

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

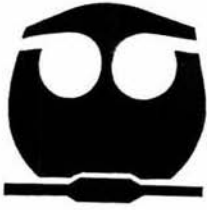
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Asociación del metabolismo de esfingolípidos  
con la acumulación de ácido salicílico  
en tejidos vegetales**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A  
**MARIANA RIVAS SAN VICENTE**

LORENA

Tutor: Dr. Javier Plasencia de la Parra



México, D.F.

Junio 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, bajo la dirección del Dr. Javier Plasencia de la Parra.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología
Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química

El Jurado para el examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Mario Rocha Sosa
Vocal	Dr. Francisco Ruiz Terán
Secretario	Dr. Eleazar Martínez Barajas
Suplente	Dra. Marina Macías Silva
Suplente	Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: \_\_\_\_\_

*Mariana Rivas*

FECHA: \_\_\_\_\_

*31 / Mayo / 04*

FIRMA: \_\_\_\_\_

*Mariana Rivas*

Este trabajo se realizó con apoyos de los proyectos:

- ❖ DGAPA-PAPIIT-UNAM (IN208300)
- ❖ CONACYT (40311-Q)
- ❖ UCMEXUS (CN-03-118)

Durante los estudios de Maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (No. de registro 170394) y DGEP-UNAM.

Se agradece la supervisión de la M.C. Manuela Nájera Martínez en el montaje de las técnicas de Biología Molecular.

Se reconoce el apoyo de la Q. Laurel Fabila Ibarra en el mantenimiento del equipo Fluor-S.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM, mi máxima casa de estudios, por brindarme una sólida formación académica.

Al Dr. Javier Plasencia de la Parra, por su invaluable ayuda, apoyo, y sabios consejos durante mis estudios de Maestría. También agradezco su supervisión y continuo trabajo en la realización de la tesis.

A las Dra. Marina Gavilanes por darme la oportunidad de integrarme al excelente grupo de trabajo del laboratorio 101, así como por sus acertados consejos y sugerencias en la realización de la tesis.

A la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay y al Dr. Francisco Rufz Terán, por el tiempo que invirtieron en mi evaluación y formación.

A los miembros del jurado, por la revisión de este trabajo y consejos acertados.

A Lety García, Auxiliar de la Coordinación del Posgrado, quien siempre tiene una sonrisa para todos los alumnos del Posgrado y nos ayuda con los trámites y papeleo.

A todos mis compañeros del laboratorio 101.....

Manuela Nájera (Manue)

Ma. Eugenia de la Torre (Maru)

Andrea SanJuan (Andreita)

Diana Sánchez

Erika Miranda

Laura Carmona

Jiro Suzuri

Nahieli Greaves

Silvia Palacios

Mariana Saucedo

Consuelo Enríquez (Chelo)

Josefina (Sra. Jose)

Por la calidez de su amistad sincera y especial, que aumentó la alegría de los buenos tiempos y me ayudó en los días difíciles.

## ☪ DEDICATORIAS ☪

☪ A Dios por crearme, por darme una hermosa familia y por todas las promesas y bendiciones que me han permitido cumplir mis metas.

*“Bienaventurado el hombre que confía en el Señor... Es como árbol plantado a orillas de un río, cuyas raíces penetran hasta encontrar el agua; árbol al que no agobia el calor ni angustian los largos meses de sequía. Su follaje se mantiene verde y produce en todo tiempo jugoso fruto.”*

*Jeremías 17:7-8*

☪ A las personas que llenan mi vida con su amor, apoyo, paciencia y tolerancia...

mis padres, Augusto y Viole,  
y mis hermanos, Javier y Vero.

☪ A mi tía Rocío, cuyo amor y apoyo han sido decisivos en mi formación académica.

☪ A mis adoradas amigas que aún en la distancia me han demostrado estar siempre cerca de mí: Noemí, Pilar, Viviana, Marta y Ruth.

## ABREVIATURAS

4-CL	4-cumaratoCoA ligasa
AAL	toxina producida por el hongo <i>Alternaria alternata</i>
ABA	ácido abscísico
<i>as-1</i>	secuencia de activación 1
<i>Avr</i>	gen de avirulencia
BA	ácido benzoico
BA2H	ácido benzoico 2-hidroxilasa
BTH	benzotiadiazol
C4H	cinamato-4-hidroxilasa
Ca <sup>2+</sup>	ión calcio
CAPK	cinasa de proteínas activada por ceramida
CAPP	fosfatasa de proteínas activada por ceramida
cbp	cuanto baste para
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CHS	chalcona sintasa
Cl <sup>-</sup>	cloruro
DAGK	diacilglicerol cinasa
DEPC	dietilpirocarbonato
DHS	dihidroesfingosina (esfinganina)
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
<i>E</i>	configuración <i>trans</i> en un doble enlace
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ERM	MAPK que responde a elicitores
EROs	especies reactivas de oxígeno
ET	etileno
FB1	fumonisina B1
f. sp.	formae specialis
g	gramo
Gal	galactosa
GlcCer	glucosilceramida
Glu	glucosa
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G
GSC	glucosil ceramida sintasa
GST	glutación-S-transferasa
GT	glucosiltransferasa
GTE	amortiguador con glucosa, Tris-HCl y EDTA
H <sup>+</sup>	protón



---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
HR	respuesta de hipersensibilidad
IC <sub>50</sub>	concentración para abatir la actividad enzimática al 50%
ICS	isocorismato sintasa
Ino	inositol
IPL	isocorismato piruvato liasa
JA	ácido jasmónico
K <sup>+</sup>	ión potasio
KDa	kilodalton
λ	longitud de onda
Man	manosa
MAPK	cinasa de proteínas activada por mitógenos
Mg <sup>2+</sup>	ión magnesio
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
μL	microlitro
μM	micromolar
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloruro de sodio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<i>nahG</i>	gen bacteriano que codifica la salicilato hidroxilasa
NaI	yoduro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
ng	nanogramo
nm	nanómetros
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
o-ANI	ácido <i>orto</i> -anísico
°C	grado Celsius
PAL	fenilalanina amonio liasa
pb	pares de bases
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	polietilenglicol
pg	picogramo
pH	logaritmo negativo de la concentración de protones
PKB	proteína cinasa B

---

PKC	proteína cinasa C
PP1 y PP2A	fosfatasa de proteínas
PPasa	pirofosfatasa
<i>PR</i>	genes relacionados con la patogénesis
PR-1	proteína asociada con la patogénesis e inducida por ácido salicílico
<i>R</i>	gen de resistencia
Rb	retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensajero
Rubisco	ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa
S1P	esfingosina-1-fosfato
SA	ácido salicílico
SAR	resistencia sistémica adquirida
SDS	dodecilsulfato de sodio
SIPK	MAPK inducida por ácido salicílico
SMasa	esfingomielinasa
spp	especies
SPT	serina palmitoil transferasa
TAE	amortiguador Tris-HCl, ácido acético, EDTA
TMV	virus del mosaico del tabaco
TNF	factor de necrosis tumoral
UBQ	ubiquitina
UV	radiación ultravioleta
<i>Z</i>	configuración <i>cis</i> en un doble enlace

## CONTENIDO

	Pág
Resumen.....	10
<b>I. Introducción</b>	
<b>A. Respuestas de defensa en las plantas infectadas por organismos patógenos.....</b>	<b>12</b>
A.1. Reconocimiento del patógeno por la planta hospedera.....	12
A.2. Respuestas tempranas en tejidos invadidos.....	13
A.2.1. Activación de canales iónicos y estallido oxidativo.....	13
A.2.2. Fosforilación y desfosforilación de proteínas.....	14
A.2.3. Respuesta de hipersensibilidad.....	15
A.3. Respuestas tardías.....	15
A.3.1. Cambios en el metabolismo y expresión de genes de defensa.....	15
<b>B. Metabolismo fenilpropanoide.....</b>	<b>16</b>
B.1. Biosíntesis de compuestos fenilpropanoides.....	16
B.2. Importancia biológica de los compuestos fenilpropanoides en plantas.....	18
B.2.1. Funciones de los fenilpropanoides en el desarrollo de la planta.....	18
B.2.2. Funciones de los fenilpropanoides en condiciones de estrés.....	18
B.3. Regulación transcripcional de la biosíntesis de fenilpropanoides durante la respuesta de defensa.....	19
<b>C. Ácido Salicílico (SA).....</b>	<b>21</b>
C.1. Funciones fisiológicas que regula el ácido salicílico en las plantas.....	21
C.2. Mecanismos de acción del SA en las respuestas de defensa contra patógenos.....	23
C.2.1. Proteínas que se unen al ácido salicílico.....	23
C.2.2. Activación de cascadas de señalización a través de una SIPK (una MAPK).....	24
C.2.3. Activación de la expresión de genes de defensa.....	24
C.3. Metabolismo del ácido salicílico.....	25
C.3.1. Biosíntesis a partir de la fenilalanina.....	25
C.3.2. Biosíntesis a partir del corismato.....	26
C.3.3. Formación de ésteres y glucósidos del ácido salicílico.....	27
C.4. Interacción entre el SA y otras hormonas en las respuestas de defensa de plantas a patógenos.....	28
<b>D. Esfingolípidos.....</b>	<b>30</b>
D.1. Diversidad estructural.....	30
D.1.1. Bases esfingoides.....	30
D.1.2. Ácidos grasos.....	31
D.1.3. Grupos polares.....	31

D.2. Metabolismo de esfingolípidos.....	32
D.2.1. Biosíntesis <i>de novo</i> .....	33
D.2.2. Degradación y recambio entre esfingolípidos.....	34
D.3. Actividad biológica.....	35
D.3.1. Esfingolípidos bioactivos en mamíferos y <i>S. cerevisiae</i> .....	35
D.3.2. Funciones de esfingolípidos en plantas.....	37
D.3.2.1. Respuestas a algunos tipos de estrés abiótico.....	37
D.3.2.2. Regulación de la actividad de proteínas.....	38
D.3.2.3. Fitopatogénesis.....	38
D.3.2.4. Muerte celular.....	39
D.4. Inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos y consecuencias tóxicas.....	39
II. Antecedentes inmediatos.....	43
III. Hipótesis.....	44
IV. Objetivos.....	44
V. Materiales y métodos.....	45
1. Imbibición de embriones.....	45
2. Extracción de ácido salicílico.....	46
3. Determinación de condiciones para el análisis cuantitativo por HPLC del ácido salicílico y o-anísico.....	46
4. Cuantificación de ácido salicílico en extractos.....	47
5. Extracción y calibración de RNA total.....	47
6. Clonación de fragmentos de cDNA de PAL, ICS, PR-1 y UBQ de maíz.....	48
6.1. Transcripción reversa.....	49
6.2. Amplificación de cDNAs por PCR.....	49
6.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	50
6.4. Ligación de insertos.....	50
6.5. Transformación de células competentes.....	51
6.6. Purificación de DNA plasmídico.....	51
6.7. Secuenciación.....	52
6.8. Digestión de plásmidos.....	52
7. Determinación de condiciones óptimas para el ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo.....	52

---

VI. Resultados.....	53
1. Condiciones para el análisis cuantitativo por HPLC del SA y ácido o-ANI.....	53
1.1. Composición de fase móvil, velocidad de flujo y tiempos de retención del SA y o-ANI	53
1.2. Curvas de calibración.....	54
2. Porcentajes de recuperación en la extracción de SA.....	55
3. Niveles basales de SA libre en embriones de maíz en germinación.....	56
4. Efecto de la FB1 en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación.....	57
4.1. Incremento en los niveles de SA en respuesta a FB1 10 µM.....	57
4.2. Acumulación de SA en respuesta a diferentes concentraciones de FB1.....	58
5. Efecto de compuestos esfingoides en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación.....	59
5.1. Acumulación de SA inducida por fitoesfingosina y esfinganina 10 µM.....	59
5.2. Acumulación de SA inducida por ceramida-C6 10 µM.....	60
6. Efecto de miriocina 100 nM y 1 µM en los niveles de SA.....	61
7. Análisis molecular de la expresión de genes que participan en la biosíntesis de SA.....	63
7.1. Clonación de cDNAs parciales de PAL, ICS, UBQ y PR-1.....	63
7.2. Condiciones óptimas para el análisis de expresión génica por RT-PCR semi-cuantitativo	64
7.3. Análisis de la expresión de <i>PAL</i> e <i>ICS</i> en respuesta a FB1, miriocina, esfinganina y ceramida.....	66
VII. Discusión de resultados.....	68
VIII. Conclusiones.....	76
IX. Bibliografía.....	77
X. Apéndice.....	94

	Página
Figura 1. Funciones probables de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en las respuestas de defensa de la célula vegetal	14
Figura 2. Relaciones biosintéticas entre compuestos fenilpropanoides	17
Figura 3. Compuestos fenilpropanoides que se acumulan ante diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico	19
Figura 4. Estructura química del ácido salicílico y compuestos análogos que activan la resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas	21
Figura 5. Rutas biosintéticas del ácido salicílico en plantas	27
Figura 6. Estructuras de las bases esfingoideas más comunes en plantas	31
Figura 7. Estructuras de esfingolípidos en plantas	32
Figura 8. Biosíntesis <i>de novo</i> y recambio de esfingolípidos en plantas	35
Figura 9. Interrupción de la biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos por inhibidores producidos por hongos patógenos de plantas	41
Figura 10. Cromatogramas de los estándares de los ácidos <i>o</i> -anísico y salicílico obtenidos bajo elución isocrática en una columna de fase reversa C18 con la mezcla metanol 40% y agua 60% (con 4% de ácido acético) a un flujo de 0.8 mL/min	53
Figura 11. Detección de SA y <i>o</i> -ANI por cromatografía líquida con detección de fluorescencia en un extracto de embriones de maíz germinados durante 36 horas	54
Figura 12. Curva de calibración del ácido salicílico	54
Figura 13. Curva de calibración del ácido <i>o</i> -anísico	55
Figura 14. Eficiencia de extracción de SA determinada por la adición de diferentes cantidades de estándar interno	55
Figura 15. Contenido de SA libre en embriones secos y en germinación	56
Figura 16. Acumulación de SA inducida por FB1 10 $\mu$ M	57
Figura 17. Efecto dosis-respuesta en la acumulación de SA inducida por FB1 en embriones de maíz germinados durante 36 horas	58
Figura 18. Efecto de las bases esfingoideas en la acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación	59
Figura 19. Efecto de la esfinganina y la ceramida 10 $\mu$ M en la acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación	61
Figura 20. Efecto de la miriocina en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación	62
Figura 21. Fragmentos de cDNA obtenidos por RT-PCR	63

Figura 22.	Calibración en gel de 2 µg de RNA total que fueron utilizados para sintetizar cDNAs	.....	65
Figura 23.	Determinación de los parámetros óptimos para la detección semi-cuantitativa de los transcritos ZmPAL, ZmICS y ZmUBQ por RT-PCR	.....	65
Figura 24.	Análisis de la expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>ICS</i> y <i>UBQ</i> en embriones de maíz germinados en presencia de inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos (FB1 10 µM y miriocina 1 µM) y esfingolípidos (esfinganina y ceramida-C6 10 µM)	.....	67
Figura 25.	Acumulación de bases esfingoideas y ácido salicílico inducida por FB1 10 µM.	.....	70
Figura 26.	Modelo propuesto para la esfinganina como regulador de la acumulación de ácido salicílico en la respuesta de defensa a patógenos	.....	75
Figura 27.	Efecto de la esfinganina y ceramida 10 µM en la acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación	.....	99

	Página
Tabla 1. Factores de transcripción que regulan o interactúan con genes del metabolismo fenilpropanoide involucrados en la respuesta de defensa a patógenos	20
Tabla 2. Composición de fases móviles utilizadas para el análisis cuantitativo del SA por HPLC en fase reversa y elución isocrática	46
Tabla 3. Oligonucleótidos específicos diseñados para sintetizar cDNAs y amplificarlos por PCR	48
Tabla 4. Preparación de la mezcla para transcripción reversa	49
Tabla 5. Preparación de las mezclas para PCR	49
Tabla 6. Contenido de SA libre e incremento en peso húmedo de embriones de maíz secos y germinados durante 4 a 60 horas	56
Tabla 7. Niveles de SA en embriones de maíz embebidos en ausencia y presencia de FB1 10 $\mu$ M	57
Tabla 8. Niveles de SA en embriones de maíz embebidos con diferentes concentraciones de FB1 durante 36 h.	58
Tabla 9. Niveles de SA (ng/gramo) en embriones de maíz embebidos con bases esfingoideas (10 $\mu$ M).	59
Tabla 10. Niveles de SA (ng/gramo) en embriones de maíz embebidos con esfinganina y ceramida 10 $\mu$ M	60
Tabla 11. Niveles de SA (ng/gramo) en embriones de maíz germinados en presencia de miriocina 100 nM y 1 $\mu$ M	62
Tabla 12. Similitud entre las secuencias de cDNA clonadas a partir de embriones de maíz y secuencias registradas en el banco de genes	64
Tabla 13. Condiciones para el ensayo de RT-PCR cuantitativo	65
Tabla 14. Contenido de SA libre en embriones de maíz germinados en presencia de esfinganina y ceramida 10 $\mu$ M	99



## RESUMEN

Cuando las plantas interactúan con ciertos patógenos activan respuestas de defensa inducibles que les permiten generar barreras físicas y químicas que previenen el desarrollo del patógeno. Las plantas resistentes desarrollan una respuesta de hipersensibilidad (HR) que se caracteriza por la formación de lesiones necróticas alrededor del sitio de infección y por cambios bioquímicos tales como: activación de flujos de iones, generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), entrecruzamiento de las proteínas de pared celular, activación de proteínas cinasas, acumulación de ácido salicílico (SA) y compuestos antimicrobianos (fitoalexinas), así como inducción de la expresión de varios genes de protección y defensa.

El ácido salicílico (SA) es un regulador importante en las respuestas de defensa ante patógenos y en la resistencia sistémica adquirida (SAR). Sus niveles se incrementan ante la infección por un patógeno tanto en el sitio de infección como en tejidos distales, e induce la expresión de varios genes asociados con la patogénesis (*PR*), muerte celular y resistencia a la infección. Aunque se sabe que el SA es una molécula que induce resistencia, se conoce muy poco de los eventos bioquímicos que relacionan la infección con su acumulación.

Los esfingolípidos son componentes estructurales de las membranas de células eucariotas. Su estructura consiste de un ácido graso unido a una base esfingoidea por un enlace amida. Estos lípidos también actúan como moléculas de señalización que regulan crecimiento celular, diferenciación y muerte celular programada en células de mamífero y levadura. Sin embargo, su función como moléculas de señalización en células de plantas ha sido poco estudiada y podría ser importante en las interacciones planta-patógeno.

La fumonisina (FB1) es una toxina producida por el hongo *Fusarium verticillioides* que inhibe la biosíntesis de esfingolípidos y cuando se aplica a embriones de maíz durante la germinación induce expresión de genes *PR*, fragmentación del DNA y activación de nucleasas. Estas respuestas son características de la HR y probablemente se deban a la interrupción del metabolismo de esfingolípidos observada como incremento en los niveles de esfinganina y fitoesfingosina.

En este trabajo se investigó si los esfingolípidos están involucrados en la vía de señalización que activa la acumulación de ácido salicílico en embriones de maíz en germinación y la ruta por la cual este metabolito es sintetizado. Los embriones de maíz germinaron en presencia de FB1 o de distintos esfingolípidos y sus niveles de ácido salicílico libre se determinaron por HPLC con un detector de fluorescencia. También se extrajo RNA total de embriones expuestos a la FB1 o esfingolípidos para analizar la expresión de genes que participan en las dos rutas biosintéticas de ácido salicílico por RT-PCR semi-cuantitativo.

El tratamiento de los embriones de maíz con FB1 10  $\mu$ M provocó que los niveles de SA se duplicaran a las 36 horas y se observó un efecto dosis-respuesta cuando se probaron concentraciones mayores de la toxina. Para determinar si la acumulación de SA inducida por la FB1 era debida al incremento de bases esfingoideas, se germinaron embriones en presencia de esfinganina o fitoesfingosina 10  $\mu$ M. Ambas bases esfingoideas elevaron los niveles de SA; la esfinganina provocó un incremento de 4

a 6 veces, mientras que la fitoesfingosina triplicó los niveles de SA, a las 16 y 24 horas respectivamente. La ceramida también provocó que se incrementaran 3 veces los niveles de SA a las 24 horas.

La FB1, esfinganina y ceramida-C6 indujeron la expresión de la PAL a las 6, 12 y 48 horas, respectivamente. La expresión de la ICS también fue incrementada por la FB1 y esfinganina, aunque en menor magnitud y más tiempo en comparación con la expresión de PAL. Como control de cargado se utilizó al transcrito de la ubiquitina pues sus niveles no tuvieron variaciones evidentes a lo largo de la germinación ni en respuesta a los compuestos probados.

Los resultados de este trabajo demuestran la asociación del metabolismo de esfingolípidos con la respuesta de defensa de la plantas dependientes de la vía del ácido salicílico. Sin embargo, es difícil señalar el compuesto en particular (base esfingoidea o ceramida) que es responsable de la acumulación de ácido salicílico por la interconversión que existe entre ellos.

## A. Respuestas de defensa en las plantas infectadas por organismos patógenos.

### A.1. Reconocimiento del patógeno por la planta hospedera.

Las plantas están expuestas al ataque por microorganismos patógenos muy diversos, por lo que han evolucionado para responder en forma muy efectiva a este tipo de agresión. La interacción planta-patógeno cuya consecuencia es la infección de la planta se conoce como compatible o de susceptibilidad, mientras que en la que no hay una infección exitosa se conoce como incompatible o de resistencia. Dentro de las respuestas de resistencia de las plantas a patógenos se pueden distinguir dos tipos: específica y no específica. La resistencia específica está determinada genéticamente por la interacción directa o indirecta entre el producto del gen de resistencia ( $R$ ) de la planta y el producto del gen de avirulencia ( $Avr$ ) del patógeno, de tal manera que la presencia o ausencia de resistencia específica en un hospedero depende de los genotipos de los organismos que participan en la interacción. Por el contrario, la resistencia no específica (incompatibilidad básica) es exhibida por todas las especies vegetales que responden a los patógenos sin la interacción génica  $R/Avr$ . A pesar de esta distinción, los eventos bioquímicos que ocurren en los dos tipos de resistencia son muy similares (Somssich & Hahlbrock, 1998; Bonas & Lahaye, 2002).

Una respuesta de resistencia exitosa depende de la detección temprana del patógeno invasor así como de la rápida y efectiva activación de los mecanismos de defensa por la planta. En el caso de la interacción compatible frecuentemente se observan procesos similares a los que ocurren en un hospedero resistente durante la infección, como son ciertos cambios bioquímicos en el tejido infectado y la inducción de la expresión de determinados genes. Sin embargo, esta respuesta es de menor magnitud que en la interacción incompatible y se presenta demasiado tarde para restringir el crecimiento del patógeno y prevenir la infección.

Las plantas se han adaptado a percibir una gran variedad de moléculas de señalización denominadas elicitores, que inducen la respuesta de defensa. En las interacciones específicas los elicitores son moléculas codificadas por genes de avirulencia ( $Avr$ ) del patógeno, mientras que los elicitores no específicos muestran una amplia diversidad estructural como:

- Oligo- o polisacáridos derivados de la pared celular (tanto del patógeno como de la planta) que son liberados durante el proceso de infección (Sharp *et al.*, 1984).
- Ácidos grasos, como los ácidos eicosapentanoico y araquidónico del oomiceto *Phytophthora infestans* que inducen la producción de sesquiterpenos antifúngicos en la papa (Bostock *et al.*, 1981).
- Péptidos: Pep-13 es un fragmento de la glicoproteína GP42 de la pared celular del hongo patógeno de soya *Phytophthora sojae*. Este péptido es percibido a través de un receptor en células de perejil provocando la activación transcripcional de genes de defensa y producción de fitoalexinas (Hahlbrock *et al.*, 1995).
- Esfingolípidos: los cerebrósidos A y C purificados del hongo patógeno del arroz *Magnaporthe grisea* constituyen un novedoso grupo de elicitores que inducen síntesis de fitoalexinas y respuesta de hipersensibilidad en hojas de arroz (Koga *et al.*, 1998).

## A2. Respuestas tempranas en tejidos invadidos.

Los diversos mecanismos de defensa en las plantas se pueden clasificar por su temporalidad en respuestas tempranas y respuestas tardías. El primer tipo de respuesta ocurre inmediatamente o a pocos minutos de estar en contacto con el organismo patógeno, generalmente en regiones cercanas al sitio inicial de infección, mientras que las respuestas tardías ocurren en horas, o incluso días después del contacto inicial y minimizan los efectos de la infección y previenen infecciones subsecuentes (Talarczyk & Hennig, 2001).

Las respuestas tempranas incluyen cambios activación de flujos iónicos, síntesis masiva de especies reactivas de oxígeno (EROs), rearrreglos del citoesqueleto, fosforilación y/o desfosforilación de proteínas, así como la inducción de muerte celular programada frecuentemente referida como respuesta de hipersensibilidad (HR). La función principal de estos eventos es actuar como la primera línea de defensa, retrasando la propagación del patógeno e iniciando los mecanismos de señalización que conducen a cambios importantes en el metabolismo de la planta infectada (Talarczyk & Hennig, 2001).

### A.2.1. Activación de canales iónicos y estallido oxidativo.

Las respuestas iniciales detectadas en células de plantas infectadas por patógenos son la activación de canales iónicos y la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estas respuestas de defensa tempranas podrían estar mediadas por la regulación de proteínas unidas a la membrana plasmática tales como la ATPasa de  $Ca^{2+}$  (Lam *et al.*, 1998) y la ATPasa de  $H^+$  (Vera-Estrella, 1994), por la activación de canales iónicos (Gelli *et al.*, 1997; Zimmermann, 1997) y por inducción de la NADPH oxidasa unida a la membrana (Desikan, 1996; Xing *et al.*, 1997). La consecuencia inmediata son los flujos iónicos, principalmente influjo de  $Ca^{2+}$  y  $H^+$  y salida de  $K^+$ ,  $H_2PO_4^-$  y  $Cl^-$ . El incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  también se ha descrito en condiciones de estrés como choque térmico, estrés salino y sequía (Trewavas & Mahl6, 1998).

La producción rápida e intensa de EROs (principalmente  $H_2O_2$ ) se conoce como estallido oxidativo y se presenta en muchos tipos de estrés incluyendo estrés hiperosmótico, sequía, heladas e infecciones por patógenos (Foyer *et al.*, 1997; Baker & Orlandi, 1995). El estallido oxidativo que se induce en infecciones por patógenos presenta dos etapas, una transitoria y otra sostenida. En células en suspensión la primera etapa se presenta durante los primeros 30 minutos ante el reconocimiento del patógeno, y la segunda ocurre desde las 1.5 hasta las 6 horas posteriores a la inoculación. En algunos casos, las interacciones compatibles también son capaces de inducir la producción de EROs, pero sólo se observa la primera etapa y esto se considera una respuesta no específica (Baker & Orlandi, 1995).

La caracterización de homólogos en plantas de la NADPH oxidasa de mamíferos (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998) sugirió que, así como ocurre en animales, esta enzima es la responsable de la producción de EROs durante el estallido oxidativo. La producción de EROs en plantas está regulada por eventos de fosforilación y/o desfosforilación, y por incrementos en los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico (Levine *et al.*, 1994; Tenhaken *et al.*, 1995; Sagi & Fluhr, 2001). Las funciones probables del estallido oxidativo incluyen (Figura 1):

- Efecto tóxico directo en microorganismos patógenos (Peng & Kuc, 1992; Wu *et al.*, 1995).
- Incremento en la formación de polímeros de lignina en la pared celular, lo cual podría crear una barrera física ante la propagación de algunos patógenos (Lamb & Dixon, 1997; Walter *et al.*, 1988).
- Participación en el entrecruzamiento oxidativo de proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) en la pared celular, protegiéndola de la degradación por enzimas del patógeno (Bradley *et al.*, 1992).
- Inducción de la síntesis de fitoalexinas (Devlin & Gustine, 1992).
- Generación de moléculas que tienen funciones de señalización en la muerte celular programada (Alvarez *et al.*, 1998).

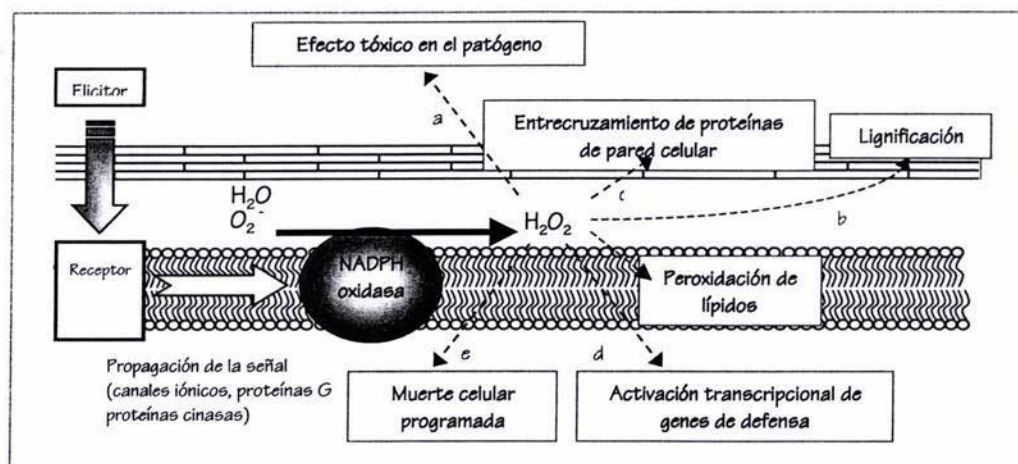


Figura 1. Funciones posibles de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en las respuestas de defensa de la célula vegetal.

### A.2.2. Fosforilación y desfosforilación de proteínas.

Las cascadas de fosforilación también están involucradas en las respuestas de defensa a patógenos en diferentes niveles (Sheel, 1998). Algunos genes *R* codifican proteínas cinasas parecidas a receptores que por sí mismas podrían activar elementos de señalización por fosforilación. El gen *Pto* de jitomate codifica a una cinasa citosólica de residuos de serina y treonina que interactúa con otras proteínas probablemente al fosforilarlas, y algunas de estas proteínas son factores de transcripción putativos que podrían activar la expresión de genes *PR* (Zhou *et al.*, 1997).

Las MAP cinasas (MAPKs) son los componentes posteriores a los receptores que transducen los estímulos externos en respuestas intracelulares (Zhang & Klessig, 2001). La activación rápida y transitoria de la MAPK que responde a elicitors denominada ERM (elicitador responsive MAPK) se demostró en células de perejil en cultivo tratadas con un péptido derivado de una glicoproteína extracelular de *Phytophthora sojae* (Ligterink *et al.*, 1997). Ante la activación, ERM es translocada al núcleo donde podría estar involucrada en la activación de genes de defensa pues varios factores de transcripción son regulados por fosforilación. La SIPK es una MAPK activada por ácido salicílico

(salicylic acid induced protein kinase) que fue purificada de plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV; Zhang & Klessig, 1997). La SIPK también es activada por dos elicitoras y una preparación cruda de elicitoras de la pared celular de *Phytophthora* spp que activan la expresión de genes de defensa, la producción de fitoalexinas y la muerte celular hipersensible (Zhang *et al.*, 1998).

### A.2.3. Respuesta de hipersensibilidad.

La reacción de las plantas ante la infección por patógenos conduce a la activación de dos vías de señalización diferentes, una de ellas induce muerte celular programada en el sitio de infección, y la otra activa mecanismos de resistencia en otras partes de la planta.

Durante las interacciones incompatibles (y también durante las no específicas) frecuentemente se desarrollan lesiones necróticas en el sitio de infección y esta respuesta es lo que se conoce como reacción hipersensible o muerte celular hipersensible. En este proceso ocurre condensación nuclear y fragmentación nucleosomal del DNA como se observa durante la apoptosis en células animales. El estallido oxidativo y los cambios en el estado redox de la célula son factores importantes que activan la muerte celular, mas no por el efecto citotóxico de las EROs, sino que éstas actúan en la vía de señalización que regula tanto a la HR y a la resistencia (Rusterucci *et al.*, 1999). La existencia de plantas mutantes que exhiben necrotización espontánea en ausencia de un patógeno indica que la muerte celular hipersensible es un proceso activo que depende de la transcripción de genes y debe estar altamente regulado (Dangl *et al.*, 1996; Buckner *et al.*, 1998). La muerte celular hipersensible puede ocurrir tanto en interacciones compatibles como en incompatibles; en el primer caso es inducida por el daño excesivo al tejido causado por el patógeno invasor, mientras que en el segundo caso es activada por los mecanismos de resistencia y ayuda a limitar la propagación del patógeno.

### A.3. Respuestas tardías.

#### A.3.1. Cambios en el metabolismo y expresión de genes de defensa.

La infección por un patógeno afecta significativamente el metabolismo de la planta y debe ser reprogramado para establecer una respuesta de defensa eficiente. Por ejemplo, en papa infectada por patógenos se ha observado una reducción drástica de los niveles de la Rubisco (Somssich & Hahlbrock, 1998), y en células de perejil tratadas con una preparación cruda de elicitoras derivados de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* se demostró que la detención del ciclo celular y la proliferación celular preceden a la activación transcripcional de genes del metabolismo fenilpropanoide (Logemann *et al.*, 1995).

La activación de vías de transducción de señales relacionadas con respuestas de defensa conduce a la activación o represión de varios genes. El patrón de expresión de algunos de estos genes es común para varios tipos de estrés, mientras que la expresión de otros se induce o reprime específicamente durante la patogénesis. Muchos genes que responden a elicitoras están involucrados en varias rutas bioquímicas tanto del metabolismo primario como del secundario. En particular, el metabolismo

secundario ha sido estudiado detalladamente debido a que muchos de sus productos se relacionan con las respuestas de defensa ya sea incrementando la resistencia de la planta o participando en la regulación de otros genes de defensa.

El metabolismo fenilpropanoide se altera de manera importante ante la infección por patógenos en todos los sistemas experimentales que se han analizado. La expresión de los genes que codifican la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y la 4-cumaratoCoA ligasa (4-CL) se induce de manera importante durante la patogénesis. Esto conduce a la activación de varias ramas de la ruta fenilpropanoide y a la producción y acumulación de varios compuestos fenólicos que pueden tener un efecto antimicrobiano directo (fitoalexinas), o bien que pueden ser depositados para formar una barrera física ante la propagación del patógeno (ligninas), o pueden participar en las respuestas de defensa como compuestos de señalización (ácido salicílico, SA) (Hahlbrock *et al.*, 1995).

La expresión de otros genes también se induce ante la infección, en especial la de un grupo distinto de genes que por estar estrechamente relacionados con la patogénesis se denominaron genes *PR*. Algunas proteínas *PR* poseen actividades enzimáticas que actúan directamente en contra del patógeno, como la familia *PR-2* formada por endo- $\beta$ -1,3-glucanasas y las *PR-3*, *-4*, *-8* y *-11* clasificadas todas como endoquitinasas (Van Loon & Van Strien, 1999). De las 14 familias de proteínas *PR* que se han descrito hasta el momento, la familia *PR-1* es la única a la cual no se le ha asignado función pues aunque se ha demostrado que algunas de estas proteínas de tabaco y jitomate poseen actividad antifúngica contra oomicetos, su mecanismo de acción se desconoce (Niderman *et al.*, 1995). Todos estos procesos se conocen como resistencia sistémica adquirida (SAR) y confieren una mayor inmunidad al tejido infectado ante infecciones subsecuentes.

## B. Metabolismo fenilpropanoide

Los compuestos fenilpropanoides constituyen una familia con una alta diversidad estructural (Figura 2) y función biológica. Su biosíntesis es importante para el desarrollo normal de la planta y está regulada por diversos factores ambientales.

### B.1. Biosíntesis de compuestos fenilpropanoides.

Todos los compuestos fenilpropanoides se derivan del ácido cinámico (Figura 2) que se sintetiza a partir de la fenilalanina por acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima que controla el flujo del metabolismo primario -vía del shikimato- al metabolismo secundario fenilpropanoide.

Los compuestos fenilpropanoides con el esqueleto básico C6-C3 de la fenilalanina se producen a partir del cinamato por reacciones de hidroxilación y metilación, algunos ejemplos son los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico y las cumarinas simples (Figura 2). Los ácidos en su forma libre raramente se acumulan en altas concentraciones en las células porque son rápidamente conjugados con azúcares (glucósidos de salicilato), con carbohidratos de pared celular (ésteres de ferulato) o con ácidos orgánicos (ácido clorogénico).

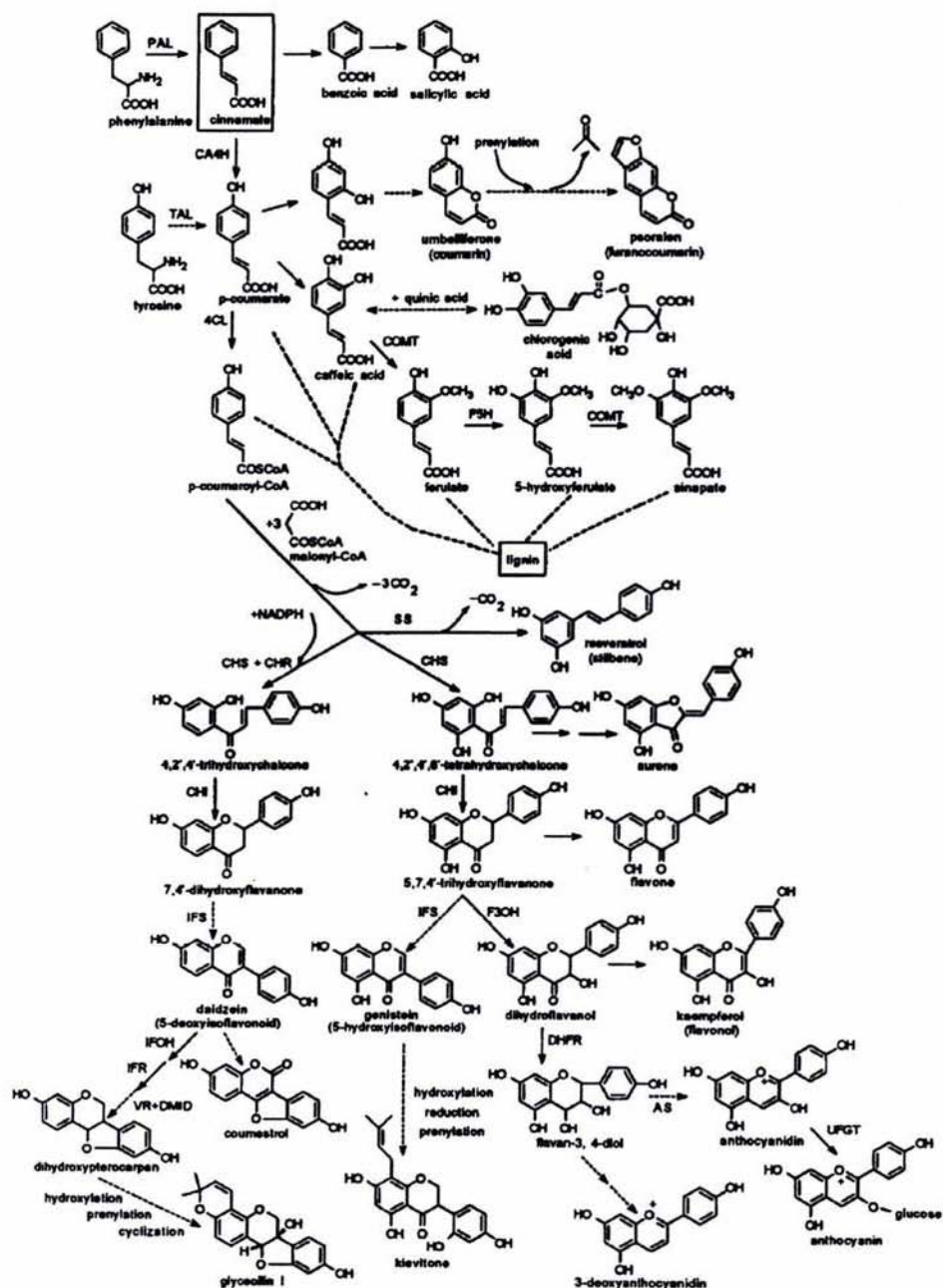


Figura 2. Relaciones biosintéticas entre compuestos fenilpropanoides (Dixon & Paiva, 1995).



Otros compuestos fenilpropanoides se derivan del esqueleto flavonoide C15 cuya síntesis es catalizada por la chalcona sintasa (CHS) que condensa p-cumaroil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA. En la mayoría de las familias de plantas el producto inicial de la CHS es una tetrahidroxichalcona que después es convertida a otros tipos de flavonoides como flavonas, flavanonas, flavanoles, y antocianinas por reacciones de hidroxilación, metilación, glicosilación, sulfonación, acilación, malonilación y/o prenilación (Figura 2, Dixon & Paiva, 1995).

## B.2. Importancia biológica de los compuestos fenilpropanoides en plantas.

### B.2.1. Funciones de los fenilpropanoides en el desarrollo de la planta.

Los ácidos hidroxicinámicos representan el grupo más abundante de fenilpropanoides en plantas y funcionan como precursores en la síntesis de lignina la cual provee soporte estructural, impermeabilidad al agua para la conducción de ésta y solutos a los tejidos, y también constituye una barrera física ante patógenos. Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos y sus formas conjugadas también pueden funcionar como aleloquímicos cuando se acumulan en altas concentraciones en la mayoría de los tejidos y son liberados al ambiente (Dixon & Paiva, 1995).

Los fenilpropanos (que se forman por reducción del grupo carboxilo del ácido *trans*-cinámico) como el alcohol cumarílico, coniferílico y sinapílico, también son precursores de lignina, mientras que otros como el eugenol e isoeugenol son compuestos volátiles que atraen insectos para la polinización (Dixon & Paiva, 1995).

También se ha reportado que los flavanoles se requieren para el crecimiento del tubo polínico en tabaco, petunia y papa (Fisher *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; van Eldik *et al.*, 1997; Yistra *et al.*, 1996).

### B.2.2. Funciones de los fenilpropanoides en condiciones de estrés.

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos que se sintetizan en respuesta al ataque por patógenos. El grupo de fitoalexinas fenilpropanoides incluye pterocarpanos, isoflavanos, isoflavonoides, cumarinas y flavanoles. Los niveles de estos compuestos se incrementan significativamente alrededor del sitio de infección en concentraciones que resultan tóxicas para los patógenos en ensayos *in vitro* (Dixon *et al.*, 1995).

Las antocianinas y flavonas se incrementan en respuesta a una alta intensidad de luz visible y se ha propuesto que su función es atenuar la cantidad de luz que alcanza a las células fotosintéticas. Asimismo, la irradiación UV induce la síntesis de flavonoides en *Arabidopsis* que absorben la luz UV protegiendo a la planta del daño por irradiación y muerte celular evitando la formación de dímeros en el DNA y su degradación (Li *et al.*, 1993; Lois, 1994).

Las antocianinas también se incrementan ante estrés por heladas (Christie *et al.*, 1994) y cuando hay deficiencia nutricional, principalmente por limitación de fósforo, aunque las razones de este incremento se desconocen. Otras deficiencias nutricionales provocan incrementos en las concentraciones de fenilpropanoides en raíces o exudados de estos tejidos, por ejemplo, la baja disponibilidad de nitrógeno

induce la acumulación de flavonoides e isoflavonoides que actúan como factores de nodulación que atraen a bacterias fijadoras de nitrógeno (Graham, 1991).

El ácido salicílico (SA) es una molécula de señalización importante que se acumula durante la respuesta de hipersensibilidad que se activa ante el ataque de un patógeno e induce la transcripción de genes *PR*, muerte celular y resistencia local y sistémica en la planta (Gaffney *et al.*, 1993; Klessig & Malamy, 1994).

En la figura 3 se enumeran los compuestos fenilpropanoides cuya síntesis se induce ante varios tipos de estrés biótico y abiótico.

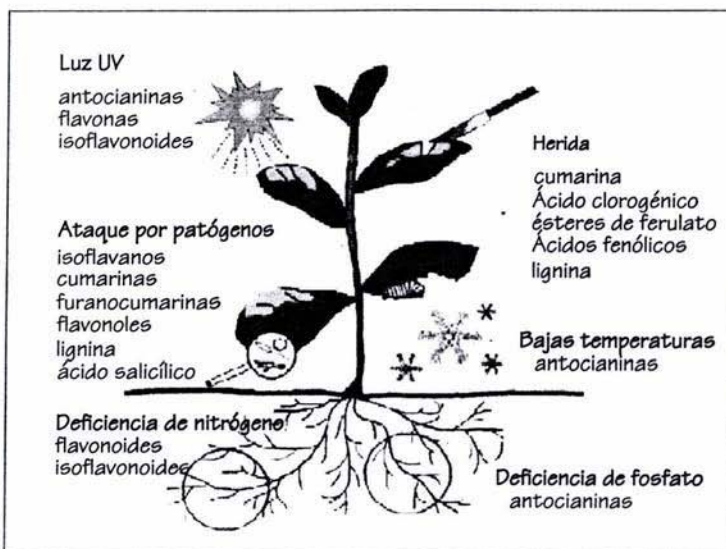


Figura 3. Compuestos fenilpropanoides que se acumulan ante diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico (Modificado de Dixon & Paiva, 1995).

### B.3. Regulación transcripcional de la biosíntesis de fenilpropanoides durante la respuesta de defensa.

En la mayoría de las especies vegetales se ha observado que la aparición de compuestos fenilpropanoides durante la respuesta a la infección por patógenos se debe a la activación transcripcional de varios genes de la ruta biosintética. Algunos de los factores de transcripción involucrados en la regulación de estos genes se presentan en la tabla 1. Los factores de transcripción MYB son abundantes y han sido los más estudiados. En *Arabidopsis* se han identificado 175 genes *myb* putativos, mientras que en *Medicago truncatula* se han identificado por lo menos 100 de los cuales 11 son inducidos durante la infección en hoja y 28 durante la nodulación de raíz y la simbiosis con micorrizas (Dixon *et al.*, 2002).

Tabla 1. Factores de transcripción que regulan o interactúan con genes del metabolismo fenilpropanoide involucrados en la respuesta de defensa a patógenos.

Familia	Gen o vía regulada	Especie	Referencia
WRKY	Fenilpropanoides y genes <i>PR</i>	varias	Eulgem <i>et al.</i> (2000)
MYB	<i>PAL</i> y otros genes de defensa	tabaco	Sugimoto <i>et al.</i> (2000)
bHLH	<i>DFR</i> y <i>BAN</i>	<i>Arabidopsis</i>	Nesi <i>et al.</i> (2000)
LIM	<i>PAL</i> , <i>ACL</i> y <i>CAD</i>	tabaco	Kawaoka <i>et al.</i> (2000)
bZIP	<i>CHS</i>	frijol	Dröge-Laser <i>et al.</i> (1997)

La actividad de los factores de transcripción es controlada a través de mecanismos transcripcionales y post-traduccionales. La regulación transcripcional determina la abundancia del factor al ajustar la síntesis de su RNAm. El control post-traduccionale puede operar a través de distintos mecanismos como son fosforilación, interacciones proteína-proteína y cambios en el potencial redox de la célula. Estos mecanismos pueden alterar la conformación del factor, permitirle interactuar con otras proteínas o afectar su localización subcelular. Algunas de estas modificaciones post-traduccionales han sido demostradas para distintos factores MYB. Por ejemplo, la capacidad de unión al DNA de los factores AmMYB305 y PhMYB3 se altera por oxidación, aunque el control redox no se demostrado *in vivo*. Por otro lado, los factores de transcripción MYB contienen varios residuos de serina y treonina, especialmente en su dominio C-terminal, que podrían ser sustratos de cinasas y la fosforilación podría afectar su actividad, como ya se ha demostrado para los factores c-MYB (Martín & PazAres, 1997). Una evidencia indirecta de la regulación de factores MYB por fosforilación es que el factor de transcripción MYB340 de *Antirrhinum* sintetizado *in vivo* tiene poca afinidad por el DNA, y al ser tratado con fosfatasa alcalina se une fuertemente al DNA, al igual que el factor sintetizado *in vitro* (Moyano *et al.*, 1996).

### C. ÁCIDO SALICÍLICO (SA)

El ácido salicílico es uno de los metabolitos secundarios producidos por las plantas y es bien conocido por sus efectos terapéuticos. En 1828 Johann Buchner aisló la salicilina, el salicilato más abundante en la corteza del sauce blanco (*Salix alba*) que había sido utilizada por egipcios, griegos y romanos como tratamiento contra la fiebre y el dolor. Durante el siglo XIX otros salicilatos, principalmente ésteres metílicos y glucósidos que se convierten fácilmente a SA, fueron aislados a partir de una gran variedad de plantas.

El SA es un compuesto fenólico (Figura 4) que en forma pura es un polvo cristalino con punto de fusión 157-159°C, moderadamente soluble en agua y muy soluble en solventes orgánicos polares. El SA fluoresce a 412 nm cuando es excitado a 301 nm.

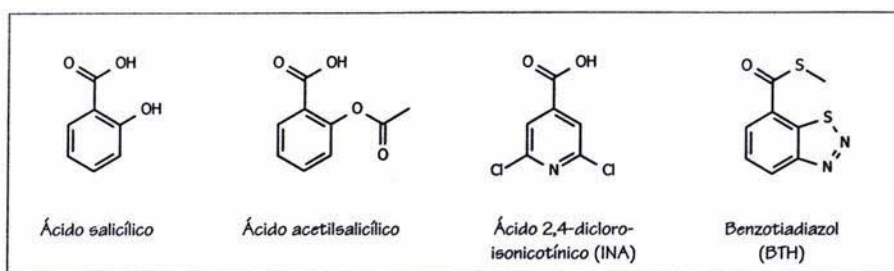


Figura 4. Estructura química del ácido salicílico y compuestos análogos que activan la resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas.

#### C.1. Funciones fisiológicas que regula el SA en plantas.

Aunque el SA se ha estudiado principalmente por ser una molécula de señalización en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos, se han descrito otras actividades fisiológicas.

##### a) Termogénesis en el ápice de flores del género *Arum*.

La termogénesis se ha observado en las inflorescencias del género *Arum* así como en 6 familias de angiospermas. La principal función de este proceso es la volatilización de aminas e indoles que atraen a los insectos polinizadores. En todos los casos estudiados la termogénesis se asocia con un incremento en la respiración alternativa o insensible a cianuro que ocurre exclusivamente en las mitocondrias de plantas, hongos y algunos protistas. En 1987 Raskin *et al.* purificaron al agente inductor de la termogénesis a partir de *Sauromatum guttatum* (azucenas) y por espectrometría de masas determinaron que se trataba del SA. Los estudios que mostraron que el SA induce la respiración alternativa al inducir la expresión del gen de la oxidasa alternativa confirmaron que el SA es un inductor natural de la termogénesis (Rhoads & McIntosh, 1992).

#### b) Crecimiento celular.

Carswell *et al.* (1989) observó que el SA activa la división celular en protoplastos de maíz. Posteriormente Rate *et al.* (1999) encontraron que la mutante de *Arabidopsis acd6-1* (*accelerated cell death 6-1*) que desarrolla un fenotipo de muerte celular espontánea y las células de sus hojas son alargadas, posee altos niveles de SA. La disminución de los altos niveles de SA en estas mutantes por sobreexpresión de la salicilato hidroxilasa bacteriana (*nahG*) induce el desarrollo de crecimientos anormales parecidos a tumores. Asimismo, la mutante *agd2* (*aberrant growth and death 2*) también desarrolla crecimientos parecidos a tumores que son exacerbados por depleción de los niveles de SA (Rate & Greenberg, 2001).

#### c) Expresión de genes durante la senescencia.

Aunque en los últimos años se han identificado genes cuya expresión se incrementa durante la senescencia (Lohman *et al.*, 1994; Buchanan-Wollaston, 1994; 1997; Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997) se desconocían las señales y las vías de transducción que incrementan la actividad transcripcional durante esta etapa. Morris *et al.* (2000) demostraron que el SA participa en la regulación de la expresión de genes durante la senescencia en las hojas, y más aún, que las proteínas PAD4 y NPR1 de la vía de señalización del SA están implicadas en la regulación. Encontraron que durante la senescencia hay un incremento discreto de los niveles de SA en las hojas. Después utilizaron plantas de *Arabidopsis* afectadas en la vía de señalización del SA (mutantes *npr1* y *pad4*, y la transgénica *nahG*) para determinar su importancia en el control de la expresión génica durante la senescencia inducida por el desarrollo. Observaron que estas plantas presentan alteraciones en los patrones de expresión de los genes marcadores de senescencia *SAG12* y *LSC*, concluyendo que la expresión del gen *SAG12* depende del SA y de algún otro factor de la senescencia aún no identificado, mientras que la expresión de los genes *LSC326* y *LSC460* depende parcialmente del SA. Las alteraciones en la expresión de estos genes se acompañan por retrasos en el amarillamiento y una necrosis reducida, sugiriendo que el SA se relaciona con la muerte celular que ocurre en la etapa final de la senescencia.

#### d) Tiempo de floración.

Yalpani *et al.* (1993) reportaron que los niveles de SA en hojas de plantas de tabaco durante la etapa inicial de floración eran 5 veces mayores comparados con los de hojas de plantas sin flores abiertas, sugiriendo que los niveles endógenos de SA cambian en la transición a la floración. Por otro lado, Gaffney *et al.* (1993) encontraron que las plantas transgénicas *nahG* incapaces de acumular SA y de activar respuestas de defensa ante la infección por patógenos, florecían después que las plantas silvestres. De la misma manera, las mutantes *sid1/eds5* (Nawrath & Métraux, 1999) y *sid2* (Wildermuth *et al.*, 2001) también incapaces de acumular SA por defectos relacionados con el transporte o con la biosíntesis de éste, respectivamente, también presentan retrasos en la floración. Estos resultados sugirieron que existe una correlación entre la deficiencia de SA y la floración tardía en *Arabidopsis*. Este fenotipo no cambia ante la aplicación de SA exógeno, indicando que la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis* requiere de la acumulación de SA endógeno.

Recientemente, Martínez *et al.* (2004) demostraron que en *Arabidopsis* el SA es un regulador del tiempo de floración y que en condiciones de estrés (irradiación UV) acelera la transición del estado vegetativo al estado reproductivo. El SA regula el tiempo de floración a través de las vías de fotoperiodo y autónoma, reprimiendo al gen represor de la floración *FLC* y activando a genes que promueven la floración como *FT*, *CO* y *SOCI*. En las plantas deficientes en SA (mutantes *eds5* y *sid2*, transgénica *nahG*) mantenidas en un fotoperiodo largo (16 h luz / 8 h oscuridad) se encontraron mayores niveles de transcrito del gen *FLC* y menores niveles de los transcritos *FT*, *CO* y *SOCI*. Al parecer la deficiencia de SA no afecta a otras vías que también controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis* pues las mutantes *eds5* y *sid2*, así como la transgénica *nahG*, responden a la vernalización y a giberelinas exógenas.

#### e) Activación de las respuestas de defensa ante patógenos.

El SA es la molécula de señalización en respuesta a patógenos mejor caracterizada en plantas. Las evidencias que confirman su importancia se han obtenido por estudios independientes y se pueden resumir en:

- ❖ El SA se acumula en respuesta a muchos tipos de patógenos (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990).
- ❖ Las plantas transformadas con el transgen *nahG* cuyo producto degrada al SA, o las plantas que poseen una mutación en la ruta biosintética o en la vía de señalización de SA son más susceptibles a patógenos (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Wildermuth *et al.*, 2001).
- ❖ Las plantas que son tratadas con SA o BTH (análogo activo del SA) y las que producen constitutivamente altos niveles de SA tienen mayor resistencia a la infección (Friedrich *et al.*, 1996; Verberne *et al.*, 2000).
- ❖ La acumulación de SA se presenta en la respuesta de hipersensibilidad (HR) e induce la transcripción de genes asociados con la patogénesis (*PR*), muerte celular y resistencia a infecciones subsecuentes (Alvarez, 2000).

### C.2. Mecanismos de acción del SA en las respuestas de defensa ante patógenos.

Aunque muchos estudios han demostrado que el SA es una señal importante para la activación de respuestas de defensa en plantas, su mecanismo de acción molecular no está claramente establecido. En los experimentos realizados para determinar los mecanismos a través de los cuales el SA induce respuestas de defensa se ha encontrado que incrementa los niveles de  $[Ca^{2+}]_{\text{cit}}$  (Kawano *et al.*, 1998), se une a proteínas con actividad antioxidante (Slaymaker *et al.*, 2002), activa a una MAPK en células de tabaco (Zhang & Klessig, 1997) e induce la expresión de varios genes de defensa (Durner *et al.*, 1997).

#### C.2.1. Proteínas que se unen al SA.

El mecanismo de acción del SA se ha tratado de explicar a través de su interacción con proteínas. El SA se une e inhibe a la catalasa y ascorbato peroxidasa citosólicas de tabaco, enzimas importantes para

la degradación de  $H_2O_2$  (Chen *et al.*, 1993), por lo que se creía que esta inhibición podría generar e incrementar la magnitud del estallido oxidativo característico de la HR. Sin embargo, también se ha demostrado que el SA actúa abajo del  $H_2O_2$  en las respuestas de defensa ante patógenos (Bi *et al.*, 1995). La posible explicación de estas observaciones contrastantes es que el SA y  $H_2O_2$  estén involucrados en un mecanismo de autoamplificación (Draper, 1997; Van Camp *et al.*, 1998).

El SA también se une a la anhidrasa carbónica de cloroplastos y a una proteína con actividad de lipasa denominada SABP2 (salicylic acid binding protein 2) (Slaymaker *et al.*, 2002; Kumar & Klessig, 2003). La anhidrasa carbónica tiene una función importante en las respuestas de defensa ante patógenos pues su silenciamiento en *Nicotiana benthamiana* inhibe a la HR inducida por la coexpresión del gen de resistencia *Pto* de jitomate y el gen de avirulencia *avrPto* de *Pseudomonas syringae* (Slaymaker *et al.*, 2002). Por otro lado, el silenciamiento del gen *SABP2* de tabaco suprime la resistencia local al virus del mosaico de tabaco (TMV), la expresión del gen *PR-1* inducida por SA y el desarrollo de resistencia sistémica adquirida (SAR). La SABP2 es una proteína soluble poco abundante (10 fmol/mg) cuya actividad de lipasa aumenta al unirse al SA con alta afinidad ( $K_d=90$  nM; Kumar & Klessig, 2003).

### C.2.2. Activación de cascadas de señalización a través de una MAPK.

Las MAP cinasas (MAPK) son mediadores importantes en la transducción de señales que conectan la percepción de estímulos externos con respuestas intracelulares. En células de tabaco el SA activa de manera rápida y transitoria una MAPK de 48 KDa denominada SIPK (salicylic acid induced protein kinase). La activación es proporcional a la concentración de SA aplicada a las células en cultivo y la actividad máxima es inducida por SA 500  $\mu$ M. La SIPK también se activa por elicitores derivados de la pared celular de *Phytophthora* spp (Zhang *et al.*, 1998).

### C.2.3. Activación de la expresión de genes de defensa.

El incremento en los niveles de SA activa la expresión de varios genes de defensa que se han clasificado en dos grupos de acuerdo al tiempo en que se expresan. Los genes de expresión tardía, como los genes *PR*, se activan varias horas después al tratamiento con SA a través de un proceso dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas. Los genes de respuesta temprana se activan a los 30 minutos posteriores al tratamiento con SA. Los genes tempranos más estudiados son los que codifican enzimas con actividad antioxidante como las glutatión-S-transferasas (GST) y glucosiltransferasas (GT) (Horvath & Chua, 1996). La expresión de estos genes tempranos también se induce en respuesta a auxinas, xenobióticos y  $H_2O_2$  (Xiang *et al.*, 1996).

A pesar de la diferencia en el curso temporal de activación se ha encontrado un elemento común de respuesta a SA denominado *secuencia de activación (as-1)* en el promotor de genes tempranos y tardíos de tabaco (Strompen *et al.*, 1998; Droog *et al.*, 1995) y *Arabidopsis* (Lebel *et al.*, 1998; Chen & Singh, 1999). El elemento *as-1* se caracteriza por dos motivos palindrómicos imperfectos TGACGTCa que unen factores de transcripción de la familia TGA de plantas (Krawczyk *et al.*, 2002). Aunque el SA activa a genes tempranos y tardíos a través de la misma familia de factores de transcripción (TGA) y del

mismo elemento de respuesta en el promotor, la activación procede a través de distintos mecanismos. Uquillas *et al.* (2004) encontraron que la activación del gen *PR-1* procede a través de una vía dependiente de la proteína NPR1, mientras que la activación de los genes tempranos *GST6* y *EIGT* no requiere a NPR1. Además, los genes tempranos y tardíos inducidos por SA tienen diferente susceptibilidad a la activación por xenobióticos ya que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético activa la expresión de *GST6* y *EIGT*, pero no de *PR-1*.

La proteína NPR1 es un componente esencial en muchas respuestas mediadas por el SA. Esta proteína contiene una secuencia de localización nuclear bipartita y dos dominios que median interacciones proteína-proteína. Su expresión es constitutiva en las plantas y se encuentra como oligómero inactivo en el citosol. El incremento en los niveles de SA provoca la transición de NPR1 a la forma monomérica activa que migra al núcleo donde actúa como coactivador de los factores de transcripción TGA, induciendo la expresión de los genes *PR* (Mou *et al.*, 2003).

### C.3. Metabolismo del ácido salicílico.

La importancia del SA como señal para la resistencia a la infección ha provocado un interés considerable en su biosíntesis. Inicialmente se había establecido que el SA se sintetiza exclusivamente en el citosol a través de la vía de los fenilpropanoides (Yalpani *et al.*, 1993), pero recientemente se encontró que también se sintetiza en el cloroplasto a partir del isocorismato por una vía que sólo se conocía en procariotes (Wildermuth *et al.*, 2001).

#### C.3.1. Biosíntesis de SA a partir de la fenilalanina.

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la desaminación de la fenilalanina produciendo ácido *trans*-cinámico que es precursor en la vía de los fenilpropanoides para sintetizar cientos de metabolitos diferentes. Para la conversión del ácido cinámico a SA se han propuesto dos vías que difieren en el orden de las reacciones de oxidación e hidroxilación. El ácido cinámico puede ser hidroxilado para producir ácido *orto*-cumárico, y por oxidación de su cadena lateral se convierte en SA. En la ruta alternativa la cadena lateral del ácido cinámico se oxida para producir ácido benzoico (BA), que al ser hidroxilado en posición *orto* se convierte en SA (Figura 5). La síntesis de SA a partir del ácido cinámico se ha demostrado en varias especies como tabaco, pepino, papa y arroz (Sticher *et al.*, 1997). En tabaco, la conversión de BA a SA involucra la activación de la enzima 2-hidroxilasa de ácido benzoico (BA2H), la cual se sintetiza *de novo* por incremento en la concentración de BA o en respuesta al ataque de un patógeno antes de que se desarrolle la HR (Yalpani *et al.*, 1993).

La actividad de la PAL regula el flujo metabólico a la ruta fenilpropanoide. En varias especies vegetales como *A. thaliana* (Ohl *et al.*, 1990), frijol (Cramer *et al.*, 1989), perejil (Lois *et al.*, 1989), chícharo (Yamada *et al.*, 1992), arroz (Minami *et al.*, 1989) y jitomate (Lee *et al.*, 1992) la PAL es codificada por una familia oligogénica. La caracterización de los promotores individuales de los genes de frijol *PAL2* y *PAL3* mostró que la expresión de estos genes difiere espacial y temporalmente durante



el desarrollo y en respuesta a estímulos externos (Liang *et al.*, 1989, Shufflebottom *et al.*, 1993). La expresión de los genes *PAL* es regulada por diversos factores como luz, herida, e infecciones por patógenos (Liang *et al.*, 1989; Pellegrini *et al.*, 1994).

La *PAL* es una enzima tetramérica que se presenta en varias isoformas que pueden provenir de modificaciones post-traduccionales de los productos de uno o más genes, o algunas de las isoformas pueden ser productos de diferentes miembros de la familia multigénica (Appert *et al.*, 1994; Sarma *et al.*, 1998). Su actividad se regula principalmente a nivel transcripcional, y también es blanco de mecanismos de regulación adicionales tales como inhibición por productos del metabolismo fenilpropanoide (Bate *et al.*, 1994), y fosforilación (Allwood *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2001).

### C.3.2. Biosíntesis a partir del corismato.

La ruta biosintética del SA a partir del corismato -que sólo se conocía en bacterias- fue descrita recientemente en *A. thaliana* por Wildermuth *et al.* (2001) quienes mapearon la mutación *sid2* en plantas afectadas en la acumulación de SA en respuesta a patógenos, y aislaron el gen *ICS1* que codifica la isocorismato sintasa (ICS).

La ICS cataliza la hidroxilación del corismato para producir isocorismato que es convertido a SA por la isocorismato piruvato liasa (IPL) generando piruvato como subproducto (Figura 5). Aunque no se han caracterizado las propiedades bioquímicas de la ICS en *A. thaliana*, la expresión del gen se induce local y sistémicamente ante patógenos fúngicos y bacterianos. Además, las mutantes *sid2* infectadas por patógenos sólo acumulan del 5 al 10% del SA que se acumula en el ecotipo silvestre y su resistencia a patógenos es reducida.

En la secuencia de aminoácidos predicha a partir del gen *ICS1* se identifican el dominio de unión a corismato, una secuencia de tránsito al cloroplasto en el extremo N-terminal, y en general presenta una identidad del 57% con la ICS de *Catharanthus roseus* y de 20% con las enzimas de bacterias. En *A. thaliana* existen dos genes *ICS*, mientras que en *C. roseus* solo hay un gen *ICS* y la enzima existe en dos isoformas que no difieren significativamente en sus propiedades bioquímicas (van Tegelen *et al.*, 1999). La actividad de las isoformas ICS en células de *C. roseus* sólo es detectable cuando éstas han sido tratadas con un elicitor (Moreno *et al.*, 1994).

El SA sintetizado en el cloroplasto podría tener como limitante el ser transportado a su sitio de acción en el citoplasma. Sin embargo, el mapeo de otra mutante *sid* indica que *SID1/EDS5* es una proteína localizada en la membrana del cloroplasto con homología a las proteínas MATE (multidrug and toxin extrusion proteins) que puede constituir una vía para la excreción del SA (Nawrath *et al.*, 2002).

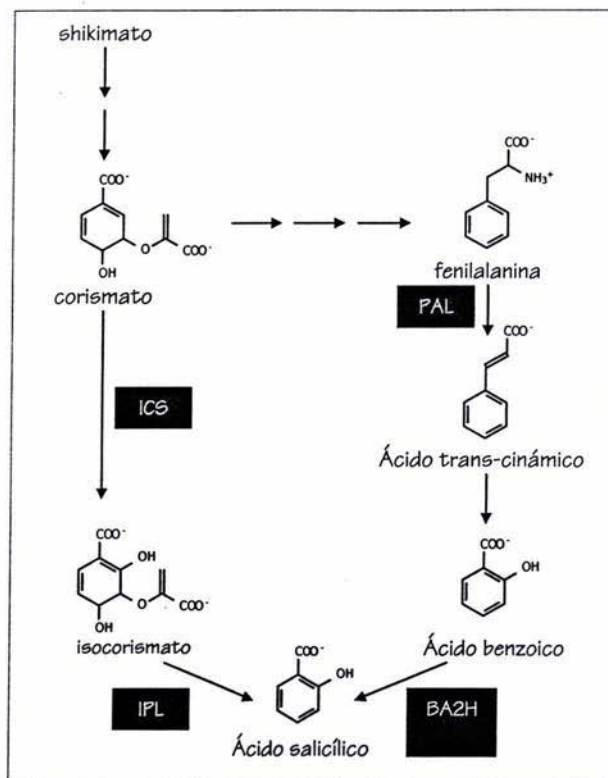


Figura 5. Rutas biosintéticas del ácido salicílico en plantas. Enzimas: isocorismato sintasa (ICS), isocorismatopiruvato liasa (IPL), fenilalanina amonio liasa (PAL) y ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H) (Modificado de Shah, 2003).

### C.3.3. Formación de ésteres y glucósidos del ácido salicílico.

El SA -al igual que otros compuestos fenólicos presentes en las plantas- es conjugado con azúcares, principalmente glucosa en forma de ésteres o glucósidos. Las reacciones de conjugación catalizadas por glucosiltransferasas constituyen un mecanismo para regular la actividad y localización subcelular de fitohormonas (Sembdner *et al.*, 1994). En estudios realizados *in vivo* aplicando [ $^{14}$ C]SA a hojas de tabaco se encontró que el 2-O- $\beta$ -D-glucósido de SA (SAG) se acumula durante el tiempo, mientras que la formación de glucosil salicilato (GS) es transitoria y ocurre rápidamente ante la aplicación de SA. Las formas conjugadas del SA no poseen actividad biológica; la formación rápida de GS podría ser un mecanismo de protección ante los efectos fitotóxicos de las altas concentraciones de SA y la formación más estable de SAG podría ser una forma de almacenamiento para su liberación posterior (Lee & Raskin, 1999).

La existencia de las formas conjugadas del SA en las plantas sugiere una complejidad adicional en la modulación de la señal del SA durante las respuestas de defensa pues se han identificado  $\beta$ -glucosidasas extracelulares que producen SA libre a partir de las formas conjugadas (Alvarez, 2000). De hecho, la separación espacial de un glucósido inactivo y su  $\beta$ -glucosidasa ha sido demostrada para varios compuestos fenólicos y constituye un mecanismo para regular a los compuestos bioactivos (Sembdner *et al.*, 1994).

#### C.4. Interacción entre el SA y otras hormonas en las respuestas de defensa de plantas a patógenos.

Muchos estudios han confirmado la importancia del SA en las respuestas de defensa ante patógenos. Sin embargo, el SA no es esencial en las respuestas de defensa ante todos los patógenos y existen otras hormonas como el ácido jasmónico (JA), el etileno (ET) y el ácido abscísico (ABA), cuyo mecanismo de acción puede ser sinérgico, antagónico o independiente del SA.

En *A. thaliana* las respuestas de defensa dependientes de SA parecen ser efectivas ante patógenos biotrofos como *Peronospora parasitica* (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996) y *Erysiphe orontii* (Reuber *et al.*, 1998). La resistencia ante este tipo de patógenos está frecuentemente asociada con muerte celular hipersensible en el sitio de infección por lo que el patógeno queda desprovisto de nutrientes. Las respuestas de defensa dependientes de JA/ET parece ser más efectivas ante patógenos necrótrofos como *Botrytis cinerea* y *Pythium* spp (Vijayan *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2000). Las bacterias patógenas son restringidas por los mismos mecanismos de defensa pues la resistencia ante algunas cepas de *Pseudomonas* (bacteria biotrofa) depende de las respuestas de defensa activadas por la acumulación de SA (Delaney *et al.*, 1994), mientras que defectos en la vía de señalización del JA/ET confieren susceptibilidad a la bacteria necrótrofa *Erwinia carotovora* (Norman-Setterblad *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, la acción de las fitohormonas que participan en el mecanismo de defensa a patógenos no es independiente invariablemente, sino que sus vías de señalización pueden entrecruzarse generando respuestas cooperativas o antagónicas. Inicialmente se describió la relación antagónica entre el SA y JA. En tabaco el SA inhibe la transcripción de genes que codifican enzimas requeridas para la síntesis de JA (Harms *et al.*, 1998; Nishiuchi *et al.*, 1997) así como la expresión del gen *PR1b* mediada por JA, mientras que el tratamiento con JA inhibe la activación transcripcional de *PR1a* inducida por SA (Niki *et al.*, 1998). En *A. thaliana* la línea transgénica *nahG* y las mutantes con niveles reducidos de SA expresan en mayor intensidad genes dependientes de JA (Penningx *et al.*, 1996). Por otro lado, algunas respuestas de defensa dependen de la acción concertada de las fitohormonas. El SA y JA contribuyen a la resistencia de *A. thaliana* ante *Plectosphaerella cucumerina*, (Thomma *et al.*, 2000). Asimismo, a través de un análisis por microarreglos se demostró que el SA y el MeJA coinducen la expresión de 55 genes involucrados en respuestas de defensa, desarrollo, mantenimiento celular, reconocimiento de señales o transducción, aunque también se observó que 8 genes que son inducidos significativamente por el SA son reprimidos por el MeJA (Shenk *et al.*, 2000). Por otro lado, la muerte celular en *A. thaliana* inducida por la fumonisina B1 producida por *Fusarium verticillioides* requiere que las vías de señalización del SA, JA y ET sean completamente funcionales (Asai *et al.*, 2000). Sin embargo, la muerte celular inducida por ozono requiere de SA y ET, y es reprimida por JA (Rao & Davis, 1999; Rao *et al.*, 2000; Overmeyer *et al.*, 2000).

El ácido abscísico (ABA) también está involucrado en la interacción planta-patógeno. Esta hormona se incrementa en respuesta a la infección por virus, bacterias y hongos (Whenham *et al.*, 1986; Steadman & Sequeira, 1970; Kettner and Dörffling, 1995). Audenaert *et al.* (2002) demostraron que la mutante *sitiens* de jitomate con niveles reducidos de ABA es mucho más resistente que el ecotipo silvestre al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*, y que su susceptibilidad puede restaurarse por aplicación de ABA en concentraciones superiores a 10  $\mu$ M. Estudios anteriores habían demostrado que la aplicación de ABA incrementa la susceptibilidad de varias especies vegetales hacia distintos patógenos como *Phytophthora infestans* y *Cladosporium cucumerinum* en papa (Henfling *et al.*, 1980), *P. megasperma* f. sp. *glycinea* en soya, *Peronospora tabacina* en tabaco (Salt *et al.*, 1986) y *B. cinerea* en jitomate (Kettner & Dörffling, 1995). Los mismos autores determinaron que el mecanismo de acción del ABA en jitomate es independiente de JA y dependiente de SA a diferencia de *A. thaliana* cuya resistencia a *B. cinerea* está mediada por JA y ET. El ABA modula la respuesta de defensa del jitomate dependiente de SA a través de dos mecanismos: reprimiendo parcialmente la actividad de PAL e influyendo directamente en la expresión de *PR-1* porque su promotor contiene al elemento de respuesta negativa a ABA *TAACAAA* (Giraudat *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren que el ABA antagoniza la respuesta de defensa dependiente de SA en la interacción del jitomate con *B. cinerea*. Se ha sugerido que los hongos patógenos produzcan ABA o induzcan su biosíntesis en la planta hospedera para suprimir sus mecanismos de defensa.

El óxido nítrico (NO) es otra molécula importante para la activación de respuestas de defensa ante patógenos (Durner & Klessig, 1999) y su relación con el SA es incierta (Klessig *et al.*, 2000). Estas moléculas de señalización parecen ser autoamplificadoras porque el NO -al igual que las EROs- estimula la acumulación de SA, y éste induce la producción de EROs tales como  $H_2O_2$  y NO (Van Camp *et al.*, 1998; Durner & Klessig, 1999). Además, las EROs y el SA cooperan con el NO para aumentar la muerte celular en células de soya en suspensión (Delledone *et al.*, 1998). El SA también estimula la síntesis en plantas de una oxigenasa inducible por patógenos que tiene una alta homología con la ciclooxigenasa de mamíferos que es activada por NO (Sanz *et al.*, 1998). Por el contrario, el SA podría antagonizar la vía de señalización del NO pues en mamíferos los salicilatos inhiben la actividad y la transcripción de la óxido nítrico sintasa inducible (Farivar & Brecher, 1996) y en plantas podría suprimir la habilidad del NO de inhibir la respiración al activar la oxidasa alternativa insensible a NO (Millar & Day, 1997).

Es evidente que las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa para enfrentarse a diferentes grupos de patógenos y que el entrecruzamiento entre las vías de señalización constituyen un medio de regulación importante para activar distintas combinaciones de las respuestas de defensa.

## D. ESFINGOLÍPIDOS

Los esfingolípidos son componentes estructurales de las membranas de células eucariotas y de algunas bacterias (Dickson & Lester 1999; Huwiler *et al.*, 2000; Kawahara *et al.*, 2000). Su distribución en las membranas celulares es asimétrica, es decir, están excluidos de la fase líquida desordenada (Ld) de glicerofosfolípidos y se segregan en microdominios específicos enriquecidos en colesterol formando una fase líquida ordenada (Lo) que flota en la fase Ld. Estos microdominios son entidades dinámicas que se fusionan, continuamente cambian de forma y pueden difundir lateralmente en la membrana plasmática, de tal forma que se comportan como balsas que pueden acercar receptores activados y moléculas transductoras coordinando la organización espacio-temporal de vías de transducción de señales en regiones específicas de la membrana (Fantini, 2003). Estos lípidos a diferencia de los fosfolípidos no poseen el esqueleto de glicerol y se derivan de la esfinganina (Figura 6).

### D.1. Diversidad estructural.

Los esfingolípidos se sintetizan a partir de las bases esfingoideas que son aminoalcoholes de cadena larga (principalmente 18 átomos de carbono) con un grupo amino en C-2 y dos grupos hidroxilo en C-1 y C-3. Otras estructuras se pueden derivar por la presencia de grupos hidroxilo adicionales y grupos metilo, así como insaturaciones (Figura 6). Un ácido graso se une al C-2 a través de un enlace amida para formar ceramida, a la cual se unen otros grupos polares en C-1 para generar esfingolípidos más complejos (Figura 7) tales como cerebrósidos y glucosilinositolfosforilceramidas (GIPC) que se forman por adición de uno a varios monosacáridos y grupos polares fosforilados a la ceramida (IUPAC, 1998).

#### D.1.1. Bases Esfingoideas.

En células animales la base esfingoidea más abundante es la esfingosina, mientras que en la levadura *S. cerevisiae* es la fitoesfingosina (formada por hidroxilación de la esfinganina en C-4). En plantas la composición de bases esfingoideas es variable pues hay más de ocho diferentes bases esfingoideas derivadas de la D-eritro-esfinganina (Figura 6). Algunas de estas bases esfingoideas poseen insaturaciones 4(E) y 8(E/Z); los isómeros predominantes entre las bases esfingoideas insaturadas de plantas son: (E/Z)-8-esfingenina, (4E, 8E/Z)-4,8-esfingadienina y (8E/Z)-4-hidroxi-8-esfingenina, mientras que la esfinganina y fitoesfingosina están presentes en niveles muy bajos y la esfingosina no se detecta en todos los tejidos. Otras bases esfingoideas que difieren en la longitud de su cadena carbonada están presentes como componentes menores en los esfingolípidos (Lynch, 1993).

Parece que las bases esfingoideas con insaturación 8(E/Z) son exclusivas de plantas, aunque las proporciones de isómeros 8(E) a 8(Z) encontradas en cerebrósidos de hojas de varias especies vegetales varía de 91:9 en pepino a 4:86 en trigo (Imai *et al.*, 1997). Por otro lado, las proporciones relativas de las bases esfingoideas di- y trihidroxiladas en cerebrósidos difiere entre especies pues el 78% de las bases esfingoideas en soya son dihidroxiladas (Ohnishi & Fujino, 1982), mientras que el 87% de las bases esfingoideas en *Arabidopsis* son trihidroxiladas. A diferencia de los cerebrósidos, las GIPC de hojas y

raíces poseen una composición similar de bases esfingoideas (Imai *et al.*, 2000a). Estos estudios sugieren que las plantas mantienen dos pozos de ceramida, uno para la biosíntesis de cerebrósidos y el otro para GIPC que podrían ser seleccionados diferencialmente por la glucosilceramida sintasa (GCS) y la inositolfosforilceramida sintasa, o bien que las enzimas podrían tener un acceso restringido a los pozos de ceramida espacialmente separados (Sperling & Heinz, 2003).

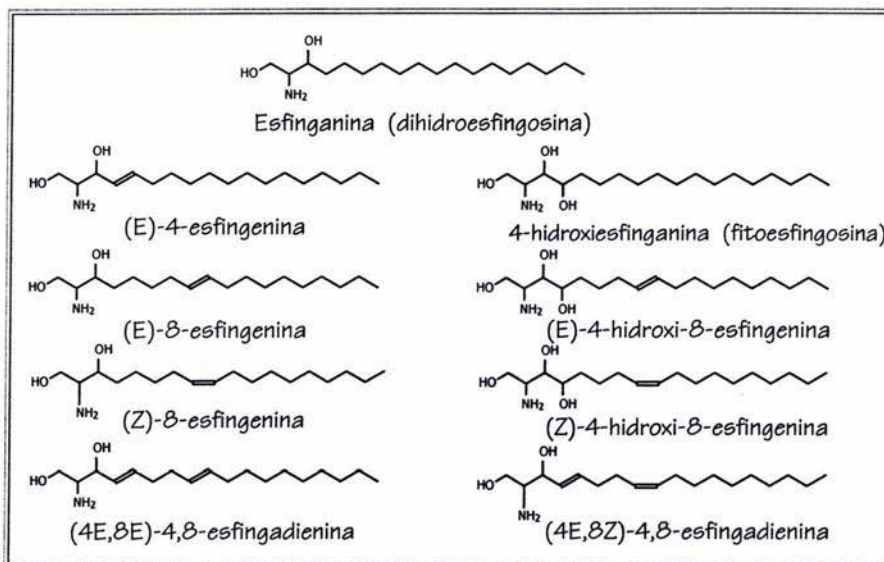


Figura 6. Estructuras de las bases esfingoideas más comunes en plantas.

#### D.1.2. Ácidos grasos.

En células de plantas hay una alta diversidad estructural de ceramidas pues más de 10 diferentes ácidos grasos pueden unirse a las 8 diferentes bases esfingoideas mencionadas anteriormente. Estos ácidos grasos son casi exclusivamente  $\alpha$ -D-hidroxiados y la longitud de su cadena varía entre 14 y 26 átomos de carbono. Los ácidos grasos más abundantes son saturados,  $\alpha$ -D-hidroxiados de 16, 20, 22 y 24C, mientras que los ácidos grasos de cadena muy larga (entre 22 y 26C)  $\omega$ 9-insaturados se encuentran en proporciones muy bajas (Imai *et al.*, 2000b). En las ceramidas de levadura los ácidos grasos predominantes poseen 26C y la mayoría está hidroxiada en la posición  $\alpha$  (Lester *et al.*, 1993).

#### D.1.3. Grupo polar.

Casi todas las ceramidas generadas por las posibles combinaciones entre bases esfingoideas y ácidos grasos presentes en las plantas dan lugar a dos tipos de esfingolípidos: cerebrósidos y GIPCs (Figura 7). Los cerebrósidos neutros se forman por glicosilación del grupo hidroxilo en C1 de la

ceramida, produciendo  $\beta$ -D-glucosil- y  $\beta$ -D-manosil-ceramida. El derivado glicosilado puede elongarse por adición secuencial de hasta 3 residuos de manosa (unidos por enlaces  $\beta(1\rightarrow3)$ ) y finalmente es encapsado por un residuo de glucosa por un enlace  $\beta(1\rightarrow4)$ .

Las GIPCs (con carga negativa) poseen un grupo inositol-1-fosfato unido por un enlace fosfodiéster al C1 de la ceramida, que puede elongarse con cadenas de oligosacáridos. Aunque las GIPC en plantas constituyen menos del 5%mol de los lípidos totales, son componentes importantes de la monocapa externa de la membrana plasmática comprendiendo del 7 al 30%mol de los lípidos de membrana (Lynch & Phinney, 1995) donde funcionan como anclas que unen covalentemente a proteínas (Svetek *et al.*, 1999; Roudier *et al.*, 2002).

En mamíferos los esfingolípidos típicos son las galactosilceramidas, gangliósidos (ceramidas cuyo grupo polar es el ácido siálico) y la esfingomielina, y ninguno de estos se ha encontrado en las plantas (Huwiler *et al.*, 2000). La mayoría de los hongos contienen dos tipos de esfingolípidos: cerebrósidos que contienen residuos de glucosa o galactosa, y GIPCs con residuos de manosa, mientras que la levadura *S. cerevisiae* sólo posee GIPCs (Dickson & Lester, 1999).

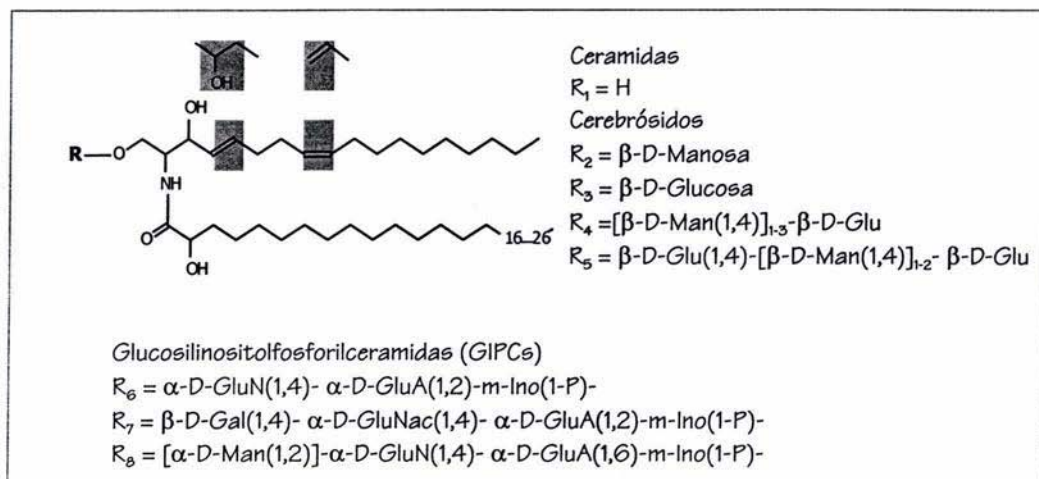


Figura 7. Estructuras de esfingolípidos en plantas. Las 4 modificaciones a las bases esfingoideas en las ceramidas se presentan en fondo gris (hidroxilación en C4, instauraciones 4(E) y/o 8(E/Z).

## D.2. Metabolismo de esfingolípidos.

El metabolismo de esfingolípidos se encuentra finamente regulado pues tanto la biosíntesis como la degradación de éstos genera intermediarios con actividad biológica que median varios procesos celulares importantes. Esto se describirá con mayor detalle en los siguientes apartados.

### D.2.1. Biosíntesis *de novo*.

La biosíntesis de esfingolípidos (Figura 8) inicia en el retículo endoplásmico con la condensación de un ácido graso activado con CoA (principalmente palmitoil-CoA) con L-serina para producir 3-ceto esfingánina. Esta reacción es catalizada por la serina palmitoil transferasa (SPT) que puede ser inhibida por L-cicloserina,  $\beta$ -cloroalanina y ciertas micotoxinas (Lynch 2000; Zweerink *et al.*, 1992). En mamíferos y *S. cerevisiae* la SPT es un heterodímero formado por las subunidades LCB1 y LCB2; en plantas es probable que también lo sea pues en el genoma de *Arabidopsis* se han identificado dos genes putativos *LCB2* y un gen *LCB1* (Genbank Acc. AB074928 y AB063254, respectivamente). Además, la expresión del cDNA de la subunidad LCB2 de *Arabidopsis thaliana* complementa a una mutante de levadura cuya actividad SPT es defectuosa (Tamura *et al.*, 2001).

En la segunda reacción la 3-ceto esfingánina es reducida a *D-eritro*-esfingánina en presencia de NADPH por la 3-ceto esfingánina reductasa. El gen que codifica a esta enzima en *S. cerevisiae* ya ha sido clonado (Beeler *et al.*, 1998) y en el genoma de *Arabidopsis* se encontraron dos genes putativos (Genbank Acc. NM\_111481 y NM\_121925) pero sus funciones aún no han sido identificadas.

La siguiente reacción es la acilación del grupo amino de la esfingánina con un ácido graso para producir ceramida (N-acil-esfingánina). En levadura esta reacción es catalizada por dos esfingánina-N-aciltransferasas similares, LAC1 y LAG1, que requieren ácidos grasos de cadena larga y en la forma activada acil-CoA (Schorling *et al.*, 2001; Guillas *et al.*, 2001). La delección de ambos genes no es letal para *S. cerevisiae* pero las células crecen poco. La habilidad de la doble mutante para crecer probablemente se deba a la actividad de dos ceramidasa (Ypc1 y Ydc1) para realizar la reacción inversa y producir ceramida a partir de ácidos grasos libres como sustrato, lo cual representa una ruta alternativa para la biosíntesis de ceramida independiente de ácidos grasos activados con CoA. El genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes homólogos a *LAG1* (AF198179 y AF198180, Brandwagt *et al.*, 2000) y la actividad de la esfingánina-N-aciltransferasa ha sido reportada en microsomas de frijol y maíz (Lynch, 2000). La *D-eritro*-esfingánina y la *D-eritro*-esfingosina son sustratos para la esfingánina-N-aciltransferasa, mientras que la fitoesfingosina y la *D-treo*-esfingánina no lo son. En levadura la N-aciltransferasa tiene especificidad por ácidos grasos de 26C, mientras que la enzima de plantas tiene especificidad por moléculas acil-CoA de 16 a 24C, lo cual sugiere que esta enzima determina la composición de ácidos grasos en cerebrósidos y GIPC. La  $\alpha$ -hidroxilación en el ácido graso debe ocurrir después de la formación de ceramida dado que los ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilados no son sustrato de la N-aciltransferasa (Lynch, 2000).

Existe un segundo mecanismo (demostrado *in vitro*) para la síntesis de ceramida en plantas que utiliza ácido palmítico libre. La actividad inversa de la ceramidasa (ceramida sintasa) es estimulada por adición de *eritro*-esfingánina o esfingosina, y la fitoesfingosina inhibe la síntesis de ceramida. La comparación de las actividades *in vitro* de la esfingánina-N-aciltransferasa y de la ceramida sintasa en preparaciones de membrana indica que la síntesis de ceramida *in vivo* ocurre principalmente por la reacción dependiente de acil-CoA (Lynch, 2000).

Una vez sintetizada la ceramida, tanto a la base esfingoidea como al ácido graso se introducen insaturaciones y/o hidroxilaciones para generar la gran variedad de esfingolípidos presentes en todas las



células. En plantas, a la esfinganina puede introducirse una insaturación en C4 o ser hidroxilada en la misma posición y a ambas estructuras se les puede introducir una insaturación adicional en C8 para producir a los isómeros *cis/trans* anteriormente descritos. Otra modificación importante en la ceramida es la adición de grupos polares al C1 que produce cerebrósidos o GIPC, aunque también se desconoce si esta adición ocurre antes o después de las modificaciones al centro hidrofóbico de la ceramida.

En lo referente a la síntesis de GIPC se desconocen las etapas que ocurren después de la formación de ceramida pues no se ha identificado ningún gen en plantas que codifique a la inositol fosforilceramida sintasa.

### D.2.2 Degradación y recambio entre esfingolípidos.

La degradación de esfingolípidos complejos se realiza por reacciones mediadas por diferentes hidrolasas que eliminan los grupos que constituyen a los esfingolípidos. Este proceso ha sido estudiado principalmente en mamíferos en los que se han caracterizado una gran variedad de efectos biológicos de la ceramida producida por las enzimas que hidrolizan esfingolípidos complejos. De estas enzimas, las mejor caracterizadas son las esfingomielinasas (SMasas) de mamíferos. Estas enzimas eliminan el grupo fosforilcolina de la esfingomielina generando ceramida. Se han identificado y caracterizado cinco diferentes SMasas de acuerdo a su pH óptimo (ácidas, neutras o alcalinas), localización celular y dependencia de cationes ( $Zn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ ). En la membrana plasmática se ha identificado actividad de SMasa ácida y hay evidencias de que también contiene SMasa neutra asociada a caveolas. La generación de ceramida por SMasas en la membrana plasmática ejerce funciones diferentes según el tipo celular, tales como la inhibición de la translocación de la proteína cinasa C (PKC) y la inhibición de NF- $\kappa$ B (Hannun *et al.*, 2001; Paris *et al.*, 2001) pero no efectos medidos por la ceramida sintetizada *de novo* como detención del ciclo celular y apoptosis (Hannun *et al.*, 2001). La SMasa ácida lisosomal podría participar en la activación de la catepsina D como blanco directo de la ceramida lisosomal (Heinrich *et al.*, 2000).

La ceramida es posteriormente degradada por ceramidasa que rompen el enlace amida en la ceramida liberando una base esfingoidea y un ácido graso libre. Se han descrito 3 diferentes tipos de ceramidasa que se clasifican como ácidas, neutras o alcalinas, de acuerdo a su pH óptimo (Pettus *et al.*, 2002). La esfingosina producida por la degradación de ceramida en mamíferos puede ser fosforilada por cinasas de esfingosina. Otra alternativa es que la esfingosina sea reutilizada por la ceramida sintasa para regenerar ceramida. La esfingosina-1-fosfato también puede entrar a la vía de salvamento por acción de una fosfatasa que regenera a la esfingosina libre, o puede ser degradada por una liasa que produce un aldehído graso y etanolamina fosfato que pueden entrar al metabolismo de glicerolípidos (Hannun *et al.*, 2001).

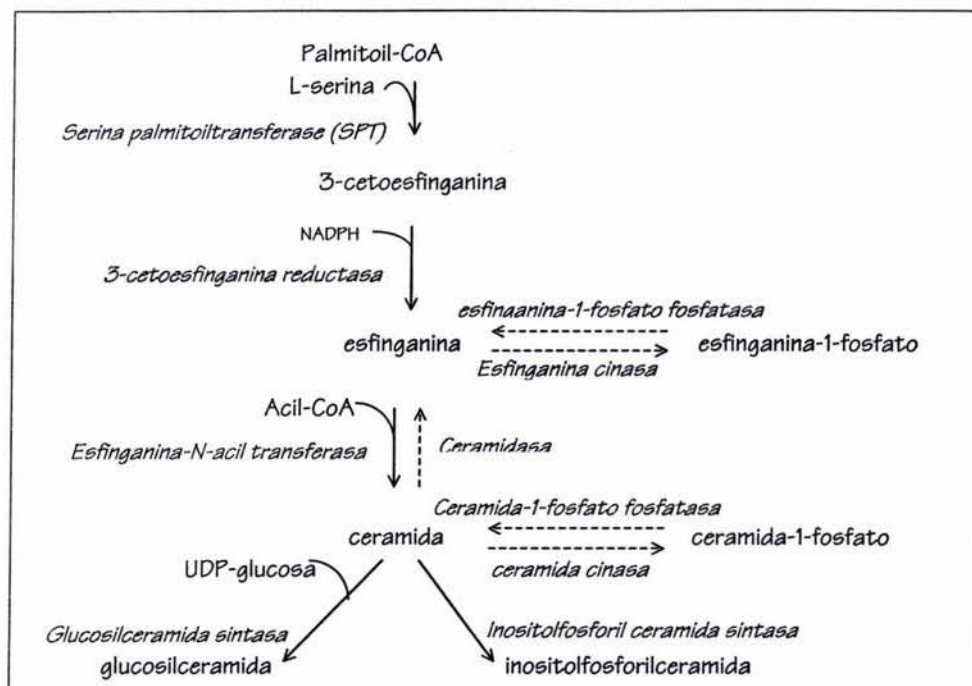


Figura 8. Biosíntesis *de novo* (flechas sólidas) y recambio (flechas discontinuas) de esfingolípidos en plantas.

### D.3.1. Actividad biológica de los esfingolípidos.

Como se describió anteriormente, varios intermediarios del metabolismo de esfingolípidos tienen actividad biológica pues participan en distintos tipos de respuesta y cascadas de señalización. A continuación se describen algunas de estas funciones en distintas especies.

#### D.3.1. Esfingolípidos bioactivos en mamíferos y *S. cerevisiae*.

##### Esfingosina

La esfingosina biológicamente activa se forma principalmente a partir de la degradación de la ceramida en mamíferos. Esta base esfingoidea, a diferencia de la ceramida, es capaz de difundir rápidamente entre las membranas celulares lo que le permite tener efectos en distintos compartimentos celulares. La esfingosina inhibe a la proteína cinasa C (PKC) (Hannun *et al.*, 1986) y a la fosfohidrolasa de ácido fosfatídico (Lavie *et al.*, 1990), y en contraste, activa a la fosfolipasa D y a la diacilglicerol cinasa (DAGK) (Yamada & Sakane, 1993). La esfingosina también activa específicamente a un grupo de cinasas de proteínas caracterizadas como *cinasas dependientes de esfingosina* (SDKs) que fosforilan a

miembros de la familia de proteínas 14-3-3 que funcionan como proteínas adaptadoras en muchas vías de señalización (Megidish *et al.*, 2000). Otros sustratos de las SDKs son proteínas de choque térmico, calreticulina y la isomerasa de puentes disulfuro (Megidish *et al.*, 1999).

Varios de los efectos descritos de la esfingosina parecen ser específicos del tipo celular pues se han encontrado efectos antimitogénicos en ciertas líneas celulares y efectos promitogénicos en otras (Merrill *et al.*, 1997).

### Fitoesfingosina

Los niveles de esta base esfingoidea y de su derivado fosforilado se incrementan significativamente en *S. cerevisiae* cuando es sometida a choque térmico (cambio en la temperatura de 25-30°C a 39-42°C) (Jenkins *et al.*, 1997; Dickson *et al.*, 1997; Skryzpek *et al.*, 1999). La combinación de estudios farmacológicos y genéticos han mostrado que la fitoesfingosina y esfinganina son esenciales para la activación de una vía de degradación de permeasas dependiente de ubiquitina que ocurre ante el choque térmico. Esta vía de degradación de proteínas activada por bases esfingoideas permite eliminar proteínas desplegadas o agregadas que podrían ser tóxicas para la célula. Por otro lado, también se ha encontrado que las bases esfingoideas son necesarias para el arresto transitorio del ciclo celular por el cual las levaduras responden al choque térmico (Jenkins & Hannun, 2001).

### Ceramida

El papel de la ceramida en la apoptosis ha sido el efecto más estudiado. Se ha demostrado que la acumulación de ceramida regula y en muchos casos es necesaria para la ejecución de la fase apoptótica en la que interviene la mitocondria (Hannun & Luberto, 2000).

A nivel molecular se han identificado 4 blancos de la ceramida, que son:

a) Fosfatasa activada por ceramida (CAPP).

Estas proteínas comprenden a las fosfatasas de serina/treonina PP1 y PP2A. Su activación por ceramida presenta estereoespecificidad y requerimiento estricto del doble enlace 4(E) en la base esfingoidea (Chalfant *et al.*, 1999). Algunos de los sustratos de las CAPP que se han identificado son PKC $\alpha$ , Bcl-2, PKB/Akt y Rb (Ricciarelli & Azzi, 1998; Deng *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000; Tamrakar *et al.*, 2000) por lo que posiblemente los efectos de la ceramida podrían estar mediados por la desfosforilación y regulación de estos y otros sustratos de las CAPP.

b) Cinasa activada por ceramida (CAPK).

Esta cinasa resultó ser la cinasa activadora de Ras cuya activación podría mediar los efectos de la ceramida en las MAP cinasas ERK (Zhang *et al.*, 1997).

c) Catepsina D.

La interacción de la ceramida con la catepsina D es necesaria y suficiente para inducir la proteólisis autocatalítica del precursor de 52 KDa que genera a la forma activa de la proteína (48/32 KDa). Se ha demostrado que la catepsina D participa en la apoptosis y que la liberación de citocromo c así como la activación de la caspasa 9/3 ocurren después de la activación de la catepsina D (Heinrich *et al.*, 1999).

d) Proteína cinasa C  $\xi$  (PKC $\xi$ ).

La ceramida incrementa la actividad de PKC $\xi$  hacia el regulador del "splicing" alternativo hnRNPA1. Se ha propuesto que la mayor fosforilación de hnRNPA1 podría inducir su translocación al núcleo e incrementar su afinidad por el RNA (Municio *et al.*, 1995).

### Esfingosina-1-fosfato (S1P)

Varios efectores biológicos como factores de crecimiento (PDGF y EGF) y citocinas (TNF $\alpha$ ) promueven la biosíntesis de esfingosina-1-fosfato al activar esfingomielinasas, ceramidasa y cinasas de esfingosina (Olvera & Spiegel, 1993; Alemany *et al.*, 1999), lo cual sugiere que la esfingosina-1-fosfato es un mensajero intracelular. La esfingosina-1-fosfato también tiene funciones extracelulares pues recientemente se demostró que puede unirse a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) codificados por la familia *EDG*. La interacción de la esfingosina-1-fosfato con los GPCRs induce proliferación, síntesis de matriz extracelular o inhibición de apoptosis inducida por ceramida, según el tipo celular en el que se estudió (Lee *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1999; Cuvillier *et al.*, 1996).

### Ceramida-1-fosfato (Cer1P)

Este esfingolípido se ha detectado en células HL-60 de humano (Dressier & Kolesnick, 1990) y en el cerebro (Shinghal *et al.*, 1993), y se han identificado dos fosfatasa que la hidrolizan específicamente por lo que también podría ser importante en la regulación de funciones celulares (Shinghal *et al.*, 1993; Boudker & Futerman 1993). Gómez-Muñoz *et al.* (1995) identificaron a la Cer1P como un agente mitogénico pues a una concentración de 10  $\mu$ M estimula la síntesis de DNA y la división celular en fibroblastos de rata. Posteriormente encontraron que 25  $\mu$ M de Cer1P activa la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA; Gómez-Muñoz *et al.*, 1997). Aunque la Cer1P puede ser considerada como un análogo estructural a los agentes mitogénicos fosfatidato y lisofosfatidato, su efecto en la transducción de señales difiere considerablemente al de estos compuestos pues la Cer1P a la concentración que estimula la síntesis de DNA no inhibe a la adenilato ciclasa y tampoco incrementa la actividad de MAP cinasas (isoformas de 42 y 44 KDa).

## D.3.2. Funciones de esfingolípidos en plantas.

A diferencia de mamíferos y *S. cerevisiae* en los que se ha descrito ampliamente la función de los esfingolípidos y sus precursores como moléculas de señalización, en plantas se han realizado muy pocos estudios para determinar esta función. A continuación se describen las funciones que se han reportado hasta el momento.

### D.3.2.1. Respuestas a algunos tipos de estrés abiótico.

Los esfingolípidos confieren estabilidad a las membranas contribuyendo a la adaptación al estrés por sequía (Norberg *et al.*, 1991) y heladas (Lynch & Steponkus, 1987; Imai *et al.*, 1995; 1997a; 1997b; Kawaguchi *et al.*, 2000; Uemura & Steponkus, 1994; Uemura, 1995). Se ha observado que la proporción de GlcCer en la membrana plasmática de plantas tolerantes a heladas es menor que en las plantas

sensibles a bajas temperaturas y que el contenido de GlcCer se reduce ante la adaptación al frío (Lynch & Steponkus, 1987; Uemura & Steponkus, 1994; Uemura, 1995). El análisis de los esfingolípidos presentes en hojas de plantas resistentes al frío mostró que contienen niveles elevados de ácido hidroxinervónico(24h:1), lo que sugiere que los cerebrósidos con hidroxiácidos monoinsaturados de cadena muy larga presentan menores transiciones de fase que los cerebrósidos que poseen hidroxiácidos saturados (Imai *et al.*, 1995; 1997a).

Asimismo, se ha encontrado que la esfingosina-1-fosfato (S1P) participa en la señalización por ácido abscísico (ABA) durante el estrés por sequía. Ng *et al.* (2001) encontraron que los niveles de S1P en extractos lipídicos se incrementan en plantas de *Commelina communis* sometidas a estrés hídrico. Los mismos autores demostraron que la S1P promueve el cierre de los estomas al inducir un incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_{ci}$ ). La S1P en concentraciones de 6 y 50  $\mu M$  indujo oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_{ci}$  a los 120 y 4 min respectivamente, indicando que la frecuencia y amplitud de las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_{ci}$  son características de la concentración de S1P aplicada, al igual que los cambios en la apertura estomatal. Los efectos de la S1P son reversibles y la presencia del doble enlace  $\Delta 4$  es esencial ya que la esfinganina-1-fosfato no afecta la apertura de los estomas. Por último, demostraron que la disminución de los niveles endógenos de S1P por la DL-treo-dihidroesfingosina (DHS, inhibidor competitivo de la esfingosina cinasa en animales) atenúa el cierre de los estomas inducido por ABA. Este mismo efecto se observó en *Arabidopsis* tipo silvestre pero no en líneas "knockout" que no expresan a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica. Esto sugiere que las proteínas G son un componente en la vía de señalización de la S1P que regula la apertura estomatal mediada por el ABA (Coursol *et al.*, 2003).

#### D.3.2.2. Regulación de la actividad de protefñas.

Una de las primeras evidencias que postularon a los esfingolípidos de plantas como mediadores intracelulares fue el estudio de Bille *et al.* (1992) quienes mostraron que la esfingosina (2.5  $\mu M$ ) estimula hasta un 90% la actividad pirofosfatasa (PPasa) en vesículas de tonoplasto y en vacuolas aisladas a partir de células en cultivo de *Chenopodium rubrum*. La esfingosina en concentraciones superiores a 5  $\mu M$  provocó el efecto contrario. La modulación de la actividad PPasa parece ser altamente específica ya que otros dos esfingolípidos estrechamente relacionados (psicosina y lisosulfátido) no afectaron significativamente la actividad de PPasa.

#### D.3.2.3. Fitopatogénesis.

Varios estudios han demostrado que los cerebrósidos fúngicos tienen actividad elicitora específica pues inducen respuesta de hipersensibilidad, acumulación de fitoalexinas y mayor resistencia a infecciones posteriores por patógenos compatibles en plantas. Los cerebrósidos con actividad elicitora fueron aislados del hongo patógeno de arroz *Magnaporthe grisea* y están formados por grupos (3E)-2-hidroxihexadecenoil o (3E)-2-hidroxiocetadecenoil unidos a (4E,8E)-9-metilesfingadienina (Koga *et al.*, 1998). El doble enlace 4(E) en la base esfingoidea es indispensable para la actividad elicitora, mientras

que los dobles enlaces 8(E) en la base esfingoidea o 3(E) en la acil amida no afectan su actividad elicitora. Estos resultados indican que las modificaciones estructurales a las bases esfingoideas en los esfingolípidos contribuyen a las diferentes respuestas celulares en las interacciones planta-patógeno.

Otra evidencia de la participación de los esfingolípidos en respuestas de defensa de plantas al ataque por patógenos es el incremento en la expresión del gen *SPT* (codifica la enzima que cataliza la primera reacción en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos) durante la respuesta de hipersensibilidad inducida en una variedad de papa resistente cuando es inoculada con el hongo *Phytophthora infestans* (Birch *et al.*, 1999).

#### D.3.2.4. Muerte celular.

La participación de los esfingolípidos en la muerte celular fue propuesta inicialmente en estudios con toxinas análogas a la esfinganina como las fumonisinas y la toxina AAL que son carcinogénicas en animales y también son fitotóxicas. En *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum* y *Datura stramonium* la fumonisina B1 así como la toxina AAL inducen pérdida de electrolitos, clorosis y muerte celular, efectos que podrían deberse a la acumulación de bases esfingoideas que provocan al inhibir a la esfinganina-N-aciltransferasa (Abbas *et al.*, 1994).

La relación de los esfingolípidos con la regulación de muerte celular y respuestas de defensa en plantas se demostró con la caracterización del gen *ACD11* de *Arabidopsis*, que codifica una proteína con una alta afinidad por la esfingosina que acelera su transferencia entre membranas *in vitro*. La inactivación de este gen activa un programa de muerte celular que no se relaciona con senescencia y que está coordinado con la activación de respuestas de defensa pues las plantas expresan constitutivamente algunos genes de defensa (*PR1*, *PR2*, *PR5*, *GST*, *CHS*) (Brodersen *et al.*, 2002).

#### D.4. Inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos y consecuencias tóxicas.

El descubrimiento y caracterización de inhibidores naturales de la biosíntesis de esfingolípidos producidos por varias especies de hongos ha permitido estudiar la función de señalización de los esfingolípidos y sus precursores en distintas especies. Estos inhibidores poseen una estructura química semejante a las bases esfingoideas, hecho que les permite interactuar con el sitio activo de las enzimas biosintéticas.

##### Miriocina

La miriocina (figura 9) es un compuesto producido por *Isaria (Cordyceps) sinclairii*, un hongo entomopatógeno utilizado por la medicina china tradicional (Im, 2003). La miriocina posee actividad inmunosupresora por lo que con base a su estructura se desarrolló el fármaco FTY720 cuya aplicación clínica actualmente se está evaluando en trasplantes en humanos (Napoli, 2000). Por otro lado, la miriocina administrada por vía oral provoca toxicidad gastrointestinal y muerte en animales de laboratorio (Fujita *et al.*, 1995). Estos efectos podrían deberse a la reducción de los niveles de bases esfingoideas, ceramida y esfingolípidos complejos pues inhibe de manera específica a la *SPT* (Miyake *et al.*, 1995).

Asimismo, se ha observado que la disminución en los niveles de esfingolípidos afecta negativamente el crecimiento celular y la viabilidad de la línea celular CTLL-2, y que la apoptosis inducida por la miriocina se previene por adición de esfingosina (Nakamura *et al.*, 1996).

Aunque se han descrito otros inhibidores de la SPT como L-cicloserina y  $\beta$ -cloro-alanina (Hanada *et al.*, 2000), la miriocina es el más potente de los que se conocen pues inhibe a la SPT a concentraciones picomolares.

### Fumonisinina B1 (FB1)

Las fumonisinas son toxinas producidas por hongos de la especie *Fusarium*, principalmente *Fusarium verticillioides* (antes *F. moniliforme* = *Gibberella fujikuroi*), *F. proliferatum* y *F. nygamai* (Rheeder *et al.*, 2002). La especie de mayor importancia económica es *F. verticillioides*, pues es un patógeno del maíz que se desarrolla en tejidos vegetativos y reproductivos, frecuentemente sin causar síntomas de infección en la planta. Sin embargo, cuando los genotipos de la planta y el hongo son los adecuados, así como las condiciones ambientales, el hongo puede causar marchitamiento, pudrición de tallo y mazorca (Nelson *et al.*, 1993). Se ha estimado que el 59% del maíz y de los productos de maíz en todo el mundo están contaminados con cantidades variables de fumonisina B1 (figura 9), que es la toxina más prevalente entre las fumonisinas (Proctor *et al.*, 1999; Haschek *et al.*, 2001).

A diferencia de la mayoría de las micotoxinas que son solubles en solventes orgánicos, las fumonisinas son hidrofílicas. Su estructura química está formada por un esqueleto de aminopentol (cadena de 20 carbonos que en varias posiciones tiene por sustituyentes un grupo amino, de uno a tres hidroxilos y dos grupos metilo) unido a dos ácidos tricarbálicos por enlaces éster (Figura 9).

Por la similitud estructural entre el esqueleto de las fumonisinas con las bases esfingoideas, uno de sus mecanismos de acción molecular incide en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos. La FB1 es un potente inhibidor de la esfinganina-N-acil-transferasa (enzima que cataliza la acilación de esfinganina) que impide la biosíntesis de esfingolípidos complejos con una  $IC_{50}$  de 0.1  $\mu$ M en preparaciones microsomales de hígado de rata (Wang *et al.*, 1991).

Las fumonisinas afectan a los animales en diferentes formas al interferir con el metabolismo de esfingolípidos (Dutton, 1996; Marasas, 1995; Merrill *et al.*, 2001). Una de las especies más susceptibles son los equinos en los que causa degeneración encefálica (Marasas *et al.*, 1988) así como en conejos (Bucci *et al.*, 1996), edema pulmonar en cerdos (Harrison *et al.*, 1990), y efectos hepatotóxicos, carcinogénicos y apoptosis en hígado de ratas (Gelderblom *et al.*, 1991; Pozzi *et al.*, 2000). Mediante estudios epidemiológicos se ha asociado el consumo de fumonisinas a una alta tasa de cáncer de esófago en humanos (Sydenham *et al.*, 1991). La inhibición de la síntesis de ceramida por las fumonisinas provoca acumulación de esfinganina en tejidos, suero y orina, lo cual se utiliza como marcador de exposición a la toxina. El incremento en los niveles de esfinganina es tan rápido y considerable que generalmente domina sobre la depleción de esfingolípidos complejos en los efectos de las fumonisinas en las células. Sin embargo, se ha observado que la falta de glicosfingolípidos afecta la función de algunas proteínas membranales (Stevens & Tang, 1997).

Las fumonisinas también son fitotóxicas. Abbas *et al.* (1991) demostraron esta actividad sobre la maleza *Datura stramonium*, en la cual la FB1 provoca una muerte celular rápida. Posteriormente se confirmó este efecto en otras malezas por lo que se propuso el uso de la FB1 como herbicida (Abbas & Boyette, 1992). La FB1 también tiene efectos fitotóxicos en *Lemna minor* desde concentraciones tan bajas como 40 nM, provocando una disminución significativa en su crecimiento y en la capacidad de sintetizar clorofila, efectos que también son inducidos por la FB2 y FB3 en concentración 1  $\mu$ M (Tanaka *et al.*, 1993). En especies de plantas cultivadas la FB1 también es fitotóxica. En el jitomate provoca necrosis en las hojas; en el maíz inhibe en un 75% la elongación radicular durante la germinación (Dohelert *et al.*, 1994) y reduce el crecimiento de plántulas de manera dosis-dependiente, siendo más fitotóxica que la FB2 y FB3 (Lamprecht *et al.*, 1994).

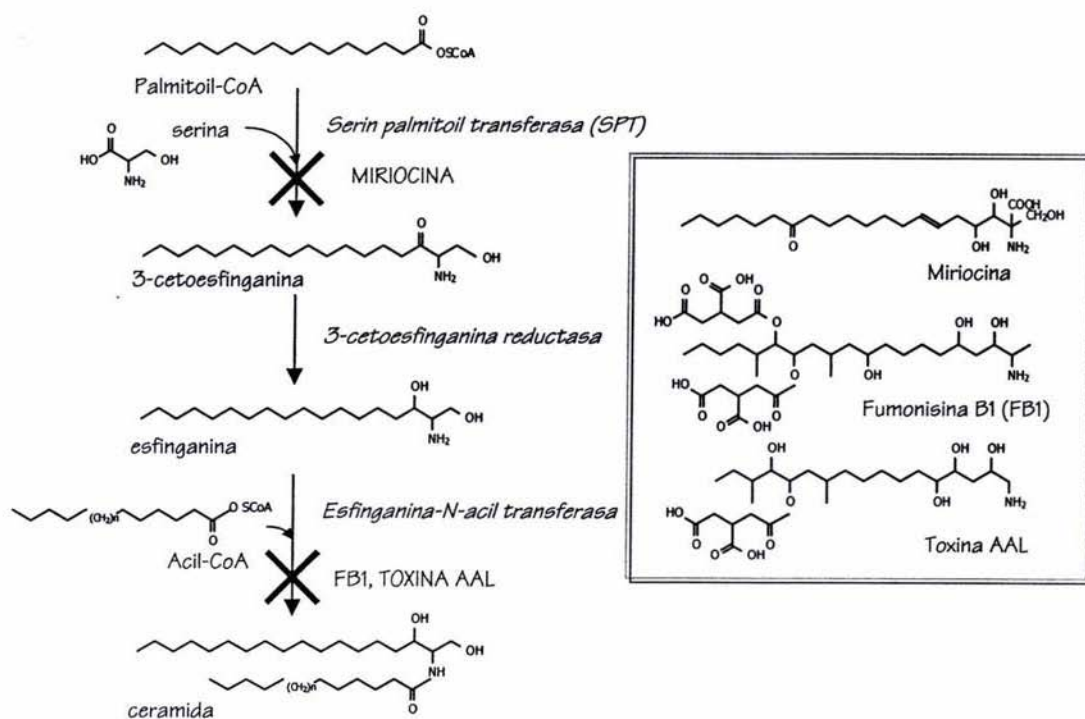


Figura 9. Interrupción de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos por inhibidores producidos por hongos patógenos de plantas.



### Toxina AAL

La toxina AAL (Figura 9) es producida por el hongo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* que infecta plantas de tomate homocigotas con genotipo *asc/asc*, induciendo muerte celular. Por el contrario, los genotipos homocigotos dominantes *Asc/Asc* son resistentes a la acción de la toxina. Aun cuando no se ha determinado con certeza la identidad del gen *Asc*, se sabe que confiere resistencia a la toxina AAL restaurando la biosíntesis de esfingolípidos y previniendo la muerte celular (Spassieva *et al.*, 2002).

La toxina AAL al igual que la FB1 inhibe la síntesis de ceramida. Sin embargo, esta toxina sólo induce efectos fitotóxicos pues no se ha asociado con intoxicaciones en animales (Abbas *et al.*, 1994). La toxina AAL (1  $\mu$ M) provoca acumulación de esfinganina y fitoesfingosina en hojas de plantas de tomate susceptibles a *A. alternata* a las 24 horas posteriores al tratamiento, así como lesiones necróticas que aumentan en tamaño y número hasta que la planta muere a los 5 días posteriores.

## II. Antecedentes inmediatos.

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la respuesta de hipersensibilidad (HR) que desarrollan las plantas de maíz ante la infección por el hongo *Fusarium verticillioides*. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y está asociado principalmente al maíz, aunque es capaz de infectar también al sorgo, trigo, frijol, y soya. *Fusarium verticillioides* es productor de una gran variedad de toxinas, entre ellas las fumonisinas. Estas toxinas poseen una estructura química análoga a las bases esfingoideas y debido a ello uno de sus mecanismos de acción molecular incide en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos. La fumonisina B1 (FB1) es un potente inhibidor de la esfinganina-N-acil-transferasa (enzima que cataliza la acilación de esfinganina), por lo que interrumpe la biosíntesis de esfingolípidos complejos (Wang *et al.*, 1991).

En los últimos años se ha estudiado a nivel celular y molecular la acción de la FB1 durante la germinación de maíz y se ha encontrado que la toxina provoca varios cambios moleculares como son: pérdida en la integridad del DNA genómico (Alcántara-Sánchez, 1998), activación de nucleasas específicas (De la Torre, resultados no publicados), y activación transcripcional de genes asociados con la patogénesis (SanJuan, 2001). También se determinó el efecto de la FB1 en los niveles de las bases esfingoideas *fitoesfingosina*, *esfinganina* y *esfingosina*, de las cuales únicamente las dos primeras se encontraron en los tejidos embrionarios de maíz. La FB1 indujo acumulación de fitoesfingosina y esfinganina con una cinética diferente pues a las 24 horas se observó la máxima acumulación de esfinganina, mientras que la máxima acumulación de fitoesfingosina se presentó a las 36 horas. La acumulación de bases esfingoideas resultó dependiente de la concentración de toxina aplicada (Rivas San Vicente, 2001). Los tiempos de máxima acumulación de bases esfingoideas coinciden con los cambios celulares antes mencionados, los cuales son característicos de la respuesta de hipersensibilidad por lo que posiblemente la FB1 también podría inducir acumulación de SA.

Por otro lado, existen algunos reportes que sugieren la existencia de una posible asociación entre el metabolismo de esfingolípidos y la respuesta de hipersensibilidad. Inicialmente se demostró que esfingolípidos derivados del micelio del patógeno *Magnaporthe grisea* actúan como elicitores específicos en plantas de arroz induciendo HR, acumulación de fitoalexinas y mayor resistencia ante infecciones subsecuentes por patógenos compatibles (Koga *et al.*, 1998). Posteriormente, Birch *et al.* (1999) encontraron que durante la HR que desarrolla la papa ante la infección por *Phytophthora infestans* aumenta la expresión del gen *SPT* que codifica a la serina palmitoil transferasa, enzima que cataliza la primera reacción en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos. Finalmente, Stone *et al.* (2000) encontraron semejanzas notables entre la HR inducida en plantas de *Arabidopsis* por patógenos avirulentos y las respuestas a la FB1, como son: acumulación de EROs, producción de camalexina (fitoalexina) y activación de la expresión de genes de defensa.

### III. Hipótesis

Los compuestos esfingoideos participan en la modulación de la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos alterando los niveles de ácido salicílico.

### IV. Objetivos

Objetivo general:

- Establecer la asociación entre el metabolismo de esfingolípidos y la acumulación de ácido salicílico como parte de la respuesta de defensa de la planta contra patógenos.

Objetivos específicos:

- Determinar los niveles basales de ácido salicílico en embriones de maíz en germinación.
- Analizar el efecto de inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos (fumonisina B1 y miriocina) en los niveles de ácido salicílico.
- Determinar el efecto de bases esfingoideas (fitoesfingosina y esfinganina) y ceramida en los niveles de ácido salicílico, y en la expresión de genes involucrados en su biosíntesis (*PAL* e *ICS*).

## V. Materiales y métodos

### Material biológico

Se emplearon semillas de maíz raza Chalqueño cosechas 2002 y 2003 de los cuales se extrajo manualmente el embrión. Tanto las semillas como los embriones se almacenaron a 4°C. Las semillas de estos lotes tenían un porcentaje de germinación superior al 90%.

### Métodos

#### 1. Imbibición de embriones.

##### 1.1. En ausencia y presencia de FB1 10 $\mu$ M.

Los embriones de maíz se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (0.5%) seguida de varios enjuagues con agua estéril. Posteriormente se distribuyeron 40 embriones en cada placa de agar al 1% (con o sin FB1) y se incubaron a 29°C, en oscuridad durante 12 a 60 h. Para las placas con FB1, primero se disolvió el agar al 1%, posteriormente se repartió en volúmenes de 20 mL en tubos Corning con tapón de rosca y se esterilizó. Cuando se enfrió a una temperatura entre 40 y 45°C, se adicionaron a cada tubo 200  $\mu$ L de la solución stock de FB1 (Sigma) 1 mM disuelta en acetonitrilo:agua (1:1 v/v), se agitaron en el vortex y finalmente se vaciaron en cajas de Petri estériles. Las semillas control se incubaron en presencia del disolvente.

##### 1.2. En presencia de diferentes concentraciones de FB1.

Se prepararon 100 mL de agar al 1%, se distribuyeron en 5 tubos Corning de 50 mL con tapón de rosca (20 mL de agar por tubo) y se esterilizó. Cuando el agar se enfrió, se añadieron a diferentes tubos 20, 200, 500 y 1000  $\mu$ L de FB1 1 mM para tener concentraciones de 1, 10, 25 y 50  $\mu$ M. El contenido de cada tubo se mezcló por agitación en el vortex y se vació en cajas Petri estériles.

Los embriones de maíz previamente desinfectados con hipoclorito de sodio se distribuyeron en estas placas y se incubaron a 29°C en oscuridad durante 36 horas.

##### 1.3. En presencia de esfinganina, fitoesfingosina o ceramida-C6 10 $\mu$ M.

Los embriones de maíz previamente desinfectados se colocaron en placas de agar preparadas como se indicó anteriormente adicionando al agar estéril bases esfingoideas o ceramida disueltas en etanol en las cantidades que se indican en el siguiente cuadro. Las soluciones se distribuyeron homogéneamente sobre el medio y se dejaron las cajas abiertas dentro de la campana para permitir la evaporación del etanol. Los embriones se incubaron a 29°C en oscuridad durante 16 a 48 horas.

<i>Esfingolípido</i>	Concentración (mM) del stock	Alícuota ( $\mu$ L) adicionada a 20 mL de agar estéril
<i>Esfinganina</i>	3.766	53
<i>Fitoesfingosina</i>	3.653	55
<i>Ceramida C6</i>	1.677	119

#### 1.4. Con miriocina 100 nM y 1 $\mu$ M.

Se preparó un stock de miriocina (Sigma) 100  $\mu$ M en metanol al 100%. De ésta solución se tomaron alícuotas de 50 y 500  $\mu$ L que se adicionaron a 50 mL de agar al 1% estéril para llevarlas a concentraciones de 100 nM y 1  $\mu$ M, respectivamente. Cada preparación de agar con miriocina se repartió en 3 cajas Petri previamente etiquetadas. Los embriones desinfectados se incubaron a 29°C en oscuridad durante 6 a 48 horas, renovando el medio de imbibición con la toxina cada 24 horas.

#### 2. Extracción de SA (Mewly & Metraux, 1993).

Se congelaron en el mortero 20 embriones por muestra (alrededor de 1.5 gramos) con nitrógeno líquido para pulverizarlos. El tejido pulverizado se transfirió a un tubo de plástico con tapón de rosca y se adicionaron 3 mL de la mezcla metanol 90% y agua 10% (v/v), y 100 ng de ácido o-anísico (10  $\mu$ L de una solución 10 ng/ $\mu$ L). Se sonicó durante 10 min en un sonicador de una frecuencia fija y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 3600 rpm en una centrífuga Sorvall RT 6000D. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el pellet se resuspendió por segunda ocasión en 3 mL de metanol al 90%. Se sonicó y centrifugó nuevamente, y el sobrenadante obtenido se mezcló con el primero. El metanol se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y el extracto se redisolvió en 2 mL de ácido tricloroacético al 5% (p/v), se sonicó durante 5 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min en una centrífuga Beckman GS-6R. El ácido salicílico se extrajo del sobrenadante con dos volúmenes de la mezcla ciclopentano:acetato de etilo (1:1 v/v) agitando suavemente durante 15 min. Para separar las fases se centrifugó durante 10 min a 3600 rpm. La fase orgánica (superior) se transfirió a un tubo limpio y se realizó una segunda extracción con la mezcla de solventes orgánicos. La fase orgánica se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y el extracto seco se disolvió en 500  $\mu$ L de metanol.

#### 3. Determinación de condiciones para el análisis cuantitativo por HPLC del ácido salicílico (SA) y ácido o-anísico (o-ANI).

##### 3.1. Elección de fase móvil y determinación de los tiempos de retención del SA y o-ANI.

De acuerdo a métodos reportados para el análisis de SA por HPLC en fase reversa y por elución isocrática se prepararon 250 mL de cada una de las siguientes mezclas para fase móvil:

Tabla 2. Composición de las mezclas de fase móvil utilizadas para el análisis cuantitativo del SA por HPLC en fase reversa y elución isocrática.

Mezcla	Estándar interno	Referencia
Acetato de sodio 0.2 M pH 5.5 90% y metanol 10%	ninguno	Nugroho <i>et al.</i> , 2001
Metanol/agua/ácido fosfórico al 85% (40/60/0.2)	ninguno	Venema <i>et al.</i> , 1996
Acetato de sodio 40 mM pH 3.5 75% y metanol 25%	ácido 3-hidroxibenzoico	Eshita, 2001
Agua (con 4% de ácido acético) 60% y metanol 40%	ninguno	Sawyer & Kumar, 2003

Las soluciones se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa de 0.22  $\mu$ m, y las mezclas se sonicaron en un frasco cerrado durante 15 min para degasificarlas.

Las soluciones de ácido salicílico y ácido o-anísico (Sigma) se prepararon en metanol, ambas en concentración de 5 mg/mL. A partir de cada una de ellas se prepararon dos diluciones consecutivas 1:100, siendo la concentración de la primera 50 ng/ $\mu$ L y de la segunda 0.5 ng/ $\mu$ L. De ésta última se prepararon soluciones de concentraciones 12.5, 5 y 0.5 pg/mL con las diferentes fases móviles a probar, de tal forma que se inyectaran 250, 100 y 10 pg, respectivamente, en los 20  $\mu$ L que toma el inyector del equipo HPLC.

El SA y o-ANI se separaron en una columna SUPELCOSIL™ LC-18S (15 cm x 4.6mm, 5  $\mu$ m) por elución isocrática con una bomba SHIMADZU modelo LC-10ADV. Para cada una de las fases móviles preparadas se probaron diferentes velocidades de flujo (de 1.5 a 0.8 mL/min) para determinar en cuál de ellas se tenía buena resolución así como tiempos de retención adecuados. El SA y o-ANI se detectaron en un espectrofluorómetro SHIMADZU modelo RF-10AXL conectado al procesador de datos C-R5A. Para la detección de ambos compuestos se estableció la  $\lambda$  de excitación en 305 nm y la  $\lambda$  de emisión en 405 nm.

### 3.2. Elaboración de curvas de calibración.

Se prepararon diferentes diluciones de SA y o-ANI en el intervalo de 0.5 a 7.5 pg/ $\mu$ L en la fase móvil que se seleccionó con anterioridad. De cada dilución se inyectaron 20  $\mu$ L por triplicado para poder calcular la desviación estándar de cada punto en la curva de calibración.

### 4. Cuantificación de SA en extractos.

A partir de los extractos solubilizados en 500  $\mu$ L de metanol se tomaron diferentes alícuotas que se llevaron a un volumen final de 250  $\mu$ L con fase móvil. De cada dilución por extracto se inyectaron 20  $\mu$ L. Los compuestos fenólicos se separaron en la columna C<sub>18</sub> por elución con la mezcla metanol 40% y agua (con 4% de ácido acético) 60%, y se detectaron a una longitud de onda de excitación de 305 nm y 405 nm para emisión. Las alturas de los picos correspondientes al SA y o-ANI se interpolaron en las curvas de calibración correspondientes para calcular la cantidad de ácido salicílico en la muestra de tejido. Los resultados se expresaron en ng de SA por gramo de peso fresco.

### 5. Extracción y calibración de RNA total.

Por cada muestra se congelaron en un mortero estéril entre 8 y 10 embriones con nitrógeno líquido para pulverizarlos. A este polvo se añadió 1 mL de TRIzol (Invitrogen) y la suspensión se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 min. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Jouan MR1812. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se le añadieron 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo 1:1 (v/v) y se agitó durante 15 segundos. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril, el RNA se precipitó por adición de 500  $\mu$ L de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 10 min. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se eliminó por decantación. El botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío (preparado con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC). Se centrifugó a 6,400 rpm durante 5 min a 4°C para compactar nuevamente al botón y eliminar al sobrenadante por

decantación y evaporación a temperatura ambiente. Finalmente el botón se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua tratada con DEPC.

El RNA total extraído se cuantificó por espectrofotometría determinando la absorbancia de una dilución 1:100 a una  $\lambda$  de 260 nm.

$$(\mu\text{gRNA total}/\mu\text{L}) = \text{Abs}_{260\text{nm}} \left( \frac{40 \mu\text{g/mL}}{1 \text{ DO}} \right) (\text{Factor de dilución}) \left( \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} \right)$$

La calibración del RNA se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL) utilizando como amortiguador TAE 1X. El RNA teñido se visualizó en un transiluminador de luz UV Hoefer Scientific Instruments modelo UVTM-10.

## 6. Clonación de fragmentos de cDNA de PAL, ICS, PR-1 y UBQ de maíz.

Con base a las secuencias de DNA que se indican en la tabla 3 (y en el Apéndice A) se diseñaron oligonucleótidos específicos para sintetizar el cDNA a partir de los transcritos de la fenilalanina amonio liasa (PAL), isocorismato sintasa (ICS), ubiquitina (UBQ) y de la proteína asociada con la patogénesis (PR-1), y amplificarlo por PCR. Todas las secuencias son de maíz excepto la de ICS. Al no encontrar las secuencias del gen o del transcrito de ICS en maíz se buscó alguna secuencia expresada (secuencia EST) relacionada a la isocorismato sintasa (ICS) de *Arabidopsis* reportada por Wildermuth *et al.* (2001). Sin embargo, entre todas las bases de datos de los genomas de plantas monocotiledóneas se encontró una sola secuencia EST de arroz de 703 pb que es casi idéntica al cDNA de la ICS de *Arabidopsis*, y se empleó para diseñar los oligonucleótidos.

Todos los cDNAs (excepto el de PR-1) se sintetizaron a partir de 2  $\mu$ g de RNA total extraído de embriones de maíz germinados durante 36 h, empleando los oligos *reverse* (Rv). El cDNA de ICS también se sintetizó a partir de RNA extraído de hojas de plántulas de maíz y arroz.

Para clonar al cDNA de PR-1 se partió del RNA total extraído de embriones germinados en presencia de SA 1 mM.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos diseñados para sintetizar cDNAs y amplificarlos por PCR.

Transcrito	Secuencia de acceso al GenBank <sup>a</sup>	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del fragmento
<i>ZmPAL</i>	L77912	<i>PALFw</i> 5'-GAG GTC AAC TCC GTG AAC GAC-3' <i>PALRv</i> 5'-TGT AGG TGG ACG ACA TGA GCT T-3'	418 pb
<i>OsICS</i>	CA763410	<i>ICSFw</i> 5'-AGA GGC ACG CCA ATT CAT AC-3' <i>ICSRv</i> 5'-AAC TTT GCA AAC TGG GAT GC-3'	231 pb
<i>ZmPR-1</i>	U82200	<i>PR1Fw</i> 5'-AGA ACT CGC CGC AGG ACT A-3' <i>PR1-Rv</i> 5'-AGC TGC AGA TGA TGA AGA CG-3'	381 pb
<i>ZmUBQ</i>	U29158	<i>UBQ-Fw</i> 5'-CAC TTG GTG TTG CGT CTC AG-3' <i>UBQ-Rv</i> 5'-CAC CTC AAG GGT GAT CGT CT-3'	306 pb

<sup>a</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

### 6.1. Transcripción reversa.

Los diferentes fragmentos de cDNAs se sintetizaron con el kit ImProm II de Promega a partir de 2 µg de RNA total siguiendo el protocolo del proveedor. El RNA molde se combinó con 20 pmoles del oligo *Rv* en un volumen de 5 µL. La muestra se incubó a 70°C durante 5 min, y posteriormente se enfriaron en baño de hielo y así se mantuvieron durante la preparación de la mezcla para la transcripción reversa. La mezcla para la transcripción reversa se preparó como se indica en la tabla 3.

Tabla 4. Preparación de la mezcla para transcripción reversa en un volumen final de 20 µM.

Componente	Concentración final	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O-DEPC		8
Buffer de reacción ImPromII™ 5X	1X	4
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 mM	2
Mezcla de dNTPs 10 mM (c/u)	0.5 mM	1

La mezcla se agitó en el vórtex y se adicionó 1 µL de transcriptasa reversa. Los 15 µL de la mezcla se combinaron con los 5 µL que contenían al RNA molde y al oligo antisentido. La reacción se incubó a 25°C durante 5 min para el alineamiento. Posteriormente se incubó a 38°C durante 1 hora, y por último, se incubó a 70°C durante 15 min para inactivar a la transcriptasa reversa. Los cDNAs se almacenaron a -20°C.

### 6.2. Amplificación del cDNA por PCR.

Se tomaron 5 µL de cada una de las reacciones de transcripción reversa para amplificar los cDNAs por PCR en un volumen de 25 µL con los componentes que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 5. Preparación de las mezclas para PCR.

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer PCR 10X	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2	2 mM
dNTPs 10 mM	0.5	0.2 mM
Oligo <i>Fw</i> 20 µM	0.6	0.5 µM*
Oligo <i>Rv</i> 20 µM	0.6	0.5 µM*
Taq DNA polimerasa (5U/µL)	0.2	1 U
H <sub>2</sub> O	13.5	cbp 20 µL

\*La concentración final de los oligos para amplificar al cDNA de UBQ fue 0.2 µM

La amplificación se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 con el siguiente programa:



94°C por 3 min	——	1 ciclo
94°C por 40 seg	}	30 ciclos
58°C por 40 seg		
72°C por 40 seg		
72°C por 7 min	——	etapa final de elongación.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis horizontal en un minigel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), preparado con TBE 1X. El DNA teñido se visualizó en un transiluminador de luz UV Hoefer Scientific Instruments modelo UVTM-10 y su fotografía se obtuvo con la cámara marca Fischer Scientific modelo EPH-6.

### 6.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.

Las bandas de interés se cortaron rápidamente con una navaja de un solo filo y se colocaron en tubos eppendorf previamente etiquetados y pesados. Los tubos con la agarosa se pesaron para calcular el volumen de ésta (0.1 g = 100 µL). La purificación del DNA se realizó con el kit GeneClean III de Bio 101. A cada tubo con agarosa se le adicionaron 4 volúmenes de NaI (respecto al volumen de agarosa). Los tubos se colocaron en un heat block a 55°C durante 5 min, mezclando suavemente cada minuto. Una vez disuelta la agarosa, se agitó en el vórtex la solución Glass-Milk (resina que se une fuertemente al DNA) y se agregaron 5 µL de ésta a cada tubo y se mezcló. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, agitando a cada minuto. Los tubos se centrifugaron a velocidad máxima por 5 seg y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se realizaron 3 lavados con 700 µL de New Wash helado, eliminándolo por centrifugación y decantación. El New Wash remanente se eliminó por evaporación a temperatura ambiente. A cada tubo se le agregaron 15 µL de agua estéril, se calentaron a 50°C por 3 min. Por último, los tubos se centrifugaron a velocidad máxima por 30 seg y los sobrenadantes se transfirieron a tubos eppendorf estériles y etiquetados.

### 6.4. Ligación de los insertos.

Los fragmentos de DNA purificados se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy Vector (3015 pb) de Promega. Este plásmido contiene extremos cohesivos con la base timina, por lo que los productos de PCR -a los que se les añadió una adenina en sus extremos- son complementarios y se puede llevar a cabo la reacción de ligación con la enzima DNA ligasa.

En un tubo eppendorf de 0.6 mL estéril se combinaron 5 µL de buffer de ligación rápida 2X, 1 µL del vector (50 ng), entre 2 y 3 µL del inserto (dependiendo de la cantidad de DNA purificado), y 1 µL de DNA ligasa T4 (3U/µL). Se mezcló por pipeteo suave y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. El producto de la reacción de ligación se almacenó a - 20°C.

### 6.5. Transformación de células competentes.

En tubos eppendorf de 1.5 mL estériles y etiquetados se mezclaron 2  $\mu$ L de la reacción de ligación correspondiente con 50  $\mu$ L de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , y se incubaron en hielo durante 20 min. Posteriormente se incubó durante 45-50 seg en un baño de agua a 42°C y rápidamente se regresaron los tubos al hielo en el que se mantuvieron durante 2 min. A cada tubo se le añadieron 950  $\mu$ L de medio SOC a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C durante 1.5 horas con agitación suave en una incubadora Lab Line Orbit. Una vez que se recuperaron las células del choque térmico, los tubos se centrifugaron a velocidad máxima, se decantó el medio y se añadieron 350  $\mu$ L de medio SOC nuevo a cada tubo. Las células se resuspendieron por pipeteo suave. Se plaquearon 50, 100 y 200  $\mu$ L de cada reacción de transformación a placas LB/amp/IPTG/X-gal previamente etiquetadas. Las placas se incubaron durante 16-24 horas a 37°C. Posteriormente se incubaron a 4°C para facilitar la detección de las colonias transformadas.

### 6.6. Purificación de DNA plasmídico (Minipreps)

Por cada reacción de transformación (4 insertos diferentes) se eligieron 6 colonias positivas, con cada una de ellas se inocularon 3 mL de medio LB con ampicilina y se incubaron durante 16 horas a 37°C con agitación. De cada cultivo se transfirieron 350  $\mu$ L a un tubo eppendorf estéril y se mezclaron con 150  $\mu$ L de glicerol al 50% para almacenarlas a -70°C.

El resto del cultivo se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó en una microfuga Sorvall MC12 FA-MICRO a 20,000 rpm durante 30 seg y el medio de cultivo se eliminó por decantación. El pellet se resuspendió en 50  $\mu$ L de solución GTE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 200  $\mu$ L de la solución de lisis recién preparada (NaOH 0.2 M / SDS al 1%), se mezcló suavemente y se incubó en baño de hielo durante 5 min. Después se agregaron 150  $\mu$ L de solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8, se invirtió suavemente para mezclar y se incubó en hielo durante 5 min para precipitar al DNA genómico. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C en la centrifuga Jouan MR1812 y se transfirieron 400  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregó RNasa A a una concentración de 20  $\mu$ g/mL y se incubó a 37°C durante 1.5 horas. Después se realizaron dos extracciones con 400  $\mu$ L de fenol:cloroformo (1:1 v/v) mezclando por agitación suave. Se centrifugó a 12,000 rpm en la microfuga durante 1 min para separar las fases, la fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo limpio. El DNA plasmídico se precipitó por adición de 700  $\mu$ L de isopropanol frío y se incubó en hielo durante 10 min. El DNA plasmídico se recuperó por centrifugación a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó por decantación y el botón se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70%. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min en la microfuga, se decantó el etanol y se eliminó por evaporación a 55°C. El pellet se resuspendió en 32  $\mu$ L de agua estéril, se agregaron 8  $\mu$ L de NaCl 4 M y 40  $\mu$ L de PEG8000 (13%). Se mezcló por pipeteo y se incubó en hielo durante 30 minutos. Para remover al sobrenadante se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C, se decantó y el pellet traslúcido se enjuagó con etanol al 70%. Se centrifugó para decantar al etanol y se eliminó completamente por evaporación a 55°C. Finalmente el plásmido se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua estéril y se almacenó a -20°C.

### 6.7. Secuenciación.

Los insertos en los plásmidos purificados fueron secuenciados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en un secuenciador automático ABIPRISM 310 (Perkin Elmer) usando los oligonucleótidos T7 y SP6. Las secuencias de los fragmentos de cDNA clonados se compararon con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa BLAST para corroborar su identidad.

### 6.8. Digestión de plásmidos.

En un tubo eppendorf de 0.5 mL se mezclaron 10  $\mu$ L del DNA plasmídico, 1.5  $\mu$ L de buffer React 3 10X (Invitrogen) y 2.5  $\mu$ L de agua estéril. Esta mezcla se incubó a 100°C durante 5 min para relajar al plásmido e inmediatamente se enfrió en baño de hielo. Posteriormente se añadió 1  $\mu$ L de EcoR1 (10 unidades) y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Los productos de la digestión se separaron por electroforesis horizontal en un minigel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL), preparado con TBE 1X. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

## 7. Determinación de condiciones óptimas para el ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo.

Los cDNAs se sintetizaron a partir de 2  $\mu$ g de RNA total empleando los oligos *Rv* indicados en la tabla 2 y el kit ImPromII de Promega. Después se realizaron varias pruebas de PCR en un volumen de 15  $\mu$ L variando distintos parámetros que fueron la concentración de oligos de 0.1 a 0.4  $\mu$ M, la cantidad de molde de 2 a 5  $\mu$ L de cDNA y el número de ciclos de amplificación entre 25 y 30, todo esto para definir las condiciones óptimas que permitieran el análisis cuantitativo de los niveles de cada uno de los transcritos en los embriones expuestos a esfingolípidos e inhibidores del metabolismo esfingoideo.

## VI. Resultados

## 1. Condiciones para el análisis cuantitativo por HPLC del ácido salicílico (SA) y ácido o-anísico (o-ANI).

## 1.1. Composición de fase móvil, velocidad de flujo y tiempos de retención del SA y o-ANI.

Las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los estándares de SA y o-ANI por HPLC en fase reversa en la columna SUPELCOSIL™ LC-18S (15 cm x 4.6mm, 5 μm) por elución isocrática y detección de fluorescencia fueron:

- ↳ Composición de fase móvil: 40% CH<sub>3</sub>OH y 60% H<sub>2</sub>O (con 4% CH<sub>3</sub>COOH)
- ↳ Flujo 0.8 mL/min
- ↳ Condiciones para la detección por fluorescencia:  $\lambda_{\text{excitación}} = 305 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}} = 405 \text{ nm}$

Los tiempos de retención del SA y o-ANI bajo estas condiciones tuvieron una variación mínima entre 5.476 y 5.512 min para el o-ANI y de 9.463 a 9.576 min para el SA (Figura 10). Ambos compuestos se pudieron resolver y detectar en los extractos de embriones de maíz (Figura 11).

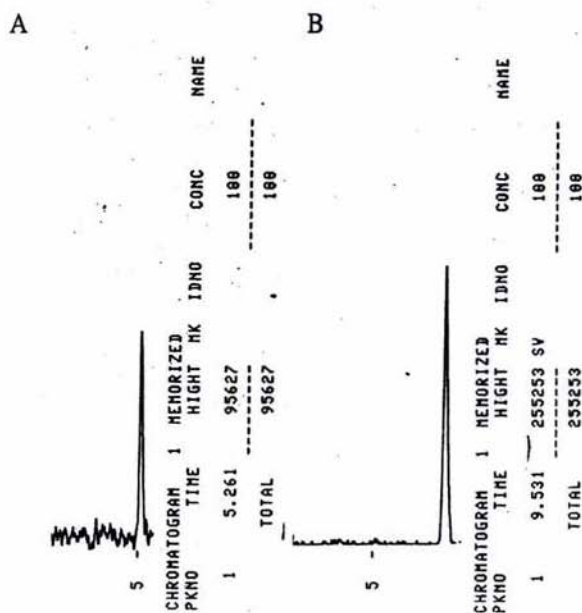


Figura 10. Cromatogramas de los estándares de los ácidos o-anísico (A) y salicílico (B) obtenidos bajo elución isocrática en una columna de fase reversa C18 con la mezcla metanol 40% y agua 60% (con 4% de ácido acético) a un flujo de 0.8 mL/min.

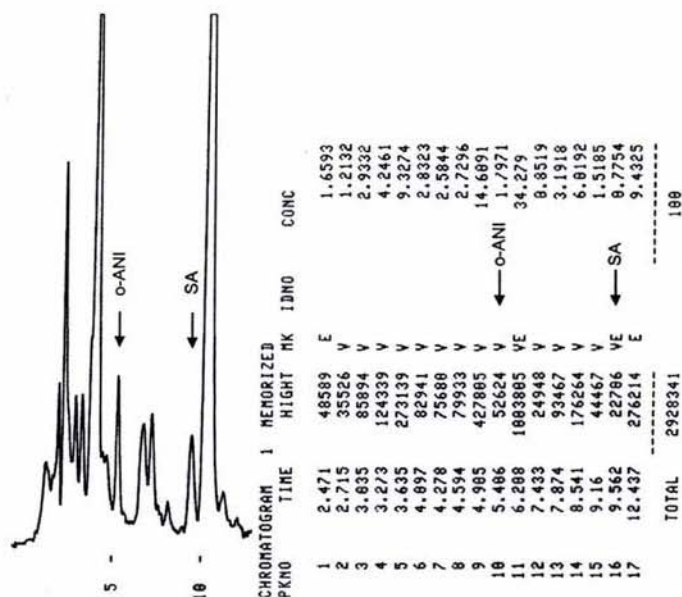


Figura 11. Detección de SA y o-ANI por cromatografía líquida con detección de fluorescencia en un extracto de embriones de maíz germinados durante 36 horas.

## 1.2. Elaboración de curvas de calibración.

A partir de soluciones de SA y o-ANI de concentración 50 pg/mL se prepararon diluciones en el intervalo de 0.05 a 7.5 pg/mL para inyectar de 1 a 150 pg (en 20  $\mu$ L que toma el inyector). Las diluciones se inyectaron en orden decreciente de concentración. El límite de detección del SA fueron 4 pg. El intervalo de masas inyectadas en el que se obtuvo una respuesta lineal del detector fue de 10 a 100 pg para ambos compuestos. Las curvas de calibración de los ácidos o-anísico y salicílico se presentan en las figuras 12 y 13.

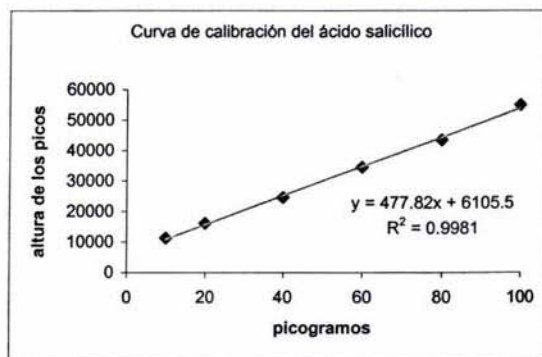


Figura 12. Curva de calibración del ácido salicílico (SA).

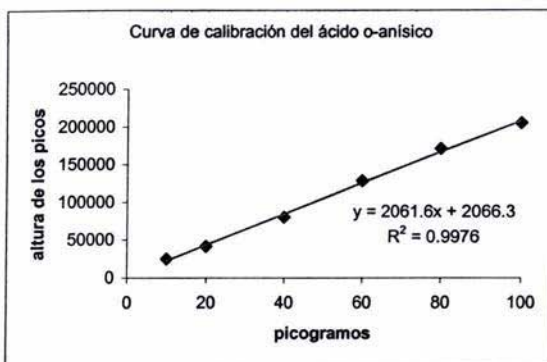


Figura 13. Curva de calibración del ácido *o*-anísico (o-ANI).

## 2. Porcentajes de recuperación en la extracción de SA.

Para establecer la eficiencia de extracción de SA se determinó la cantidad de estándar interno (ácido *o*-anísico) que se debía adicionar a los extractos. En un primer ensayo se prepararon dos series de extractos (a partir de 1.5 gramos de embriones) a los que se adicionaron 25 y 250 ng de *o*-ANI teniendo como antecedente que para la extracción de SA a partir de 1.5 gramos de hojas de pepino se utilizaron 250 ng de *o*-ANI (Mewly & Metraux, 1993). El análisis por HPLC de las dos series de extractos mostró que la adición de 25 ng de *o*-ANI era insuficiente pues no se pudo detectar el estándar interno, mientras que la adición de 250 ng resultó en una baja eficiencia. En este primer ensayo se obtuvieron porcentajes de recuperación alrededor del 30% (Figura 14), muy bajos con respecto a los porcentajes entre 65 y 73% reportados por Mewly & Metraux (1993). En un segundo ensayo de extracción se añadieron 100 ng de *o*-ANI, y con esta cantidad de estándar interno se estimaron porcentajes de recuperación del 37.6 al 62.8% ( $\bar{x} = 52.2 \pm 11.4$ , para 5 diferentes extractos). Esta cantidad de *o*-ANI se agregó a todos los extractos para estimar el porcentaje de recuperación de SA en cada extracción individual.

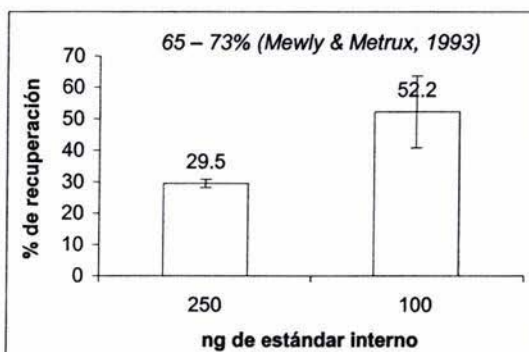


Figura 14. Eficiencia de extracción de SA determinada por la adición de diferentes cantidades de estándar interno y su comparación con los valores reportados en otros estudios.

### 3. Niveles basales de SA en embriones de maíz en germinación.

Se determinó el contenido de SA en embriones secos y germinados en condiciones óptimas antes de determinar si los inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos, así como estos lípidos inducían algún efecto en los niveles de SA en embriones de maíz durante la germinación. En los embriones secos se encontró un alto contenido de SA libre (113 ng<sub>SA</sub>/g<sub>tejido</sub>). Sin embargo, este valor se obtuvo con base al peso seco de los embriones. Al germinar éstos absorben rápidamente agua (Tabla 6) por lo que los cálculos del contenido de SA durante la germinación se realizó con base al peso húmedo. Como se observa en la tabla 6 y figura 15, los niveles de SA se mantuvieron entre 18 y 27 ng/g entre las 12 y 60 horas de germinación.

Tabla 6. Contenido de SA libre e incremento en peso húmedo de embriones de maíz secos y germinados durante 4 a 60 horas.

Horas de germinación	ng SA / g <sub>tejido</sub>	Incremento en peso húmedo <sup>a</sup>
0	113 ± 11	-
4	58 ± 10	1.84 ± 0.04
8	33 ± 3	1.90 ± 0.08
12	21 ± 1	1.88 ± 0.03
16	27 ± 11	1.91 ± 0.25
24	26 ± 10	1.95 ± 0.15
36	25 ± 4	2.02 ± 0.09
48	18 ± 4	2.15 ± 0.29
60	20 ± 1	2.15 ± 0.09

<sup>a</sup> peso húmedo / peso seco

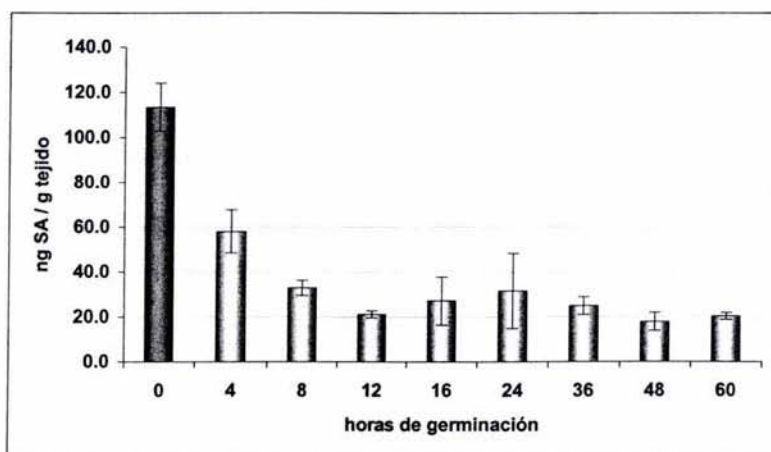


Figura 15. Contenido de SA libre en embriones secos (■) y en germinación (▨).

#### 4. Efecto de la FB1 en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación.

##### 4.1. Incremento en los niveles de SA en respuesta a FB1 10 $\mu$ M.

Debido a que la FB1 en concentración 10  $\mu$ M provoca cambios moleculares característicos de la respuesta de hipersensibilidad, se evaluó la capacidad de la toxina para inducir acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación. Los resultados de tres experimentos independientes mostraron que la FB1 10  $\mu$ M induce una acumulación discreta, pero significativa ( $P < 0.01$ ) de SA libre en los embriones de maíz germinados durante 36 horas (Tabla 7 y Figura 16).

Tabla 7. Concentraciones de SA en embriones de maíz embebidos en ausencia y presencia de FB1 10  $\mu$ M.

Tiempo de germinación (horas)	ng SA / gramo de tejido		Relación FB1 / control
	Controles	FB1	
12	16.49 $\pm$ 3.47	19.92 $\pm$ 2.96	1.21
24	18.54 $\pm$ 4.31	23.16 $\pm$ 2.8	1.25
36	16.32 $\pm$ 1.81	31.19 $\pm$ 3.29*	1.91
48	21.7 $\pm$ 1.86	21.07 $\pm$ 2.54	0.97
60	17.46 $\pm$ 2.68	25.05 $\pm$ 3.25	1.43

\*  $P < 0.01$

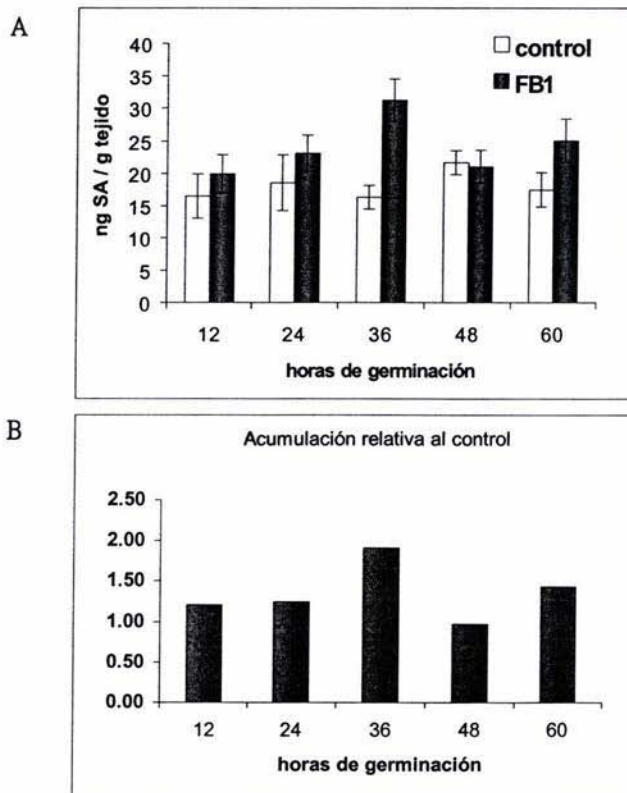


Figura 16. Acumulación de SA inducida por la FB1. (A) Contenido de SA en embriones de maíz germinados en ausencia ( $\square$ ) y presencia ( $\blacksquare$ ) de FB1 10  $\mu$ M. (B) Acumulación relativa a los controles de germinación.



#### 4.2. Acumulación de SA en respuesta a diferentes concentraciones de FB1.

Para determinar si la respuesta mostrada por los embriones embebidos con FB1 10  $\mu\text{M}$  es dependiente de la dosis de toxina, se germinaron embriones durante 36 horas en presencia de varias concentraciones de FB1. En este ensayo se observó un efecto dosis-respuesta (Tabla 8 y Figura 17), es decir, la acumulación de SA en los embriones de maíz fue proporcional a la concentración de FB1 aplicada. Cuando se aplicó FB1 25  $\mu\text{M}$  se incrementaron en un 100% los niveles de SA libre y a 50  $\mu\text{M}$  se observó un incremento mayor al 150%.

Tabla 8. Niveles de SA en embriones de maíz embebidos con diferentes concentraciones de FB1 durante 36 h.

Concentración de FB1 ( $\mu\text{M}$ )	ng SA / gramo de tejido	Acumulación relativa al control
0	18.99 $\pm$ 1.68	1
1	22.85 $\pm$ 1.34	1.20
10	31.37 $\pm$ 3.48	1.65
25	40.47 $\pm$ 3.39	2.13
50	49.53 $\pm$ 2.77	2.61

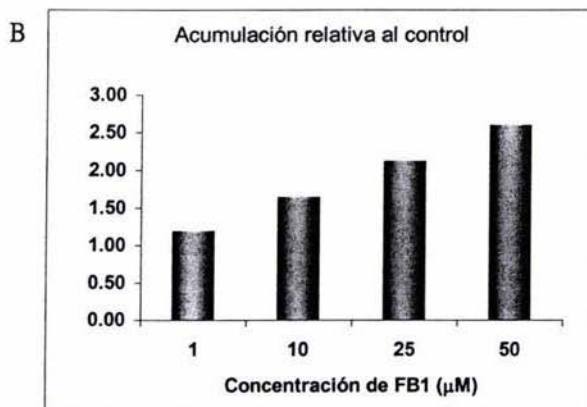
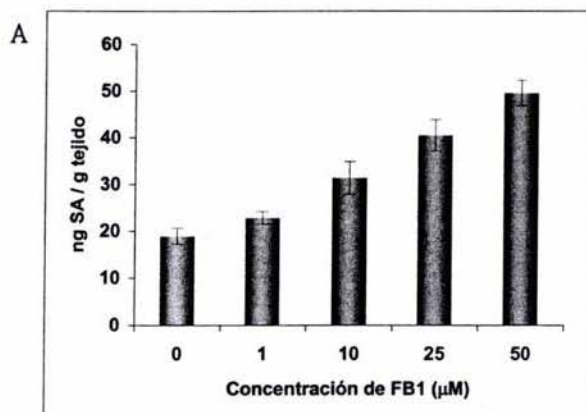


Figura 17. (A) Efecto dosis-respuesta en la acumulación de SA inducida por FB1 en embriones de maíz germinados durante 36 h. (B) Acumulación de SA relativa al control de germinación.

## 5. Efecto de las bases esfingoideas y la ceramida en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación.

### 5.1. Acumulación de SA inducida por fitoesfingosina y esfinganina 10 $\mu$ M.

Para determinar si la acumulación de SA inducida por la FB1 estaba asociada al incremento en los niveles de bases esfingoideas ocasionado por la inhibición de la esfinganina-N-acil transferasa por la toxina (Rivas, 2001), se embebieron embriones de maíz en placas que contenían esfinganina o fitoesfingosina 10  $\mu$ M. Ambas bases indujeron un incremento considerable en los niveles de SA y éste se observó en tiempos más cortos que con FB1 (Tabla 9 y Figura 18). El tratamiento con esfinganina provocó un incremento de 6 veces en los niveles de SA de embriones germinados durante 16 horas, mientras que en embriones germinados con la fitoesfingosina se triplicaron los niveles de SA a las 24 horas de germinación. El disolvente en que se prepararon los esfingolípidos no tuvo ningún efecto sobre la inducción de SA. El incremento en los niveles de SA con esfinganina es transitorio pues a las 24 horas se reducen a 95 ng/g, aunque se mantienen por encima del control hasta las 48 horas.

Tabla 9. Niveles de SA (ng/gramo) en embriones de maíz embebidos con bases esfingoideas (10  $\mu$ M).

Horas de imbibición	controles	Etanol (0.275%)	Esfinganina	fitoesfingosina
16	22.08 $\pm$ 4.47	29.99 $\pm$ 3.19	130.37 $\pm$ 7.38	47.29 $\pm$ 6.69
24	18.62 $\pm$ 4.74	23.7 $\pm$ 3.86	95.74 $\pm$ 5.66	59.74 $\pm$ 4.27
30	20.83 $\pm$ 3.71	27.86 $\pm$ 3.06	53.11 $\pm$ 5	27.61 $\pm$ 3.28
36	18.53 $\pm$ 1.8	17.87 $\pm$ 4.25	36.44 $\pm$ 3.84	40.13 $\pm$ 4.49
42	21.51 $\pm$ 1.65	14.92 $\pm$ 1.78	38.53 $\pm$ 3.4	24.09 $\pm$ 2.71
48	24.38 $\pm$ 2.65	14.74 $\pm$ 2.35	26.87 $\pm$ 3.08	22.11 $\pm$ 3.02

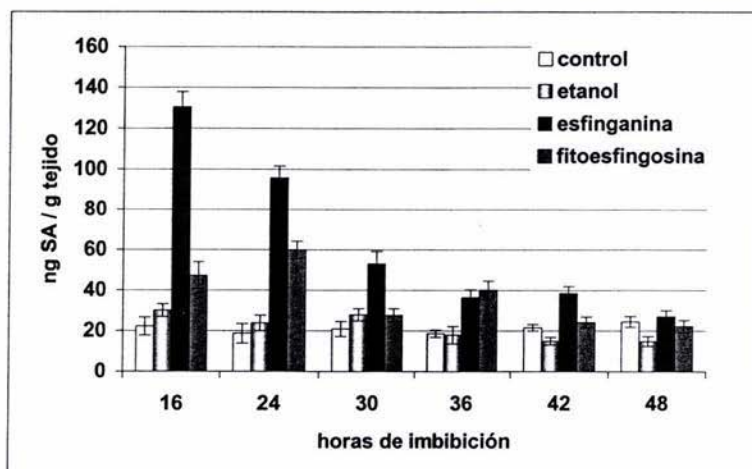


Figura 18. Efecto de las bases esfingoideas en la acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación. Los embriones se germinaron en presencia de las bases esfingoideas fitoesfingosina (■) y esfinganina (■) 10  $\mu$ M, y en presencia del solvente (□) durante el tiempo indicado. El SA se extrajo y se cuantificó por HPLC con un detector de fluorescencia.

## 5.2. Acumulación de SA inducida por ceramida-C6 10 $\mu$ M.

Debido a que tanto las bases esfingoideas como la ceramida pueden actuar como moléculas de señalización, se diseñó un experimento para determinar si la esfinganina o la ceramida era la responsable de inducir la producción de SA. Considerando que la esfinganina exógena en el ensayo anterior podría ser utilizada como sustrato por la esfinganina-N-aciltransferasa e incrementar los niveles de ceramidas endógenas, se determinó si una ceramida de cadena corta (ceramida-C6) podía inducir acumulación de SA en los embriones. Para este ensayo se utilizó un nuevo lote de semillas de maíz (cosecha 2003), y considerando que podría existir variabilidad entre lotes de maíz se repitió el ensayo con esfinganina 10  $\mu$ M incluyendo tiempos de germinación más cortos.

Al comparar el efecto de la esfinganina 10  $\mu$ M en los embriones del nuevo lote de semillas (Figura 19) con el presentado anteriormente (Figura 18) se observó que el patrón de acumulación de SA no fue el mismo pues en los embriones de la cosecha 2002 la máxima acumulación ocurrió a las 16 horas, mientras que en embriones de la nueva cosecha ocurrió a las 36 horas. Sin embargo, sí se observó un incremento en los niveles de SA libre a tiempos tempranos en los tejidos incubados con esfinganina. En la tabla 10 y figura 19 se observa que la ceramida exógena también provocó un incremento superior al 200% en los niveles de SA en embriones de maíz que se observó únicamente a las 24 horas.

Tabla 10. Niveles de SA (ng/gramo) en embriones de maíz embebidos con esfinganina y ceramida 10  $\mu$ M. Entre paréntesis se indica la acumulación de SA relativa a los controles de germinación.

Horas de imbibición	ng SA / gramo tejido		
	Controles	Esfinganina	Ceramida-C6
4	58.1 $\pm$ 9.7	138.4 $\pm$ 34.1 (2.4)	47.3 $\pm$ 15.6 (0.8)
8	35.6 $\pm$ 7.4	99.2 $\pm$ 27.6 (2.8)	24.6 $\pm$ 10.7 (0.7)
12	25.8 $\pm$ 5.2	102.2 $\pm$ 27.7 (4)	27.8 $\pm$ 11.4 (1.1)
16	23 $\pm$ 4.9	62.7 $\pm$ 18.2 (2.7)	31.4 $\pm$ 10.2 (1.4)
24	25.3 $\pm$ 7.9	79.2 $\pm$ 17.5 (3.1)	78.1 $\pm$ 21.4 (3.1)
36	27.1 $\pm$ 7.1	142.5 $\pm$ 36.3 (5.2)	34.6 $\pm$ 11.2 (1.3)
48	27 $\pm$ 9	67.7 $\pm$ 18 (2.5)	14.9 $\pm$ 11 (0.6)
60	33.5 $\pm$ 6.6	53.2 $\pm$ 15.6 (1.6)	26.2 $\pm$ 11.4 (0.8)

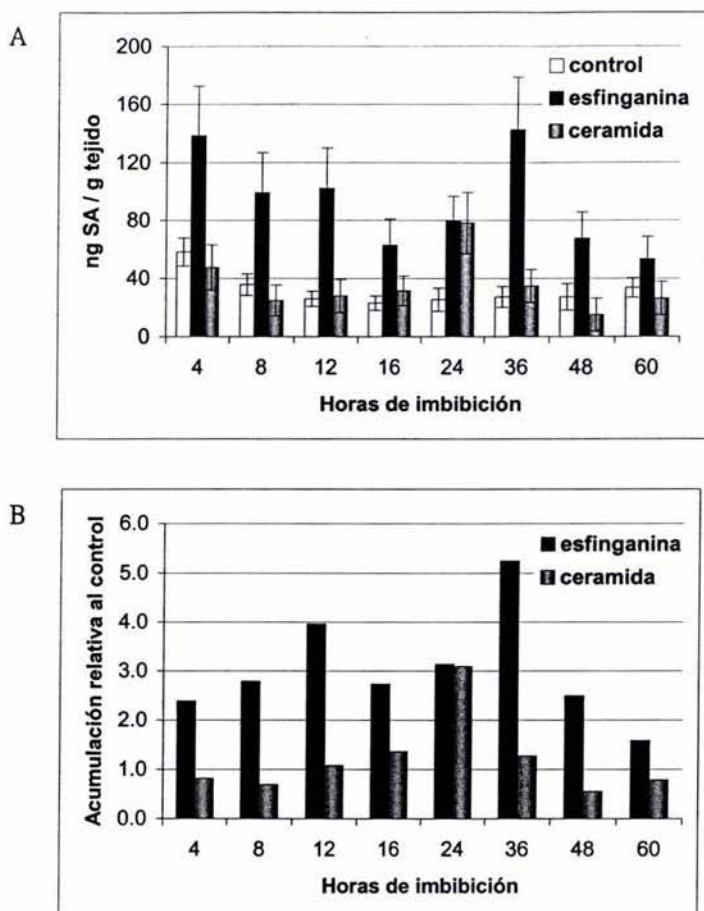


Figura 19. Efecto de la esfingalina y la ceramida  $10 \mu\text{M}$  en la acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación. (A) Incremento en los niveles de SA inducido por esfingalina (■) y ceramida (▒) en embriones de la cosecha 2003. (B) Acumulación de SA relativa a los controles de germinación.

#### 6. Efecto de miriocina $100 \text{ nM}$ y $1 \mu\text{M}$ en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación.

La FBI es un inhibidor de la esfingalina-N-acil-transferasa y causa acumulación de bases esfingoideas que a su vez provocan un aumento en los niveles de SA. Para corroborar la relación entre el incremento en la concentración intracelular de esfingalina y/o esfingolípidos complejos y la acumulación de SA se analizó el efecto de un inhibidor de la serina palmitoil transferasa (miriocina) en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación pues este causaría una reducción en los niveles de bases esfingoideas. Se probaron dos concentraciones de miriocina ( $100 \text{ nM}$  y  $1 \mu\text{M}$ ) ya que *in vitro* inhibe a la SPT de células CTLL-2 con una  $\text{IC}_{50}$  de  $0.3 \text{ nM}$  (Miyake *et al.*, 1995).

Los niveles de SA en los embriones germinados en presencia de miriocina fueron ligeramente inferiores o similares a los niveles de SA presentes en los controles (Tabla 11 y Figura 20). En particular, se observó una reducción del 50% en los niveles de SA a las 24 horas y no hubo diferencia entre las dosis de miriocina empleadas.

Tabla 11. Niveles de SA (ng/gramo) en embriones de maíz germinados en presencia de miriocina 100 nM y 1  $\mu$ M.

Horas de imbibición	controles	Miriocina 100 nM	Miriocina 1 $\mu$ M
6	51.1 $\pm$ 8.4	30.2 $\pm$ 7.4	31.4 $\pm$ 5.5
12	20.1 $\pm$ 4.1	15.4 $\pm$ 3.4	19.8 $\pm$ 4.0
24	28.1 $\pm$ 5.2	13.3 $\pm$ 3.1	13.7 $\pm$ 3.1
36	26.0 $\pm$ 4.9	17.3 $\pm$ 3.6	17.4 $\pm$ 3.6
48	35.6 $\pm$ 6.3	31.1 $\pm$ 5.6	32.3 $\pm$ 5.8

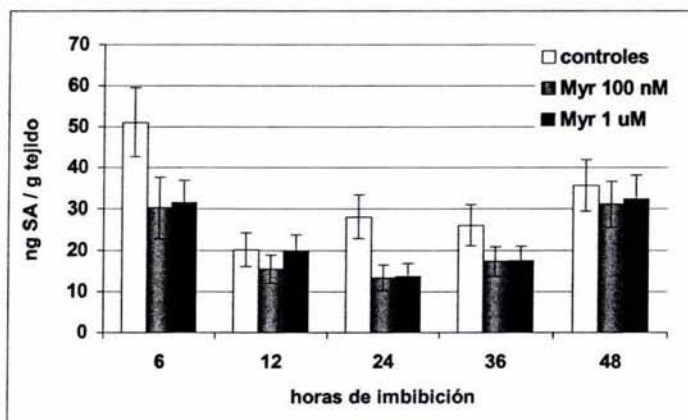


Figura 20. Efecto de la miriocina en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación.

## 7. Análisis molecular de la expresión de genes que participan en la biosíntesis de SA.

Para determinar si efectivamente la acumulación de SA inducida por FB1, bases esfingoideas y ceramida se debe a la inducción en su biosíntesis, se analizó por RT-PCR semi-cuantitativo la expresión de los genes *PAL* e *ICS* en respuesta a esfingolípidos e inhibidores del metabolismo esfingoideo.

### 7.1. Clonación de cDNAs parciales de *PAL*, *ICS*, *UBQ* y *PR-1*.

Los oligonucleótidos diseñados (tabla 3 en materiales y métodos) permitieron sintetizar y amplificar a los cDNAs de maíz correspondientes a los transcritos de *PAL*, *ICS*, y *UBQ* (Figura 21) a partir de RNA total de embriones de maíz germinados durante 36 horas. El cDNA de *ZmPAL* contiene 418 pares de bases (pb) y el cDNA de *ZmUBQ* 306 pb (Figura 21A). Debido a que los oligonucleótidos para amplificar la secuencia de *ZmICS* se diseñaron a partir de una secuencia EST de arroz, se usó RNA de embriones y hoja de esta planta como control positivo (Figura 21C) y se pudo amplificar también a partir de RNA de maíz (Figura 21D). No fue posible clonar al cDNA de *ZmPR-1* a partir del RNA de embriones germinados en presencia de FB1 10  $\mu$ M (que se utilizaría como control positivo de la acumulación de SA ante una mayor expresión de *PAL* y/o *ICS*) debido a que el oligonucleótido *reverse* amplificó inespecíficamente un fragmento de cDNA que corresponde a una proteína de choque térmico (HSP, Figura 21B). En un segundo ensayo para clonar al cDNA de *ZmPR-1* se utilizó RNA de embriones germinados en presencia de SA 5 mM, y se probó un nuevo oligonucleótido *reverse* (Apéndice A), pero no se lograron amplificar los productos esperados de 381 y 262 pb.

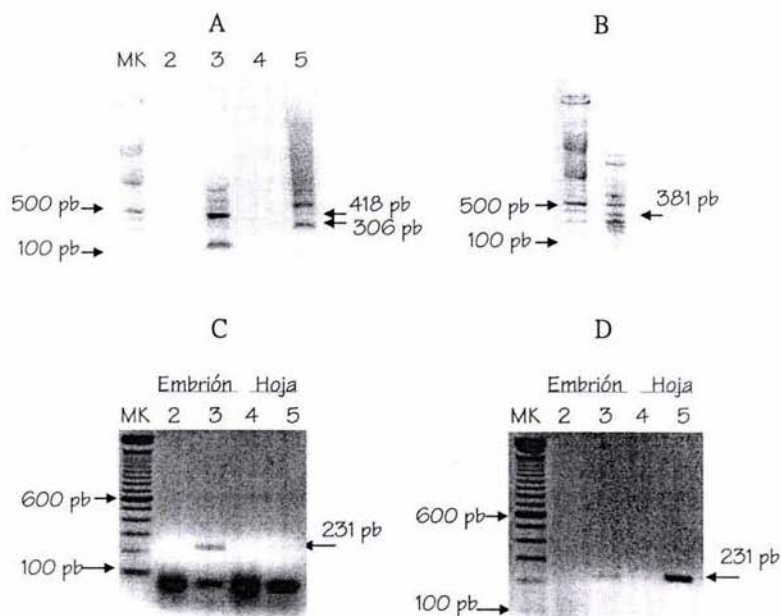


Figura 21. Fragmentos de cDNA obtenidos por RT-PCR: (A) *PAL* y *UBQ* (418 y 306 pb, respectivamente), (B) HSP de maíz, (C) *ICS* de arroz y (D) *ICS* de maíz. En (A), (C) y (D) en los carriles 2 y 4 se cargaron controles negativos (RNA como molde).

La identidad de cada uno de los cDNAs clonados (tabla 12) se corroboró por comparación con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa BLAST. Las secuencias de los cDNAs se presentan alineadas con sus homólogas en el Apéndice B.

Tabla 12. Similitud entre las secuencias de cDNA clonadas a partir de embriones de maíz y secuencias registradas en el banco de genes.

Clona	Especie	Acceso Genbank	% identidad
ZmPAL	<i>Zea mays</i>	L77912	88
	<i>Triticum aestivum</i>	AY005474	88
	<i>Hordeum vulgare</i>	Z49146	87
	<i>Oryza sativa</i>	AY224546	87
ZmUBQ	<i>Zea mays</i>	U29158	98
	<i>Oryza sativa</i>	X76064	88
	<i>Hordeum vulgare</i>	X04133	86
	<i>Magnaporthe grisea</i>	AF056625	86
ZmICS	<i>Oryza sativa</i>	CA763410	87
	<i>Glycine max</i>	CD398634	86
	<i>Triticum aestivum</i>	BQ905086	84
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AY056055	67
ZmHSP	<i>Triticum aestivum</i> HSP80-2	X98582	90
	<i>Hordeum vulgare</i> HSP90	AY325266	90
	<i>Oryza sativa</i> HSP82	Z11920	86

## 7.2. Condiciones óptimas para el análisis de expresión génica por RT-PCR semi-cuantitativo.

Un aspecto muy importante en este ensayo fue verificar la integridad del RNA que se utilizó como molde para sintetizar a los cDNAs, así como la calibración de todas las muestras. Cada muestra de RNA se cuantificó por espectrofotometría y posteriormente se determinó su calidad al analizar 2 µg por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio (Figura 22).

Todos los cDNAs se sintetizaron con oligonucleótidos específicos (Tabla 3 en Materiales y Métodos) a partir de 2 µg RNA total, y se realizaron varias pruebas de PCR variando la cantidad de molde, concentración de oligonucleótidos y número de ciclos de amplificación. El transcrito de la ubiquitina (UBQ) es muy abundante pues se pudo detectar usando una concentración de oligonucleótidos de 0.08 µM con 27 ciclos de amplificación (Figura 23B y E). Para la detección semi-cuantitativa del transcrito de la PAL se utilizaron 27 ciclos y una concentración de oligonucleótidos de 0.1 µM (Figura 23A y C), mientras que el transcrito de la ICS fue el menos abundante ya que se requirieron 30 ciclos y una concentración de oligonucleótidos de 0.4 µM. Las condiciones establecidas para cada transcrito se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones para el ensayo de RT-PCR cuantitativo.

Transcrito	[oligos] ( $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ cDNA <sup>a</sup>	Ciclos de amplificación	$\mu\text{L}$ de PCR <sup>b</sup> cargados en gel
PAL	0.1	2	27	10
ICS	0.4	4	30	15
UBQ	0.08	2	27	10

<sup>a</sup> Sintetizado a partir de 2  $\mu\text{g}$  de RNA<sub>total</sub> en un volumen de 20  $\mu\text{L}$ .

<sup>b</sup> Volumen final por reacción 15  $\mu\text{L}$ .

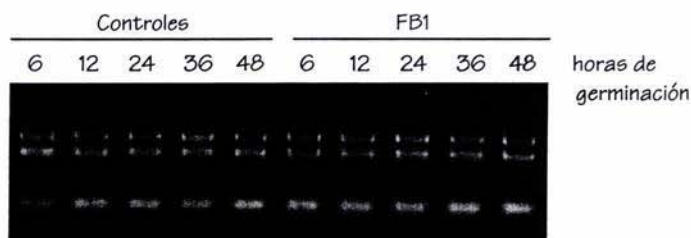


Figura 22. Calibración en gel de 2  $\mu\text{g}$  de RNA total que serían utilizados para sintetizar cDNAs.

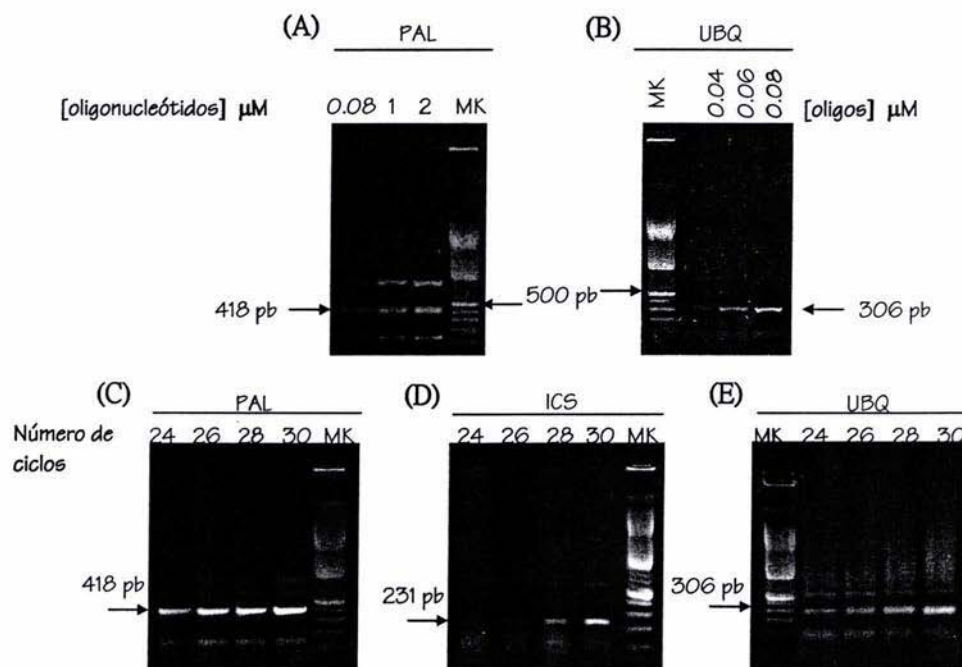


Figura 23. Determinación de los parámetros óptimos para la detección semi-cuantitativa de los transcritos ZmPAL, ZmICS y ZmUBQ por RT-PCR. Se realizaron pruebas variando la cantidad de cDNA, el número de ciclos y la concentración de oligonucleótidos.



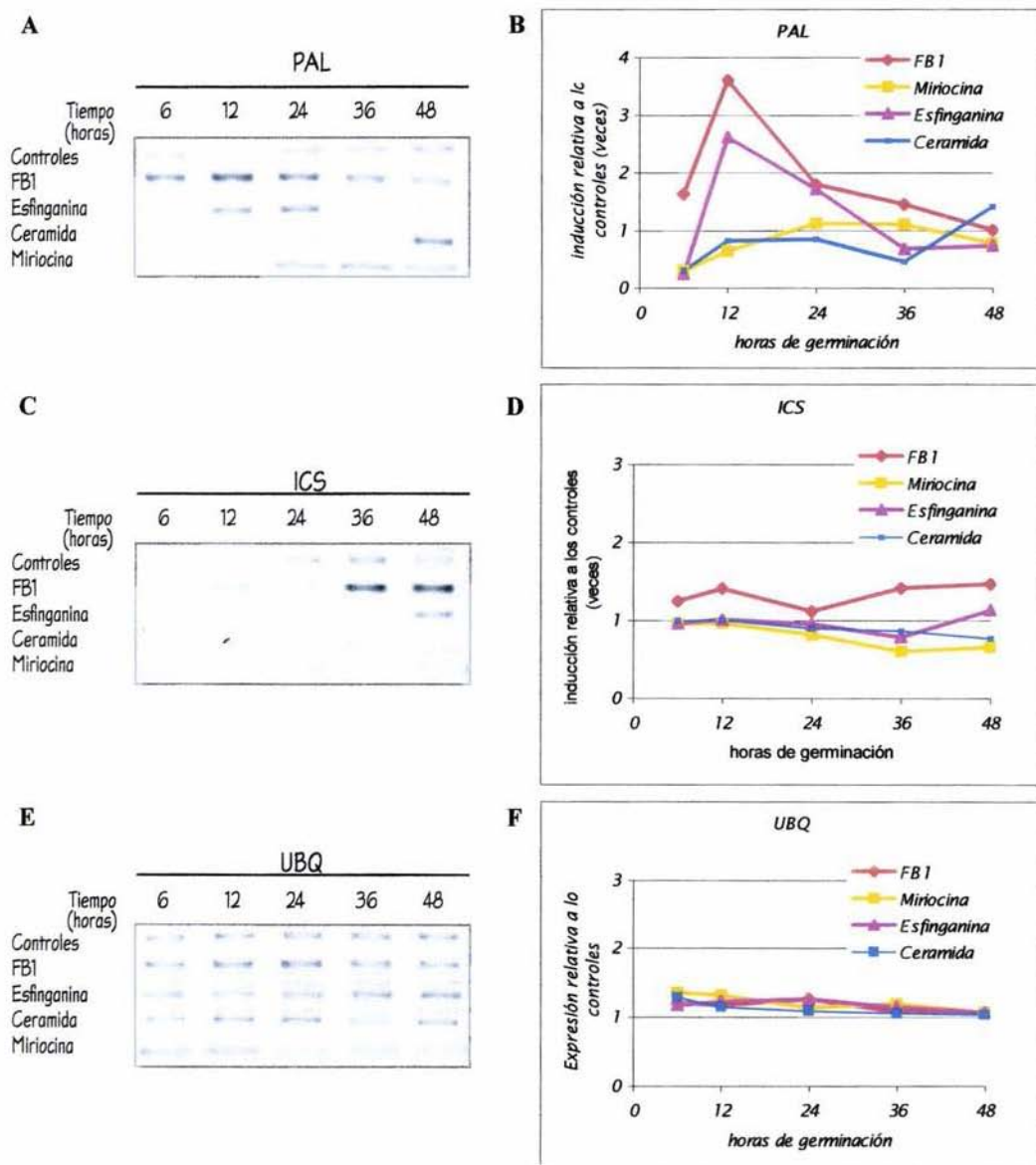
### 7.3. Análisis de la expresión de *PAL* e *ICS* en respuesta a FB1, miriocina, esfinganina y ceramida-C6.

Se analizaron los niveles de transcrito de la fenilalanina amonio-liasa (*PAL*) y de la isocorismato sintasa (*ICS*) debido a que éstas catalizan la primera reacción en cada una de las dos rutas biosintéticas descritas para el SA (Shah, 2003).

La FB1, esfinganina y ceramida-C6 indujeron la expresión de *PAL* (Figura 24A). Con FB1 se observó un incremento en la expresión de *PAL* desde las 6 horas, y se alcanzó la máxima expresión a las 12 horas. El análisis densitométrico indicó que los niveles de transcrito aumentaron 4 veces (Figura 24B). La esfinganina también causó un incremento en la expresión de *PAL*, detectable desde las 12 horas de germinación (Figura 24B), y a partir de este tiempo los niveles del transcrito disminuyeron gradualmente hasta alcanzar los niveles presentes en el control. La ceramida indujo un incremento del 40% (1.4 veces) hasta las 48 horas (Figura 24A y B).

La expresión del gen *ICS* también se incrementó por el tratamiento con la FB1 y esfinganina, pero esta inducción fue discreta, de apenas un 25% en las primeras horas de germinación y se hizo más evidente a partir de las 36 horas con FB1 y a las 48 horas con esfinganina (Figura 24C y D).

El transcrito de ubiquitina en los embriones de maíz es abundante y resultó un marcador adecuado como control de carga en la técnica de PCR semi-cuantitativo pues los niveles no tuvieron variaciones evidentes durante la germinación ni en respuesta al tratamiento con las toxinas y compuestos esfingoides (Figura 24E).



**Figura 24.** Análisis de la expresión de los genes *PAL* (A), *ICS* (D) y *UBQ* (E) en embriones de maíz germinados en presencia de inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos (FB1 10  $\mu$ M y miriocina 1  $\mu$ M) y esfingolípidos (esfingarina y ceramida-C6 10  $\mu$ M). Densitometría de la expresión de *PAL* (B) e *ICS* (D) en respuesta a los esfingolípidos y a los inhibidores de su biosíntesis. La expresión de *UBQ* (F) permaneció constante durante la germinación y ante el tratamiento con esfingolípidos o con las toxinas que afectan el metabolismo esfingolípido.

## VII. Discusión de resultados

### Análisis cuantitativo de SA por HPLC.

La mayoría de las técnicas reportadas para el análisis cuantitativo de SA por HPLC en fase reversa por elución isocrática y detección de fluorescencia se realizan a partir de tejido verde diferenciado, principalmente hojas (Nugroho *et al.*, 2001; Eshita, 2001). En la primera etapa para establecer las condiciones de análisis de SA se probaron las tres soluciones de elución que difieren en su composición (Tabla 2 en Materiales y Métodos) para evaluar su capacidad de resolver al estándar interno (o-ANI) y al analito (SA) de otros compuestos fluorescentes presentes en los tejidos del embrión de maíz. Sin embargo, ninguna de las mezclas resultó satisfactoria para este propósito por lo que se evaluó la mezcla metanol 40% y 60% agua (con 4% de ácido acético) empleada como fase móvil para separar al SA de otros fármacos en una columna C<sub>18</sub> (Sawyer & Kumar, 2003). Esta fase móvil permitió resolver a los estándares de o-ANI y SA a un flujo de 1.5 mL/min, aunque se estableció un flujo más bajo (0.8 mL/min) para separar al o-ANI y al SA de otros compuestos fenólicos presentes en los extractos.

El método analítico para la cuantificación de SA en extractos de compuestos fenólicos de embriones de maíz resultó altamente sensible y lineal en un rango amplio que permitió analizar los niveles de o-ANI y de SA con límites de detección menores a 10 pg.

### Porcentaje de recuperación en la extracción de SA.

Aunque se han reportado distintos compuestos como estándares internos en la extracción de SA (Eshita, 2001), la elección del ácido o-anísico se debió a que, además de satisfacer las características de un estándar interno (propiedades químicas semejantes al SA, detección específica así como alta sensibilidad para su detección), se confirmó su ausencia en los embriones de maíz y bajo las condiciones anteriormente descritas para el análisis por HPLC se separa con una buena resolución del SA y de otros compuestos fenólicos presentes en los extractos.

La adición de un estándar interno es recomendable en una técnica analítica pues permite determinar la eficiencia de cada extracción individual, por lo que se obtienen datos más precisos del contenido de SA en el tejido vegetal. Los solventes empleados (metanol al 90% y la mezcla acetato de etilo:ciclopentano 1:1 v/v) permitieron una extracción cuantitativa de SA a partir de embriones de maíz pues los porcentajes de recuperación obtenidos para el estándar interno (o-ANI) casi siempre fueron mayores al 60%, y similares a los reportados por Mewly & Metraux (1993) en la extracción de SA a partir de hojas de pepino.

### Niveles basales de SA en embriones de maíz en germinación.

Aparentemente los embriones secos tienen un alto contenido de SA libre que disminuye 50% a las 4 horas de germinación. Sin embargo, este valor de contenido relativo se expresó en base al peso seco y en las muestras de embriones de maíz embebidos se expresan en base al peso húmedo. La toma de agua en los embriones ocurre rápidamente y el peso casi se duplica desde las 4 horas de germinación, lo que sugiere que los niveles de SA son similares a estos dos tiempos. La disminución posterior de los niveles de SA hasta alcanzar valores entre 18 y 27 ng/g posiblemente también se deba a la actividad de glucosiltransferasas que lo conjugan para almacenarlo.

Se deseaba comparar los niveles de SA libre encontrados en embriones de maíz con valores reportados en la literatura, pero en todas las especies vegetales de las que se conoce el contenido de SA las determinaciones fueron realizadas en hojas de plantas de por lo menos dos semanas de edad. Entonces, este es el primer estudio que cuantifica al SA en una etapa de desarrollo temprana como es la germinación. Es probable que la síntesis y acumulación del SA encontrado en los embriones secos ocurriera durante la maduración de la semilla.

Resulta interesante que el contenido de SA en embriones de maíz secos (113 ng/g) es muy similar al reportado en hojas de plantas de maíz de 4 a 6 semanas de edad (alrededor de 150 ng/g; Morris *et al.*, 1998). El alto contenido de SA libre en los embriones secos sugiere que no sólo es una molécula de resistencia inducible, sino que también podría constituir una defensa preformada durante el desarrollo de la semilla para optimizar sus respuestas de defensa durante la germinación, ya que la inducción de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de SA y su traducción a proteínas requeriría tiempo que el patógeno podría aprovechar para colonizar a la semilla en germinación. Esta suposición está respaldada en reportes que demuestran que las semillas de cereales están preparadas para contener a los patógenos al tener proteínas con actividad antifúngica e insecticida. Estas proteínas tienen una distribución diferencial pues en semillas de maíz la proteína inactivadora del ribosoma se encuentra preferentemente en el endospermo, mientras que la zeamatina es más abundante en el embrión (Guo *et al.*, 1999).

Por otro lado, el SA presente en el embrión seco también debe ser importante para regular procesos fisiológicos durante la germinación y el establecimiento de la plántula como son el crecimiento celular (Rate *et al.*, 1999) y la termotolerancia (Clarke *et al.*, 2004).

#### **Incremento en los niveles de SA inducido por la FB1 en embriones de maíz en germinación.**

La FB1 es una toxina que induce varias respuestas características de defensa y de la HR en embriones de maíz durante la germinación. La FB1 provocó acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación (Figura 16). Este incremento fue notorio a las 36 horas de germinación y se observó un efecto dependiente de la dosis en esta respuesta (Figura 17). Al comparar el curso temporal de acumulación de bases esfingoideas inducido por la FB1 10  $\mu$ M durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (Rivas San Vicente, 2001) con el incremento en los niveles de SA es evidente que la acumulación de bases esfingoideas precede a la del SA (Figura 25), por lo que se postuló como hipótesis de este trabajo que estos precursores de esfingolípidos participan en la regulación de la biosíntesis de SA.

Sabiendo que el SA es una molécula importante en la integración de la respuesta de defensa a patógenos que induce la activación transcripcional de genes de proteínas PR y que es esencial en la HR, sería posible que la degradación de DNA y activación transcripcional de glucanasas y quitinasas inducidas por la FB1 también ocurriera como consecuencia de la elevación en los niveles de SA.

Nuestros resultados proveen evidencia bioquímica directa de que la FB1 induce la acumulación de SA en plantas. Anteriormente solo se tenían evidencias genéticas en plantas de *A. thaliana*, que al ser infiltradas con FB1 o transferidas a placas de agar con la toxina desarrollan lesiones parecidas a la HR y expresan genes PR (Stone *et al.*, 2000). Es interesante notar que la elevación de casi dos veces en los niveles de SA inducida por la FB1 en los embriones de maíz en germinación es muy semejante a la acumulación de este metabolito en hojas de plántulas de maíz de 4 a 6 semanas de edad inoculadas con esporas de *Colletotrichum graminicola*

o *Bipolaris maydis* (2.6 veces; Morris *et al.*, 1998). Esto sugiere que en las etapas tempranas de desarrollo existe la capacidad funcional completa para desarrollar una respuesta de defensa dependiente de la vía del ácido salicílico.

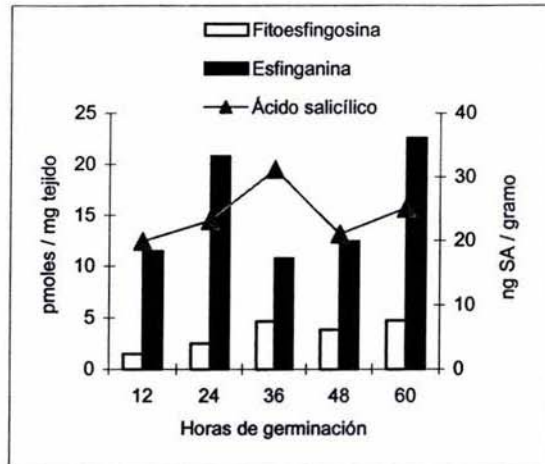


Figura 25. Acumulación de bases esfingoideas (pmoles/mg tejido; Rivas San Vicente, 2001) y ácido salicílico (ng/g) inducida por FB1 10  $\mu$ M.

#### Efecto de las bases esfingoideas y ceramida en los niveles de SA en embriones de maíz en germinación.

La hipótesis de que la acumulación de SA inducida por la FB1 estaba relacionada con el incremento en los niveles de bases esfingoideas se corroboró al encontrar que la esfinganina y fitoesfingosina 10  $\mu$ M aumentaron los niveles de SA de los embriones en germinación en mayor magnitud (6 y 3 veces, respectivamente) y en tiempos más cortos (16 y 24 horas, respectivamente) que la toxina (Figura 18). Sin embargo, es difícil señalar que uno de estos compuestos en particular sea directamente responsable de la acumulación de SA en los embriones pues los esfingolípidos se pueden metabolizar rápidamente en la célula e interconvertirse entre ellos. Las bases esfingoideas que se adicionan al medio de imbibición pueden difundir rápidamente a través de la membrana plasmática y podrían ser fosforiladas para formar esfinganina-1-fosfato y fitoesfingosina-1-fosfato (Crowther & Lynch, 1997), derivados que también poseen actividad biológica en mamíferos y *S. cerevisiae* (Dickson & Lester, 1999; Huwiler *et al.*, 2000). Asimismo, la esfinganina al ser sustrato de la esfinganina-N-acil-transferasa podría incrementar los niveles de ceramidas endógenas, y entonces éstas podrían ser las responsables de la acumulación de SA. Para corroborar o descartar esta hipótesis se determinó si una ceramida de cadena corta incrementa los niveles de SA en los embriones de maíz en germinación. La ceramida-C6 también estimuló la acumulación de SA (Figura 19), pero con una cinética más lenta pues se observó el efecto hasta las 24 horas. Este incremento tardío (con respecto al inducido por las bases esfingoideas) en los niveles de SA provocado por la ceramida-C6 podría deberse a que este esfingolípidos al tener una estructura química más compleja que las bases esfingoideas no difunde tan rápido como ellas a través de la membrana plasmática.

Este experimento no resolvió totalmente nuestra pregunta pues también es posible que la ceramida sea hidrolizada por una ceramidasa liberando moléculas de esfingosina que incrementaría los niveles de bases esfingoideas. También es posible que la esfingosina sea reaclada con un ácido graso de cadena larga como se ha demostrado en células de mamíferos (Ogretmen *et al.*, 2002).

La interconversión de esfingolípidos dificulta la interpretación del efecto de las bases esfingoideas y ceramida en la inducción de SA, aunque de cualquier manera los resultados indican una evidente asociación entre la acumulación de SA y el metabolismo de estos lípidos.

Un aspecto importante del incremento en los niveles de SA provocado por las bases esfingoideas y la ceramida en los embriones en germinación es que una vez alcanzada la acumulación máxima de SA, los niveles decrecen con tendencia a los niveles basales. Esto se debe a que los esfingolípidos exógenos son metabolizados por los embriones (desapareciendo el estímulo que promueve la acumulación de SA) pues en otro ensayo en el que los embriones se transfirieron cada 24 horas a placas de agar frescas (adicionadas con esfingánina o ceramida C6) sí se mantuvieron los altos niveles de SA (Figura 27 en el Apéndice C).

#### **Efecto de un inhibidor de la síntesis de bases esfingoideas (miriocina).**

La miriocina es otra micotoxina que afecta la biosíntesis de esfingolípidos por ser un potente inhibidor de la serina palmitoil transferasa (SPT; Miyake *et al.*, 1995), enzima que cataliza la primera reacción en esta ruta. Para corroborar que es el incremento en la concentración de bases esfingoideas en la célula y no la depleción de otros esfingolípidos -como la ceramida- lo que induce acumulación de SA, se determinó el efecto de la miriocina en los niveles de SA en embriones durante la germinación. Como se esperaba, el contenido de SA de los embriones germinados en presencia de miriocina fue similar o ligeramente inferior al de los controles (Figura 20), con lo cual se demuestra que los esfingolípidos y la actividad de la SPT son importantes en la cascada de señalización que activa la acumulación de SA en la respuesta de defensa a patógenos.

Ya se había sugerido la participación de la SPT y sus productos (las bases esfingoideas) en la respuesta de defensa a patógenos por el hecho de que la transcripción del gen *SPT* de papa se induce fuertemente durante la interacción incompatible con el hongo *Phytophthora infestans* (Birch *et al.*, 1999). Sin embargo, aun no se ha demostrado que los niveles de bases esfingoideas se eleven, por lo que la miriocina sería una herramienta útil para determinar si inhibe o reduce la intensidad de la HR en algún sistema de incompatibilidad.

Es importante notar que aunque no se determinaron los niveles de bases esfingoideas en los embriones expuestos a la miriocina, es casi seguro que disminuyeron pues las concentraciones de toxina empleadas (100 nM y 1  $\mu$ M) son superiores a la  $K_i$  de la SPT de células CTLL-2 ( $2.8 \times 10^{-10}$  M). Por otro lado, la miriocina en concentración 100 nM fue suficiente para prevenir la muerte celular provocada por la toxina AAL 200 nM (que induce acumulación de bases esfingoideas) en hojas de jitomate (Spassieva *et al.*, 2002).

#### **Condiciones óptimas para el análisis de expresión génica por RT-PCR semi-cuantitativo.**

Los niveles de los transcritos de los genes que codifican las enzimas de la ruta biosintética de ácido salicílico se determinaron con la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo. Esta técnica permite detectar niveles bajos de transcrito y variaciones en los niveles de éste si se emplea un RNAm marcador cuyos niveles no varíen a lo largo de la germinación ni en respuesta a los compuestos que se probaron. Se encontró que

los niveles del transcrito de la ubiquitina no variaron a lo largo de la germinación y tampoco fueron afectados por la adición de las toxinas o de los esfingolípidos (Figura 24E y F). Para analizar los niveles de los transcritos de los genes *PAL* e *ICS* se determinó para cada uno la cantidad de molde, la concentración de oligonucleótidos y el número de ciclos de amplificación. Para analizar la expresión de *ZmPAL* y *ZmUBQ* fueron suficientes 2  $\mu$ L de cDNA y 27 ciclos de amplificación, con concentraciones de oligonucleótidos de 0.1 y 0.06  $\mu$ M, respectivamente, mientras que para analizar la expresión de *ZmICS* se requirió el doble de cDNA (4  $\mu$ L), una alta concentración de oligonucleótidos (0.4  $\mu$ M) y 30 ciclos de amplificación. El RNAm de *ZmICS* es escaso en los embriones en germinación debido a que la proteína se dirige a cloroplasto y en esta temprana etapa del desarrollo apenas se empiezan a diferenciar los plastidios. La baja concentración de oligonucleótidos utilizada para la *ZmUBQ* no fue limitante pues aún con 0.04  $\mu$ M se pudo visualizar el producto de amplificación en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 23). El número de ciclos de amplificación determinado para cada cDNA se mantuvo dentro del intervalo exponencial sin haber alcanzado la saturación (Figura 23).

#### **Análisis de la expresión de genes que participan en la biosíntesis de SA en respuesta a FB1, miriocina, esfinganina y ceramida C6.**

Se supuso que la acumulación de SA libre provocada por FB1, bases esfingoideas y ceramida podría deberse a una inducción en su biosíntesis teniendo como antecedente que la infección por patógenos y otras condiciones de estrés aumentan la expresión de la PAL (Reinold & Hahlbrock, 1996; Dixon & Paiva, 1995). También se analizó la expresión del gen que codifica a la ICS porque recientemente se demostró su participación en la resistencia a patógenos (Wildermuth *et al.*, 2001).

El análisis de la expresión de los genes *ZmPAL* y *ZmICS* (Figura 24 A y C) demostró que la acumulación de SA inducida por FB1, esfinganina y ceramida C6 se relaciona con una mayor expresión de estos genes. Se esperaba encontrar mayor expresión de estos genes en los embriones germinados con esfinganina pues de todos los compuestos evaluados fue la que provocó mayor acumulación de SA. Sin embargo, la mayor inducción de la expresión de *ZmPAL* y *ZmICS* se debió a la FB1, lo cual podría atribuirse a que la toxina tiene otros mecanismos de acción molecular que podrían activar la expresión de genes de defensa independientemente de la acumulación de bases esfingoideas.

El análisis densitométrico sugiere que la mayoría del SA acumulado provino de la ruta biosintética de la PAL pues en los embriones expuestos a la FB1 y a la esfinganina su transcrito se incrementó 4 y 2.5 veces (Figura 24B), respectivamente, mientras que el transcrito de la ICS aumentó 1.5 veces en respuesta a la FB1 (Figura 24D). Sin embargo, para confirmar o descartar esta suposición se deberán determinar los niveles de ambas proteína (PAL e ICS) así como su actividad en embriones sometidos a los tratamientos que ya se han descrito.

Este es el primer estudio que determina la contribución de las dos rutas biosintéticas del SA en la respuesta de defensa, evaluando la expresión de las enzimas importantes en la regulación de estas vías. En plantas se ha demostrado que la PAL regula la biosíntesis de SA por la vía de los fenilpropanoides. La producción de SA a partir del corismato catalizada por la ICS se describió recientemente y su regulación no ha sido estudiada, pero en procarotes se reportó que la ICS regula biosíntesis de salicilatos (Gaille *et al.*, 2003).

### Posible participación de ZmHSP en la activación de la respuesta de defensa por esfingolípidos.

Es interesante notar que se aisló un cDNA de una proteína de choque térmico (ZmHSP) con un oligonucleótido diseñado para sintetizar al cDNA de ZmPR-1 a partir de RNA de embriones expuestos a FB1 10  $\mu$ M como un transcrito que aparentemente se incrementa.

En *S. cerevisiae* y mamíferos se ha demostrado que la respuesta a choque térmico está mediada por cambios en los niveles de esfingolípidos, aunque difieren en términos del lípido activo, mecanismo y función final. Las bases esfingoideas (sintetizadas *de novo*) se consideran como los principales esfingolípidos bioactivos en la respuesta al choque térmico en levadura debido a que incrementan los niveles de trehalosa que actúa como termoprotector permitiendo que la levadura sobreviva y crezca a temperaturas elevadas. En mamíferos el incremento en los niveles de ceramida (ocasionado por la degradación de esfingomielina) se ha relacionado con la apoptosis, aunque la acumulación de ceramida en respuesta al choque térmico no conduce a muerte celular en todas las líneas celulares y podría tener alguna otra función termoprotectora aún no descubierta (Jenkins 2003).

La inducción de la expresión de *ZmHSP* en embriones de maíz expuestos a la FB1 sugiere que en plantas -al igual que en *S. cerevisiae*- la acumulación de bases esfingoideas induce la expresión de HSPs. Sin embargo, también es posible que la acumulación de SA inducida por la FB1 sea la responsable de la mayor expresión de *ZmHSP* pues el SA induce la expresión de HSPs en jitomate y *Arabidopsis*, y les confiere termotolerancia al igual que a otras especies vegetales (Clarke *et al.*, 2004).

Recientemente se ha descubierto que las HSPs tienen una función importante en la respuesta de defensa a patógenos. La SIPK (cinasa de proteínas inducida por SA) de *Nicotiana benthamiana* interactúa con la HSP90 citosólica en ensayos de doble híbrido (Kanzaki *et al.*, 2003). Los mismos autores demostraron la participación de las HSPs en la respuesta de defensa a patógenos al encontrar que las plantas silenciadas en los genes *HSP90* y *HSP70* no desarrollan HR ante la infiltración de la proteína INF del hongo *Phytophthora infestans*, o de la bacteria *Pseudomonas cichorii*, y que su expresión de genes *PR* fue menor en comparación a las plantas silvestres. En *A. thaliana* una mutación en el dominio de unión a ATP de la HSP90 compromete la función de la proteína de resistencia RPM1 que activa la respuesta de defensa ante *Pseudomonas syringae* (Hubert *et al.*, 2003).

En base a los resultados obtenidos y a los elementos que se conocen de la vía de señalización del ácido salicílico, se propone el modelo representado en la figura 26. El incremento intracelular en la concentración de esfinganina -ya sea por la rápida difusión de la base esfingoidea exógena a través de la membrana plasmática, o bien, por la inhibición de la esfinganina-N-acil-transferasa por la FB1- activa la expresión del gen o genes que codifican a la PAL que participa en la biosíntesis de SA. Esta enzima se presenta en varias isoformas que pueden ser productos de diferentes miembros de la familia multigénica o pueden provenir de modificaciones post-traduccionales de uno o más genes (Appert *et al.*, 1994; Sarma *et al.*, 1998). La inducción de la expresión de PAL aumenta la biosíntesis de SA en el citosol y este metabolito induce la expresión de genes y afecta la conformación de muchas proteínas al alterar el estado redox de la células, entre ellas el regulador transcripcional NPR1 y el factor de transcripción TGA1 (Mou *et al.*, 2003; Després *et al.*, 2003). A través de la familia de factores transcripcionales TGA el SA activa a genes



tempranos (*GST* y *GT*) y tardíos (genes *PR*), aunque la activación procede a través de distintos mecanismos pues la activación transcripcional de los genes *PR* procede a través de una vía dependiente de NPR1 (Uquillas *et al.*, 2004). La proteína NPR1 en el citosol se mantiene como un oligómero inactivo a través de puentes disulfuro intramoleculares, ocultando una secuencia de localización nuclear. El incremento en los niveles de SA provoca la transición de NPR1 a la forma monomérica activa que migra al núcleo donde actúa como coactivador de los factores de transcripción TGA induciendo la expresión de los genes *PR* (Mou *et al.*, 2003). La actividad de algunos factores de transcripción como TGA1 y TGA4 depende de la acumulación de SA pues se reduce su puente disulfuro y adoptan una conformación que les permite interactuar con NPR1. La unión de NPR1 a estos factores transcripcionales aumenta su afinidad por el DNA en el elemento *cis* TGACG (Després *et al.*, 2003).

Los factores de transcripción WRKY también participan en la vía de señalización del SA. Se ha demostrado que el factor WRKY70 de *A. thaliana* actúa río abajo de NPR1 como coactivador de genes inducidos por SA (Li *et al.*, 2004). El gen *ICS1* de *A. thaliana* posee en su promotor elementos *cis* denominados cajas W que son reconocidas por factores de transcripción WRKY, por lo que es probable que la acumulación de SA en el citosol provocada por la esfinganina active al factor WRKY requerido para la activación transcripcional del gen o genes *ICS* en maíz. Esto explicaría que la inducción de la expresión de ZmICS ocurriera después de la activación transcripcional de ZmPAL.

Es probable que la inducción de la expresión de ZmPAL y ZmICS por los esfingolípidos esté mediada principalmente por factores de transcripción MYB. Las proteínas MYB son la familia de factores transcripcionales más abundantes en plantas y son los principales reguladores del metabolismo secundario (Jin & Martin, 1999), y más aun, que la proteína AtMYB30 de *A. thaliana* actúa como un regulador positivo de la HR (Vailleau *et al.*, 2002).

Resultaría interesante determinar el mecanismo por el cual los esfingolípidos inducen la expresión de genes que participan en la biosíntesis de SA, en especial, la combinación de elementos *cis* y factores *trans* que se requiere para la transcripción de los genes *PAL* e *ICS*. Se sabe que los factores MYB de plantas se unen a uno o más de dos elementos *cis* cuyas secuencias consenso son CNGTTR, GKTWGTR y GKTTWGGTR donde N=A/T/C/G, R=A/G, K=G/T y W=A/T (Yang *et al.*, 2001). Otro aspecto interesante sería determinar si los esfingolípidos modulan la actividad de las proteínas MYB y otros factores transcripcionales involucrados por mecanismos post-traduccionales. Quizá los esfingolípidos activen cinasas que alteren el estado de fosforilación de los factores transcripcionales y esto aumente su afinidad por el DNA y la transcripción de genes (Johnson *et al.*, 1999).

Este trabajo aporta evidencias de la participación de los precursores de esfingolípidos en regulación de la respuesta de defensa en plantas, y es probable que el balance en los niveles de estos compuestos y de sus derivados fosforilados module la respuesta de defensa y muerte celular en plantas. Recientemente se describió que la mutante *acd5* (accelerated cell death) de *A. thaliana* muestra síntomas exacerbados durante el ataque por patógenos y muerte celular (Liang *et al.*, 2003). Una vez aislado el gen, se identificó a la proteína ACD5 como una ceramida cinasa que probablemente contribuye en la regulación de los niveles de ceramida que induce muerte celular.

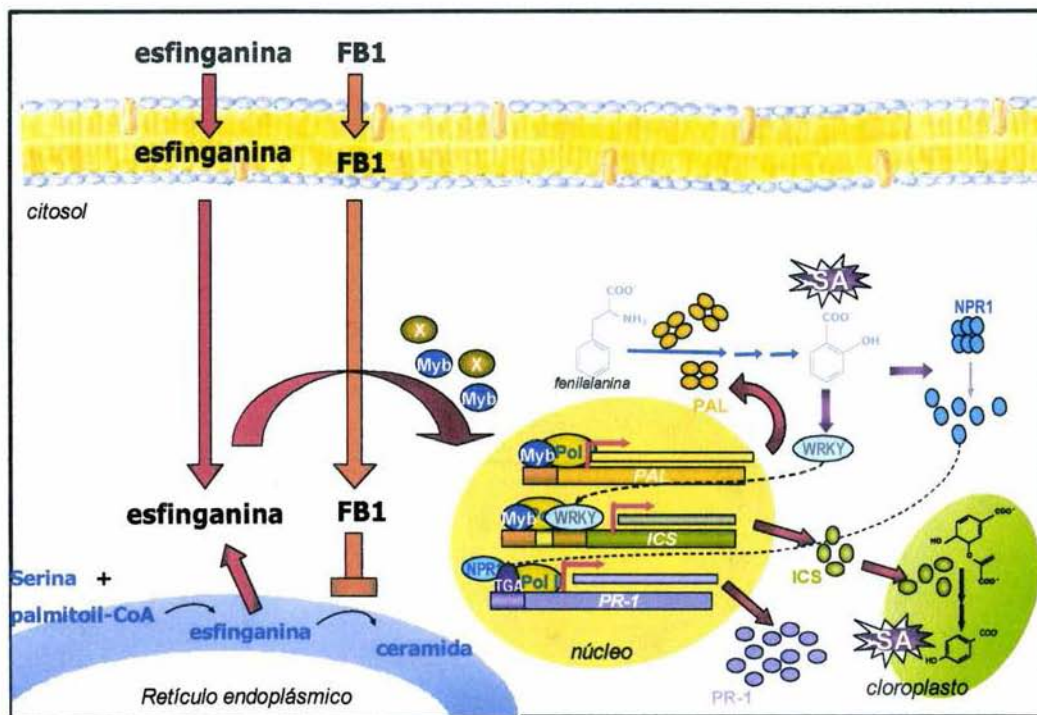


Figura 26. Modelo propuesto para la esfinganina como regulador de la acumulación de ácido salicílico en la respuesta de defensa a patógenos, donde FB1 es la fumonisina B1; SA es el ácido salicílico; Myb, WRKY y TGA son factores de transcripción; NPR1 es un regulador transcripcional; Pol II es la RNA polimerasa II; PAL es la fenilalanina amonio liasa; ICS es la isocorismato sintasa, y PR-1 es la proteína asociada con la patogénesis cuya expresión se induce por ácido salicílico.

## VIII. Conclusiones

La FB1 siendo una micotoxina que altera la biosíntesis de esfingolípidos provocando acumulación de bases esfingoideas, resultó una herramienta útil para estudiar la asociación entre el metabolismo de esfingolípidos y la acumulación de ácido salicílico. La FB1 induce un incremento significativo en los niveles de ácido salicílico libre en embriones de maíz a las 36 horas de imbibición, y este incremento es proporcional a la concentración de toxina añadida. Asimismo, la esfinganina y fitoesfingosina inducen una acumulación de ácido salicílico libre en mayor magnitud y en menor tiempo que la FB1, lo que sugiere que estos compuestos están mediando el incremento en los niveles de ácido salicílico observado. Por otro lado, la ceramida-C6 exógena también provoca acumulación de ácido salicílico, posiblemente porque es hidrolizada por una ceramidasa en los embriones para generar esfingosina, aunque esta posibilidad no fue explorada en este trabajo.

Tanto la FB1 como la esfinganina activan la expresión de los genes *PAL* e *ICS* que codifican enzimas importantes en las dos rutas biosintéticas del ácido salicílico. La inducción de la expresión de estos genes sugiere que la regulación a nivel transcripcional es uno de los mecanismos por los cuales se controla la actividad de la PAL y de la ICS.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis sobre una de las funciones de los compuestos esfingoideos como moléculas de señalización que participan en la respuesta de defensa de plantas contra patógenos a través de la acumulación de ácido salicílico.

## X. Bibliografía

- Abbas HK & Boyette CD (1992) Phytotoxicity of fumonisin B1 on weed and crop species. *Weed Technol* 6: 548-552.
- Abbas HK, Boyette CD, Hoagland FE, Vesonder RF (1991) Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin. *Weed Sci* 39: 673-677.
- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Gras EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AHJ, Riley RT (1994) Fumonisin- and AAL-Toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* 106: 1085-1093.
- Alcántara-Sánchez F (1998) Efecto de la fumonisin B1 en la integridad del AND genómico de maíz durante la germinación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 98 pp.
- Aleman R, Meyer zu Heringdorf D, van Koppen CJ, Jakobs KH (1999) Formyl peptide receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase. *J Biol Chem* 274: 3994-3999.
- Allwood EG, Davies DR, Gerrish C, Ellis BE, Bolwell P (1999) Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett* 457: 47-52.
- Alvarez MA (2000) Salicylic acid in the machinery of the hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* 44: 429-442.
- Alvarez ME, Penell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Appert C, Logemann E, Hahlbrock K, Schmid J, Amrhein N (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur J Biochem* 225: 491-499.
- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene- and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12: 1823-1835.
- Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol* 128: 491-501.
- Baker CJ & Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33: 299-321.
- Bate NJ, Orr J, Ni W, Meromi A, Nadler-Hassar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb CJ, Elkind Y (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7608-7612.
- Beeler T, Bacikova D, Gable K, Hopkins L, Johnson C, Slife H, Dunn T (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* *TSC10/YBR265w* gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive *csg2Δ* mutant. *J Biol Chem* 273: 30688-30694.
- Bi YM, Kenton P, Mur L, Darby R, Draper J (1995) Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J* 8: 235-245.

- Bille J, Weiser T, Bentrup FW (1992) The lysolipid sphingosine modulates pyrophosphatase activity in tonoplast vesicles and isolated vacuoles from a heterotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plantarum* 84: 250-254.
- Birch PRJ, Avrova AO, Ducan JM, Lyon GD, Toth RL (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Int* 12: 356-361.
- Bonas U & Lahaye T (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol* 5: 44-50.
- Bostock RM, Kic JA, Laine RA (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* 212: 67-69.
- Boudker O & Futerman AH (1993) Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane. *J Biol Chem* 268: 22150-22155.
- Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FLW, Laurent PL, Kneppers TJA, Hille J, Nijkamp HJJ (2000) A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc Natl Acad USA* 97: 4961-4966.
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen LB, Brown RE, Mundy J (2002) Knockout of Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes & Dev* 16: 490-502.
- Bucci T, Hansen DK, LaBorde JB (1996) Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B1. *Nat Toxins* 4: 51-52.
- Buchanan-Wollaston V & Ainsworth C (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol* 33: 821-834.
- Buchanan-Wollaston V (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 105: 839-846.
- Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48: 181-199.
- Buckner B, Janick-Buckner D, Gray J, Johal GS (1998) Cell-death mechanisms in maize. *Trends Plant Sci* 3: 218-223.
- Carswell GK, Johnson CM, Shillito RD, Harms CT (1989) O-acetylsalicylic acid promotes colony formation from protoplasts of an elite maize inbred. *Plant Cell Reports* 8: 282-284.
- Chalfant CE, Kishikawa K, Mumby MC, Kamibayashi C, Bielawska A, Hannun YA (1999) Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 274: 20313-20317.
- Chen W & Singh KB (1999) The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* *GST6* promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J* 19: 667-677.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.
- Cheng SH, Sheen J, Gerrish C, Bolwell P (2001) Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett* 503: 185-188.

- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541-549.
- Clarke SM, Mur LA, Wood JE, Scott IM (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38: 432-447.
- Coquoz JL, Buchala A, Meatrux JP (1998) The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol* 117: 1095-1101.
- Coursol S, Fan LM, Lé Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM (2003) Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423: 651-654.
- Cramer CL, Edwards K, Dron M, Liang X, Dildine SL, Bolwell GP, Dixon RA, Lamb CJ, Schuch W (1989) Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol Biol* 12: 367-383.
- Crowther GJ & Lynch DV (1997) Characterization of sphinganine kinase activity in corn shoot microsomes. *Arch Biochem Biophys* 337: 284-290.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutking JS, Spiegel S (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381: 800-803.
- Dangl J, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.
- Daruwala R, Kwon O, Meganathan R, Husdspeth MES (1996) A new isochorismate synthase specifically involved in menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>) biosynthesis encoded by the *menF* gene. *FEMS Microbiol Lett* 140: 159-163.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role for salicylic acid in plant resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Delledone M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Deng X, Ito T, Carr B, Mumby M, May WS Jr (1998) Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 273: 34157-34163.
- Desikan R (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett* 383: 213-217.
- Després C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert PR (2003) The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15: 2181-2191.
- Devlin WS & Gustine DL (1992) Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiol* 100: 1189-1195.
- Dickson RC & Lester RL (1999) Yeast sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 1426: 347-357.
- Dickson RC, Nagiee EE, Skrzypek M, Tillman P, Wells GB, Lester RL (1997) Sphingolipids Are Potential Heat Stress Signals in *Saccharomyces*. *J Biol Chem* 272: 30196-30200.
- Dixon RA & Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.

- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3: 371-390.
- Dixon RA, Paiva NL, Bhattacharyya MK (1995) Engineering disease resistance in plants: An overview. In *Molecular Methods in Plant Pathology*, RP Singh & US Singh, eds (Boca Raton: CRC Press, pp.249-270).
- Dohelert DC, Knutson CA, Vesonder RF (1994) Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127: 117-121.
- Draper J (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci* 2: 162-165.
- Dressier KA & Kolesnick RN (1990) Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukaemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *J Biol Chem* 265: 14917-14921.
- Dröge-Laser W, Kaiser A, Lindsay WP, Halkier B, Loake GA, Doerner PW, Dixon RA, Lamb CJ (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP transcription factor, G/HBF-1, in the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J* 16: 726-738.
- Droog F, Spek A, van der Kooy A, de Ruyter A, Hoge H, Libbenga K, Hooykaas P, van der Zaal B (1995) Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione S-transferase genes *Nt103-1* and *Nt103-35*. *Plant Mol Biol* 29: 413-429.
- Durner J & Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 369-374.
- Durner J, Shah J, Klessig DF (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 2: 266-274.
- Dutton MF (1996) Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol Ther* 70: 137-161.
- Eshita SM (2001) 3-Hydroxybenzoic acid as an internal standard for the high-pressure liquid chromatography quantitation of salicylic acid in plants. *Anal Biochem* 289: 99-102.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatez S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5: 199-206.
- Fantini J (2003) How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. *Cell Mol Life Sci* 60: 1027-1032.
- Farivar RS & Brecher P (1996) Salicylate is a transcriptional inhibitor of the inducible nitric oxide synthase in cultured cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 271: 31585-31592.
- Fisher R, Budde I, Hain R (1997) Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *Plant J* 11: 489-498.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* 100: 241-254.
- Fujita T, Yoneta M, Hirose R (1995) Simple compounds, 2-alkyl-2-amino-1,3-propanediols have potent immunosuppressive activity. *Bio Med Chem Lett* 5: 847-852.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.

- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Gaillie C, Reimann C, Haas D (2003) Isochorismate synthase (PchA), the first and rate-limiting enzyme in salicylate biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 278: 16893-16898.
- Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG (1991) Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247-1251.
- Gelli A, Higgins VJ, Blumwald E (1997) Activation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol* 113: 269-279.
- Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris PC, Bouvier-Durand M, Vartanian N (1994) Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* 26: 1557-1577.
- Gomez-Muñoz A, Duffy PA, Martin A, O'Brien L, Byun HS, Bittman R, Brindley DN (1995) Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Mol Pharmacol* 47: 883-889.
- Gomez-Muñoz A, Frago LM, Alvarez L, Varela-Nieto I (1997) Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochem J* 325: 435-440.
- Graham TL (1991) Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissue and in seed and root exudates. *Plant Physiol* 95: 594-603.
- Guillas I, Kirchman PA, Chuard R, Pfefferli M, Jiang JC, Jazwinski SM, Conzelmann A (2001) C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J* 20: 2655-2665.
- Guo BZ, Cleveland TE, Brown RL, Widstrom NW, Lynch RE, Russin JS (1999) Distribution of antifungal proteins in maize kernel tissues using immunochemistry. *J Food Protect* 62: 295-299.
- Gupta V, Willits MG, Blazebrook J (2000) *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 503-511.
- Hahlbrock K, Scheel D, Longemann E, Nummerger T, Parniske M, Reinold S, Sacks WR, Schmelzer E (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4150-4157.
- Hanada K, Nishijima M, Fujita T, Kobayashi S (2000) Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells: A novel evaluation system using an SPT defective mammalian cell mutant. *Biochem Pharmacol* 59: 1211-1216.
- Hannun YA & Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 10: 73-80.
- Hannun YA, Loomis CR, Merrill AHJ, Bell RM (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *J Biol Chem* 261: 12604-12609.
- Hannun YA, Luberto C, Argraves KM (2001) Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40: 4893-4903.
- Harms K, Ramirez I, Peña-Cortés H (1998) Inhibition of wound induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiol* 118: 1057-1065.



- Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JRJ (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J Vet Diagn Invest 2: 217-221.
- Haschek WM, Gumprecht LA, Smith G, Tumbleson ME, Constable PD (2001) Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. Environ Health Perspec 109 (Suppl 2) 251-257.
- Heinrich M, Wickel M, Schneider-Brachert W, Sandberg C, Brunner J, Kronke M, Shutze S (1999) Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. EMBO J 18: 5252-5263.
- Henfling JWDM, Bostock R, Kuc J (1980) Effects of abscisic acid on rishitin and lubumin accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* and *Cladosporium cucumerinum* in potato tuber tissue slices. Phytopathology 70: 1074-1078.
- Hermann KM (1995) The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic aminoacids. Plant Cell 7: 907-919.
- Horvath D & Chua NH (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. Plant Mol Biol 31: 1061-1072.
- Hubert DA, Tornero P, Belkhadir Y, Krishna P, Takahashi A, Shirasu K, Dangl JL (2004) Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. EMBO J 22: 5679-5689.
- Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sanhoff K (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. Biochim Biophys Acta 1485: 63-69.
- Im DS (2003) Linking chinese medicine and G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci 24: 2-4.
- Imai H, Morimoto Y, Tamura K (2000a) Sphingoid base composition of monoglucosylceramide in Brassicaceae. J Plant Physiol 157 453-456.
- Imai H, Ohnishi M, Hotsubo K, Kojima M, Ito S (1997a) Sphingoid base composition of cerebroside from plant leaves. Biosci Biotech Biochem 61: 351-353.
- Imai H, Ohnishi M, Kinoshita M, Kojima M, Ito S (1995) Structure and distribution of cerebroside containing unsaturated hydroxy fatty acids in plant leaves. Biosci Biotech Biochem 59: 1309-1313.
- Imai H, Ohnishi M, Kojima M, Ito S (1997b) In: JP Williams, MU Khan, NW Lem (Eds) Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of plant lipids. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, 1997, PP. 224-226.
- Imai H, Yamamoto K, Shibahara A, Miyatani S, Nakayama T (2000b) Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxy fatty acids of glucosylceramides by gas chromatography-mass spectrometry. Lipids 35: 233-236.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (1998) Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997. Eur J Biochem 257: 293-298.
- Jenkins GM (2003) The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response. Cell Mol Life Sci 701-710.
- Jenkins GM & Hannun YA (2001) Role for *de novo* sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 276: 8574-8581.

- Jenkins GM, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid LM, Hannun YA (1997) Involvement of Yeast Sphingolipids in the Heat Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272: 32566-32572.
- Jin H & Martin C (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41: 577-585.
- Johnson TK, Scweppe RE, Septer J, Lewis RE (1999) Phosphorylation of B-Myb regulates its trans-activation potential and DNA binding. *J Biol Chem* 274: 36741-36749.
- Kanzaki H, Saitoh H, Ito A, Fujisawa S, Kamoun S, Katou S, Yoshioka H, Terauchi R (2003) Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* 4: 383-391.
- Kawaguchi M, Imai H, Naoe M, Yasui Y, Ohnishi M (2000) Cerebrosides in grapevine leaves: distinct composition of sphingoid bases among the grapevine species having different tolerances to freezing temperature. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1271-1273.
- Kawahara K, Moll H, Knirel YA, Seydel U, Zahringer U (2000) Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur J Biochem* 267: 1837-1846.
- Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S (1998) Salicylic acid induced extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco cell suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol* 39: 721-730.
- Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, Endo S, Yamada K, Ebinuma H (2000) Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlim1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* 22: 289-301.
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb CA (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91<sup>phox</sup> subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell* 10: 255-266.
- Kettner J & Dörffling K (1995) Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Planta* 196: 627-634.
- Klessig DF & Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* 26: 1439-1458.
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8849-8855.
- Koga J, Yamauchi T, Shimura M, Ogawa N, Oshima K, Umemura K, Kikuchi M, Ogasawara N (1998) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem* 273: 31985-31991.
- Krawczyk S, Thurow C, Higgeweg R, Gatz C (2002) Analysis of the spacing between the two palindromes of *activation sequence-1* with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential. *Nucleic Acid Res* 30: 775-781.
- Kumar D & Klessig DF (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 16101-16106.

- Lam CHB, Xing T, Higgins VJ, Blumwald E (1998) Effect of race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on the tomato plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Physiol Mol Plant Pathol* 52: 309-321.
- Lamb C & Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251-275.
- Lamprecht SC, Marasas WFO, Alberts JF, Cawood ME, Gelderblom WCA, Shephard GS, Thiel PG, Calitz FJ (1994) Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology* 84: 383-391.
- Lavie Y, Piterman O, Liscovitch M (1990) Inhibition of phosphatidic acid phosphohydrolase activity by sphingosine: Dual action of sphingosine in diacylglycerol signal termination. *FEBS Lett* 277: 7-10.
- Lebel E, Heifetz P, Thome L, Uknes S, Ryals J, Ward E (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J* 16: 223-233.
- Lee HI & Raskin I (1999) Purification, cloning and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J Biol Chem* 274: 36637-36642.
- Lee HI, Leon J, Raskin I (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4076-4079.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99: 301-312.
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T (1998) Sphingosine-1-Phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279: 1552-1555.
- Lee SW, Rabb J, Nazar RN (1992) Truncated phenylalanine ammonia-lyase expression in tomato. *J Biol Chem* 267: 11824-11830.
- Lester RL, Wells GB, Oxford G, Dickson RC (1993) Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *J Biol Chem* 268: 845-856.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon RA, Lamb C (1994) H2O2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell* 79: 583-593.
- Li J, Brader G, Paiva ET (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319-331.
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179.
- Liang H, Yao N, Tae-Song J, Luo S, Lu H, Greenberg JT (2003) Ceramide modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* 17: 2636-2641.
- Liang X, Dron M, Cramer CL, Dixon RA, Lamb CJ (1989) Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J Biol Chem* 264: 14486.
- Ligterink W, Kroj T, zur Nieden U, Hirt H, Sheel D (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276: 2054-2057.

- Logemman E, Wu SC, Schroder J, Schmelzer E, Somssich IE, Hahlbrock K (1995) Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell-cycle genes. *Plant J* 8: 865-876.
- Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 92: 322-328.
- Lois R (1994) Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 194: 498-503.
- Lois R, Dietrich A, Hahlbrock K, Schulz W (1989) A phenylalanine ammonia lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *EMBO J* 8: 1641-1648.
- Lynch DV & Steponkus PL (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol* 83: 761-767.
- Lynch DV (1993) Sphingolipids. In: Moore TS, ed. *Lipid metabolism in plants*. Boca Raton. CRC Press, 279-302.
- Lynch DV (2000) Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. *Methods Enzymol* 311: 130-149.
- Lynch DV, Phinney AJ (1995) In: JC Kader, P Mazliak (Eds), *Plant Lipid Metabolism*, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, 1995, pp. 239-241.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Marasas WFO (1995) Fumonisin: their implications for human and animal health. *Nat Toxins* 3: 193-198.
- Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, van der Lugt JJ (1988) Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* 55: 197-203.
- Martin C & Paz-Ares J (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Gen* 13: 67-73
- Martínez C, Pons E, Prats G, León J (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J* 37: 209-217.
- Mauch-Mani B & Slusarenko AJ (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-212.
- Megidish T, Hamaguchi A, Iwabuchi K, Hakomori SI (2000) Assays of sphingosine-dependent kinase for 14-3-3 protein. *Methods Enzymol* 312: 381-387.
- Megidish T, Takio K, Titani K, Iwabuchi K, Hamaguchi A, Igarashi Y, Hakomori S (1999) Endogenous substrates of sphingosine-dependent kinases (SKDs) are chaperone proteins: heat shock proteins, glucose-regulated proteins, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Biochemistry* 38: 3369-3378.
- Merrill AHJ, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss KA, Wang E (1997) Sphingolipids: The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 208-225.
- Merrill AHJ, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect* 109 (Suppl 2) 283-289.

- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Rascdore K, Schmid E, Blum W, Inverardi B (1990) Increase of salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.
- Millar AH & Day DA (1997) Alternative solutions to radical problems. *Trends Plant Sci* 2: 289-290.
- Minami E, Ozeki Y, Matsuoka M, Koizuka N, Tanaka Y (1989) Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants. *Eur J Biochem* 185: 19-25.
- Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T (1995) Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 396-403.
- Moreno PRH, Van der Heijden R, Verpoorte R (1994) Elicitor-mediated induction of isochorismate synthase and accumulation of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Catharanthus roseus* cell suspension and shoot cultures. *Plant Cell Rep* 14: 188-191.
- Morris K, Mackerness SAH, Page T, John F, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J* 23: 677-685.
- Morris SW, Vernooij B, Titatam S, Starrett M, Thomas S, Wiltse CC, Frederiksen RA, Bhandhufalck A, Hulbert S, Uknes S (1998) Induced resistance responses in maize. *Mol Plant Microbe Int* 11: 643-658.
- Mou Z, Fan W, Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-944.
- Moyano E, Martínez-García JF, Martín C (1996) Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *Plant Cell* 8: 1519-1532.
- Muller R, Dahm C, Shulte G, Leistner E (1996) An isochorismate hydroxymutase isogene from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 378: 131-134.
- Municio MM, Lozano J, Sanchez P, Moscat J, Díaz-Meco MT (1995) Identification of Heterogeneous Ribonucleoprotein A1 as a Novel Substrate for Protein Kinase C $\xi$ . *J Biol Chem* 270: 15884-15891.
- Nakamura S, Kozutsumi Y, Sun YD, Miyake Y, Fujita T, Kawasaki T (1996) Dual roles of sphingolipids in signalling of the escape from an onset of apoptosis in a mouse cytotoxic T-cell line, CTLL-2. *J Biol Chem* 271: 1255-1257.
- Napoli KL (2000) The FTY720 story. *Ther Drug Monit* 22: 47-51.
- Nawrath C & Métraux JP (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11: 1393-1404.
- Nawrath C, Heck S, Parinshawong N, Métraux JP (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14: 275-286.
- Nelson PE, Desjardins AE, Plattner RD (1993) Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu Rev Phytopathol* 31: 233-252.
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L (2000) The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell* 12: 1863-1878.

- Ng CKY, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410: 596-599.
- Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal; isolation and characterization of three 14-Kda proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* 108: 17-27.
- Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* 39: 500-507.
- Nishiuchi T, Hamada T, Kodama H, Iba K (1997) Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *Plant Cell* 9: 1701-1712.
- Norberg P, Mansson JE, Liljenberg C (1991) Characterization of glucosylceramide from plasma membranes of plant root cells. *Biochim Biophys Acta* 1066: 257-260.
- Norman-Setterblad C, Vidal S, Paiva ET (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Int* 13: 430-438.
- Nugroho LH, Ververne MC, Verpoorte R (2001) Salicylic acid produced by isochorismate synthase and isochorismate pyruvate lyase in various parts of constitutive salicylic acid producing tobacco plants. *Plant Sci* 161: 911-915.
- Ogretmen B, Pettus BJ, Rossi MJ, Wood R, Usta J, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA (2002) Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *J Biol Chem* 277: 12960-12969.
- Ohl S, Hedrick SA, Chory J, Lamb CJ (1990) Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2: 837
- Ohnishi M & Fujino Y (1982) *Lipids* 17: 803-810.
- Olivera A & Spiegel S (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365: 557-560.
- Overmeyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langerbartels C, Sandermann H Jr, Kangasjarvi J (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849-1862.
- Paris F, Grassmé H, Cremesti A, Zager j, Fong YA, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Gulbin E, Kolesnick R (2001) Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase *-/-* hepatocytes. *J Biol Chem* 276: 8297-8305.
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M (1994) Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol* 106: 877-886.
- Peng M & Kuc J (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699.

- Penninckx I, Eggermont K, Terras F, Thomma B, Samblanx G, Buchala A, Metraux JP, Manners J, Broekaert W (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1585: 114-125.
- Pozzi CR, Correa B, Xavier JG, Direito GM, Orsi RB, Matarazzo SV (2000) Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. *Mycopathologia* 151: 21-27.
- Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD, Hohn TM (1999) A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Gen Biol* 27: 100-112.
- Rao MV & Davis KR (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J* 17: 603-614.
- Rao MV, Lee HI, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633-1646.
- Raskin I, Ehmann A, Melander WR, Meeuse BJD (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* 237: 1601-1602.
- Raskin I, Turner IM, Melander WR (1989) Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2214-2218.
- Rate DN & Greenberg JT (2001) The *Arabidopsis* aberrant growth and death 2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J* 27: 203-211.
- Rate DN, Cuenca JV, Bowman GR, Guttman DS, Greenberg JT (1999) The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signalling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11: 1695-1708.
- Reinold S & Hahlbrock K (1996) Biphasic temporal and spatial induction patterns of defense-related mRNAs and proteins in fungus-infected parsley leaves. *Plant Physiol* 112: 131-
- Reuber TL, Plotnikova JM, Dewdney J, Rogers EE, Wood W, Ausubel FM (1998) Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J* 16: 473-485.
- Rheeder JP, Marasas WF, Vismer HF (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 68: 2102-2105.
- Rhoads DM & McIntosh L (1994) Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell* 4: 1131-1139.
- Ricciarelli R & Azzi A (1998) Regulation of Recombinant PKC $\alpha$  Activity by Protein Phosphatase 1 and Protein Phosphatase 2A. *Arch Biochem Biophys* 355: 197-200.
- Rivas San Vicente LM (2001) Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisina B1. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 99 pp.
- Roudier F, Schindelmann G, DeSalle R, Benfey PN (2002) The COBRA Family of Putative GPI-Anchored Proteins in *Arabidopsis*. A New Fellowship in Expansion. *Plant Physiol* 130: 538-548.

- Rowland BM, Taber HW (1996) Duplicate isochorismate synthase genes of *Bacillus subtilis*: regulation and involvement in the biosynthesis of menaquinone and 2,3-dihydroxybenzoate. *J Bacteriol* 178: 854-861.
- Rusterucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylides C (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J Biol Chem* 274: 36446-36445.
- Sagi M & Fluhr R (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91<sup>nox</sup> NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 126: 1281-1290.
- Salt SD, Tuzun S, Kuc J (1986) Effects of  $\beta$ -ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold: mimicry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina* Adam. *Physiol Mol Plant Biol* 28: 287-297.
- SanJuan Badillo A (2001) Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 110 pp.
- Sanz A, Moreno JI, Castresana C (1998) PLOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell* 10: 1523-1537.
- Sarma AD, Sreelakshmi Y, Sharma R (1998) Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry* 49: 2233-2243.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10832-10837.
- Sawyer MJ & Kumar V (2003) A rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of aspirin, salicylic acid, and caffeine in effervescent tablets. *J Chromat Sci* 41: 393-397.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11655-11660.
- Schorling S, Vallee B, Barz WP, Riezman H, Oesterhelt D (2001) Lag1p and Lac1p Are Essential for the Acyl-CoA-dependent Ceramide Synthase Reaction in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Biol Cell* 12: 3417-3427.
- Sembdner G, Atzorn R, Schneider G (1994) Plant hormone conjugation. *Plant Mol Biol* 26: 1459-1481.
- Serino L, Reimann C, Baur H, Beyeler M, Visca P, Haas D (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 249: 217-228.
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* 6: 365-371.
- Sharp JK, Valent B, Albersheim P (1984) The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J Biol Chem* 259: 11321-11336.
- Sheel D (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1: 305-310.
- Shinghal R, Scheller RH, Bajjalieh SM (1993) *J Neurochem* 61: 2279-2285.



- Shufflebottom D, Edwards K, Schuch W, Bevan M (1993) Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably cell specificities and induction patterns. *Plant J* 3: 835.
- Skrzypek MS, Nagiec MM, Lester RL, Dickson RC (1999) Analysis of phosphorylated sphingolipid long-chain bases reveals potential roles in heat stress and growth control in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* 181: 1134-1140.
- Slaymaker D, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11640-11645.
- Somssich IE & Hahlbrock K (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* 3: 86-90.
- Spassieva SD, Markham JE, Hille J (2002) The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J* 32: 561-572.
- Sperling P & Heinz E (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta* 1632: 1-15.
- Staswick PE, Yuen GY, Lehman CC (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* 15: 747-754.
- Steadman JR & Sequeira L (1970) Abscisic acid in tobacco plants: tentative identification and its relation to stunting induced by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Physiol* 45: 691-697.
- Stevens VL & Tang J (1997) Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glucosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J Biol Chem* 272: 18020-18025.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Plant Pathol* 35: 235-270.
- Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 12: 1811-1822.
- Strompen G, Grüner R, Pfitzner UM (1998) An *as-1* like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1A from tobacco. *Plant Mol Biol* 37: 871-833.
- Sugimoto K, Takeda S, Horochika H (2000) MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes. *Plant Cell* 12: 2511-2528.
- Svetek J, Yadav MP, Nothnagel EA (1999) Presence of a Glycosylphosphatidylinositol Lipid Anchor on Rose Arabinogalactan Proteins. *J Biol Chem* 274: 14724-14733.
- Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Stockenstrom S (1991) Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J Agric Food Chem* 39: 2014-2018.
- Talarczyk A & Hennig J (2001) Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. *Cell Mol Biol Lett* 6: 955-970.
- Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW (2000) Role of pRb dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* 5: 121-137.

- Tamura K, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I, Imai H (2001) Characterization of an Arabidopsis cDNA Encoding a Subunit of Serine Palmitoyltransferase, the Initial Enzyme in Sphingolipid Biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 42: 1274-1281.
- Tanaka T, Abbas HK, Duke SO (1993) Structure-dependent phytotoxicity of fumonisins and related compounds in a duckweed bioassay. *Phytochemistry* 33: 779-785.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4158-63.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Broekaert WF, Cammue BPA (2000) Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiol Biochem* 38: 421-427.
- Thornberry NA & Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91<sup>phox</sup>) *Plant J* 14: 365-370.
- Trewavas AJ & Malhó R (1998) Ca<sup>2+</sup> signalling in plant cells: the big network! *Curr Opin Plant Biol* 1: 428-433.
- Uemura M & Steponkus PL (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol* 104: 479-496.
- Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiol* 109: 15-30.
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X, Holuigue L (2004) NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Mol Plant Mol Biol* 17: 34-42.
- Vailleau F, Daniel X, Tronchet M, Montillet JL, Triantaphylidès C, Roby D (2002) A R2R2-MYB gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 10179-10184.
- Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* 3: 330-334.
- Van Eldik GJ, Reijnen WH, Ruiters RI, van Herpen MMA, Schrauven JAM, Wullems GJ (1997) Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant J* 11:105-113.
- Van Loon LC & Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55: 85-97.
- Van Tegelen LJP, Moreno PRH, Croes AF, Verpoorte R, Wullems GJ (1999) Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 119: 705-712.
- Venema DP, Hollman PCH, Janssen K, Katan MB (1996) Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods, using HPLC with fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 44: 1762-1767.
- Vera-Estrella R (1994) Plant defense response to fungal pathogens. I. Activation of host plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol* 104: 209-215.
- Vijayan P, Shockey J, Levesque CA, Cook RJ, Browse J (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7209-7214.

- Vom Endt D, Kijne JW, Memelink J (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* 61: 107-114.
- Walter MH, Grima-Pettenati J, Grand C, Boudet AM, Lamb CJ (1988) Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5546-5550.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AHJ (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem* 266: 14486-14490.
- Warnecke D & Heinz E (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol Life Sci* 60: 919-941.
- Whenham RJ, Fraser RSS, Brown LP, Payne JA (1986) Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and darkgreen areas, and relationship to symptom development. *Planta* 168: 592-598.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.
- Wu GS, Short BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-1368.
- Xiang C, Miao ZH, Lam E (1996) Coordinated activation of *as-1* type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol Biol* 32: 415-426.
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* 9: 249-259.
- Xu P, Vogt T, Taylor LP (1997) Uptake and metabolism of flavonols during *in-vitro* germination of *Petunia hybrida* L pollen. *Planta* 202: 257-265.
- Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol* 103: 315-321.
- Yamada K & Sakane F (1993) *Biochim Biophys Acta* 1169: 211-216.
- Yamada T, Tanaka Y, Sriprasertsak P, Kato H, Hashimoto T, Kawamata S, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T, Oku H (1992) Phenylalanine ammonia-lyase genes from *Pisum sativum*: structure, organ-specific expression and regulation by fungal elicitor and suppressor. *Plant Cell Physiol* 33: 715-725.
- Yang S, Sweetman JP, Amirsadeghi S, Barghchi M, Huttly AK, Chung WI, Twell D (2001) Novel anther-specific *myb* genes from tobacco as putative regulators of phenylalanine ammonia-lyase expression. *Plant Physiol* 126: 1738-1753.
- Yistra B, Muskens M, van Tunen AJ (1996) Flavonols are not essential for fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 32: 1155-1158.
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S (1991) Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 114: 155-167.

- Zhang Q, Peyruchaud O, Frenck KJ, Magnusson MK, Mosher DF (1999) Sphingosine-1-phosphate stimulates fibronectin matrix assembly through a Rho-dependent signal pathway. *Blood* 93: 2984-2990.
- Zhang S & Klessig DF (1997) Salicylic acid activates a 48 kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809-824.
- Zhang S & Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* 6: 520-527.
- Zhang S, Du H, Klessig DF (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 1998: 10: 435-449.
- Zhang YH, Yao B, Delikat S, Bayoumy S, Lin XH, Basu S, McGinley M, Chan-Hui PY, Lichenstein H, Kolesnik R (1997) Kinase Suppressor of Ras Is Ceramide-Activated Protein Kinase. *Cell* 89: 63-72.
- Zhou J, Tang X, Martin GB (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J* 16: 3207-3218.
- Zimmermann S (1997) Receptor-mediated activation of Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2751-2755.
- Zweerink MM, Edison AM, Wells GB, Pinto W, Lester RL (1992) Characterization of a novel, potent, and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* 267: 25032-25038.

XI. Apéndice

Secuencias consultadas para el diseño de oligonucleótidos utilizados en el ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo. Las secuencias donde se alinean los oligonucleótidos se indican en negritas.

**ZmPAL (L77912)**

1141	CGCCGCA	TG	GCTGGG	CCCC	CAGATCG	GAGG	TCATCCG	CGC	CCACCA	AG	TCCATCG	AGC
1201	<b>GCGAGG</b>	<b>TC</b>	<b>CA</b>	<b>CTCCG</b>	<b>TG</b>	<b>AA</b>	<b>CA</b>	<b>ACCCG</b>	<b>CG</b>	<b>CC</b>	<b>ACCCG</b>	<b>CG</b>
1261	ACGGCGG	CA	CTTCCAG	GGC	ACCCCAT	CG	CGCTGT	CCAT	GGACA	CGCC	CGCTCG	CA
1321	TCGCCA	ACAT	CGGCA	AGCTC	ATGTT	CGCG	AGTTCT	CCGA	GCTCG	TCA	AC	GAGTTCT
1381	ACAACGG	GCT	CACCT	TCA	AC	CTGGC	CGCA	ACCC	CAGC	CTGG	AC	TACGG
1441	AGGCAC	CGA	GATCG	CCAT	G	GCCTC	CTACT	GCTCC	GAGCT	CCAGT	ACCT	G
1501	TCACCA	ACCA	CGTGC	AGAG	C	GCGG	ACGAG	C	ACA	ACC	AGGA	CGTGA
1561	TCTCGG	CCAG	GAAG	ACCG	CGC	GAGG	CGAT	CG	ACAT	CTG	AA	<b>GCTCAT</b>
												<b>GTCC</b>

**ZmUBQ (U29158)**

421	TGGCCG	ACTA	CAACAT	TTCAG	AAGG	AGAG	CA	CCCT	CACT	TT	GGT	GTG
481	GCATGC	AGAT	CTTCG	TGAAG	ACTCT	GACTG	CT	GCA	AGAC	TAT	CACC	CTT
541	CTGATAC	CAAT	TGACA	ATGTC	AAGGC	CAAGA	TCC	CAGG	ACAA	GGAG	GGG	CAT
601	AGCAGC	GGCT	CATTTT	TG	GGCA	AGCAG	TCG	AGG	ACGG	CGC	ACG	CTT
661	ACATTC	AGAA	GGAG	AGCACC	CTCC	ACTTGG	TGCT	GCG	TCT	CAG	GGG	TG
721	TCGTGA	AGAC	ACTT	ACTGG	<b>AAG</b>	<b>ACG</b>	<b>ATCA</b>	<b>CCCT</b>	<b>TG</b>	<b>AG</b>	<b>GT</b>	<b>CC</b>
												<b>CTG</b>

**ZmPRI (U82200)**

1	GA	ACTAG	TAA	TTAT	CAG	CAA	ACA	CAA	ACA	ATGG	CCGA	GGCT	AGC
61	CT	GGCC	ATGG	CAG	CCAT	CGT	CGT	GGC	GGC	TGC	ACG	<b>AGAA</b>	<b>CTCG</b>
121	GT	GAC	CCGC	ACA	ACG	CGC	GCG	CGC	CGAC	GTGG	GCG	GGT	GC
181	AC	CGT	GGCC	CGT	ACG	CGCA	GAG	CTAC	CGC	GCG	CAG	CGC	CT
241	CAC	TCCG	CGC	GGCC	TAC	GG	CGA	AACT	CT	TTCT	GGG	CTC	CG
301	GCG	TCCG	ACG	CCG	TGGG	CTC	CTGG	G	TCC	GAGA	AGC	ACT	AC
361	<b>AG</b>	<b>CT</b>	<b>GC</b>	<b>GC</b>	<b>GG</b>	<b>CG</b>	<b>AG</b>	<b>GT</b>	<b>GC</b>	<b>GC</b>	<b>CA</b>	<b>TG</b>	<b>GT</b>
421	GC	CA	TCG	CGCT	GTGG	CCGCT	CGT	CTG	CGAC	AACA	ACG	<b>CGCT</b>	<b>TT</b>
481	TACA	ACCC	CGC	CGG	CAAC	CGT	TCG	CGC	GAG	AGCC	CTACT	AGACT	GT
541	ATT	TAT	TATA	TATA	CGCT	TATA	TA	TA	AACT	CAG	CAT	GCAT	ATT
601	TCA	ACT	CTGT	ATAT	CATT	TAT	ATT	ACG	ATGA	TTAT	ATT	GAT	GA
661	AAA	ACC	ATGC	AGG	CGATT	TG	AGC	CAAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA

**OsICS (CA763410)**

NATA	CTCT	ATCC	GAG	AGCC	GGTT	TGG	TG	ACT	GNAG	<b>AG</b>	<b>CA</b>	<b>CG</b>	<b>CA</b>
<b>CATA</b>	<b>CA</b>	<b>AG</b>	<b>AT</b>	<b>TG</b>	<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>TG</b>	<b>AA</b>	<b>TG</b>	<b>GG</b>	<b>AC</b>	<b>CT</b>	<b>GT</b>
AGG	AG	CT	GAA	AGT	GAG	TTG	CT	GT	TGG	GAT	TAG	AT	CAG
CAC	TT	TAG	TT	TGT	CT	GGT	CG	GA	AT	TGT	TGA	AG	TG
TG	AG	CT	TG	AC	AA	GCAT	<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	<b>GC</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>
TTG	CT	TG	CAA	GAGG	CT	GAA	AT	AT	GG	AA	AGT	GAT	TT
TTTT	GT	TG	TG	AAGA	AG	ATTG	CT	TT	TT	TT	CT	G	CA
TCA	AG	TG	CT	GCAT	AC	CAAT	TAT	GT	TT	CCG	AT	CA	AT
GCT	GA	AG	CA	AAAT	CCA	AGA	AGG	TG	AC	GAA	GAG	AA	AG
ATG	T	ACA	ATA	A	ATT	GTA	ATT	CA	GT	TAG	TG	CA	GT
TAG	TT	TG	T	A	AT	CT	TT	CT	TT	AT	CA	TT	TG
AA	AC	CA	CA	TT	CA	AG	AT	CA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA

Alineamiento del cDNA parcial de la PAL de maíz Chalqueño (ZmPAL) con secuencias homólogas. Origen de las secuencias: *Zea mays* (L77912), *O. sativa* (AY224546), *T. aestivum* (AY005474), *H. vulgare* (Z49146).

	1171					1230
ZmPAL				TGAGGTCAA	CTCCGTGAAC	GACAACCCCG
<i>Zea mays</i>	TCATCCGCGC	GCACCACCAAG	TCCATCGAGC	GCGAGGTCAA	CTCCGTGAAC	GACAACCCCG
<i>O. sativa</i>	TCATCCGCGC	GCACCACCAAG	TCGATCGAGC	GCGAGGTCAA	CTCCGTGAAC	GACAACCCCG
<i>T. aestivum</i>	TTATTTCGATT	TGCCACCAAG	TCGATTGAGC	GTGAGATCAA	CTCTGTCAAC	GACAACCCCG
<i>H. vulgare</i>	TCATCCGGTC	TGCCACCAAG	TCCATCGAGC	GCGAGGTCAA	CTCCGTCAAC	GACAACCCAG
				*** **	*** **	*** **
	1231					1290
ZmPAL	TCATCGACGT	GTCCCGTGGC	AAGGCGCTCC	ACGGCGGCAA	CTTCGACGCG	ACGCCCATCG
<i>Zea mays</i>	TCATCGACGT	CCACCGCGC	AAGGCGCTGC	ACGGCGGCAA	CTTCGAGGGC	ACGCCCATCG
<i>O. sativa</i>	TCATCGACGT	CCACCGCGC	AAGGCCCTGC	ACGGCGGCAA	CTTCGAGGGC	ACGCCCATCG
<i>T. aestivum</i>	TCATCGACGT	CTCCCGTGGC	AAGGCCATCC	ACGGTGGCAA	CTTCCAAGGC	ACGCCCATTG
<i>H. vulgare</i>	TCATTGACGT	CCACCGTGGC	AAGGCACTCC	ATGGCGGCAA	CTTCCAGGGC	ACACCCATCG
	**** **	*** **	***** *	* ** **	***** **	** ***** *
	1291					1350
ZmPAL	GCGTGTCCAT	GGACAACACC	AGGTCGCGC	TCGCGCGCAT	CGGCAAGCTC	ATGTTGCGGC
<i>Zea mays</i>	GCGTGTCCAT	GGACAAGGCC	CGCCTCGCCA	TCGCCAACAT	CGGCAAGCTC	ATGTTGCGGC
<i>O. sativa</i>	GCGTGTCCAT	GGACAACACC	CGCCTCGCCA	TCGCCAACAT	CGGCAAGCTC	ATGTTGCGCC
<i>T. aestivum</i>	GTGTCTCCAT	GGACAACACC	CGCCTCGCCA	TTGTCTGCTAT	TGGCAAGCTC	ATGTTGCGGC
<i>H. vulgare</i>	GTGTGTCCAT	GGACAACACC	CGTCTCGCCA	TCGCCAACAT	TGGCAAGCTC	ATGTTGCGGC
	* ** *****	***** **	* *****	* ** **	***** **	***** **
	1351					1410
ZmPAL	AGTTCTCGGA	GCTCGTGAAC	GACTTCTACA	ACAATGGCCT	GCCGTCCAAC	CTGTCCGGAG
<i>Zea mays</i>	AGTTCTCCGA	GCTCGTCAAC	GAGTTCTACA	ACAACGGGCT	CACCTCCAAC	CTGGCCGGCA
<i>O. sativa</i>	AGTTCTCCGA	GCTCGTCAAC	GAGTTCTACA	ACAACGGGCT	CACGTCAAAC	CTGGCCGGCA
<i>T. aestivum</i>	AGTTCTCGGA	GCTCGTGAAC	GACTTCTACA	ACAATGGCCT	GCCTTCCAAC	CTGTCCGGTG
<i>H. vulgare</i>	AGTTCTCCGA	GCTCGTCAAC	GAGTTCTACA	ACAACGGGCT	GACCTCCAAC	CTGGCCGGCA
	***** **	*** **	***** **	***** **	* ** **	***** **
	1411					1470
ZmPAL	GCGCAACCC	GAGCCTGGAC	TACGGCTTCA	AGGGCGCCGA	GATTGCCATG	GCCTCCTACT
<i>Zea mays</i>	GCGCAACCC	CAGCCTGGAC	TACGGCTTCA	AGGGCACCGA	GATCGCCATG	GCCTCCTACT
<i>O. sativa</i>	GCGCAACCC	GAGCCTGGAC	TACGGCTTCA	AGGGCACCGA	GATCGCCATG	GCCTCCTACT
<i>T. aestivum</i>	GCGCAACCC	GAGCCTGGAC	TATGGTTTCA	AGGGCGCCGA	GATCGCCATG	GCCTCCTACT
<i>H. vulgare</i>	GCGCAACCC	CAGCCTGGAC	TACGGCTTCA	AGGGCACCGA	GATCGCCATG	GCCTCCTACT
	* *****	*** **	** ** **	***** **	*** **	** ** **
	1471					1530
ZmPAL	GCTCCGAGCT	CCAGTTCTGT	GCCAACCCCG	TGACCAACCA	CGTCCAGAGC	GCGGAGCAGC
<i>Zea mays</i>	GCTCCGAGCT	CCAGTACCTG	GGCAACCCCA	TCACCAACCA	CGTGCAGAGC	GCGGAGCAGC
<i>O. sativa</i>	GCTCCGAGCT	CCAGTTCTCT	GCCAACCCCG	TCACCAACCA	CGTCCAGAGC	GCGGAGCAGC
<i>T. aestivum</i>	GCTCTGAGCT	GCAGTTCTTG	GGCAACCCCG	TGACTAACCA	TGTCCAGAGC	GCGGAGCAGC
<i>H. vulgare</i>	GCTCTGAGCT	CCAGTACCTT	GCCAACCCCG	TGACCAACCA	TGTCCAGAGT	GCGGAGCAGC
	***** **	***** *	* *****	* ** **	*** **	***** **
	1531					1590
ZmPAL	ACAACCCAGGA	CGTGAACTCC	CTCGGCCTCA	TCTCGTCCAG	GAAGACGGCC	GAGGCCGTGC
<i>Zea mays</i>	ACAACCCAGGA	CGTGAACTCC	CTGGGCCTCG	TCTCGGCCAG	GAAGACGGCC	GAGGCCGTGC
<i>O. sativa</i>	ACAACCCAGGA	CGTGAACTCC	CTCGGCCTCG	TCTCGGCCAG	GAAGACGGCC	GAGGCCGTGC
<i>T. aestivum</i>	ACAACCCAGGA	TGTGAACTCA	CTTGGTCTGA	TCTCATCCAG	GAAGACGGCC	GAGGCTATTG
<i>H. vulgare</i>	ACAACCCAGGA	CGTGAACTCT	CTCGGCCTCG	TCTCGGCCAG	GAAGACGGCC	GAGGCTGTGC
	***** **	** ** **	** ** **	***** **	***** *	***** **
	1591					1650
ZmPAL	ACGTGCTGAA	GCTCATGTGC	TCCACCTACA	A		
<i>Zea mays</i>	ACATCCTGAA	GCTCATGTGC	TCCACCTACA	TCGTGGCGCT	GTGCCAGGCC	GTGCACCTGC
<i>O. sativa</i>	ACATCCTCAA	GCTCATGTCC	TCCACCTACC	TGGTTGCGCT	GTGCCAGGCC	GTGCACCTGC
<i>T. aestivum</i>	ACATCTTGAA	GATCATGTCT	TCCACGTTC	TGGTGGCTCT	GTGCCAGGCC	AITGACCTTC
<i>H. vulgare</i>	ACATCCTGAA	GCTCATGTCC	TCCACATACA	TGGTGGCGCT	GTGCCAGGCC	ATGCACCTCC
	** * **	* *****	***** *			



Alineamiento del cDNA parcial de la UBQ de maíz Chalqueño (ZmUBQ) con secuencias homólogas. Origen de las secuencias: *Z. mays* (U29158), *O. sativa* (X76064), *H. vulgare* (X04133) y *M. grisea* (AF056625).

	241						300
ZmUBQ	CACTT	GGTGTGCGT	CTCAGGGGCG	GCATGCAGAT	CTTCGTGAAG	ACTCTGACCG	
<i>Zea mays</i>	CCCTCCACTT	GGTGTGCGT	CTCAGGGGCG	GCATGCAGAT	CTTCGTGAAG	ACTCTGACTG	
<i>O. sativa</i>	CCCTCCACCT	TGTGCTCAGG	CTCAGGGGAG	GCATGCAGAT	CTTCGTCAAG	ACCTTACTGCTG	
<i>M. grisea</i>	CTCTCCACCT	CGTGTCTCCG	CTCCGTGGTG	GCATGCAGAT	TTCGTCAAA	ACCCTCACTG	
<i>H. vulgare</i>	CCCTTCACCT	GGTGTCTCCG	CTTCGTGGTG	GCATGCAGAT	CTTCGTGAAG	ACCCTGACCG	
	*** *	*** * *	** * ** *	*****	*****	** * ** *	
	301						360
ZmUBQ	GCAAGACTAT	CACCCTTGAG	GTCGAGTCTT	CTGATACCAT	TGATAATGTC	AAGGCCAAGA	
<i>Zea mays</i>	GCAAGACTAT	CACCCTTGAG	GTCGAGTCTT	CTGATACCAT	TGACAATGTC	AAGGCCAAGA	
<i>O. sativa</i>	GCAAGACCAT	CACCCTTGAG	GTCGAGTCTT	CTGATACCAT	TGACAATGTC	AAGGCCAAGA	
<i>M. grisea</i>	GCAAGACGAT	TACCTTGAG	GTCGAGTCTT	CCGATACCAT	CGACAATGTA	AAGTCGAAGA	
<i>H. vulgare</i>	GCAAGACCAT	CACACTGGAG	GTCGAGTCTT	CTGATACCAT	CGACAACGTC	AAGGCCAAGA	
	***** *	** * ** *	** * ** *	** * ** *	** * ** *	** * ** *	
	361						420
ZmUBQ	TCCAGGACAA	GGAGGGCATC	CCTCCGGACC	AGCAGCGGCT	CATTTTTGCC	GGCAAGCAGC	
<i>Zea mays</i>	TCCAGGACAA	GGAGGGCATC	CCTCCGGACC	AGCAGCGGCT	CATTTTTGCC	GGCAAGCAGC	
<i>O. sativa</i>	TCCAGGACAA	GGAGGGCATC	CCCCGGACC	AGCAGCGTCT	CATCTTCGCT	GGCAAGCAGC	
<i>M. grisea</i>	TCCAGGACAA	GGAGGGTATT	CCTCCGGACC	AACAACGCTT	TATTTTCGCT	GGAAAGCAGT	
<i>H. vulgare</i>	TCCAGGACAA	GGAGGGCATC	CCTCCGGACC	AGCAGCGGCT	CATCTTTGCT	GGCAAGCAGC	
	*****	***** *	** * ** *	** * ** *	** * ** *	** * ** *	
	421						480
ZmUBQ	TCGAGGACGG	GCGCACGCTG	GCTGACTACA	ACATTCCAGAA	GGAGAGCACT	CTCCACTTGG	
<i>Zea mays</i>	TCGAGGACGG	GCGCACGCTT	GCCGACTACA	ACATTCCAGAA	GGAGAGCAC	CTCCACTTGG	
<i>O. sativa</i>	TTGAGGATGG	CCGCACCTCG	GCTGACTACA	ACATCCAGAA	GGAGTCCACC	CTCCACTTGG	
<i>M. grisea</i>	TGGAGGACGG	TCGGACCCTT	TCCGACTACA	ATATCCAGAA	GGAAACGACC	CTCCACTTGG	
<i>H. vulgare</i>	TCGAGGATGG	CCGCACCTCG	GCTGACTATA	ACATCCAGAA	GGAGTCCACT	CTCCACTTGG	
	* * * * *	** * ** *	* * * * *	* * * * *	** * ** *	** * ** *	
	481						540
ZmUBQ	TGCTGCGTCT	CAGGGGTGGC	ATGCAGATCT	TCGTGAAGAC	ACTTACTGGC	AAGACGATCA	
<i>Zea mays</i>	TGCTGCGTCT	CAGGGGTGGC	ATGCAGATCT	TCGTGAAGAC	ACTTACTGGC	AAGACGATCA	
<i>O. sativa</i>	TGCTCAGGCT	CAGGGGAGGC	ATGCAGATCT	TCGTCAAGAC	CTTACTGGC	AAGACCATCA	
<i>M. grisea</i>	TCCTTCGTCT	CCGTGGTGGC	ATGCAGATTT	TCGTCAAGAC	TTTACGGGC	AAGACCATCA	
<i>H. vulgare</i>	TGCTCAGGCT	TCGTGGAGGC	ATGCAGATTT	TCGTGAAGAC	CCTCACGGC	AAGACCATCA	
	* * * * *	* * * * *	*****	*****	* * * * *	*****	
	541						
ZmUBQ	CCCTTGAGGT	G					
<i>Zea mays</i>	CCCTTGAGGT	GGAGTCCTCG					
<i>O. sativa</i>	CCCTTGAGGT	CGAGTCCTCT					
<i>M. grisea</i>	CGTTGGAGGT	CGAGTCCTCA					
<i>H. vulgare</i>	CACCTGGAGGT	GGAGTCCTCT					
	* * * * *						



Alineamiento del cDNA parcial de la ZmHSP de maíz Chalqueño con secuencias homólogas. Origen de las secuencias: *T. aestivum* (X98582), *O. sativa* (Z11920) y *H. vulgare* (AY325266).

	3451					3510
ZmHSP	.....	.....	.....	.....	AGCTGCAGAT	GATGAAGACG
<i>T. aestivum</i>	ACCCCATCTC	CCTGTGGACC	GAGAAGACCA	CTGAGAAGGA	AATTTCTGAC	GATGAAGATG
<i>H. vulgare</i>	ACCCCATCTC	CCTGTGGACT	GAGAAGACCA	CCGAGAAGGA	AATTTCTGAC	GATGAAGACG
<i>O. sativa</i>	ACCCTATCTC	TCTATGGACT	GAGAAGACCA	CTGAGAAGGA	AATTTCTGAT	GATGAAGATG
consensus	acc.c.atctc	.ct.tggac.	gagaagacca	c.gagaagga	AatTtCtGAt	GATGAAGAcG
	3511					3570
ZmHSP	ACGAGGATAA	GAAGGAT...	GAGGAGGGTA	AGGTTGAGGA	TGTTGATGAT	GAAAAGGAAG
<i>T. aestivum</i>	AGGAGGAGAA	GAAGGATACT	GAGGAGGGCA	AGGTTGAGGA	TGTTGATGAG	GAGAAGGAAG
<i>H. vulgare</i>	AGGAGGAGAA	GAAGGATACC	GAGGAGGGCA	AGGTTGAGGA	TGTTGATGAG	GAGAAGGAAG
<i>O. sativa</i>	AGGAAGAGAA	GAAGGATGCT	GAGGAGGGGA	AGGTTGAGGA	TGTTGATGAA	GAGAAGGAAG
consensus	AgGAgGAgAA	GAAGGAT.c.	GAGGAGGG.A	AGGTTGAGGA	TGTTGATGA.	GAgAAGGAAG
	3571					3630
ZmHSP	AGAAGGAAAA	GAAGAAGAAG	AAGATCAAGG	AGGTTTCTCA	TGAGTGGCAA	TTGGTCAACA
<i>T. aestivum</i>	AGAAGGAAAA	GAAGAAAAAG	AAGATCAAGG	AAGTCTCTCA	TGAGTGGAAC	TTGGTCAACA
<i>H. vulgare</i>	AGAAGGAAAA	GAAGAAAAAG	AAGATCAAGG	AAGTCTCTCA	TGAGTGGAAC	TTGGTCAACA
<i>O. sativa</i>	AAAAGGAGAA	GAAAAAGAAG	AAGATCAAGG	AGGTTTCTCA	TGAGTGGTCC	CTGGTCAACA
consensus	AgAAGGAaAA	GAAgAaGAAg	AAGATCAAGG	AgGTTtCTCA	TGAGTGG.ac	tGGTCAACA
	3631					3690
ZmHSP	AGCAGAAGCC	AATCTGGATG	AGGAAGCCTG	AGGAGATTAC	CAAAGAAGAG	TATGCTGCTT
<i>T. aestivum</i>	AGCAGAAGCC	TATCTGGATG	AGGAAGCCAG	AGGAGATCAA	CAAGGAAGAG	TATGCTGCTT
<i>H. vulgare</i>	AGCAGAAGCC	TATCTGGATG	AGGAAGCCAG	AGGAGATCAA	CAAGGAAGAG	TATGCTGCTT
<i>O. sativa</i>	AACAGAAGCC	TATCTGGATG	AGGAAGCCTG	AGGAGATCAA	TAAGGAGGAG	TATGCTGCTT
consensus	AgCAGAAGCC	Tatctggatg	AGGAAGCctG	AGGAGATcAc	cAAGgAaGAG	TATGCTGCTT
	3691					3750
ZmHSP	TCTACAAGAG	CTTGACCAAC	GACTGTGAGG	AGCATCTTGC	TGTGAAGCAC	TTCTCTGTTG
<i>T. aestivum</i>	TCTACAAGAG	CTTGACCAAT	GACTGGGAGG	AGCATTTGGC	TGTCAAGCAC	TTCTCTGTTG
<i>H. vulgare</i>	TCTACAAGAG	CTTGACCAAT	GACTGGGAGG	AGCATTTGGC	TGTCAAGCAC	TTCTCTGTTG
<i>O. sativa</i>	TCTACAAGTC	CCTGACAAAC	GACTGGGAGG	AGCATCTTGC	TGTCAAGCAC	TTCTCTGTTG
consensus	TCTACAAGAg	CtTGACcAaC	GACTGgGAGG	AGCATcTtGc	TGTcAAGCAC	TTCTCTGtG
	3751					3810
ZmHSP	AGGGCCAGCT	TGAGTTCAAG	GCCGTACTCT	TTGTGCCAAA	GCGGGCCCCC	TTGACCTCT
<i>T. aestivum</i>	AGGGCCAGCT	TGAGTTCAAG	GCTGTCTCTG	TTGTGCCAAA	GAGGGCCCCC	TTTACCTCT
<i>H. vulgare</i>	AGGGTCAGCT	TGAGTTCAAG	GCTGTCTCTG	TTGTTCCCAA	GAGGGCCCCC	TTGACCTCT
<i>O. sativa</i>	AGGGTCAGCT	GGAATTCAAA	GCTGTCTCT	TTGTTCCCAA	GAGGGCACC	TTGACCTCT
consensus	AGGGcCAGCT	tGAgTTCAAg	GctGt.CTcT	TTGTgCCcAA	GaGGGccCcc	TTeGACCTCT
	3811					3870
ZmHSP	TCGACACCAG	GAAGAAGCCG	AACAACATCA	AGCTGTATGT	GCGACCGTGC	TTCATCATCT
<i>T. aestivum</i>	TCGACAACAA	GAAGAAGGCC	AACAACATCA	AGCTGTATGT	GCGCCGTGTC	TTCATCATGG
<i>H. vulgare</i>	TCGACAACAA	GAAGAAGGCC	AACAACATCA	AGCTGTATGT	GCGCCGTGTC	TTCATCATGG
<i>O. sativa</i>	TTGATACGAG	GAAGAAGCTC	AACAACATCA	AGCTTACGT	CCGCCGAGTC	TTCATCATGG
consensus	TcGAcAccAg	GAAGAAGccC	AACAACATCA	AGCTgTAtGt	gCCcG.G.TC	TTcATCATgg
	3871					
ZmHSP	GCAGCT....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>T. aestivum</i>	ACAACCTGTGA	GGAGTTGATC	CCTGAGTACC			
<i>H. vulgare</i>	ACAACCTGTGA	TGAGTTGATC	CCTGAGTACC			
<i>O. sativa</i>	ACAACCTGTGA	GGAGCTGATC	CCTGAGTGGC			
consensus	aCAactgtga	.gag.tgatc	cttgagt..c			

Efecto de la esfinganina y ceramida 10  $\mu\text{M}$  en los niveles de SA de embriones de maíz durante la germinación, renovando el medio de imbibición cada 24 horas.

Tabla 14. Contenido de SA libre en embriones de maíz germinados en presencia de esfinganina y ceramida 10  $\mu\text{M}$ .

Horas de imbibición	ng SA / gramo		
	controles	esfinganina	Ceramida-C6
6	51.8 $\pm$ 7.9	218.9 $\pm$ 39.5	106.9 $\pm$ 23.2
12	32.2 $\pm$ 2.9	114.6 $\pm$ 22.3	61.6 $\pm$ 14.9
24	32.6 $\pm$ 4	122.3 $\pm$ 23.8	145.6 $\pm$ 30.3
36	28.6 $\pm$ 2.8	111.5 $\pm$ 21.9	131.1 $\pm$ 27.6
48	34.7 $\pm$ 0.7	106.9 $\pm$ 21.1	97.5 $\pm$ 21.4
60	26.2 $\pm$ 2	69.3 $\pm$ 15.1	96.5 $\pm$ 21.4

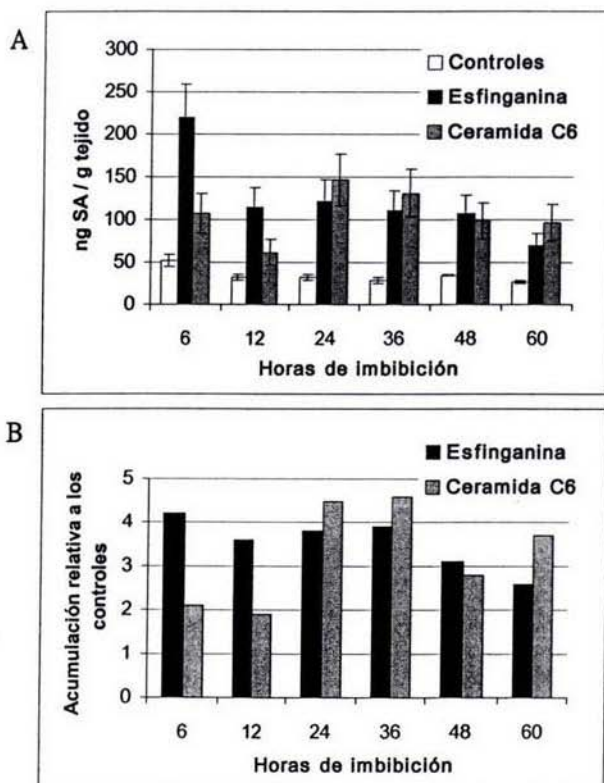


Figura 27. Efecto de la esfinganina y ceramida 10  $\mu\text{M}$  en la acumulación de SA en embriones de maíz durante la germinación. El medio de imbibición adicionado con el esfingolípido correspondiente se renovó cada 24 horas. (A) Incremento en los niveles de SA inducido por la esfinganina y la ceramida. (B) Acumulación relativa a los controles de germinación.