es suficiente para potenciar la inducción de los genes de defensa por alguna otra señal, de forma que, cuando se ve afectada su síntesis, también disminuye la expresión de los genes de defensa en respuesta al patógeno.

Otra posibilidad, es que el JA *per se* no participe en ciertas interacciones específicas planta-patógeno, como es el caso de la cebada y el hongo *Erysiphe graminis* (Hause B. y col., 1997). Pero no se descarta la posibilidad de que el intermediario PDA, o alguna otra oxilipina sí lo hagan. A este respecto, se ha visto

que los niveles PDA se incrementan en respuesta a un elicitador (Mueller M. y col., 1993), además de tener la capacidad por sí mismo de inducir la expresión de genes de defensa y la acumulación de fitoalexinas (Blechert S. y col., 1995). De hecho, es posible que el PDA tenga una relevancia mayor como señalizador en la fisiología de la planta de lo que se pensaba, como demuestran los estudios de fito-toxicidad de su análogo estructural: la coronatina (Weiler E. W. y col., 1994).

La coronatina, es una toxina producida por las bacterias *P. syringae* que produce clorosis en las hojas, incrementa los niveles de etileno, acelera la senescencia asociada a la enfermedad e inhibe el crecimiento de la raíz, todos ellos fenómenos asociados con la acción del JA. Al parecer, la acción tóxica de este compuesto se debe a su mimetismo con la señalización de los octadecanoides, sin embargo, ya que la coronatina no puede convertirse en JA, podrían atribuirse éstas respuestas al PDA (Weiler E. W. y col., 1994).

Otras de las oxilipinas implicadas en las respuesta de estrés, son los aldehídos volátiles producto de la LOX y la HPL. Se ha observado que el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con trans-2-hexenal, induce la acumulación de los transcritos de tres enzimas de la vía de fenilpropanoides (Pal, ChS y DFR), (Bate N. J. y S. J. Rothstein, 1998).

Debido a que los inhibidores que utilizamos, están afectando de forma general a la familia génica de LOX y de AOS, también estamos evitando la síntesis de cualquiera oxilipina. Si es que alguno de estos compuestos tiene una implicación directa en la activación de los genes de defensa, se explicaría el por qué disminuye la expresión de la ACCasa y la ChS en presencia de los inhibidores y la falta del incremento en la concentración de JA en presencia de Pst. Para determinar si alguna otra oxilipina está involucrada, necesitaríamos cuantificarlas al igual que al JA.

Queda claro, que la participación de JA no es la misma durante la reacción hipersensible de tabaco y la de frijol, aún cuando los dos fueron expuestos a bacterias de la misma especie.

### **5.3 Acumulación de fitoalexinas**

En este estudio, demostramos que el JA agregado exógenamente es capaz de inducir los genes de la ACCasa y la ChS. Sin embargo, mientras Pst es capaz de inducir la acumulación de fitoalexinas, el JA no lo es. Este dato concuerda con un estudio hecho por Longland A. C. y col. (1987), donde adicionan ácido linolénico (precursor del JA) a hojas de frijol y no observan ningún incremento en la producción de cumestrol, a diferencia de cuando adicionan ácido araquidónico o ácido linoléico (18:2) donde sí lo observan.

Las posibles explicaciones a éste resultado son: una, es que se requiera de una señal adicional al JA para la activación post-traducciona l de las enzimas de la vía de fenilpropanoides. Otra posibilidad, es que las últimas enzimas que participan en la síntesis de flavonoides no sean inducibles por este fitorregulador y la tercera es que los mecanismos que evitan su degradación o su almacenamiento no sean activados por JA.

Considerando que el JA no se acumula en la hojas durante la interacción de Pst con el frijol (Negro Jamapa) y que es incapaz de inducir la acumulación de fitoalexinas por sí mismo, pensamos que para la regulación de la vía de los fenilpropanoides deben de estar participando señales adicionales al JA, ya sea otra oxilipina o algún otro fitorregulador.

#### 5.4 Otros fitorreguladores involucrados en la expresión de la ACCasa

Al ABA y al etileno se les ha implicado en la activación de genes de defensa en respuesta a la herida mecánica (Hildmann T. y col., 1992; O'Donnell P. J. y col., 1996). El etileno además, tiene una participación en la inducción de genes que contienen con el ataque de patógenos (Ecker J. R. y R. W. Davis, 1987).

Nosotros demostramos que el tratamiento de plantas con cada uno de estos fitorreguladores inducen la expresión de la ACCasa.

El efecto de los inhibidores de la acción de etileno en la acumulación de los ARNm de la ACCasa y la ChS en respuesta a un elicitor y a Pst, nos aporta evidencia de que este fitorregulador participa efectivamente como mediador en la activación de la vía de los flavonoides. Para el caso del tiosulfato de plata, éste tiene un efecto inhibitorio mayor que los inhibidores de la síntesis de oxilipinas utilizados (fig.11A). Posiblemente el STS tiene una penetración más efectiva a las células o tenga un efecto pleiotrópico sobre otros procesos celulares, pero también es factible que el etileno tenga una repercusión directa sobre la activación de estos genes.

En *Arabidopsis* se ha demostrado que la inducción de genes de defensa en respuesta a ciertos patógenos, requiere de la síntesis tanto de JA como de etileno en forma paralela (Penninckx I. A. M. A. y col., 1998). En el presente, nosotros no podemos establecer si las oxilipinas están actuando como un potenciador de la acción del etileno sobre la expresión de los genes cuyas enzimas están involucradas en la síntesis de flavonoides en la planta de frijol, o si la síntesis de octadecanoides y de etileno sean igualmente indispensables para la activación de éstos genes. Lo que podemos decir con base en nuestros datos, es que ambos están involucrados. Un modelo que sintetiza los resultados antes expuestos se muestra en la figura 14.

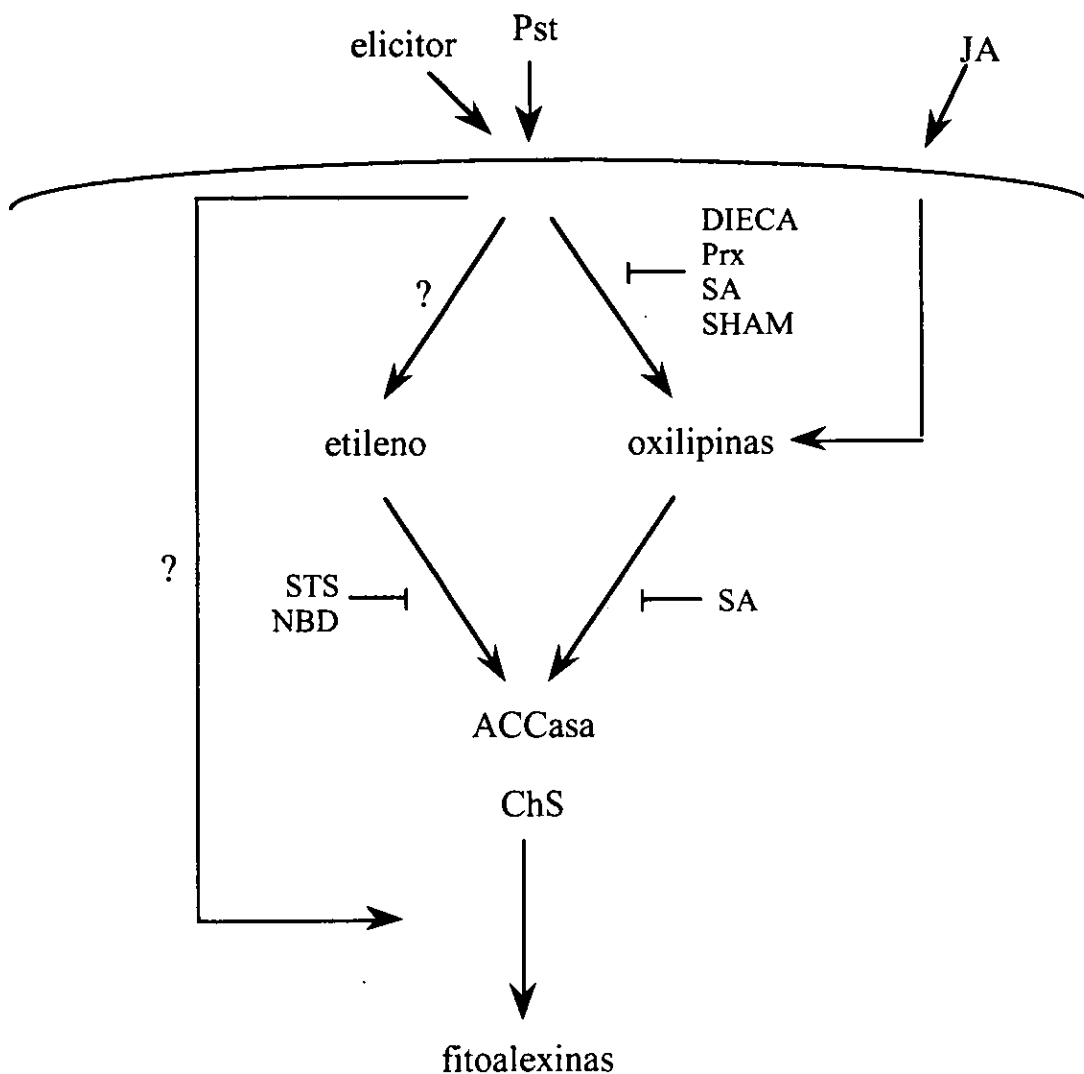


Fig. 14: La planta de frijol al percibir el ataque de un patógeno, en este caso Pst, o de un elicitor, induce la síntesis de oxilipinas y posiblemente incrementa los niveles del etileno. Ambos, participan en la acumulación de las enzimas de la vía de los fenilpropanoides, entre ellas la ACCasa y la ChS, con la subsecuente acumulación de la fitoalexinas. Por otra parte, el JA exógeno induce la producción de al menos de estas enzimas, pero no se acumulan las fitoalexinas. Es factible que existan señales adicionales en presencia del patógeno que permitan la acumulación de las fitoalexinas, que no sucede al aplicar el JA.

En las plantas solanáceas se ha estudiado ampliamente la participación del ABA en la cadena de transducción de señales que permite la inducción de los genes de defensa como *pin2*, en respuesta a la herida. De hecho, se sabe que la acumulación



del JA y la inducción de *pin2* se lleva a cabo como consecuencia de la previa acumulación del ABA (Peña-Cortés H. y col., 1995). Aunque los genes de la vía de los fenilpropanoides responden a la herida y a la adición del JA, no se han realizado estudios sobre la participación del ABA como un mediador de dicha respuesta.

Por otra parte, se ha reportado que el ABA actúa como un inhibidor de la inducción de las enzimas de la vía de los fenilpropanoides en respuesta a un elicitador, a *Phytophthora megasperma* y a la luz (Ward E. W. B. y col., 1989; Graham T. L. y M. Y. Graham, 1996).

Nosotros observamos que el ABA induce la acumulación del ARNm de la ACCasa en las plantas de frijol, pero no lo induce cuando se adiciona al cultivo de células en suspensión (dato no mostrado). Este resultado, nos podría estar indicando que no todos los mecanismos de señalización de la planta completa están presentes en el cultivo de células en suspensión, pero también nos da evidencia de que la sola adición del ABA no es suficiente para la inducción de la ACCasa, ya que un gene que se utilizó como control positivo del mismo experimento, sí se acumula su ARNm. Así mismo, el estrés osmótico y el salino, condiciones en las que se sabe el ABA se incrementa y tiene participación en la inducción de genes de defensa, la ACCasa no se expresa (dato no mostrado). Con estos resultados es difícil determinar la relevancia del ABA en la inducción del gene de la ACCasa en la respuesta al estrés.

El ABA, el etileno y posiblemente las oxilipinas, participan en los procesos de senescencia de la planta. Nosotros, observamos que existe una reinducción en la acumulación de los ARNm de la ACCasa y la ChS en hojas senescentes comparado con la acumulación basal de las hojas maduras. También se ha reportado que otros genes de defensa como las PRs, enzimas que participan en la síntesis de lignina u otras proteínas que se inducen en respuesta a patógenos, se expresan durante la senescencia. A este respecto se puede especular, la existencia de condiciones estresantes comunes durante la senescencia y el ataque de patógenos (Walter M. H. y

col., 1996; Quirino B. F. y col., 1999). Es posible que la acumulación de los fitorreguladores asociados con la respuesta al estrés, pudieran activar los mecanismos de defensa durante la senescencia de forma similar a lo que sucede durante la respuesta hipersensible.

## VI. CONCLUSIONES

Con base en todos los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, concluimos que:

La ACCasa citosólica se regula de forma similar a las otras enzimas de la vía de fenilpropanoides en respuesta a estrés, así como a la adición de JA, lo que apoya su participación como una enzima de esta vía. Posiblemente, sea una enzima regulatoria de la síntesis de flavonoides.

Durante la interacción de *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Jamapa con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, la acumulación de los ARN mensajeros de la acetil CoA carboxilasa y la chalcona sintasa, está mediada parcialmente por la acción de una oxilipina.

El ácido jasmónico, no se acumula durante la respuesta hipersensible determinada por esta interacción, por lo que no podemos asegurar su participación en la inducción de los genes de defensa ni en la producción de las fitoalexinas.

col., 1996; Quirino B. F. y col., 1999). Es posible que la acumulación de los fitorreguladores asociados con la respuesta al estrés, pudieran activar los mecanismos de defensa durante la senescencia de forma similar a lo que sucede durante la respuesta hipersensible.

## VI. CONCLUSIONES

Con base en todos los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, concluimos que:

La ACCasa citosólica se regula de forma similar a las otras enzimas de la vía de fenilpropanoides en respuesta a estrés, así como a la adición de JA, lo que apoya su participación como una enzima de esta vía. Posiblemente, sea una enzima regulatoria de la síntesis de flavonoides.

Durante la interacción de *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Jamapa con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, la acumulación de los ARN mensajeros de la acetil CoA carboxilasa y la chalcona sintasa, está mediada parcialmente por la acción de una oxilipina.

El ácido jasmónico, no se acumula durante la respuesta hipersensible determinada por esta interacción, por lo que no podemos asegurar su participación en la inducción de los genes de defensa ni en la producción de las fitoalexinas.

Posiblemente actúe como un potenciador de las respuesta de la planta ante este tipo de estrés.

El etileno y posiblemente el ABA, participen en la expresión de los genes de la vía de fenilpropanoides en respuesta al estrés.

## VII. PERSPECTIVAS

Uno de los resultados más importantes que obtuvimos de este estudio, es que a diferencia de lo que sucede durante la respuesta hipersensible en otros sistemas estudiados, en nuestro sistema no parece haber un incremento en la concentración endógena del JA. Lo primero que se tendría que hacer, es medir la concentración del JA por cromatografía de gases y de confirmarse el resultado anterior, investigar si otra oxilipina tiene una participación en este proceso. Un candidato sería el intermediario de la síntesis del JA, el PDA. Además, se podrían medir los niveles de etileno del frijol en respuesta a Pst, para poder establecer que el etileno es el otro fitorregulador involucrado en la expresión de los genes de la vía de los fenilpropanoides.

Por otra parte, otra forma de aproximarse al estudio de la transducción de señales en la inducción del gene de la ACCasa en respuesta al estrés, sería el análisis de la expresión de un gene reportero ligado al promotor de la ACCasa de frijol, introducido en plantas de Arabidopsis. Desconocemos si el promotor del gene de la ACCasa responda en ésta planta a los mismos estímulos que en frijol, pero existe la

Posiblemente actúe como un potenciador de la respuesta de la planta ante este tipo de estrés.

El etileno y posiblemente el ABA, participen en la expresión de los genes de la vía de fenilpropanoides en respuesta al estrés.

## VII. PERSPECTIVAS

Uno de los resultados más importantes que obtuvimos de este estudio, es que a diferencia de lo que sucede durante la respuesta hipersensible en otros sistemas estudiados, en nuestro sistema no parece haber un incremento en la concentración endógena del JA. Lo primero que se tendría que hacer, es medir la concentración del JA por cromatografía de gases y de confirmarse el resultado anterior, investigar si otra oxilipina tiene una participación en este proceso. Un candidato sería el intermediario de la síntesis del JA, el PDA. Además, se podrían medir los niveles de etileno del frijol en respuesta a Pst, para poder establecer que el etileno es el otro fitorregulador involucrado en la expresión de los genes de la vía de los fenilpropanoides.

Por otra parte, otra forma de aproximarse al estudio de la transducción de señales en la inducción del gene de la ACCasa en respuesta al estrés, sería el análisis de la expresión de un gene reportero ligado al promotor de la ACCasa de frijol, introducido en plantas de Arabidopsis. Desconocemos si el promotor del gene de la ACCasa responda en ésta planta a los mismos estímulos que en frijol, pero existe la

posibilidad, ya que el análisis del promotor de uno de los genes de la ChS de frijol introducido a tabaco, no mostró diferencias (Stermer B. A. y col., 1990), lo que indica que los mecanismos de señalización están conservados en diferentes especies. La ventaja de poder hacer este estudio en *Arabidopsis* es que contamos con mutantes en cada uno de los posibles fitorreguladores que participan en la expresión de la ACCasa, lo que nos permitiría discernir el efecto de cada uno de ellos. A este respecto, hemos estado trabajando en el aislamiento del promotor de la ACCasa de frijol.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Elheiga L., W. R. Brinkley, L. Zhong, S. S. Chirala, G. Woldegiorgis y S. J. Wakil (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**: 1444-1449.

Alban C., P. Baldet y R. Douce (1994). Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Biochem. J.*, **300**: 557-565.

Albretch T., A. Kehlen, K. Stahl, H. D. Knöfel, G. Sembdner y E. W. Weiler (1993). Quantification of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. *Planta*, **191**: 86-94.

Alonso J. M., T. Hirayama, G. Roman, S. Nourizadeh y J. R. Ecker (1999). EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**: 2148-2152.

posibilidad, ya que el análisis del promotor de uno de los genes de la ChS de frijol introducido a tabaco, no mostró diferencias (Stermer B. A. y col., 1990), lo que indica que los mecanismos de señalización están conservados en diferentes especies. La ventaja de poder hacer este estudio en *Arabidopsis* es que contamos con mutantes en cada uno de los posibles fitorreguladores que participan en la expresión de la ACCasa, lo que nos permitiría discernir el efecto de cada uno de ellos. A este respecto, hemos estado trabajando en el aislamiento del promotor de la ACCasa de frijol.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Elheiga L., W. R. Brinkley, L. Zhong, S. S. Chirala, G. Woldegiorgis y S. J. Wakil (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**: 1444-1449.

Alban C., P. Baldet y R. Douce (1994). Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Biochem. J.*, **300**: 557-565.

Albretch T., A. Kehlen, K. Stahl, H. D. Knöfel, G. Sembdner y E. W. Weiler (1993). Quantification of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. *Planta*, **191**: 86-94.

Alonso J. M., T. Hirayama, G. Roman, S. Nourizadeh y J. R. Ecker (1999). EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**: 2148-2152.

Ausubel F. M., F. Katagiri, M. Mindrinos y J. Glazebrook (1995). Use of *Arabidopsis thaliana* defense-related mutant to dissect the plant response to pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **92**: 4189-4196.

Baker B., P. Zambryski, B. Staskawicz y S. P. Dinesh-Kumar (1997). Signaling in Plant-Microbe Interactions. Science, **276**: 726-733.

Baldwin I. T., Z. P. Zhang, N. Diab, T. E. Ohnmeiss, E. S. McCloud, G. Y. Lynds y E. A. Schmelz (1997). Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. Planta, **201**: 397-404.

Bao X., M. Pollard y J. Ohlrogge (1998). The Biosynthesis of Erucic Acid in Developing Embryos of *Brassica rapa*. Plant Physiol., **118**: 183-190.

Bate N. J. y S. J. Rothstein (1998). C<sub>6</sub>-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. The Plant Journal, **16**: 561-569.

Bell E. A. (1981). The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products, en: The Biochemistry of Plants 7. E.E. Conn Editor, Academic Press. New York, 798 p.

Bell J. N., T. B. Ryder, V. P. M. Wingate, J. A. Bailey y C. J. Lamb (1986). Differential Accumulation of Plant Defense Gene Transcripts in a Compatible and a Incompatible Plant-Pathogen Interaction. Mol. Cel. Biol., **6**: 1615-1623.

Bell E., R. A. Creelman y J. E. Mullet (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **92**: 8675-8679.

Bergey D. R., G. A. Howe y C. A. Ryan (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **93**: 12053-12058.

Blechert S., W. Brodschelm, S. Hölder, L. Kammerer, T. M. Kutchan, M. J. Mueller, Z. Q. Xia y M. H. Zenk (1995). The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **92**: 4099-4105.



Blumwald E., G. S. Aharon y B. C. H. Lam (1998). Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Sci.*, **3**: 342-346.

Burbulis I. E. y B. Winkel-Shirley (1999). Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**: 12929-12934.

Choi D., R. M. Bostock, S. Avdiushko y D. F. Hildebrand (1994). Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induced different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**: 2329-2333.

Conconi A., M. Miquel, J. A. Browse y C. A. Ryan (1996). Intracellular Levels of Free Linolenic and Linoleic Acids Increase in Tomato Leaves in Response to Wounding. *Plant Physiol.*, **111**: 797-803.

Cramer C. L., K. Edwards, M. Dron, X. Liang, S. L. Dildine, G. P. Bolwell, R. A. Dixon, C. J. Lamb y W. Schuch (1989). Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol. Biol.*, **12**: 367-383.

Creelman R. A. y J. E. Mullet (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**: 41114-41119.

Creelman R. A. y J. E. Mullet (1997). Oligosaccharins, Brassinolides, and Jasmonates: Nontraditional Regulators of Plant Growth, Development, and Gene Expression. *The Plant Cell*, **9**: 1211-1223.

Dakora F. D., C. M. Joseph y D. A. Phillips (1993). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Root Exudates Contain Isoflavonoids in the Presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.*, **101**: 819-824.

Dixon R. A. y N. L. Paiva (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, **7**: 1085-1097.

Doares S. H., J. Narváez-Vásquez, A. Conconi y C. A. Ryan (1995). Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol.*, **108**: 1741-1746.

Ebel J. y K. Hahlbrock (1977). Enzymes of Flavone and Flavonol-Glycoside Biosynthesis. *Eur. J. Biochem.*, **75**: 201-209.

Ecker J. R. y R. W. Davis (1987). Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**: 5202-5206.

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

Ellard-Ivey M. y C. J. Douglas (1996). Role of Jasmonates in the Elicitor- and Wound-Inducible Expression of Defense Genes in Parsley and Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.*, **112**: 183-192.

Farmer E. E. y C. A. Ryan (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**: 7713-7716.

Felton G. W., K. L. Korth, J. L. Bi, S. V. Wesley, D. V. Huhman, M. C. Mathews, J. B. Murthy, C. Lamb y R. A. Dixon (1999). Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. *Current Biology*, **9**: 317-320.

Feys B. J. F., C.E. Benedetti, C. N. Penfold y J. G. Turner (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistant to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *The Plant Cell*, **6**: 751-759.

Franceschi V. R. y H. D. Grimes (1991). Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**: 6745-6749.

Gantet P., N. Imbault, M. Thiersault and P. Doireau (1998). Necessity of a Functional Octadecanoic Pathway for Indole Alkaloid Synthesis by *Catharanthus roseus* Cell Suspensions Cultured in an Auxin-Starved Medium. *Plant Cell Physiol.*, **39**: 220-225.

Gilman M. (1995). Ribonuclease protection assay, en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons Inc. pp 4.7.1-4.7.8.

Graham T. L. y M. Y. Graham (1996). Signaling in Soybean Phenylpropanoid Responses. *Plant Physiol.*, **110**: 1123-1133.

Greenberg J. T. (1996). Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**: 12094-12997.

Gundlach H., M. J. Müller, T. M. Kutchan y M. H. Zenk (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**: 2389-2393.

Hammond-Kosack K. y J. D. G. Jones (1996). Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell*, **8**: 1773-1791.

Harms H., R. Atzorn, A. Brash, H. Kühn, C. Wasternack, L. Willmitzer y H. Peña-Cortés (1995). Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant Cell*, **7**: 1645-1654.

Hause B., K. H. Kogel, B. Parthier y C. Wasternack (1997). In Barley Leaf Cells, Jasmonates do not Act as a Signal during Compatible or Incompatible Interactions with the Powdery Mildew Fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *J. Plant Physiol.*, **150**: 127-132.

He S. Y. (1996). Elicitation of Plant Hypersensitive Response by Bacteria. *Plant Physiol.*, **112**: 865-869.

Heldt H. W. (1997). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, New York 524 p.

Hildmann T., M. Ebner, H. Peña-Cortés, J. J. Sánchez-Serrano, L. Willmitzer y S. Prat (1992). General Roles of Abscisic and Jasmonic Acids in Gene Activation as a Result of Mechanical Wounding. *The Plant Cell*, **4**: 1157-1170.

Hotter G. S., J. Kooter, I. A. Dubery, C. J. Lamb, R. A. Dixon y M. J. Harrison (1995). Cis elements and potential trans-acting factors for the developmental regulation of the *Phaseolus vulgaris* CHS15 promoter. *Plant Mol. Biol.*, **28**: 967-981.  
Howe, G. A., J. Lightner, J. Browse y C. A. Ryan (1996). An Octadecanoid Pathway Mutant (JL5) of Tomato Is Compromised in Signaling for Defense against Insect Attack. *The Plant Cell*, **8**: 2067-2077.

Hrazdina G., A. M. Zobel y H. C. Hoch (1987). Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**: 8966-8970.

Jakobek J. L. y P. B. Lindgren (1993). Generalized Induction of Defense Responses in Bean Is Not Correlated with the Induction of the Hypersensitive Reaction. *The Plant Cell*, **5**: 49-56.

Kenton P., L. A. J. Mur, R. Atzorn, C. Wasternack y J. Draper (1999). (-)-Jasmonic Acid Accumulation in Tobacco Hypersensitive Response Lesions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**: 74-78.

King E., M. K. Ward y D. E. Raney (1954). Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, **44**: 301-307.

Konishi T., K. Shinohara, K. Yamada y Y. Sasaki (1996a). Acetyl-CoA Carboxylase in Higher Plants: Most Plants Other Than Gramineae Have Both the Prokaryotic and the Eukaryotic Forms of This Enzyme. *Plant Cell Physiol.*, **37**: 117-122.

Konishi T., T. Kamoi, R. Matsuno y Y. Sasaki (1996b). Induction of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase in Pea Leaves by Ultraviolet-B Irradiation. *Plant Cell Physiol.*, **37**: 1197-1200.

Kubasek W. L., B. W. Shirley, A. McKillop, H. M. Goodman, W. Briggs y F. M. Ausubel (1992). Regulation of Flavonoid Biosynthetic Genes in Germinating *Arabidopsis* Seedlings. *The Plant Cell*, **4**: 1229-1236.

Laudert D., U. Pfannschmidt, F. Lottspeich, H. Holländer-Czytko y E. W. Wiler (1996). Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.*, **31**: 323-335.

León J. y J. J. Sánchez-Serrano (1999). Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**: 373-380.

Longland A. C., A. J. Slusarenko y J. Friend (1987). Arachidonic and Linoleic Acids Elicit Isoflavonoid Phytoalexin Accumulation in *Phaseolus vulgaris* (French bean). *J. Phytopathology* **120**: 289-297.

Maldonado M. T. (1996). Actividad de un extracto de *Saccharomyces cerevisiae* como estimulador de la resistencia a la antracnosis en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) cv. Flor de Mayo. Tesis para obtener el grado de biólogo, 80 p. U.N.A.M.

Maldonado-Mendoza I. E., M. López-Meyer, J. R. Galef, R. J. Burnett y C. L. Nessler (1996). Molecular analysis of new member of the opium poppy tyrosine/3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase gene family. *Plant Physiol.*, **110**: 43-49.

McConn M. y J. Browse (1996). The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant. *The Plant Cell*, **8**: 403-416.

McConn M., R. A. Creelman, E. Bell, J. E. Mullet y J. Browse (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 5473-5477.

McDowell J. M. y J. L. Dangi (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.*, **25**: 79-82.

- Meyer A., O. Miersh, C. Büttner, W. Dathe y G. Sembdner (1984). Occurrence of the Plant Growth Regulator Jasmonic Acid in Plants. *J. Plant Growth Regul.*, **3**: 1-8.
- Mueller M. J., W. Brodschelm, E. Spannagl y M. H. Zenk (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**: 7490-7494.
- Naton B., K. Hahlbrock y E. Schmelzer (1996). Correlation of Rapid Cell Death in Metabolic Changes in Fungus-Infected, Cultured Parsley Cells. *Plant Physiol.*, **112**: 433-444.
- Nojiri H., M. Sugimori, H. Yamane, Y. Nishimura, A. Yamada, N. Shibuya, O. Kodama, N. Murofushi y T. Omori (1996). Involvement of Jasmonic Acid in Elicitor-Induced Phytoalexin Production in Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Physiol.*, **110**: 387-392.
- Norman C., S. Vidal y T. Palva (1999). Oligogalacturonide-Mediated Induction of a Gene Involved in Jasmonic Acid Synthesis in Response to the Cell-Wall Degrading Enzymes of the Plant Pathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**: 640-644.
- O'Donnell P. J., C. Calvert, R. Atzorn, C. Wasternack, H. M. O. Leyser y D. J. Bowles (1996). Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science*, **274**: 1914-1917.
- Parker J. E. y M. J. Coleman (1997). Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends Biochem. Sci.*, **22**: 291-296.
- Penninckx I. A. M. A., K. Eggermont, F. R. G. Terras, B. P. H. J. Thomma, G. W. De Samblanx, A. Buchala, J. P. Métraux, J. M. Manners y W. F. Broekaert (1996). Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *The Plant Cell*, **8**: 2309-2323.
- Penninckx I. A. M. A., B. P. H. J. Thomma, A. Buchala, J. P. Métraux y W. F. Broekaert (1998). Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of Plant Defensin Gene in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **10**: 2103-2113.

Peña-Cortés H., Albrecht T., Prat S., Weiler E. W. y L. Willmitzer (1993). Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, **191**: 123-128.

Peña-Cortés H., J. Fisahn y L. Willmitzer (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**: 4106-4113.

Quirino B. F., J. Normanly y R. M. Amasino (1999). Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molec. Biol.*, **40**: 267-278.

Reinold S. y K. Halbrock (1996). Biphasic Temporal and Spatial Induction Patterns of Defense-Related mRNAs and Proteins in Fungus-Infected Parsley Leaves. *Plant Physiol.*, **112**: 131-140.

Rickauer M., W. Brodschelm, A. Bottin, C. Véronési, H. Grimal y M. T. Esquerré-Tugayé (1997). The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta*, **202**: 155-162.

Roesler K. R., L. J. Savage, D. K. Shintani, B. S. Shorrosh y J. B. Ohlrogge (1996). Co-purification, co-immunoprecipitation, and coordinate expression of acetyl-coenzyme A carboxylase activity, biotin carboxylase, and biotin carboxyl carrier protein of higher plants. *Planta*, **198**: 517-525.

Rojo E., J. León y J. J. Sánchez-Serrano (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **20**: 135-142.

Royo J., J. León, G. Vancanneyt, J. P. Albar, S. Rosahl, F. Ortego, P. Castañera y J. J. Sánchez-Serrano (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**: 1146-1151.

Sasaki Y., T. Konishi y Y. Nagano (1995). The Compartmentation of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase in Plants. *Plant Physiol.*, **108**: 445-449.

Schaller F. y E. W. Weiler (1997a). Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants. 12-Oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *Eur. J. Biochem.*, **245**: 294-299.

Schaller F. y E. W. Weiler (1997b). Molecular Cloning Characterization of 12-Oxophytodienoate Reductase, an Enzyme of the Octadecanoid Signaling Pathway from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 28066-28072.

Schulte W., R. Töpfer, R. Stracke, J. Schell y N. Martini (1997). Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by multi-gene family: Indication for plastidic localization of at least one isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 3465-3470.

Schweizer P., A. Buchala, P. Silverman, M. Seskar, I. Raskin y J. P. Métraux (1997). Jasmonate-Inducible Genes Are Activated in Rice by Pathogen Attack without a Concomitant Increase in Endogenous Jasmonic Acid Levels. *Plant Physiol.*, **114**: 79-88.

Sembdner G. y B. Parthier (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 569-589.

Sharan M., G. Taguchi, K. Gonda, T. Jouke, M. Shimosaka, N. Hayashida, M. Okazaki (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science*, **132**: 13-19.

Shorrosh B. S., R. A. Dixon y J. B. Ohlrogge (1994). Molecular cloning, characterization, and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**: 4323-4327.

Sivasankar S., B. Sheldrick y S. J. Rothstein (2000). Expression of Allene Oxide Synthase Determines Defense Gene Activation in Tomato. *Plant Physiol.*, **122**: 1335-1342.

Somerville C. R. y W. L. Ogren (1982). Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis thaliana*; en *Methods in Chloroplast Biology*. Edelman R. H. M. y N.H. Chua (Eds.), Elsevier Biomedical Press, pp. 129-138.



Song W. C., C. D. Funk y A. R. Brash (1993). Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**: 8519-8523.

Staskawicz B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, J. G. Ellis y J. D. G. Jones (1995). Molecular Genetics of Plant Disease Resistance. *Science*, **268**: 661-667.

Staswick P. E., G. Y. Yuen y C. C. Lehman (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal*, **15**: 747-754.

Stermer B. A., J. Schmid, C. J. Lamb, R. A. Dixon (1990). Infection and stress activation of bean chalcone synthase promoters in transgenic tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 381-388.

Stryer L. (1988). *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 3rd ed. New York, 1089 p.

Theodorou M. K., J. C. M. Scanton e I. M. Smith (1982). Infection and phytoalexin accumulation in French Bean leaves injected with spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology*, **103**: 189-197.

Thomma B. P. H. J., K. Eggermont, I. A. M. A. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Vogelsang, B. P. A. Cammue y W. F. Broekaert (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**: 15107-15111.

Titarenko E., E. Rojo, J. León y J. J. Sánchez-Serrano (1997). Jasmonic Acid-Dependent and -Independent Signaling Pathways Control Wound-Induced Gene Activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **115**: 817-826.

Toledo-García I. I. (1998). Efectos sobre la nodulación de *Phaseolus vulgaris* de los mecanismos de defensa de la planta inducidos por patógenos. Tesis para obtener el grado de maestría en Ciencias Agropecuarias, 75 p. U.A.E.M.

Ueda J. y K. Miyamoto (1994). Separation of a new type of plant growth regulator, jasmonates, by chromatographic procedures. *Journal of chromatography A*, **658**: 129-142.

Véronési C., M. Rickauer, J. Fournier, M. L. Pouénat y M. T. Esquerré-Tugayé (1996). Lipoxygenase Gene Expression in the Tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* Interaction. *Plant Physiol.*, **112**: 997-1004.

Vick B. A. y D. C. Zimmerman (1984). Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiol.*, **75**: 458-461.

Vijayan P., J. Shockey, C. A. Lévesque, R. J. Cook y J. Browse (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**: 7209-7214.

Walter M. H., J. W. Liu, J. Wünn y D. Hess (1996). Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*Ypr10*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur. J. Biochem.* **239**: 281-293.

Ward E. W. B., D. M. Cahill y M. K. Bhattacharyya (1989). Abscisic Acid Suppression of Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity and mRNA, and Resistance of Soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Plant Physiol.*, **91**: 23-27.

Ward E. R., S. J. Uknes, S. C. Williams, S. S. Dincher, D. L. Wiederhold, D. C. Alexander, P. Ahl-Goy, J. P. Métraux y J. A. Ryals (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induced Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, **3**: 1085-1094.

Wasternack C. y B. Parthier (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.*, **2**: 302-307.

Weicher H., I. Stenzek, E. Berndt, C. Wasternack e I. Feussner (1999). Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Letters*, **464**: 133-137.

Weiler E. W., T. M. Kutchan, T. Gorba, W. Brodschelm, U. Niesel y F. Bublitz (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants FEBS Letters, **345**: 9-13.

Wink M. (1999). Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology. Sheffield Academic Press, Sheffield 362 p.

Xu Y., P. F. L. Chang, D. Liu, M. L. Narasimhan, K. G. Raghothama, P. M. Hasegawa y R. A. Bressan (1994). Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. The Plant Cell, **6**: 1077-1085.

Yanai, Y., T. Kawasaki, H. Shimada, E. S. Wurtele, B. J. Nikolau y N. Ichikawa (1995). Genomic Organization of 251 kDa Acetyl-CoA Carboxylase Genes in *Arabidopsis*: Tandem Gene Duplication has Made Two Differentially Expressed Isozymes. Plant Cell Physiol., **36**: 779-787.

Yang Y., J. Shah y D. F. Klessig (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. Genes and Development, **11**: 1621-1639.

Yu I. C., J. Parker y A. F. Bent (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **95**: 7819-7824.

Ziegler J., I. Stenzel, B. Hause, H. Maucher, M. Hamberg, R. Grimm, M. Ganai y C. Wasternack (2000). Molecular Cloning of Allene Oxide Cyclase. J. Biol. Chem., **275**: 19132-19138.