



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

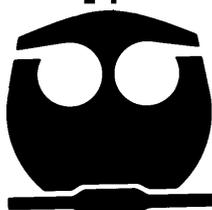
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PARTICIPACIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS  
MEMBRANALES EN RESPUESTAS DE DEFENSA  
EN PLANTAS

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A :  
**SILVIA PALACIOS BAHENA**

Tutor: Dra. Marina Gavilanes Ruíz



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Mario Rocha Sosa  
Vocal: Dra. Bertha González Pedrajo  
Secretario: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres  
Suplente: Dr. Eleazar Martínez Barajas  
Suplente: Dr. Jorge Ramírez Salcido

Sitio en donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio 101. Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química, UNAM

Asesor del Tema: \_\_\_\_\_

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante: \_\_\_\_\_

QFB. Silvia Palacios Bahena

## RECONOCIMIENTOS

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 101 DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ

Silvia Palacios Bahena, recibió becas de CONACYT (No. **195666**), de UC-MEXUS ( CN-03-118), Universidad de California y de DGAPA, UNAM (PAPIIT IN207806).

Este trabajo de tesis fue financiado por los proyectos DGAPA, UNAM (PAPIIT IN207806); CONACYT (40311-Q y 55610); UC-MEXUS, Universidad de California ( CN-03-118) y PAIP, Facultad de Química, UNAM (6290-02).

AL DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA POR SU ASESORÍA Y AYUDA TÉCNICA EN EL MANEJO DEL HPLC.

A LA Q.F.B. CONSUELO ENRÍQUEZ ARREDONDO POR LA AYUDA TÉCNICA REQUERIDA EN EL PROYECTO.

AL COMITÉ TUTORAL DE LOS ESTUDIOS DE MAESTRÍA:

DR. MARIO ROCHA SOSA (IBT)

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES (FQ)

DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ (FQ)

POR SUS OBSERVACIONES Y COMENTARIOS REALIZADOS EN EL DESARROLLO DEL TRABAJO.

AL JURADO ASIGNADO, POR LA REVISIÓN Y LAS SUGERENCIAS REALIZADAS DEL PRESENTE TRABAJO.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Máxima Casa de Estudios, la UNAM, por brindarme una sólida formación académica.

A mi chaparrito **Eric Gustavo** y a **Sofía**, mi mejor amiga del mundo. A ustedes que llenan mi vida con su amor.

A mi mamá, por tu cariño y por el apoyo que siempre me has brindado.

A mis hermanos por creer siempre en mí.

A todos mis compañeros del laboratorio 101 y a la Sra. Jose.

A Lety García, Auxiliar de la Coordinación del Posgrado, por ayudarnos con los trámites y papeleo.

A la Dra. Marina por su gran apoyo y por la formación que de ella recibí hasta este punto de mi vida académica.

**MUCHAS GRACIAS A TODOS**

Hija mía, juntas iniciamos este proyecto y juntas hemos llegado a la meta.

Gracias por haber llegado a mi vida

# ÍNDICE

	<b>RESUMEN</b>	1
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1	LA ENFERMEDAD EN LAS PLANTAS	3
1.1.1	Manifestaciones físicas de la enfermedad	3
1.1.2	Manifestaciones celulares de la enfermedad	5
1.1.3	Manifestaciones moleculares de la enfermedad	7
1.2	MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD	8
1.2.1	Resistencia constitutiva	9
1.2.2	Resistencia inducida	9
1.2.3	Resistencia sistémica adquirida	10
1.3	TEORÍA DEL GEN POR GEN	10
1.4	RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD (HR)	10
1.5	LA PLANTA DE FRIJOL ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	11
1.5.1	Tizón común bacteriano (o tizón común del frijol)	12
1.5.2	Síntomas de la enfermedad	12
1.5.3	Organismo causal	12
1.5.4	Biología	12
1.6	LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS PLANTAS Y SU INTERACCIÓN CON PATÓGENOS	13
1.6.1	Propiedades de las membranas	13
1.6.2	Función de las membranas biológicas	15
1.6.3	Estructura de la membrana plasmática	16
1.6.4	Composición lipídica de las membranas	17
1.6.5	Composición proteica de las membranas	19
1.6.6	Composición de carbohidratos en las membranas	20
1.7	BALSAS DE LÍPIDOS	20
1.7.1	Función de las balsas lipídicas	21
1.7.2	Balsas lipídicas en plantas	21
1.8	EVENTOS EN LOS QUE PARTICIPA LA MEMBRANA PLASMÁTICA ANTE EL ATAQUE DE PATÓGENOS	22
1.8.1	Recepción de estímulos (elicitors, toxinas)	22
1.8.2	Transducción de la señal (receptores, cinasas)	23

1.8.3	Reservorio de lípidos señalizadores	24
1.8.4	Inducción de la expresión de genes de defensa	25
1.9	COMPUESTOS ESFINGOIDEOS COMO MODULADORES EN PLANTAS	27
1.9.1	Esfingolípidos	27
1.9.2	Biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos	27
1.9.3	Bases esfingoideas	28
1.9.4	Funciones generales de los esfingolípidos	29
1.9.5	Esfingolípidos bioactivos en mamíferos y levaduras <i>S. cerevisiae</i>	29
1.9.6	Función de los esfingolípidos en plantas	31
1.9.7	Inhibidores de la biosíntesis de esfingolípido	32
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES INMEDIATOS</b>	34
2.1	Justificación	34
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	35
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	35
4.1	Objetivos particulares	35
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	36
5.1	Material biológico	36
5.2	Cultivo del frijol Canario 60	36
5.3	Infiltración de hojas de frijol	37
5.4	Cuantificación del crecimiento bacteriano	37
5.5	Índice de Enfermedad (IE)	38
5.6	Obtención de la fracción de vesículas de membrana plasmática	38
5.7	Determinación de la concentración de proteína para fracciones microsomal y de membrana plasmática	40
5.8	Extracción de lípidos de fracciones membranales de frijol con acetato de etilo	41
5.9	Hidrólisis alcalina de esfingolípidos e identificación de bases de cadena larga (LCB)	41
5.10	Detección de bases de cadena larga por cromatografía en capa fina (TLC)	41
5.11	Detección y cuantificación de bases de cadena larga por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)	42
5.11.1	Elaboración de curvas de calibración	43
5.11.2	Cuantificación de bases de cadena larga en extractos de las diferentes fracciones membranales de tejido de frijol	43
5.12	Procedimientos estadísticos utilizados	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	44

6.1	Infiltración de los disolventes H <sub>2</sub> O, silwet L-77 y MgCl <sub>2</sub> en hojas de frijol	44
6.2	Infiltración de hojas de frijol con bacterias patógenas	45
6.3	Infiltración de hojas de frijol con FB1	46
6.4	"Efecto protector" de la FB1, <i>Ech</i> y <i>Pst</i> en hojas infiltradas con <i>Xapf</i>	46
6.4.1	Registro fotográfico de la evolución de la infección bacteriana	47
6.4.2	Determinación del Índice de Enfermedad	47
6.4.3	Determinación del crecimiento bacteriano	50
6.5	Detección de bases esfingoideas por TLC	51
6.5.1	Perfil de bases de cadena larga de fracción microsomal de hojas de frijol expuestas a FB1 y a patógenos bacterianos	54
6.6	Determinación de bases de cadena larga por HPLC. Reacción de derivatización de una base de cadena larga con naftalen-2,3-dicarboxialdehído (NDA)	56
6.6.1	Separación de bases de cadena larga por HPLC utilizando diferentes condiciones cromatográficas	57
6.6.2	Identificación de bases de cadena larga de extractos lipídicos	60
6.6.3	Comparación de la extracción de lípidos membranales por los métodos de Castegnaro <i>et al.</i> (1998) y de Markham <i>et al.</i> (2006)	63
6.6.4	Derivatización de extractos lipídicos de hojas de frijol expuestas a diferentes tratamientos	63
6.6.5	Cuantificación de la base de cadena larga fitoesfingosina en fracción microsomal de hojas de frijol	66
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática de las funciones básicas en la planta.	5
Figura 2	Esquema de desarrollo de la planta de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	11
Figura 3	Modelo actual de la estructura de la membrana propuesto por S.J. Singer y G.L. Nicholson (1972).	16
Figura 4	Lípidos y esteroides encontrados en membrana plasmática de plantas.	18
Figura 5	Estructura de la glucosilceramida, un esfingolípido complejo.	27
Figura 6	Biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos en plantas.	28
Figura 7	Bases esfingoideas más comunes en plantas.	29
Figura 8	Estructura de la miriocina, un inhibidor muy potente de la SPT.	33
Figura 9	Estructura de la Fumonisina B1, un inhibidor de la esfinganina N-acil transferasa.	33
Figura 10	Estructura de la toxina AAL, un inhibidor de la esfinganina N-acil transferasa.	33
Figura 11	Infiltración de los disolventes en hojas de frijol.	44
Figura 12	Infiltración de hojas de frijol con patógenos bacterianos.	45
Figura 13	Infiltración de hojas de frijol con diferentes concentraciones de FB1.	46
Figura 14	Prueba de sensibilidad de las cepas <i>Ech</i> , <i>Pst</i> y <i>Xapfa</i> a la FB1.	47
Figura 15	Curso temporal del "efecto protector" de la FB1, <i>Pst</i> y <i>Ech</i> en hojas infiltradas con <i>Xapf</i> .	48
Figura 16	Progreso de la infección ocasionada por la cepa <i>Xapf</i> en coinfección con MgCl <sub>2</sub> , FB1, o <i>Ech</i> .	49
Figura 17	Curso temporal del crecimiento bacteriano de <i>Xapf</i> en hojas infiltradas.	50
Figura 18	Crecimiento de <i>Xapf</i> , <i>Ech</i> y <i>Pst</i> en hojas de frijol.	51
Figura 19	Placa de TLC teñida con CBB (coomassie brilliant blue).	53
Figura 20	Separación de LCB con diferentes fases móviles.	53
Figura 21	Cuantificación por densitometría de una LCB (SO).	53
Figura 22	Porcentaje de recuperación del compuesto no identificado (o putativamente una LCB) a partir del extracto lipídico.	54
Figura 23	Detección de posibles LCB en los extractos de hojas de frijol con dos diferentes compuestos reveladores en TLC.	55
Figura 24	Perfil de LCB de fracciones microsomales (FM) de hojas de frijol infiltradas con 20 µL de una solución 10 µM de FB1 y hojas infiltradas con 20 µL de una solución 1 x 10 <sup>8</sup> ufc/ ml del patógeno <i>Pst</i> a los tiempos post infiltración de 0.5 a 3.0 h	55

<b>Figura 25</b>	Reacción de derivatización de una base de cadena larga con NDA (Naftalen-2,3-dicarboxialdehído) en presencia de cianuro	56
<b>Figura 26</b>	Cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa de derivados de tres estándares de LCB.	57
<b>Figura 27</b>	Detección de LCB por HPLC.	58
<b>Figura 28</b>	Curvas patrón de LCB las cuales se construyeron con cada uno de los estándares.	58
<b>Figura 29</b>	Cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa de cuatro estándares diferentes (PS, SO, SN, y d20:1).	59
<b>Figura 30</b>	Curva patrón de la LCB d20:1 como estándar interno.	60
<b>Figura 31</b>	Cromatograma de detección de las LCB por HPLC.	61
<b>Figura 32</b>	Separación de las LCB presentes en homogenados de radículas de frijol por HPLC.	62
<b>Figura 33</b>	Comparación de la recuperación del estándar interno d20:1 por los métodos de extracción de Castegnaro y Markham.	63
<b>Figura 34</b>	Cromatogramas de detección de LCB por HPLC en extractos lipídicos de fracciones microsomales de hojas de frijol expuestas a FB1 y <i>Pst</i> .	64
<b>Figura 35</b>	Cuantificación de PS en FM de hojas de frijol.	66
<b>Figura 36</b>	Perfil de acumulación del pico A y del pico B en FM de hojas de frijol.	67
<b>Figura 37</b>	Perfil de bases de cadena larga.	78
<b>Figura 38</b>	Modelo del posible mecanismo de acción de patógenos bacterianos y FB1 como elicitores de defensa y muerte celular programada a través de la acumulación de LCB en <i>Phaseolus vulgaris</i>	80

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I</b>	Etapas del desarrollo del frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	11
<b>Tabla II</b>	Comparación de la separación de LCB con dos diferentes condiciones cromatográficas	60
<b>Tabla III</b>	Identificación de LCB en homogenados de radículas de frijol	62
<b>Tabla IV</b>	LCB encontradas en hojas de frijol (picos derivatizados con NDA)	65

## ABREVIATURAS

ATP	adenosintrifosfato	μM	micromolar
AAI	toxina del hongo <i>Alternaria alternata</i>	μL	microlitro
ABA	ácido abscísico	NDA	naftalen-2,3-dicarboxialdehído
<i>Avr</i>	gen de avirulencia	nm	nanometro
CBB	azul brillante de Coomassie	nmol	nanomol
DC	dicloxacilina	PA	ácido fosfatídico
DGDG	digalactosildiacylglicerol	PC	fosfatidilcolina
DHS	DL-treo-dihidroesfingosina	PCD	muerte celular programada
DIG	glicolípidos insolubles en detergente	PE	fosfatidiletanolamina
dpi	días post infiltración	PI	fosfatidilinositol
DNA	ácido desoxirribonucleico	PLA	fosfolipasa A
DRMs	membranas resistentes a detergente	PLC	fosfolipasa C
d18:2	esfingadienina	PLD	fosfolipasa D
d20:1	d-eritro-C20-esfingosina	pmol	picomol
E	eritromicina	Pe	penicilina
<i>Ec</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	PS	fitoesfingosina
<i>Ech</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
ERM	elicitor responsive MAPK	PR	genes relacionados con la patogénesis
ERO	especies reactivas de oxígeno	PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados
ES	estreptomicina	PX	polimixina B
FB1	fumonisina B1	<i>R</i>	gen de resistencia
FM	fracción microsomal	RF	rifampicina
GC	cromatografía de gases	Rf	índice de retención
GEM	membranas enriquecidas en glicolípidos	RNA	ácido ribonucleico
GPI	glicosilfosfatidilinositol	ROIs	intermediarios reactivos de oxígeno
GPIC	glucosilinositolfosforilceramidas	SAMs	micotoxinas análogas a esfinganina
h	hora	SN	esfinganina
H <sub>2</sub> O	agua	SO	esfingosina
hpi	horas post infiltración	SPT	serina palmitoil transferasa
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia	S1P	esfingosina- 1-fosfato
HR	respuesta de hipersensibilidad	TE	tetraciclina
IE	índice de enfermedad	TIFF	fracciones flotantes insolubles en tritón

KA	Kanamicina	TIM	membranas insolubles en tritón
LCB	bases de cadena larga	TLC	cromatografía en capa fina
LI	lincomicina	tpi	tiempos post infiltración
LOX	lipoxigenasas	TR	tiempo de retención
MAPKs	proteínas cinasas activadas por mitógeno	t18:1	dehidrofitoesfingosina
mg	miligramo	UFC	unidades formadoras de colonias
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio	UV	luz ultravioleta
MGDG	monogalactosildiacilglicerol	VMP	vesículas de membrana plasmática
min	minuto	VPE	Enzima procesadora vacuolar
mL	mililitro	<i>Xapf</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
mM	milimolar		var. <i>fuscans</i>

## RESUMEN

La muerte celular ocurre como necrosis o como muerte celular programada, esta última está genéticamente definida. En plantas, la muerte celular no sólo es reconocida como un importante proceso en el desarrollo de la planta, sino también como un componente esencial en las respuestas de defensa contra patógenos. Una característica de la muerte celular en plantas resistentes a patógenos involucra una muerte celular rápida y localizada conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR). Se ha demostrado que la toxina fumonisina B1 (FB1) induce necrosis, fragmentación de DNA y acumulación de bases de cadena larga (LCB) libres en diferentes tejidos vegetales, lo cual puede ser atribuido a que esta toxina inhibe competitivamente a la esfinganina-*N*-aciltransferasa en plantas. Ésto ha proporcionado evidencias de la participación de los esfingolípidos en la señalización que lleva a la aparición de la muerte celular programada durante las respuestas a la enfermedad en plantas (Wang *et al.* 1996; Moore *et al.* 1999; Asai *et al.* 2000).

En este trabajo, se estudió la relación entre esfingolípidos membranales y la respuesta de defensa a patógenos. Para ello, se determinaron los niveles de esfingolípidos endógenos en fracciones microsomales de hojas de *Phaseolus vulgaris* en condiciones en que la planta presenta una HR. La estrategia fue utilizar un sistema de interacción planta- patógeno en el cual, plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) fueron expuestas a patógenos virulentos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xapf*)), patógenos avirulentos (*Erwinia carotovora* (*Ec*), *Erwinia chrysanthemi* (*Ech*) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*)) y FB1, como formas naturales y artificiales, respectivamente, de inducir cambios en los niveles endógenos de esfingolípidos y de sus precursores. Se encontró que la toxina FB1 produce una lesión parecida a una HR con características macroscópicas similares a las lesiones causadas por las bacterias *Ec*, *Ech* y *Pst*, quienes causaron una lesión típica de HR; por otra parte, la bacteria patógena *Xapf* causó grandes zonas de clorosis y necrosis en el foliolo entero. Adicionalmente, se determinó que tanto la toxina FB1 como las bacterias *Ech* y *Pst* confirieron protección a la planta contra la infección por *Xapf*, lo cual confirma que la lesión causada por la FB1 comparte características morfológicas y funcionales con las típicas lesiones HR, en donde se están promoviendo reacciones de defensa. En estas condiciones, donde la planta presenta una lesión de HR, se encontró que hay cambios en los niveles de bases de cadena larga presentes en los tratamientos con FB1 encontrándose tres picos, uno de esos picos fue identificado como fitoesfingosina (PS), la cual presentó elevaciones transitorias a los tiempos de 0.5, 1, 4 (2.18 veces), 5 (1.6 veces), 24 (2.7 veces) y 48 horas post infiltración (hpi). En hojas infiltradas con *Pst*, la acumulación de PS se dio a los tiempos de 5 (1.9 veces) y 24 (4.65 veces) hpi. Los otros dos picos aparentemente de bases de cadena larga (designados como pico A y pico B) también presentaron cambios en los niveles de acumulación a los diferentes tiempos y con los dos tratamientos (FB1 y *Pst*). El pico A presentó una cinética muy parecida a la de la PS, ya que las muestras tratadas con FB1 y *Pst*

coincidieron claramente con la PS a los tiempos de 4, 5, 24 y 48 hpi, y a las 24 hpi respectivamente, lo cual sugiere que tanto la PS como el pico A son bases de cadena larga que podrían estar fluctuando en paralelo en asociación a una respuesta de defensa en la planta. En cuanto al pico B, éste sólo se acumuló en las primeras tres horas post infiltración y presentó una acumulación máxima al tiempo de 1 hpi con ambos tratamientos. Una de las características cromatográficas de las probables bases de cadena larga A y B es que en el HPLC éstas eluyen antes que la fitoesfingosina, lo que sugiere una naturaleza más polar. Esta polaridad, puede deberse a la presencia de un doble enlace, lo cual las haría más polares que la PS y por comparación con un perfil cromatográfico de diferentes bases de cadena larga obtenido por HPLC y reportado por Markham *et al.* (2006), podríamos sugerir que estos picos A y B corresponden a la dehidrofitoesfingosina (t18:1) con sus dos diferentes isómeros: t18:1 (8Z) y t18:1(8E). Un dato que apoya esta propuesta es que la t18:1 es una de las bases más abundantes en frijol (Carter y Koob, 1969 y Markham *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos indican que hay una asociación entre la elevación de bases de cadena larga y la manifestación de la capacidad de defensa de la planta, evidenciada como la protección de una zona en la que las células experimentan muerte celular que restringe el avance del patógeno al resto del tejido. Estos datos constituyen una evidencia a favor de que los esfingolípidos pueden estar mediando respuestas de defensa en plantas, probablemente a través de una acción sobre la delimitación del área de la muerte celular.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA ENFERMEDAD EN LAS PLANTAS

Se dice que una planta está sana, o normal, cuando ésta es capaz de llevar a cabo sus funciones fisiológicas esenciales. Sin embargo, cuando las células de la planta pierden la habilidad de llevar a cabo una o algunas de sus funciones esenciales, ya sea porque son interrumpidas por algún microorganismo patógeno o por un factor ambiental adverso que interrumpa la actividad de la célula, la altere o la inhiba y le provoque un mal funcionamiento y en algunos casos su muerte, entonces, se dice que la planta empieza a enfermar. Una vez que la planta enferma, empieza a presentar cambios físicos visibles que se conocen como síntomas de la enfermedad. La enfermedad en la planta se define como una serie de respuestas visibles e invisibles de las células y tejidos ante un microorganismo patógeno o a factores ambientales que dan como resultado cambios adversos en la forma, función o integridad de la planta que lleve a un daño parcial o a la muerte de la planta entera (Agrios, 1997).

La enfermedad en la planta es causada tanto por factores no infecciosos (agentes abióticos) como temperatura, humedad, nutrientes minerales, contaminantes, luz, etc; que estén por arriba o por debajo del nivel de tolerancia de la planta; o por microorganismos patógenos (agentes bióticos), que causan enfermedad al interrumpir el metabolismo de la célula a través de enzimas, toxinas, reguladores de crecimiento y otras sustancias secretadas por ellos. Según el tipo de célula o tejido afectado por la enfermedad, se altera una determinada función fisiológica de la planta.

### 1.1.1 Manifestaciones físicas de la enfermedad

Después de que la planta ha sido infectada, ésta puede mostrar cambios dramáticos en su crecimiento y productividad, apareciendo también otras alteraciones que van acompañadas por cambios en su estructura y fisiología. El desarrollo de síntomas está influenciado por el ambiente y la salud del hospedero al momento de la infección (Isaac, 1991). Algunos de estos síntomas son:

*Reducción del crecimiento:* En la mayoría de los casos, éste es un importante síntoma de enfermedad que se manifiesta como una reducción en el rendimiento de un cultivo, esto es, hay disminución en número, tamaño y calidad de frutos, granos, semillas, flores, etc. Muchos de estos efectos se originan por la ruptura de tejido fotosintético y la perturbación de otros procesos (incremento en la velocidad de respiración, cambios de nutrientes y en la relación de agua por ejemplo), como resultado de la invasión patogénica.

*Necrosis:* El término necrosis es usado para describir la muerte de tejidos infectados. Durante el desarrollo de la enfermedad, la necrosis puede extenderse y provocar rápidamente la muerte de la planta entera o puede estar restringida a zonas aisladas. Las manchas necróticas aparecen en las hojas de la planta infectada como resultado de la muerte celular localizada.

*Roya:* El término roya se refiere a enfermedades en la planta que causan ennegrecimiento de las hojas y otros órganos y se aplica frecuentemente a infecciones que se extienden muy rápidamente.

*Humedecimiento:* La enfermedad debida a exceso de agua puede afectar a todos los tipos de plantas, pero afecta principalmente a las plántulas, ya que las raíces y la base del tallo son infectados por hongos patógenos necrótrofos. Al inicio de la infección aparecen lesiones oscuras. Las células afectadas se hinchan y posteriormente se colapsan, lo que puede provocar la rápida muerte de la planta.

*Escabro:* Este término es usado para describir las lesiones necróticas superficiales que son formadas como resultado a la invasión al hospedero. En algunas infecciones, estas lesiones van acompañadas por la formación de corcho bajo la epidermis o por asociación del micelio fúngico. La epidermis eventualmente se rompe para liberar las esporas fúngicas.

*Antracnosis:* Es el nombre común de enfermedades de plantas caracterizadas por una lesión negruzca con acumulación de esporas negras y micelio en algunos casos.

*Manchas en las hojas:* Pequeñas manchas de necrosis aparecen en las hojas de la planta. Estas lesiones reducen efectivamente la capacidad fotosintética de las hojas y cuando el hongo esporula, la relación de agua puede ser alterada debido a la ruptura de la cutícula. La infección temprana afecta la superficie de las hojas de la planta que gradualmente se van tiñendo de negro. Las manchas causan pequeños problemas en la planta, a menos que la infección sea muy severa, pero en términos económicos causa problemas debido al aspecto de la hoja.

*Úlceras:* Las lesiones necróticas las cuales aparecen hundidas dentro del tejido de la planta son llamadas úlceras. Estas zonas pueden estar rodeadas por un sobrecrecimiento del tejido de la planta, el cual ocurre como respuesta al efecto causado por la herida. Cuando el daño ocurre debajo del tejido vascular de la planta, la infección puede ser fatal.

*Clorosis:* Un gran número de enfermedades produce una coloración amarillenta en las hojas de la planta infectada. Estos síntomas son frecuentemente atribuidos a una deficiencia de hierro en las hojas, produciendo una reducción en la síntesis de clorofila. Este síntoma puede asociarse con el efecto del hongo patógeno en los cloroplastos.

*Marchitamiento:* Las condiciones de sequía dan como resultado la pérdida de turgencia en las hojas y como consecuencia la planta se marchita. A menos que el suministro de agua sea restringido o prolongado, esta condición es reversible. El marchitamiento causado por la invasión de hongos patógenos es generalmente irreversible y puede progresar y afectar a toda la planta con relativa rapidez.

*Deformaciones y frenado del crecimiento:* Un gran número de infecciones causadas por hongos patógenos produce alteraciones en las características morfológicas del tejido de la planta hospedera y afecta el desarrollo normal de la planta. Se utilizan términos como hipoplasia cuando el desarrollo normal de la planta se ve frenado. Una reducción de la división celular puede ser un mecanismo primario para este efecto. Hiperplasia es un término que se utiliza cuando el tejido de la planta crece en exceso,

generalmente como resultado de la división celular incrementada. La hipertrofia describe un crecimiento excesivo debido al alargamiento de las células individuales.

### Relación Función-Síntomas

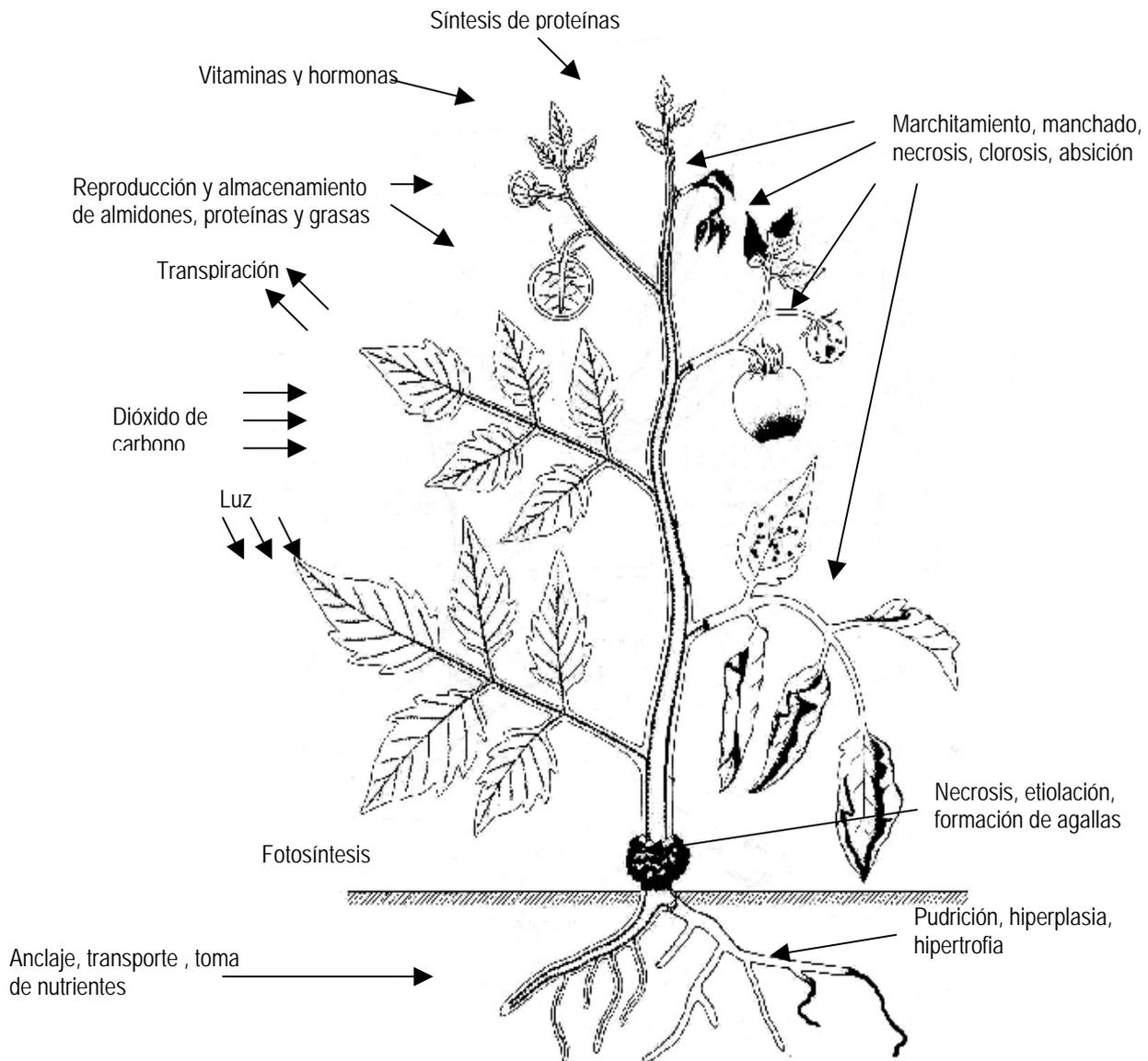


Fig. 1 Representación esquemática de las funciones básicas en la planta (izquierda) y la interferencia de estas funciones (derecha) causadas por algunos tipos comunes de enfermedad en plantas (Agrios, 1997).

#### 1.1.2 Manifestaciones celulares de la enfermedad

Ya que las plantas llevan a cabo varias funciones celulares esenciales durante su ciclo de vida, cualquier interrupción de alguna de ellas resultaría en una condición de enfermedad de la planta.

##### Efectos sobre la fotosíntesis

La fotosíntesis es una de las funciones básicas de las plantas verdes; ahí, la energía luminosa es utilizada para la síntesis de glucosa a partir de  $\text{CO}_2$  y agua, con la simultánea liberación de  $\text{O}_2$ . La

fotosíntesis es fundamental para la vida de las plantas verdes, por lo que la interferencia de este proceso por patógenos daría como resultado un estado de enfermedad de la planta, provocando lesiones cloróticas y necróticas, reducción en el crecimiento y en la producción de frutos de muchas plantas infectadas. En enfermedades como el moteado de las hojas, roya y otros tipos de enfermedad en el cual hay destrucción del tejido de la hoja o defoliación, la fotosíntesis se reduce debido a que la superficie fotosintética de la planta es menor. En otras enfermedades causadas por patógenos, la fotosíntesis se reduce en etapas tardías de la enfermedad, ya que afectan a los cloroplastos y causan su degeneración. Hay enfermedades causadas por algunos hongos o bacterias, donde el contenido total de clorofilas se reduce sin que se afecte su actividad fotosintética. En algunas enfermedades causadas por hongos o bacterias, la fotosíntesis disminuye a causa de las toxinas producidas por estos patógenos (por ejemplo, tentoxina y tabtoxina que inhiben la actividad de algunas enzimas que participan directa o indirectamente en la fotosíntesis). En algunas plantas infectadas, los estomas permanecen parcialmente cerrados, la clorofila está reducida y la fotosíntesis se detiene antes de que la planta se marchite. Organismos como virus, mollicetos y nemátodos inducen grados variables de clorosis en la mayoría de estas enfermedades, la fotosíntesis es reducida de manera muy importante (Manners, 1982; Agrios, 1997).

#### Efectos sobre la respiración

Cuando las plantas son infectadas por patógenos, se ve incrementado el índice de respiración, esto significa que el tejido afectado usa sus reservas de carbohidratos más rápido que el tejido sano. El aumento en la velocidad de respiración aparece poco después de la infección y continúa aumentando durante la multiplicación y esporulación del patógeno. Después de eso la respiración disminuye a niveles normales o por debajo de la que realiza una planta sana. La respiración se incrementa más rápidamente en infecciones de plantas resistentes, en las cuales, una gran cantidad de energía es requerida y usada para la rápida producción y movilización de mecanismos de defensa de las células. En estas plantas, la respiración también declina rápidamente después de alcanzar su máximo. En variedades susceptibles donde los mecanismos de defensa no pueden ser movilizados rápidamente en contra de un patógeno en particular, la respiración se incrementa lentamente después de la inoculación y los niveles se mantienen altos por largo tiempo. Un incremento en la respiración después de la infección, está acompañado por varios cambios en el metabolismo de la planta:

- a. La actividad o concentración de varias enzimas de la cadena respiratoria se ven incrementadas.
- b. La acumulación y oxidación de compuestos fenólicos, muchos de los cuales están asociados con los mecanismos de defensa en plantas, están aumentados durante la respiración incrementada.
- c. La respiración en plantas enfermas está acompañada por un incremento en la activación de la vía de las pentosas fosfato, la cual es la principal fuente de compuestos fenólicos.

- d. La fermentación se incrementa considerablemente, probablemente como resultado de una acelerada necesidad de energía en la planta enferma bajo condiciones en las que la respiración aerobia normal es insuficiente ya que no puede proporcionar suficiente energía.

El incremento en la respiración en plantas enfermas es provocado, en parte, porque la fosforilación oxidativa está desacoplada, por lo que la energía requerida por las células para sus procesos vitales es entonces producida por otras vías menos eficientes (vía de las pentosas fosfato y fermentación) (Manners, 1982; Agrios, 1997).

#### Efectos sobre el movimiento de agua y solutos

Todas las células vegetales requieren de agua en abundancia y una cantidad adecuada de nutrientes para llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Las plantas absorben agua y nutrientes inorgánicos del suelo a través de su raíz. Cuando una planta es infectada por un patógeno, éste puede interferir de una o varias formas con la movilización de agua y nutrientes que lleva a cabo la planta. Algunos patógenos afectan la integridad o función de la raíz provocando una mala absorción del agua; otros patógenos crecen en los vasos del xilema e interfieren con el movimiento del agua a través del tallo; en algunas enfermedades, los patógenos alteran la economía del agua en la planta causando una transpiración excesiva, provocando que las células de la hoja sean más permeables y que los estomas tengan un mal funcionamiento (Agrios, 1997).

#### Efectos sobre la permeabilidad de las membranas celulares

Las membranas celulares son estructuras de bicapa lipídica que rodean a la célula, en la cual se encuentran intercaladas proteínas específicas o en contacto de manera superficial por interacciones iónicas. Funcionan como barreras de permeabilidad muy selectivas, que contienen sistemas de transporte que regulan la composición iónica y molecular del medio interno, controlan el flujo de información entre las células y llevan a cabo un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y sus alrededores. Una alteración o interrupción de la membrana celular por factores físicos o químicos que alteren la permeabilidad de la membrana (por lo general la incrementan) causa una incontrolable fuga de sustancias útiles, como también la incapacidad de inhibir el flujo de sustancias en exceso o indeseables. Estos cambios en la permeabilidad son detectados en respuesta a infecciones por patógenos, a toxinas específicas de hospederos y – no específicas de hospederos, a ciertas enzimas del patógeno y a ciertos químicos tóxicos del aire. El principal efecto observado a partir de un cambio en la permeabilidad de la membrana es la fuga de electrolitos (Agrios, 1997).

### 1.1.3 Manifestaciones moleculares de la enfermedad

La transcripción de DNA celular a RNA mensajero y su traducción a proteínas son dos procesos básicos fundamentales que están estrictamente regulados en una célula normal. La interrupción de alguno de estos procesos por patógenos o factores ambientales puede afectar la expresión de los genes causando cambios drásticos y desfavorables en la estructura y función de la célula afectada.

Los procesos de transcripción en células infectadas se ven afectados por cambios en la composición, estructura y función de la cromatina asociada al DNA celular. Se sabe que los virus causan enfermedad debido a que ellos utilizan los nucleótidos de la célula hospedera y su maquinaria para producir su propio RNA. En varias enfermedades, la actividad de ribonucleasas (enzimas que rompen el RNA) es incrementada en plantas infectadas, tal vez por formación de nuevos tipos de ribonucleasas que no se producen en plantas sanas. Se ha visto que las plantas infectadas contienen niveles elevados de RNA, especialmente en etapas tempranas de la infección. Los efectos sobre la traducción se ven reflejados en el aumento en la actividad de algunas enzimas asociadas a la generación de energía (durante la respiración) o a la producción u oxidación de varios compuestos fenólicos, algunos de los cuales están implicados en reacciones de defensa a patógenos. Algunas de estas enzimas pueden estar presentes en la célula al mismo tiempo de la infección, otras son sintetizadas *de novo* y es necesario incrementar la actividad de transcripción y traducción. El incremento en la síntesis de proteínas en tejido infectado se ha observado principalmente en hospederos resistentes al patógeno y alcanza niveles muy altos en etapas tempranas de la infección, esto es, en los primeros minutos y de 2-20 horas después de la inoculación (Agrios, 1997; Manners, 1982).

## 1.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD

Las plantas han desarrollado una amplia variedad de mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque continuo de microorganismos fitopatógenos, virus o insectos. El éxito de la infección de la planta y por lo tanto, la enfermedad, ocurre cuando hay compatibilidad entre el patógeno y hospedero (susceptibilidad) y cuando la planta contrarresta de forma exitosa la infección (no enfermedad), se da una relación incompatible o de resistencia. La resistencia de una planta a un patógeno se puede dar de manera específica y no específica. La resistencia no específica o resistencia constitutiva o incompatibilidad básica, la presentan todas las especies vegetales que responden a patógenos sin que haya interacción génica *R/Avr*. Mientras que la resistencia específica está determinada por la interacción entre un gen de resistencia (*R*) de la planta y el producto del gen de avirulencia (*AVR*) del patógeno, así que la presencia o ausencia de resistencia específica en un hospedero depende de los genotipos tanto del hospedero como del patógeno (Bonas y Lahaye, 2002; Somssich y Hahlbrock, 1998). Existen tres posibles razones para que exista incompatibilidad genética entre el patógeno y su hospedero:

1. Interacción no hospedera – la planta es incapaz de satisfacer los requerimientos del patógeno, siendo éste incapaz de crecer bajo estas condiciones.
2. Resistencia no hospedera – el hospedero cuenta con suficientes sistemas de defensa preformados, tales como barreras estructurales o compuestos tóxicos que limitan el crecimiento y/o desarrollo del patógeno.

3. Resistencia – los mecanismos de defensa inducibles del hospedero son suficientes para restringir el crecimiento y/o desarrollo del patógeno (Talarczyk y Henning, 2001).

Las plantas pueden presentar diferentes formas de resistencia que a continuación se describen:

### **1.2.1 Resistencia constitutiva**

La primera línea de defensa de las plantas ante patógenos son los mecanismos constitutivos, los cuales están presentes antes del ataque de un patógeno y consisten en barreras estructurales y compuestos químicos preexistentes. Así, la planta está equipada con ceras y cutinas que cubren a las células de la epidermis de hojas, frutos, tallos y raíz. Algunas plantas son resistentes a la enfermedad causada por ciertos patógenos, ya que en ellas existen compuestos que inhiben la colonización del patógeno y que están presentes antes de que ocurra la infección. Varias de estas defensas tales como alcaloides tóxicos, terpenoides, compuestos fenólicos y algunos compuestos de ácidos grasos tales como dienos son expresados constitutivamente y se encuentran en concentraciones altas en células jóvenes de frutos, hojas o semillas y se ha propuesto que son los responsables de la resistencia de tejidos jóvenes a microorganismos patógenos. Muchos otros compuestos son potentes inhibidores de enzimas hidrolíticas, como las enzimas pectinolíticas de algunos patógenos de plantas. Otro tipo de compuestos preformados, tales como saponinas (compuestos glicosilados esteroidales y triterpenos), tomatina en tomate y avenacina en avena, tienen actividad membranolítica antifúngica; además, excluyen a hongos patógenos que carecen de enzimas (saponinasas) que rompen la saponina y así puedan infectar a la planta hospedera. De esta manera, la presencia o ausencia de saponinas en el hospedero y de saponinasas en el hongo determina el rango de hospederos para el hongo patógeno. Además se han reportado varias proteínas preformadas que actúan como inhibidores de proteinasas y enzimas hidrolíticas del patógeno involucradas en la degradación de la pared celular del hospedero; también actúan inactivando ribosomas extraños o incrementando la permeabilidad de la membrana plasmática del hongo. Adicionalmente, se cuenta con las lecitinas, las cuales son proteínas que se unen específicamente a ciertos azúcares que se encuentran en gran concentración en muchos tipos de semillas, causando lisis e inhibiendo el crecimiento de muchos hongos (Agrios, 1997).

La superficie de la célula vegetal cuenta con cantidades variables de enzimas hidrolíticas como las glucanasas y quitinasas que causan la degradación de compuestos de la pared celular del hongo, contribuyendo de esta manera a la resistencia a la infección (Wittstock y Gershenzon, 2002).

### **1.2.2 Resistencia inducida**

El reconocimiento temprano del patógeno por la planta es muy importante para que ésta pueda movilizar las defensas bioquímicas y estructurales con las que cuenta para protegerse del patógeno. La planta recibe moléculas señal (moléculas que indican la presencia de un patógeno), tan pronto como el patógeno establece contacto físico con la planta. Algunos patógenos (especialmente hongos y bacterias) liberan en su entorno sustancias tales como glicoproteínas, carbohidratos, ácidos grasos y péptidos,

mismos que, en varias interacciones planta-patógeno, actúan como elicitores que son reconocidos por la planta. Una vez que se da el reconocimiento de estos elicitores derivados del patógeno, una serie de señales de alarma es enviada a proteínas y genes nucleares de la célula hospedera causando su activación, la producción de sustancias que inhiben al patógeno y su movilización o la de sus productos hacia el punto de ataque de la célula por el patógeno. Algunas de estas señales y sustancias de alarma son intracelulares, pero en muchos casos, la señal también es transmitida a las células adyacentes, y frecuentemente es transmitida de manera sistémica a toda la planta (Agrios, 1997).

### 1.2.3 Resistencia sistémica adquirida

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es un mecanismo de defensa inducida que confiere protección por largo tiempo contra un amplio espectro de microorganismos. La SAR requiere del ácido salicílico y está asociada a la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, tanto en el sitio de infección, como en tejidos sistémicos, y las cuales contribuyen a la resistencia (Durrat y Dong, 2004).

## 1.3 TEORÍA DEL GEN POR GEN

La teoría se refiere a la interacción gen por gen que existe entre plantas y sus patógenos como resultado de una relación incompatible (no enfermedad) y requiere de un gen de resistencia (R) dominante o semidominante en la planta y un correspondiente gen de avirulencia (Avr) en el patógeno (Flor, 1971). Los genes de resistencia permiten a las plantas detectar moléculas de genes Avr específicos, inician la transducción de señales para activar defensas, y tienen la capacidad de desarrollar nuevos genes R específicos (Hammond-Kosack y Jones, 1997).

## 1.4 RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD (HR)

La muerte celular programada no sólo es reconocida como un importante proceso en el desarrollo natural de las plantas, también es un componente esencial en la respuesta de defensa de las plantas (Spassieva *et al.* 2002). La respuesta de defensa de las plantas ante la invasión por patógenos conduce a la activación de dos diferentes vías de señalización, una induce muerte celular programada en el sitio de infección, y la otra activa mecanismos de resistencia en el tejido infectado y en otras partes de la planta (Talarczyk y Henning, 2001).

En interacciones incompatibles se desarrollan lesiones necróticas en y alrededor del sitio de infección y esta respuesta es conocida como reacción de hipersensibilidad o muerte celular hipersensible. Algunas características comunes de muerte celular en animales y plantas incluye la condensación nuclear y fragmentación nucleosomal del DNA. El estallido oxidativo y el conjunto de cambios en el estado redox de la célula son factores importantes que activan la muerte celular, esto no ocurre a través de un efecto citotóxico de las ERO, sino que actúan como elementos de señalización celular regulando tanto la HR como la resistencia (Resterucci *et al.* 1999).

## 1.5 LA PLANTA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una de las leguminosas más importantes en la dieta. Está considerado como la fuente más barata de proteínas y calorías. La planta de frijol es susceptible a condiciones extremas: exceso o falta de humedad, por tal razón debe sembrarse en suelos de textura ligera y bien drenados. La planta del frijol se caracteriza generalmente según su porte, en arbustivo de crecimiento bajo y determinado y en trepadoras de crecimiento indefinido. También se clasifica, según su hábito de crecimiento en: erecto, semirecto y rastrero. La planta se adapta mejor a condiciones tropicales, su temperatura óptima de desarrollo es de 24-30 °C. Temperaturas menores a 18 °C retardan el periodo de floración. Es exigente en agua durante los primeros 50 días después de la siembra y requiere de una alta radiación solar para un óptimo desarrollo. La descripción de desarrollo del frijol se muestra en la Tabla I y Fig. 2.

Tabla I Etapas del desarrollo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

ETAPA	DESCRIPCIÓN
V1	<b>Emerger:</b> es la etapa de aparición de los cotiledones sobre la superficie del suelo hasta el desarrollo de las hojas primarias.
V2	<b>Hojas primarias:</b> esta etapa se refiere al desarrollo completo de las hojas primarias y el inicio del desarrollo del primer trifolio.
V3	<b>Primer trifolio:</b> es el completo desarrollo del primer trifolio hasta el inicio del desarrollo del tercer trifolio.
V4	<b>Tercer trifolio:</b> es el completo desarrollo del tercer trifolio hasta la aparición de los primeros botones florales.
R5	<b>Prefloración:</b> inicia con la aparición de los primeros botones florales al surgimiento de las primeras flores.
R6	<b>Floración:</b> inicia con el surgimiento de las primeras flores a la expansión del ovario después de la fertilización.
R7	<b>Desarrollo de la vaina:</b> abarca de la expansión del ovario a la elongación de la vaina hasta su tamaño completo antes de que la semilla incremente su peso.
R8	<b>Llenado de la vaina:</b> La semilla empieza a incrementar en tamaño, peso y desarrolla pigmento. Inicia la senescencia de la hoja.
R9	<b>Maduración:</b> se refiere al inicio de la senescencia hasta su maduración y la caída de humedad en la semilla de un 15 % aproximadamente.

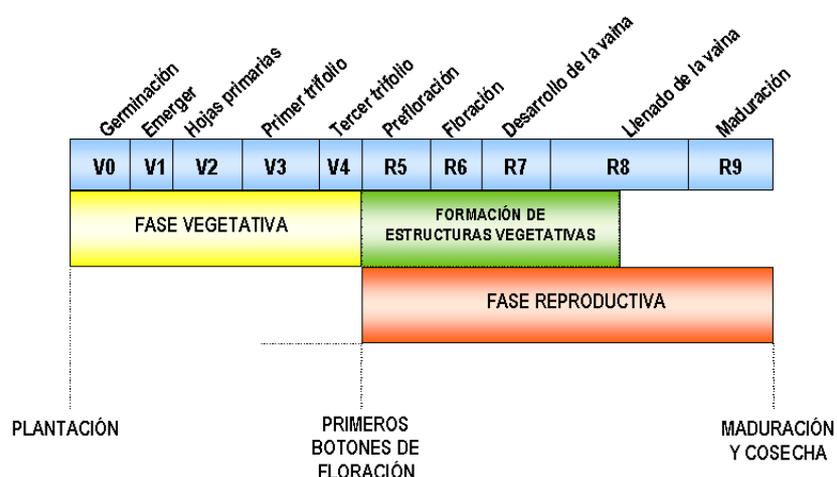


Fig.2 Esquema de desarrollo de la planta de *Phaseolus vulgaris* (Hall, 1991).

Una de las enfermedades más comunes en *Phaseolus vulgaris* es el tizón común bacteriano.

### 1.5.1 Tizón común bacteriano (o tizón común del frijol)

El tizón común del frijol es inducido por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y afecta el follaje y las vainas de frijol. Se ha considerado que es una de las enfermedades más importantes en áreas de producción de frijol, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde el daño que produce puede ser muy severo, ya que reduce el rendimiento de la planta infectada y afecta la calidad de la semilla provocando pérdidas mayores al 45% de la producción de grano, esto es debido a que la presencia de altas temperaturas y lluvias frecuentes favorecen el desarrollo del patógeno (Cruz *et al.* 2001). El tizón común se desarrolla cuando la semilla que se siembra está contaminada, cuando el suelo de cultivo presenta un historial de enfermedad y cuando el clima es consistentemente caliente y húmedo.

### 1.5.2 Síntomas de la enfermedad

Los síntomas en la hoja inicialmente aparecen como manchas húmedas que gradualmente se van ampliando, el tejido se pone flácido y aparece la necrosis, la zona dañada está frecuentemente rodeada de una pequeña zona de tejido color amarillo limón. Las lesiones pueden encontrarse en el margen y en las áreas intervenosas de la hoja. Como las lesiones se extienden y se unen, las plantas parecen estar quemadas. En infecciones severas, las hojas muertas permanecen unidas a la planta en maduración. La bacteria sale del estoma, suministrando inóculo para propagaciones secundarias.

Los síntomas en la vaina se presentan como lesiones generalmente circulares, ligeramente hundidas, y café-rojizo oscuras. Las lesiones varían en tamaño y forma dependiendo de la edad de la vaina. Bajo condiciones de alta humedad, las lesiones en la vaina están frecuentemente cubiertas de rezumar bacteriano.

Los síntomas sobre semillas blancas se presentan como manchas amarillas o café distribuidas por toda la cubierta de la semilla o restringidas al área del hilum. Semillas severamente afectadas están frecuentemente arrugadas y exhiben pobre germinación (Hall, 1991).

### 1.5.3 Organismo causal

El tizón común del frijol es causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Esta bacteria es un bacilo aerobio Gram (-) de 0.4-0.9 x 0.6-2.6  $\mu\text{m}$  y que presenta movilidad gracias a que cuenta con un flagelo polar. En agar, las colonias son convexas de color amarillo brillante con actividad lipolítica e hidrolizan gelatina, caseína y almidón. En medios de cultivo que contienen tirosina produce un pigmento café oscuro.

### 1.5.4 Biología

Las bacterias entran a la hoja por los estomas o heridas, y subsecuentemente invaden los espacios intercelulares, causando la gradual disolución de la lamela media. La entrada al tallo se da de tres maneras: vía los estomas del hipocotilo y epicotilo; a través del sistema vascular de las hojas; o por

los cotiledones infectados. La penetración a la semilla es a través del sistema vascular del pedicelo y el funículo. Los micrópilos también sirven como un punto de entrada a la semilla. El patógeno permanece en la cubierta de la semilla o pasa a los cotiledones cuando la semilla germina y de esta forma infecta a la planta joven resultante. Las bacterias pueden permanecer viables por varios años debajo de la cubierta de la semilla. Una sola fuente de inóculo en un cultivo puede contaminar un área de más de 8 m alrededor de ésta; así, una planta enferma en 10 000 es suficiente para causar una severa epidemia.

## 1.6 LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS PLANTAS Y SU INTERACCIÓN CON PATÓGENOS

La célula vegetal está compuesta por organelos y sistemas membranales, los cuales incluyen cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, Golgi, tonoplastos, retículo endoplásmico, núcleo y una variedad de pequeñas vesículas bien definidas, todos embebidos en el citoplasma y encerrados por una membrana plasmática, la cual está rodeada por una pared celular. Mientras la relativa rigidez de la pared celular confiere estabilidad y protección contra daño mecánico a la célula, la membrana plasmática proporciona un entorno relativamente constante para el metabolismo intracelular, llevando a cabo un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y sus alrededores (Larsson *et al.* 1990).

### 1.6.1 Propiedades de las membranas

Las membranas difieren en su estructura como en sus funciones, sin embargo tienen en común algunas propiedades importantes:

1. Grosor. Las membranas son estructuras laminares, de sólo dos moléculas de grosor, que forman espacios cerrados entre distintos compartimentos. El grosor de la mayoría de las membranas está comprendido entre 60 y 100 Angstrom.
2. Composición y asimetría de las membranas. Las membranas son estructural y funcionalmente asimétricas, es decir, su composición es diferente cuantitativa y cualitativamente, tanto en su composición lipídica como en la colocación y orientación de las proteínas y los oligosacáridos. La superficie externa e interna de todas las membranas biológicas conocidas tienen diferentes componentes y diferentes actividades enzimáticas. Las proteínas de membrana tienen una orientación determinada porque se sintetizan y se insertan de manera asimétrica. Esta asimetría absoluta se mantiene por la carencia de movimiento transmembranal de estas proteínas durante la vida de las membranas y porque las membranas siempre se sintetizan por crecimiento de las ya existentes. También los lípidos se distribuyen asimétricamente como resultado de su propia biosíntesis, pero normalmente esta asimetría no es absoluta, excepto en el caso de los glicolípidos. Por ejemplo, la membrana plasmática de mamíferos, las esfingomielinas y las fosfatidilcolinas se sitúan con preferencia en la hoja externa de la bicapa, mientras que las fosfatidiletanolaminas y las fosfatidilserinas se sitúan en la hoja interna. En plantas se ha sugerido que el bajo punto isoeléctrico del apoplasto en la superficie externa de la membrana plasmática se debe a

la presencia de fosfolípidos ácidos, a fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico que se encuentran principalmente en la hoja externa de la bicapa (Larsson *et al.* 1990). En ambas hojas hay grandes cantidades de colesterol (Stryer, 2003; Larsson *et al.* 1990). Los carbohidratos están localizados exclusivamente en la superficie externa de la membrana plasmática (Voet y Voet, 1995).

3. Carga eléctrica de superficie. La mayoría de las membranas están polarizadas eléctricamente debido a los grupos polares de lípidos, proteínas y carbohidratos y a la actividad de bombas iónicas que proporcionan una diferencia de concentración de iones a ambos lados de la bicapa. De esta forma, las membranas presentan una carga negativa en el interior (normalmente, -60 milivoltios). El potencial de membrana desempeña un papel clave en el transporte, en la conversión de energía y en la excitabilidad (Stryer, 2003).

4. Estabilidad. Los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas relativamente pequeñas que tienen a la vez una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, estas moléculas pueden formar espontáneamente estructuras ordenadas y estables como micelas, liposomas y bicapas (Stryer, 2003).

5. Permeabilidad selectiva. Las bicapas lipídicas tienen una permeabilidad muy baja para iones y para la mayoría de las moléculas polares. La bicapa lipídica de las membranas es intrínsecamente impermeable a los iones y moléculas polares. La permeabilidad se la confieren proteínas de membrana especializadas como son las bombas, canales y traslocadores, los cuales son responsables del transporte transmembranal pasivo o activo. El agua es una excepción importante, ya que atraviesa fácilmente las bicapas lipídicas debido a su tamaño pequeño, alta concentración y ausencia de carga absoluta. La permeabilidad de los diferentes iones y otras moléculas está dada por sus coeficientes de permeabilidad. Para moléculas pequeñas, el coeficiente de permeabilidad depende directamente de sus solubilidades relativas en disolventes apolares y en agua, esto indica que para que la molécula pueda atravesar la membrana, primero deberá eliminar su envoltura de agua de solvatación quedando disuelta en la matriz hidrocarbonada de la membrana por donde difundirá hasta el otro lado de la membrana, donde será nuevamente solvatada (Stryer, 2003).

6. Fluidez. La fluidez de la membrana está controlada por la composición de sus ácidos grasos y su contenido en esteroides. Muchos procesos, como el transporte o la transducción de señales, dependen de la fluidez de los lípidos de la membrana que, a su vez, depende de las propiedades de las cadenas de ácidos grasos (Stryer, 2003), que pueden estar presentes en tres diferentes fases: la fase de gel, la fase líquido-ordenada ( $l_o$ ), y la fase líquido-cristalina o fase fluida ( $l_d$ ). En la fase de gel, los lípidos tienen baja movilidad, con sus cadenas de ácido graso completamente extendidas. Por arriba de su punto de fusión, los lípidos están en una fase fluida y forman estructuras relajadas desordenadas con alta movilidad lateral. La fase líquido-ordenada ( $l_o$ ) es intermedia entre la fase de gel y la fase fluida y en ella los lípidos presentan alta movilidad lateral y una estructura ordenada con ácidos grasos extendidos (Helms y Zurzolo, 2004). Es importante considerar que los esteroides tienen efectos importantes sobre las propiedades físicas

de la bicapa lipídica (Brown y London, 2000). Los esteroides se insertan en las bicapas con el eje orientado perpendicularmente al plano de la bicapa. El grupo hidroxilo del esteroide forma un puente de hidrógeno con un átomo de oxígeno del carbonilo de la cabeza polar del fosfolípido, mientras que su cola hidrocarbonada se localiza en el dominio no polar de la bicapa. La estructura del esteroide perturba las interacciones hidrofóbicas regulares entre las cadenas de ácidos grasos (Stryer, 2003).

### 1.6.2 Función de las membranas biológicas

Las membranas llevan a cabo diversas funciones que resultan ser esenciales para la vida, la organización general y funcional del sistema endomembranal es altamente conservada en células eucariotas. Entre estas funciones se encuentran:

- a) Barreras de delimitación o compartimentalización. Las membranas son estructuras dinámicas, con gran especialización, dependiendo del tipo de célula o de organela en la que se encuentren y confieren a las células su individualidad al separarlas de su entorno.
- b) Filtro selectivo de solutos en ambas direcciones, constituyen barreras de permeabilidad muy selectivas para minerales extracelulares y compuestos orgánicos, los cuales incluyen iones, azúcares, aminoácidos, péptidos y xenobióticos. La permeabilidad selectiva resulta de las propiedades de la bicapa lipídica y de la actividad de muchos transportadores y canales, los cuales son energéticamente regulados por el desarrollo y el medio ambiente (Delrots *et al.* 2001).
- c) Comunicación celular. Las membranas plasmáticas controlan el flujo de información entre las células y llevan a cabo un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y sus alrededores (Stryer, 2003).
- d) Transporte de solutos. El transporte de solutos a través de la membrana requiere de dos condiciones: 1) que la molécula sea capaz de atravesar una barrera hidrofóbica, y 2) una fuente de energía debe potenciar el movimiento. Las moléculas lipofílicas pueden moverse a través de la membrana por difusión simple, ya que se trasladan a favor de su gradiente de concentración. Las moléculas polares o cargadas requieren de proteínas especializadas que las transporten a través de la barrera hidrofóbica, el desplazamiento de estas moléculas a favor de su gradiente de concentración se hace mediante transporte pasivo o difusión facilitada, pero si la molécula se mueve en contra de su gradiente de concentración se requiere de una fuente de energía externa, a este movimiento se le denomina transporte activo y genera un gradiente de concentración
- e) Transducción de energía. Varios tipos de membranas como las plasmáticas de procariontes y las de mitocondria y cloroplasto en eucariontes están especializadas en la conversión de diferentes formas de energía, ya que cuentan con un gran número de proteínas, generalmente asociadas en complejos de varias subunidades que son capaces de actuar secuencialmente en reacciones que involucran el transporte de  $e^-$ ,  $H^+$  y la síntesis o hidrólisis de ATP (Alberts *et al.* 2002; Stryer, 2003)

f) Recepción de estímulos. La célula responde de forma extremadamente significativa a determinados estímulos. Las cascadas de transducción de señales intervienen en la detección y procesado del estímulo. Estos circuitos moleculares detectan, amplifican e integran las diversas señales externas para generar respuestas tales como cambios en la actividad enzimática, expresión de genes o activación de los conductos iónicos.

### 1.6.3 Estructura de la membrana plasmática

La membrana plasmática es la frontera entre la célula y su medio ambiente y es probablemente la más compleja y diferenciada. En plantas, la membrana plasmática es una estructura excitable con transportadores y canales que son capaces de responder a un amplio rango de estímulos específicos y no específicos (Callow y Green, 1996).

La mayor parte del conocimiento actual sobre las membranas biológicas se basa en el modelo del mosaico fluido propuesto por S.J. Singer y G.L. Nicholson en 1972 (Fig.3) (Mathews *et al.* 2004) el cual explica la organización fundamental de las membranas biológicas.

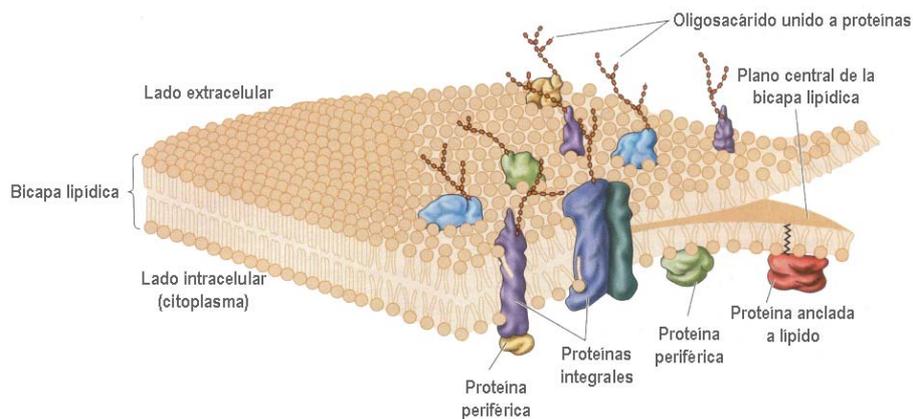


Fig.3 Modelo actual de la estructura de la membrana propuesto por Singer y Nicholson (1972).

Lo esencial de este modelo es que las membranas son disoluciones bidimensionales de proteínas globulares y lípidos orientados. Algunos puntos importantes en este modelo son:

- I. Los constituyentes lipídicos de la membrana se encuentran en forma de bicapa debido a su carácter anfipático. La bicapa lipídica desempeña un doble papel: es a la vez un disolvente para las proteínas integrales de membrana y una barrera de permeabilidad.
- II. Las proteínas de membrana interaccionan específicamente con una pequeña proporción de lípidos membranales los cuales pueden ser esenciales para su función.
- III. Las proteínas de membrana pueden difundir lateralmente en la matriz lipídica a menos que queden restringidas por interacciones especiales, mientras que no son libres para girar de un lado al otro de la membrana (Stryer, 2003).

A pesar de que el modelo del mosaico fluido propuesto por S.J. Singer y G.L. Nicholson ha sido una herramienta valiosa que describe la dinámica y organización de las membranas biológicas, datos experimentales obtenidos en las últimas dos décadas, han demostrado que la compartimentalización temporal de ciertos componentes membranales específicos puede ser importante para que se lleven a cabo procesos que requieren de su agrupación (Vereb *et al.* 2003). En esta propuesta, lípidos y proteínas pueden estar temporalmente confinados a dominios, áreas cuya composición, propiedades físicas y función difieren del resto de la membrana y son capaces de modular las funciones biológicas de las moléculas atrapadas en estas regiones (Edidin y Stroynowski, 1991; Lommerse *et al.* 2004). Actualmente se han demostrado tres tipos de estructuras heterogéneas en la membrana plasmática. Una de las primeras estructuras encontradas son las caveolas, las cuales son invaginaciones que presentan la forma de una ánfora de tamaño pequeño (~ 60 nm de diámetro), su componente principal es la proteína caveolina, la cual se une a colesterol. Las caveolas han sido implicadas en diversas funciones celulares, tales como el transporte de colesterol, la endocitosis y la transducción de señales (Razani *et al.* 2002; Lommerse *et al.* 2004). Una segunda estructura son las balsas lipídicas, las cuales son ensamblajes dinámicos enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, que se mueven dentro de la bicapa fluida y su tamaño puede variar desde varios nanómetros a un micrómetro (Simon e Ikonen, 1997; Lommerse *et al.* 2004). El tercer tipo de heterogeneidad son las redes de actina asociada a la membrana, este tipo de heterogeneidad se refiere a un esqueleto membranal que impone barreras eficientes en la difusión de los diferentes constituyentes de la membrana. El tamaño de estos dominios de difusión se determinó por el diámetro de la malla de la red del esqueleto membranal y se demostró que puede ser de 300- 600 nm (Lommerse *et al.* 2004).

#### 1.6.4 Composición lipídica de las membranas

La membrana plasmática de las células vegetales consiste de lípidos, proteínas y carbohidratos (Buchanan, 2000). Los principales lípidos de membranas plasmáticas en plantas y en animales son los esteroides, glicolípidos y fosfolípidos (Fig. 4). En las membranas plasmáticas de plantas, la relación entre las diferentes clases de lípidos varía en los diferentes órganos de una planta en particular y en un mismo órgano de diferentes plantas.

La mayoría de los esteroides se encuentran libres. De éstos, el sitosterol, campesterol y estigmasterol predominan en las plantas, mientras que en los animales el colesterol es el que predomina. En algunas especies se han encontrado otros esteroides que son poco comunes como el cicloartenol que se encuentra en la avena, el espinasterol, estigmastenol y el 7-estigmastenol en la espinaca. Además de los ésteres libres se han encontrado también ésteres de esteroides, glicósidos y glicósidos acilados, los cuales parecen ser más abundantes en las membranas plasmáticas de plantas que de animales. La composición de los esteroides varía de un órgano a otro de la planta como entre la raíz y la hoja (Hartmann-Bouillon y Benveniste, 1987; Cooke *et al.* 1989; Larsson *et al.* 1990).

El glucocerebrósido es el principal glicolípido en la membrana plasmática de plantas, pero se encuentran también en pequeñas cantidades el monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y el digalactosildiacilglicerol (DGDG) (Yoshida y Uemura, 1986).

La fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) son los principales fosfolípidos en membranas plasmáticas de plantas y animales (Hartmann-Bouillon y Benveniste, 1987), la PC es algunas veces sustituida por el equivalente esfingomielina en las membranas plasmáticas de animales. En las membranas de plantas, el ácido fosfátidico (PA) es el tercer fosfolípido más abundante y le sigue a la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina que se encuentran en mayor cantidad (Stallaert y Geuns, 1994). El fosfatidilinositol (PI) juega un papel importante en la transducción de señales a través de la vía del ciclo de fosfoinosítidos y está presente en menores cantidades (Rochester *et al.* 1987).

Los principales ácidos grasos de las membranas plasmáticas de las plantas y la mayoría de otros organismos, tienen una longitud de cadena de 16 a 18 átomos de carbono y contienen de uno a tres dobles enlaces en configuración *cis*. Los ácidos palmítico (16:0), ácido oleico (18:1), ácido linoléico (18:2), y el ácido linolénico (18:3), y algunas especies de ácido hexadecatrienoico (16:3) constituyen más del 90 % de las cadenas aciladas de la estructura de los glicerolípidos de casi todas las membranas vegetales (Clarkson *et al.* 1980; Mas *et al.* 1994; Olson *et al.* 1994; Ohlrogge y Browse, 1995; Burgos y Donaire, 1996), lo cual contrasta con las membranas plasmáticas de animales, en donde predominan el ácido palmítico, el ácido esteárico (18:0) y el ácido araquidónico (20:4). A pesar de estas diferencias, el grado de insaturación de los ácidos grasos en la membrana plasmática es similar en las membranas plasmáticas de plantas y animales (Larsson *et al.* 1990).

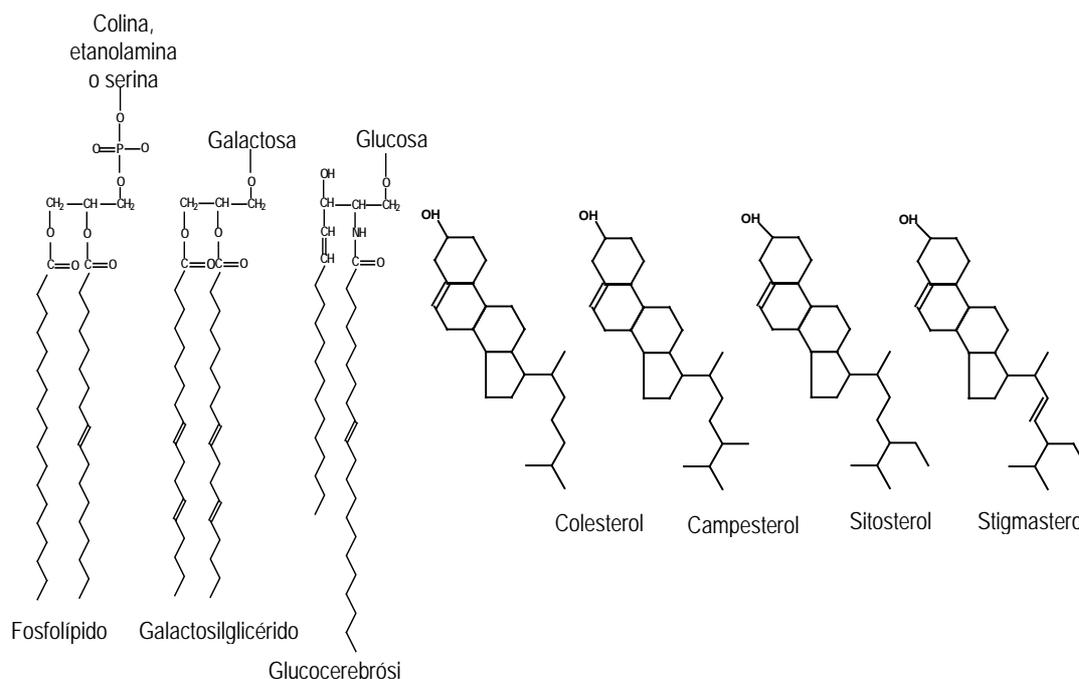


Fig. 4 Lípidos y esteroides encontrados en membrana plasmática de plantas (Buchanan *et al.* 2000).

Los principales ácidos grasos de las membranas plasmáticas de las plantas y la mayoría de otros organismos, tienen una longitud de cadena de 16 a 18 átomos de carbono y contienen de uno a tres dobles enlaces en configuración *cis*. Los ácidos palmítico (16:0), ácido oleico (18:1), ácido linoléico (18:2), y el ácido linolénico (18:3), y algunas especies de ácido hexadecatrienoico (16:3) constituyen más del 90 % de las cadenas aciladas de la estructura de los glicerolípidos de casi todas las membranas vegetales (Clarkson *et al.* 1980; Mas *et al.* 1994; Olson *et al.* 1994; Ohlrogge y Browse, 1995; Burgos y Donaire, 1996), lo cual contrasta con las membranas plasmáticas de animales, en donde predominan el ácido palmítico, el ácido esteárico (18:0) y el ácido araquidónico (20:4). A pesar de estas diferencias, el grado de insaturación de los ácidos grasos en la membrana plasmática es similar en las membranas plasmáticas de plantas y animales (Larsson *et al.* 1990).

### 1.6.5 Composición proteica de las membranas

La membrana plasmática tiene en su interior un gran número de proteínas específicas que facilitan distintas funciones como el transporte, la comunicación y la transducción de energía. El modelo de membrana del mosaico fluido incluye dos tipos básicos de proteínas de membrana: proteínas periféricas (extrínsecas) y las proteínas integrales (intrínsecas). Recientemente se han descubierto cuatro clases adicionales de proteínas de membrana, proteínas unidas a ácido graso, proteínas unidas a grupos prenilo, proteínas ancladas a fosfatidilinositol y proteínas ancladas a colesterol, estas últimas sólo han sido descubiertas en células animales (Buchanan, 2000).

Las proteínas de membrana pueden dividirse en proteínas periféricas (extrínsecas) e integrales (intrínsecas) de acuerdo a sus diferencias en solubilidad:

A. Las proteínas periféricas de membrana o extrínsecas son aquellas que están unidas a la membranas a través de interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógeno, se disocian de la membrana por procedimientos relativamente suaves que dejan intacta la membrana, tales como la exposición a soluciones salinas de elevada fuerza iónica, agentes quelantes de metales o cambios de pH (Voet y Voet, 1990).

B. Las proteínas integrales de membrana dependen de interacciones hidrofóbicas para asociarse con las membranas. Este tipo de proteína membranal requiere que las cadenas laterales de aminoácidos apolares queden expuestas en su superficie para asociarse con las cadenas apolares de las cadenas hidrocarbonadas que integran la matriz interna de la bicapa (Bohinski, 1991). Las proteínas integrales de membrana tienen estructuras regulares, incluyendo hojas  $\beta$ , aunque las hélices  $\alpha$  son las estructuras más comunes de estas proteínas. Las proteínas integrales están fuertemente unidas a la membrana por fuerzas hidrofóbicas y sólo pueden ser separadas de éstas por tratamiento con agentes que rompen la membrana. Éstos incluyen solventes orgánicos, detergentes, y agentes caotrópicos (iones que interrumpen la estructura del agua) (Voet y Voet, 1995).

### 1.6.6 Composición de carbohidratos en las membranas

Muchos constituyentes de las membranas biológicas pueden estar glicosilados. Los oligosacáridos se sitúan en la superficie externa de las células eucariotas por lo que contribuyen a la asimetría de la membrana. Pueden estar unidos a lípidos (glicolípidos), o a las proteínas (glicoproteínas). Aunque más de 50 carbohidratos han sido identificados en la naturaleza, sólo 9 (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, L-fucosa, L-arabinosa, D-xilosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido n-acetil-neuramínico) han sido encontrados en membranas biológicas. Las proteínas encontradas en la cara externa de la membrana contienen oligosacáridos unidos a residuos de arginina (principalmente), serina y treonina mediante enlaces n-glicosídico (entre la arginina y el N-acetil-glucosamina) y enlaces o-glicosídicos con serina o treonina. En los glicolípidos, el oligosacárido se encuentra unido en la posición 3 del glicerol mientras que los ácidos grasos son esterificados en las posiciones 1 y 2 (Howard, 1993).

## 1.7 BALSAS DE LÍPIDOS

El concepto de balsas lipídicas se originó de estudios sobre la distribución de esfingolípidos en membranas polarizadas de células epiteliales (Simons y Meer, 1988). Se propuso que las balsas lipídicas son entidades dinámicas enriquecidas en esteroides y esfingolípidos presentes en la hoja externa de la membrana plasmática que no están distribuidos de manera uniforme, y que se presentan como una agrupación en la fase líquido ordenada que flota en la fase líquido desordenada, la cual es más extensa y fluida (Simons e Ikonen, 1997). La gran afinidad entre esfingolípidos y colesterol permite su asociación espontánea y estable y radica en la rigidez estructural de la parte de la esfingosina de la ceramida de los esfingolípidos, y en la rigidez de la estructura de la parte cíclica y planar del colesterol, la cual favorece la disposición trans de las colas hidrocarbonadas (Ahmed *et al.* 1997; Brown y London, 1998; Xu *et al.* 2001). Estas características estructurales de los esfingolípidos y colesterol dan por resultado una estructura rígida, compacta y estable, con un alto ordenamiento y baja movilidad de la parte hidrofóbica de sus componentes, originando una fase líquido ordenada que se ha denominado balsas lipídicas o microdominios (van Blitterswijk *et al.* 1987).

Se ha propuesto que las propiedades físicas de los microdominios dependen básicamente de las proteínas que pueden estar presentes dentro de los mismos o bien situadas en sus fronteras con la fase fluida de la bicapa lipídica, sugiriendo que la composición molecular de las balsas lipídicas difiere del resto de la MP por albergar a un grupo específico de proteínas integrales y asociadas a la membrana como las proteínas G ancladas a lípido o unidas covalentemente a glicosilfosfatidilinositol (GPI), un típico lípido-ancla (Simons e Ikonen, 1997; Munro, 2003).

De acuerdo a las características de insolubilidad en detergente, las balsas lipídicas también conocidas como microdominios suelen llamarse membranas resistentes a detergente (DRMs), membranas enriquecidas en glicolípidos insolubles en detergente (DIG), membranas enriquecidas en glicolípidos

(GEM), fracciones flotantes insolubles en tritón (TIFF), membranas insolubles en tritón (TIM) (Brown y London, 2000). Una subcategoría de los microdominios son las caveolas, las cuales son invaginaciones de la MP y cuyo componente principal es la proteína caveolina (Simons y Toomre, 2000).

### 1.7.1 Función de las balsas lipídicas

Existen reportes que indican que las balsas lipídicas juegan un papel importante en diversos procesos biológicos, incluyendo numerosas vías de transducción de señales, apoptosis, adhesión celular y migración, transmisión sináptica, organización del citoesqueleto y en la clasificación de proteínas durante la exocitosis y la endocitosis (Munro, 2003).

Las balsas lipídicas han sido implicadas en la parte de la transducción de señales transmembranal, ya que en los DRMs se lleva a cabo el reclutamiento y concentración de varios receptores y componentes de señalización (Simons y Toomre, 2000). Receptores para varios factores de crecimiento y hormonas han sido localizados presuntamente en microdominios (Okamoto *et al.* 1998); además, se ha demostrado que muchas moléculas de señalización tales como receptores de tirosina cinasas, isoformas de la proteína C cinasa, proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAP), adenilato ciclasa, intermediarios de señalización lipídica y subunidad  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas se encuentran enriquecidas en los DRMs (Okamoto *et al.* 1998). Con estas evidencias se ha propuesto que las balsas lipídicas representan "plataformas de señalización" en las cuales varios componentes de cascadas de transducción de señales se concentran localmente (Hoessli *et al.* 2000).

Otra función atribuida a las balsas lipídicas es su participación en la organización del citoesqueleto por asociación con regiones celulares ricas en actina (Oliferenco *et al.* 1999; Simpson-Holley *et al.* 2002; Wickström *et al.* 2003; Falk *et al.* 2004).

Recientemente, la muerte celular programada (apoptosis) ha sido relacionada con las balsas lipídicas (García *et al.* 2003). Se ha reportado que muchos receptores de muerte celular y sus ligandos se encuentran enriquecidos en los DRMs, lo cual sugiere que la asociación lateral de las balsas lipídicas concentra receptores y a sus ligandos en los microdominios, provocando la activación de una potente respuesta apoptótica (Gajate y Mollinedo, 2005).

Por otra parte, se ha sugerido que los microdominios de membrana plasmática actúan como portales para la entrada de patógenos y la importación de ciertas macromoléculas dentro de la célula hospedera y su subsecuente translocación a diferentes sitios subcelulares (Rosenberger *et al.* 2000).

### 1.7.2 Balsas lipídicas en plantas

El análisis de fracciones de membranas insolubles en Triton X-100 de células vegetales revelan resultados similares a los obtenidos en DRMs de células animales. Algunas evidencias son la identificación de polipéptidos residentes en los DRMs de plantas (por ejemplo, PM-ATPasa, ERD4, SKU5, acuaporinas y proteínas 14-3-3). También se encontró que los DRMs de células animales y vegetales

presentan series de proteínas similares, las cuales incluyen polipéptidos anclados a GPI, ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP y moléculas de señalización, lo cual fortalece la idea de que estas proteínas están posiblemente asociadas a una fracción lipídica en particular. Otra característica es que parece que los DRMs están enriquecidos en esteroides y esfingolípidos o al menos podrían poseer proporciones elevadas de esteroides/proteína y esfingolípidos/proteína, respectivamente (Bhat y Panstruga, 2005). Reportes previos muestran que los DRMs de plantas presentan algunas diferencias con respecto a los DRMs de animales y levaduras, por ejemplo, los DRMs de tabaco presentan una alta flotabilidad debido posiblemente a una baja relación de lípido/proteína de los DRMs (Mongrand *et al.* 2004). Además, los esteroides y esfingolípidos de plantas presentan una mayor diversidad estructural que en su contraparte en animales y levaduras (Sperling and Heinz, 2003).

## 1.8 EVENTOS EN LOS QUE PARTICIPA LA MEMBRANA PLASMÁTICA ANTE EL ATAQUE DE PATÓGENOS

Las respuestas iniciales detectadas en células de plantas infectadas por patógenos se dan en la región del apoplasto, y en particular en la membrana plasmática. Entre ellas las más documentadas son la interacción de productos del patógeno con receptores, la activación de canales iónicos y la producción de peróxido de hidrógeno. Estas respuestas de defensa tempranas están instrumentadas por proteínas unidas a la membrana plasmática tales como la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> (Lam *et al.* 1998) y la ATPasa de H<sup>+</sup> (Vera-Estrella, 1994), canales iónicos (Gelli *et al.* 1997; Zimmermann, 1997) y por la NADPH oxidasa unida a la membrana (Desikan, 1996; Xing *et al.* 1997). La consecuencia inmediata de la acción de estas moléculas son los flujos iónicos, principalmente influjo de Ca<sup>2+</sup> y H<sup>+</sup>, la salida de K<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> y Cl<sup>-</sup>, y la formación del radical superóxido, así como el desencadenamiento de la señalización intracelular en respuesta a la llegada del patógeno.

### 1.8.1 Recepción de estímulos (elicitors, toxinas)

Las plantas se han adaptado a percibir una gran variedad de moléculas de señalización denominadas elicitors, que inducen la respuesta de defensa. En las interacciones específicas, los elicitors son moléculas codificadas por genes de avirulencia (*Avr*) del patógeno, los cuales son reconocidos por receptores putativos de la planta hospedera, este reconocimiento es seguido por la activación de una cascada de transducción de señales que resulta en la activación de genes de defensa y la expresión de resistencia a la enfermedad en la planta hospedera (Vera Estrella *et al.* 1994). Por ejemplo, en un elicitor raza específico, el producto putativo del gen de avirulencia *avr5* del hongo patógeno *Cladosporium fulvum*, induce un incremento rápido en especies reactivas de oxígeno, peroxidasas y compuestos fenólicos en células de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) que llevan el gen de resistencia complementario *Cf5*. Estos cambios rápidos en la superficie de la célula están involucrados en la activación de respuestas de defensa inducibles vía un receptor de alta afinidad localizado en la membrana

plasmática de la célula hospedera (Vera-Estrella *et al.* 1992). Por otro lado, 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). Por ejemplo, el elicitador oligosacárido del hongo patógeno de soja *Phytophthora megasperma* identificado como un hepta - $\beta$ -glucopiranosido, induce la síntesis de fitoalexinas (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 la soja *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). El glicopéptido del hongo patógeno del chícharo *Mycosphaerella pinodes*, induce una rápida alcalinización y un incremento en los niveles de iones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en el espacio extracelular de tejidos de chícharo y cowpea; el influjo de estos iones podría estar estrechamente asociado con el inicio de respuestas de defensa y con sistemas de transducción de señales (Amano *et al.* 1997).
- Flagelina: es un importante factor de virulencia de bacterias patógenas. flg22 es un péptido sintético que incluye la región N-terminal de la flagelina y que está altamente conservada en diferentes especies de bacterias. Células en suspensión de *Lycopersicon* y *Arabidopsis* inducen una explosión oxidativa, deposición de calosa, producción de etileno, activación de MAP cinasas e inducción de los genes de defensa: PR1, PR5, PAL1 y GST1, como respuesta a la exposición de las células a la flg22 (Gómez-Gómez y Boller, 2002).
- Esfingolípidos: los cerebrósidos A y C purificados del hongo patógeno del arroz *Magnaporthe grisea* constituyen un novedoso grupo de elicitores que inducen la síntesis de fitoalexinas y respuestas de hipersensibilidad en hojas de arroz (Koga *et al.* 1998).
- Otro tipo de elicitador derivado de patógenos son las micotoxinas AAL producida por el patógeno de tomate *Alternaria alternata* y la fumonisina B1 (FB1) producida por el patógeno de maíz *Fusarium verticillioides*. Se ha reportado que AAL y FB1 inducen muerte celular en hojas de tomate y protoplastos (Wang *et al.* 1996; Moore *et al.* 1999). También se ha reportado que FB1 desarrolla lesiones reminiscentes de la respuesta de hipersensibilidad, las cuales incluye la generación de intermediarios reactivos de oxígeno, deposición de compuestos fenólicos y callosa, acumulación de fitoalexinas, y la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR) en plantas de *Arabidopsis* (Stone *et al.* 2000).

### 1.8.2 Transducción de la señal (receptores, cinasas)

La membrana plasmática es el sitio donde la interacción elicitador-receptor inicia la vía de transducción de señales que lleva a la resistencia de la planta hospedera. Los receptores de membrana plasmática pueden percibir y responder a diversos estímulos externos. En la mayoría de los casos, ésto se

lleva a cabo por la unión de ligandos específicos a receptores membranales, los cuales inducen cambios conformacionales que influyen la actividad de efectores corriente abajo (Callow y Gree, 1996).

La transducción de señales frecuentemente involucra la generación de segundos mensajeros, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , y cambios en la fosforilación de proteínas. Se sabe que las cascadas de señalización están involucradas en las respuestas de defensa a patógenos a diferentes niveles (Sheel, 1998), los cuales, están determinados por el equilibrio entre las actividades de las proteínas cinasas y proteínas fosfatasas relacionadas. Algunos genes *R* (*Xa21* de *Oryza sativa* y *FLS2* de *Arabidopsis*) 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 interactúan 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 proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) son los componentes posteriores a los receptores que transducen los estímulos externos en respuestas intracelulares (Zhang y Klessig, 2001). La activación rápida y transitoria de la MAPK que responde a elicitores 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, ya que 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 y Klessig, 1997). La SIPK también es activada por dos elicinas y una preparación cruda de elicitores de 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).

### 1.8.3 Reservorio de lípidos señalizadores

Los lípidos presentan diversas funciones importantes en las plantas, principalmente como componentes estructurales de las membranas y almacenes de energía. En plantas, las membranas celulares sirven también como reservorio de lípidos biológicamente activos, de donde se liberan precursores de lípidos oxidados, como las oxilipinas. Algunas de estas oxilipinas, como el ácido jasmónico (JA), son importantes moléculas señal en la defensa de plantas contra patógenos (Shah, 2005). Las oxilipinas son potentes moléculas de señalización en las respuestas de defensa en animales y plantas. El punto de inicio de la síntesis de oxilipinas es catalizado por lipoxigenasas (LOXs), la cual añade oxígeno molecular a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) para dar el correspondiente ácido graso hidroperoxidado. Los productos derivados de LOX se acumulan en plantas en respuesta al ataque por patógenos y por tratamientos con inductores de la respuesta de defensa en plantas (Weber, 2002).

Los esfingolípidos, un tipo de lípido particularmente abundante en las membranas plasmáticas, participan activamente en las funciones generales de éstas en células animales: comunicación célula-

célula, reconocimiento celular, regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis (Hakomori, 1990). Los esfingolípidos modulan la transducción de señales transmembranales vía sus efectos sobre proteínas cinasas asociadas con receptores de factores de crecimiento y sobre una proteína cinasa C (Hakomori, 1990). Se ha mostrado que las ceramidas, funcionan como segundos mensajeros en vías de transducción de señales que participan durante la apoptosis (Obeid *et al.* 1993; Hannun, 1996) y donde el doble enlace en la posición 4E- de la base esfingoidea es importante para que lleve a cabo su función (Bielawska *et al.* 1993). En plantas, recientemente se reportó que el metabolito esfingolípido, esfingosina-1- fosfato (S1P) es una molécula señalizadora involucrada en la regulación por ácido abscísico (ABA) del turgor de células guarda (Ng *et al.* 2001). Este metabolito S1P funciona como un mensajero intracelular y un ligando extracelular para receptores acoplados a proteínas G que regulan diversos procesos biológicos que van desde proliferación celular hasta apoptosis.

Por otra parte, se ha reportado que los fosfolípidos desempeñan una función importante en la señalización, ya que los productos derivados de éstos y que son generados por la fosfolipasa A (PLA), fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD) participan como moléculas de señalización que median diversos procesos celulares (Ryu, 2005; Yamaguchi *et al.* 2005; Shah, 2005). Por ejemplo, el ácido fosfatídico (PA) es una potente molécula señalizadora en plantas y animales que modula la actividad de cinasas, fosfatasas, fosfolipasas, proteínas que participan en el tráfico membranal, señalización por  $Ca^{2+}$ , y en el estallido oxidativo (Munnik, 2003; Wang, 2004). Ácidos grasos regulan la actividad de enzimas involucradas en la generación de moléculas señal en la defensa de plantas, por ejemplo, la actividad de la PLD $\delta$ , la cual protege a las células de la muerte celular inducida por el estallido oxidativo, esta enzima es estimulada por el ácido oléico, ácido graso insaturado (18:1) (Wang y Wang, 2001).

#### 1.8.4 Inducción de la expresión de genes de defensa

La activación de vías de transducción de señales relacionadas con las 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. La activación de ciertas enzimas durante los eventos de señalización es una característica importante para la defensa en plantas y algunas de estas proteínas son clave en el metabolismo activado durante la interacción planta-patógeno. Un ejemplo es la fenilalanina amonio liasa, enzima clave en la ruta de los fenil propanoides; la catalasa, la cual tiene un papel importante durante el estrés oxidativo, y también enzimas y proteínas que son secretadas para la defensa directa de la planta como la proteína rica en hidroxiprolina que refuerza la pared celular, las quitinasas y glucanasas, enzimas líticas que degradan la pared celular de los hongos.

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 hidroxilasa (4-CL) se

induce de manera importante durante la patogénesis, lo cual conduce a la activación de varias ramas de la vía 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).

Las plantas tienen distintas enzimas y metabolitos antioxidantes localizados en diferentes compartimentos celulares; los principales son la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); y las catalasas (CAT) que catalizan la remoción de  $H_2O_2$ ; estas últimas son las más importantes en la remoción de  $H_2O_2$ . Aunque las propiedades y requerimientos son diferentes, estas proteínas funcionan efectivamente en paralelo. La catalasa no requiere de poder reductor y tiene una alta velocidad de reacción pero una baja afinidad por el  $H_2O_2$ , de tal modo que sólo lo elimina cuando hay una concentración muy alta. La capacidad antioxidante es entonces dependiente de la severidad del estrés, así como de la especie vegetal y su estado de desarrollo. La mayoría de estas enzimas se han encontrado en cloroplasto, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Bolwell y Wojtaszek, 1997).

Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP: hydroxyproline- rich glycoprotein) o extensinas, localizadas en pared celular parece que contribuyen con la defensa de la planta, ayudando a protegerla contra el ataque de los patógenos, elicitación o daño mecánico. Se ha mostrado que las extensinas se acumulan en la pared celular cerca de los sitios donde el crecimiento microbiano es restringido por la planta, y que elicitores fúngicos y pequeños galacturónidos pueden provocar la expresión de genes de extensinas, mientras que fragmentos peptídicos de alto peso molecular y algunos compuestos de ácido galacturónico, tienen la habilidad de suprimir la deposición de hidroxiprolina en la pared celular y la expresión de genes de extensinas (Cassab, 1998).

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 denominan genes *PR*. Algunas proteínas *PR* poseen actividades enzimáticas que actúan directamente en contra del patógeno, como la familia *PR-2* formada por la endo- $\beta$ -1, 3-glucanasas y las *PR-3*, -4, -8 y -11 clasificadas todas como endoquitinasas (Van Loon y van Serien, 1999). Los genes de quitinasas de plantas son inducidos en respuesta a la invasión de patógenos, tratamientos con elicitores, metales pesados y condiciones de estrés tales como la exposición a la hormona etileno. Además, las quitinasas de plantas, ya sea solas o en combinación con las  $\beta$ -1, 3-glucanasas inhiben el crecimiento micelial por rompimiento masivo de la pared celular de un gran número de hongos (Cohen- Kupiec y Chet, 1998).

## 1.9 COMPUESTOS ESFINGOIDEOS COMO MODULADORES EN PLANTAS

### 1.9.1 Esfingolípidos

Los esfingolípidos son componentes ubicuos de las membranas en células eucariotas y en algunas bacterias son sintetizados en el retículo endoplásmico (ER) y Golgi, pero están enriquecidos en la membrana plasmática y endosomas, en donde se encuentran realizando diversas funciones (Van Meer y Lisman, 2002; Koga *et al.* 1998). Su estructura química difiere de la mayoría de los glicerolípidos en que tienen un esqueleto de ceramida (Sperling y Heinz, 2003).

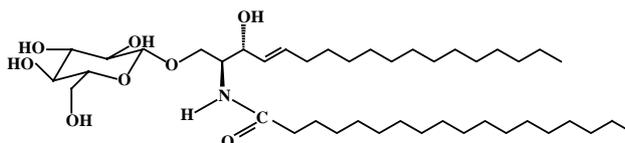


Fig. 5 Estructura de la glucosil ceramida, un esfingolípido complejo

Los esfingolípidos (Fig. 5) se sintetizan a partir de bases esfingoideas (aminoalcoholes de cadena larga) con un grupo amino en el C-2 y dos grupos hidroxilo en el C-1 y C-3. 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 el C-1 para generar esfingolípidos más complejos tales como cerebrósidos y GIPC (glucosilinositolfosforilceramidas), que se forman por adición de uno o varios residuos glicosilo y otros grupos polares fosforilados a la ceramida. La estructura base de la ceramida puede ser modificada por la presencia de grupos hidroxilo adicionales, grupos metilo y centros de insaturación (Sperling and Heinz, 2003).

### 1.9.2 Biosíntesis *de novo* de esfingolípidos

La biosíntesis de los esfingolípidos (Fig. 6) se inicia en el retículo endoplásmico con la condensación de un ácido graso activado como palmitoil-CoA, con L-serina para producir 3-cetoesfinganina, catalizada por la enzima *serina palmitoiltransferasa* (SPT) (Lynch, 2000). La reacción puede ser inhibida específicamente por L-cicloserina,  $\beta$ -cloro-L-alanina y algunas micotoxinas (Lynch, 2000; Zweerink, *et al.* 1992).

En el segundo paso, la 3-cetoesfinganina es reducida con NADPH por la NADP<sup>+</sup> 3-cetoesfinganina oxidoreductasa para dar esfinganina (D-*eritro*-2-amino-1,3-dihydroxialcano). En la siguiente reacción, el grupo amino de la esfinganina es acilado para producir ceramida (N-acil-esfinganina). La D-*eritro*-esfinganina y la D-*eritro*-esfingosina sirven como sustratos para la esfinganina-N-aciltransferasa (ceramida sintasa), mientras que la fitoesfingosina y la D-*treo*-esfinganina no lo son.

Una vez que la ceramida ha sido sintetizada, tanto a la base esfingoidea como al ácido graso se introducen enzimáticamente insaturaciones y/o hidroxilaciones para generar las distintas formas de esfingolípidos encontradas en las células. En plantas, la esfinganina puede sufrir una insaturación en C4 para dar (E)-4-esfingenina o puede ser hidroxilada en la misma posición para dar 4-hidroxiesfinganina

(fitoesfingosina); a estas estructuras se les puede introducir una insaturación adicional en el C8 para dar los correspondientes isómeros *cis/trans*. La ceramida sufre otras modificaciones importantes para la formación de esfingolípidos complejos como cerebrósidos y GIPC (glicosil inositol fosforilceramida). Estas modificaciones se dan por la adición de grupos polares (generalmente carbohidratos de mayor o menor complejidad), al C1 de la ceramida.

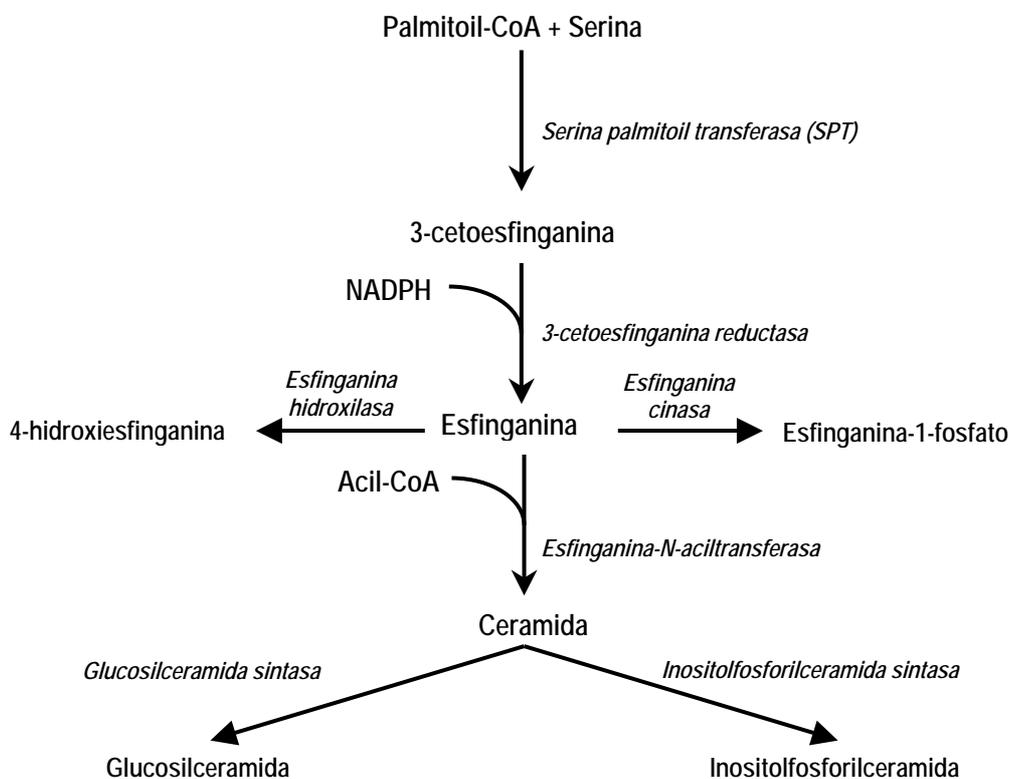


Fig. 6 Biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en plantas (Sperling and Heinz, 2003).

### 1.9.3 Bases esfingoideas

La base esfingoidea más abundante en animales es la esfingosina, mientras que en la levadura *S. cerevisiae* (la cual ha sido un organismo modelo para el estudio del metabolismo de esfingolípidos), la base esfingoidea predominante es la 4-hidroxiesfinganina (fitoesfingosina) formada por la hidroxilación de la esfinganina en el C-4, mientras que la composición de bases esfingoideas en plantas es variable, siendo más de ocho diferentes bases derivadas de la D-eritro-esfinganina (Fig. 7). Algunas de estas bases contienen insaturaciones 4(E) y 8(E/Z); los isómeros predominantes entre las bases esfingoideas insaturadas de plantas son la (E/Z)-8-esfingenina, la (4E, 8E/Z)-4,8-esfingadienina y la (8E/Z)-4-hidroxi-8-esfingenina (dehidrofitoesfingosina). La esfinganina y fitoesfingosina se encuentran en bajas proporciones, mientras que la esfingosina se ha detectado hasta muy recientemente en células estomáticas (Ng *et al.* 2001; Coursol *et al.* 2003; Pandey y Assmann, 2004).

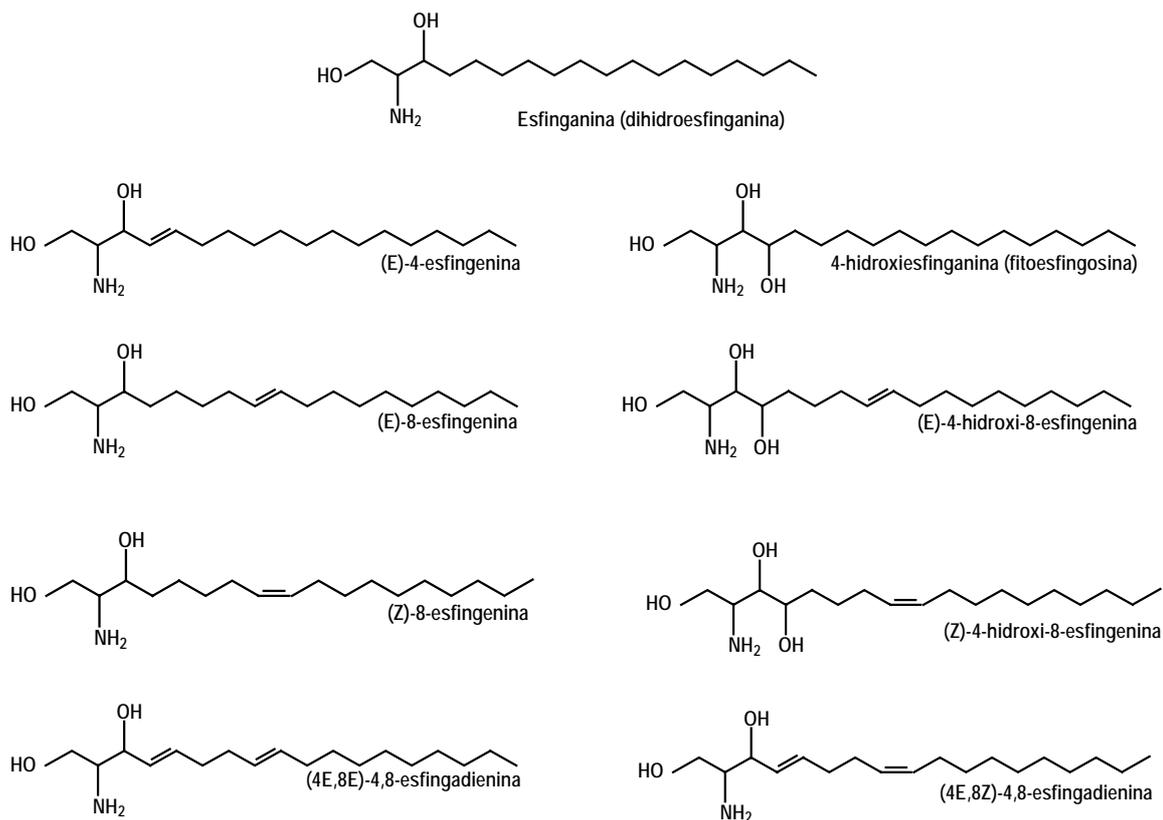


Fig. 7 Bases esfingoideas más comunes en plantas (Sperling and Heinz, 2003).

#### 1.9.4 Funciones generales de los esfingolípidos

Además de ser elementos importantes en la organización membranal (Futerman, 1995), los esfingolípidos juegan un papel muy importante en procesos celulares, funcionando como segundos mensajeros y regulando varias funciones celulares como la diferenciación, crecimiento, apoptosis (Spiegel y Merrill, 1996) y defensa ante patógenos (Sperling y Heinz, 2003). A continuación se describen algunas funciones de los esfingolípidos en algunas especies:

#### 1.9.5 Esfingolípidos bioactivos en mamíferos y levaduras *S. cerevisiae*.

Éstos son: esfingosina, ceramida y las correspondientes especies fosforiladas.

##### Esfingosina

La esfingosina, es capaz de atravesar rápidamente 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 y Sakane, 1993). La esfingosina también activa específicamente a un grupo 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). 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).

### **Ceramida**

La ceramida es uno de los compuestos más estudiados, ya que está implicada en la regulación de procesos claves tales como la inhibición del crecimiento, diferenciación y apoptosis (Dagan *et al.* 2003), siendo la apoptosis el efecto más estudiado. Se ha demostrado que la acumulación de la ceramida tiene un efecto regulador y que en muchos casos es necesaria para la ejecución de la fase apoptótica en la que interviene la mitocondria (Hannun y Luberto, 2000). A nivel molecular se han identificado cuatro blancos de la ceramida que son:

1. Fosfatasa activada por ceramida (CAPP). Estas proteínas comprenden a las fosfatasa de serina/treonina PP1 y PP2A. Su activación por ceramida presenta estereoespecificidad y requerimiento estricto del doble enlace 4(E) en la base esfingoidea.
2. Cinasa activada por ceramida (CAPK). Esta proteína 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).
3. 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, que ocurre después de la activación de la catepsina D (Heinrich *et al.* 1999).
4. 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).

### **Fitoesfingosina**

Los niveles de la fitoesfingosina 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; Skryzpek *et al.* 1999). La combinación de estudios farmacológicos y genéticos han mostrado que la fitoesfingosina y la 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. Se ha encontrado también que las bases esfingoideas son necesarias para el arresto transitorio del ciclo celular, por el cual las levaduras responden al choque térmico (Jenkins y Hannun, 2001).

## **Esfingosina-1-fosfato (S1P)**

Varios efectos biológicos como factores de crecimiento (PDGR y EGF) y citocinas (TNF $\alpha$ ) promueven la biosíntesis de esfingosina-1-fosfato al activar esfingomielinasas, ceramidasa y cinasas de esfingosina (Olivera y 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 y Kolesnick, 1990) y en el cerebro (Shinghal *et al.* 1993), identificándose dos fosfatasa que la hidrolizan específicamente, por lo que también podría ser importante en la regulación de funciones celulares. Se ha identificado 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, también se encontró que 25  $\mu$ M de Cer1P activa la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (Gómez-Muñoz *et al.* 1995, 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 a la cual 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).

### **1.9.6 Función de los esfingolípidos en plantas**

Hay poca información sobre las funciones de los esfingolípidos en plantas, pero se ha propuesto que pueden ser importantes mediadores celulares, al igual que en animales y hongos. Se ha encontrado que los esfingolípidos confieren estabilidad a las membranas contribuyendo a la adaptación al estrés por sequía (Norberg *et al.* 1991) y heladas (Lynch y Steponkus, 1987; Imai *et al.* 1995, 1997a, 1997b; Kawaguchi *et al.* 2000). 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 y Steponkus, 1987; Uemura y Steponkus, 1994; Uemura, 1995).

Por otra parte, se ha encontrado que la esfingosina-1-fosfato (S1P) participa en la señalización por ácido abscísico (ABA) durante el estrés por sequía. Se encontró que los niveles de S1P en extractos lipídicos se incrementan en plantas de *Cammelina communis* sometidas a estrés hídrico (Ng *et al.* 2001), también se demostró que S1P promueve el cierre de los estomas al inducir un incremento en la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup>. Los efectos de la S1P son reversibles y la presencia del doble enlace  $\Delta 4$

es esencial, ya que la esfingalina-1-fosfato no afecta la apertura de los estomas. Estos experimentos demostraron también 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 (Ng *et al.* 2001).

Se ha descrito que algunos cerebrósidos tienen actividad elicitora específica, ya que inducen la respuesta de hipersensibilidad, la acumulación de fitoalexinas y mayor resistencia a infecciones posteriores por patógenos compatibles en plantas (Koga *et al.* 1998). 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 el 3(E) en la acil amida no afectan su actividad elicitora, esto indica que las modificaciones estructurales en las bases esfingoideas de los esfingolípidos contribuyen a las diferentes respuestas celulares en las interacciones planta-patógeno.

Se encontró que durante la HR que desarrolla la papa ante la infección por *Phytophthora infestans* hay un aumento en 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 (Birch *et al.* 1999). También se han encontrado semejanzas entre la HR inducida en plantas de *Arabidopsis* por patógenos avirulentos y las respuestas a la FB1, como son: acumulación de especies reactivas de oxígeno, producción de camalexina (fitoalexina) y activación de la expresión de genes de defensa. Hay evidencias que sugieren que la toxina AAL induce muerte celular programada (PCD) como resultado de alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos y que PCD está asociada a la acumulación de bases esfingoideas libres, dihidroesfingosina y 3-cetodihidroesfingosina (Spassieva *et al.* 2002).

### 1.9.7 Inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos

#### Miriocina

La miriocina (Fig. 8) es un compuesto producido por *Isaria (Cordyceps) sinclairii*, organismo entomopatogénico. La miriocina posee actividad inmunosupresora, por lo que con base en su estructura se desarrolló el fármaco FTY720, cuya aplicación clínica actualmente se está evaluando en transplantes en humanos (Napoli, 2000). Se ha visto que 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, ceramidas y esfingolípidos complejos, ya que inhibe de manera específica a la SPT (Miyake *et al.* 1995). Por otro lado, se ha observado que la disminución en los niveles de esfingolípidos afecta negativamente el crecimiento 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). 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.

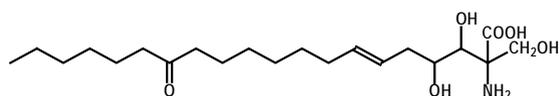


Fig.8 Estructura de la miriocina, un inhibidor muy potente de la SPT.

### Fumonisina B1 (FB1)

Algunos hongos fitopatógenos necrótrofos, sintetizan una amplia variedad de compuestos fitotóxicos, entre éstos se incluyen toxinas análogas a esfinganina, las cuales son producidas por al menos dos especies de hongos no relacionados, *Alternaria* y *Fusarium* spp. Fumonisina B1 (FB1) (Fig. 9), es una de varias toxinas análogas a la esfinganina producida por algunos hongos de *Fusarium* spp, principalmente *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) (Desjardins *et al.* 1995). FB1 despierta una forma apoptótica de muerte celular programada (PCD) tanto en tejidos vegetales, como en células animales en cultivo (Tolleson *et al.* 1996; Wang *et al.* 1996<sup>a</sup>), probablemente a través de la inhibición competitiva con la ceramida sintetasa (esfinganina-N-acil transferasa), enzima clave en la biosíntesis de esfingolípidos (Wang *et al.* 1990). Los esfingolípidos, como ya se mencionó, juegan papeles diversos en muchos procesos celulares actuando como anclas para proteínas de membrana (Futerman, 1995) y como segundos mensajeros regulando varias funciones celulares, incluyendo diferenciación, crecimiento y apoptosis.

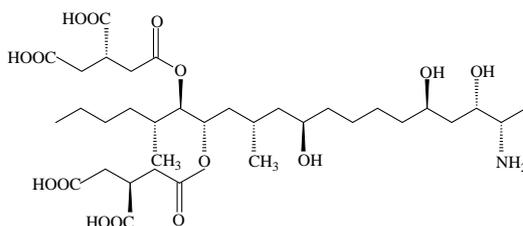


Fig. 9 Estructura de la Fumonisina B1, un inhibidor de la esfinganina N-acil transferasa.

### Toxina AAL

La toxina AAL (Fig. 10) es producida por el hongo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* que infecta plantas de tomate homocigotas con genotipo asc/asc, induciendo muerte celular, mientras que plantas con genotipo homocigotas dominantes Asc/Asc son resistentes a la acción de la toxina. La toxina AAL al igual que la FB1 inhiben la síntesis de ceramida. Sin embargo, esta toxina induce efectos tóxicos en plantas, animales y humanos (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.

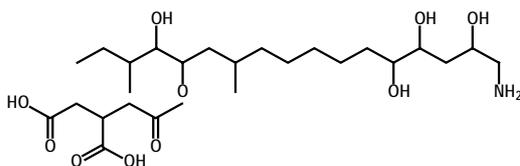


Fig. 10 Estructura de la toxina AAL, un inhibidor de la esfinganina N-acil transferasa.

## 2 ANTECEDENTES INMEDIATOS

La implicación de los esfingolípidos en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos está sustentada en los antecedentes en la literatura que se mencionaron en las líneas anteriores y en evidencias experimentales que nuestro grupo de trabajo ha acumulado recientemente y que se han derivado del uso de la Fumonisina B1 en embriones de maíz. Esta toxina tiene una similitud estructural con las bases esfingoideas, por lo que resulta un inhibidor de la enzima esfinganina-N-aciltransferasa (ceramida sintasa) (Wang *et al.* 1991, Merrill *et al.* 1993), dando como resultado la interrupción de la biosíntesis de esfingolípidos complejos y una acumulación en los sustratos de la reacción que cataliza la enzima y que son las bases esfingoideas. Por ello, la FB1 ha sido empleada como un agente que puede modificar los niveles endógenos de compuestos esfingoideos, generando los efectos que se resumen a continuación:

Por una parte, el grupo del Dr. Plasencia ha encontrado que la FB1 o el aumento en esfinganina induce tres respuestas que corresponden a reacciones de defensa contra patógenos: a) pérdida de la integridad del DNA genómico (Alcántara, 1998) y activación de nucleasas específicas (De la Torre, no publicado), lo cual puede estar asociado a la muerte celular que se presenta en la HR, b) activación transcripcional de genes asociados con la patogénesis (San Juan, 2001) y c) elevación de los niveles de ácido salicílico (Rivas, 2004).

Por otra parte, hemos encontrado efectos de la FB1 localizados en la membrana plasmática y que son dependientes de la acción de la FB1 sobre la esfinganina N-acil transferasa. Estos efectos son: a) inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> originada por una deficiencia de ceramida (Gutiérrez-Nájera, 2003), b) acumulación de esfinganina en la membrana plasmática y acumulación de fitoesfingosina en la fracción microsomal (Gutiérrez-Nájera, 2003), c) disminución en la peroxidación de lípidos membranales (Palacios, 2002), d) disminución de la fluidez membranal (Gutiérrez-Nájera, 2003) y e) aumento en la permeabilidad membranal.

### 2.1 Justificación

Varios de los efectos de la FB1 en los que se presentan respuestas de defensa (exposición de embriones de maíz a la FB1) se han encontrado en condiciones en las que hay cambios en los niveles endógenos de esfingolípidos membranales, por lo que es posible que éstos estén implicados en las reacciones de defensa. Por ello, resulta relevante explorar si se produce un desbalance de esfingolípidos endógenos membranales como consecuencia de una exposición real a patógenos.

Una correlación positiva entre los cambios en los niveles de esfingolípidos membranales y la presencia de una reacción de defensa ante la exposición a un patógeno constituiría una evidencia a favor de que: a) los esfingolípidos pueden estar mediando respuestas de defensa y b) las membranas celulares están involucradas en el proceso.

### 3 HIPÓTESIS

La respuesta de defensa contra patógenos está asociada a una modificación en los niveles de esfingolípidos endógenos membranales en plantas.

### 4 OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de esfingolípidos en fracciones membranales de hojas de *Phaseolus vulgaris* en condiciones en las que la planta presenta reacciones de defensa.

#### 4.1 Objetivos particulares

1. Inducir una respuesta de enfermedad o de resistencia en *Phaseolus vulgaris* por patógenos. Exponer por infiltración hojas de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) canario 60 a la acción de un patógeno bacteriano, al que frijol es resistente, en este caso *Erwinia chrysanthemi* 3937, y a la acción de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* al que frijol es susceptible. En ambas situaciones, establecer condiciones óptimas de infiltración de los patógenos bacterianos (concentraciones, tiempos de exposición), para luego determinar:
  - a) Lesión de HR
  - b) Índice de Enfermedad y proliferación bacteriana
2. Explorar si la adición de FB1 produce una respuesta de defensa en *Phaseolus vulgaris*. Exponer por infiltración hojas de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) canario 60 a la acción de la FB1, estableciendo condiciones óptimas de infiltración de FB1 (concentraciones, tiempos de exposición), para luego determinar:
  - a) Lesión de HR
  - b) Índice de Enfermedad y proliferación bacteriana (cofiltración con FB1)
3. Determinar los niveles endógenos de bases esfingoideas membranales en condiciones en que se presenten reacciones de defensa inducidas por FB1 o patógenos bacterianos. Aislar fracciones membranales de hojas de frijol controles (infiltradas con  $MgCl_2$ ) e infiltradas con FB1 y los patógenos bacterianos y determinar los niveles de bases esfingoideas por TLC o HPLC.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

Los experimentos se realizaron usando plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* Canario 60) de 4 a 5 semanas de edad, con semillas generadas en cultivos de invernadero.

### 5.2 Cultivo del frijol Canario 60

1. Las semillas de frijol se desinfectaron con una solución de etanol al 70 % y se agitaron a temperatura ambiente por 1 min, después se enjuagaron con agua bidestilada varias veces.
2. Posteriormente, se adicionó a las semillas una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 10 min. La solución de hipoclorito se desechó y el frijol se enjuagó con agua bidestilada varias veces, después se les añadió agua bidestilada y se dejaron reposar 2 h a temperatura ambiente.
3. Las semillas se colocaron sobre una charola de plástico que previamente se llenó con agrolita húmeda, el hilo de la semilla quedó en contacto con la agrolita (la semilla no se entierra).
4. La charola se tapó con aluminio y se incubó a una temperatura de 25-29 °C hasta que las semillas germinaron (aproximadamente 5 días). El riego se realizó con agua bidestilada.
5. Una vez que las semillas germinaron (exhibieron un crecimiento radicular de aproximadamente 3 cm), cada una de las plántulas se pasó a un vaso de plástico lleno de agrolita y se regaron alternando con H<sub>2</sub>O y medio de Hoagland-Arnon hasta que alcanzaron una edad de 4 a 5 semanas.

#### Medio Hoagland-Arnon

Macronutrientes		Micronutrientes	
Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
KNO <sub>3</sub>	6 mM	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.009 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.046 mM
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0008 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 mM	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0003 mM
KNO <sub>3</sub>	6 mM	H <sub>2</sub> M <sub>6</sub> O <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.0001 mM
1 mL/L de medio (1g/200mL) Fe-EDTA* pH final: 5.2- 5.5			

\*Fe-EDTA: ácido etilendiamino tetraacético (sal sodio-fierro)

Se usaron diferentes tratamientos para infiltrar los folíolos de frijol: una toxina producida por el hongo *Fusarium verticillioides*, la Fumonisina B1 (FB1), la cepa bacteriana de *Erwinia chrysanthemi* 3937 (Ech), la de *Erwinia carotovora* 71 (Ec), la cepa de *Xantomonas axonopodis* pv *phaseoli* var. *fuscans* (Xapñ) y la cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 RPM1 (Pst).

### 5.3 Infiltración de hojas de frijol

Se seleccionaron plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de 4 a 5 semanas de edad aproximadamente que tenían de 3 a 4 trifolios totalmente extendidos, con un color verde homogéneo y que físicamente se veían sanos. Los folíolos se infiltraron en el envés con 20  $\mu$ L de cada uno de los diferentes tratamientos usando una jeringa de insulina graduada y sin aguja, se aplicó una ligera presión sobre el folíolo de tal manera que no se rompiera y la solución penetrara en el tejido (Yang *et al.* 2002). Se hicieron de 4 a 6 aplicaciones en cada folíolo.

Se usaron las siguientes concentraciones de los diferentes tratamientos:

Tratamiento	Concentración
Fumonisina B1 (FB1)	0.01, 0.1, 1, 5 y 10 $\mu$ M
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937 ( <i>Ech</i> ) y <i>Erwinia carotovora</i> 71( <i>Ec</i> )	1x10 <sup>8</sup> UFC/mL
<i>Xantomonas axonopodis</i> pv <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> ( <i>Xap</i> ñ)	1x10 <sup>8</sup> UFC/mL
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 avr <i>RPM1</i> ( <i>Pst</i> )	1x10 <sup>8</sup> UFC/mL

Como controles, se infiltraron los solventes en los que se encontraban disueltos estos compuestos y cepas bacterianas (H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> y silwet L77). La cosecha de los folíolos que fueron infiltrados y sus controles, se realizó a las 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 y 48 horas post infiltración (hpi), cortando el folíolo entero. El tejido se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -70 °C hasta su análisis. Cabe mencionar que la eficiencia del efecto de la inoculación en la planta depende de factores ambientales (temperatura, humedad y luz), de la planta misma (velocidad de crecimiento y variedad, apertura estomatal, nutrición, manejo después de la inoculación y condiciones fisiológicas) y del patógeno (concentración, edad del inóculo y variación genética) (Coney *et al.* 1973).

### 5.4 Cuantificación del crecimiento bacteriano

Cada uno de los folíolos de frijol se infiltraron con 20  $\mu$ L de una suspensión de *Xantomonas axonopodis* pv *phaseoli* var. *fuscans* (*Xap*ñ) que contenía 1x10<sup>8</sup> UFC/ mL como control positivo de enfermedad y 20  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 10 mM como control negativo de crecimiento de bacterias, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avr *RPM1* (*Pst*), *Erwinia chrysanthemi* 3937 (*Ech*) como control positivo de una HR; además se hizo la infiltración de 20  $\mu$ L de FB1 10  $\mu$ M.

La cuantificación del crecimiento bacteriano en el folíolo se realizó recortando 3 discos de 1 cm<sup>2</sup> en los sitios de infiltración; los tres discos se maceraron en una bolsa de plástico añadiendo 200  $\mu$ L de una solución estéril de MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Se tomaron 100  $\mu$ L del macerado y se diluyó en 4900  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril (dil 1:50), a partir de esta dilución se realizó una serie de diluciones del macerado de las cuales se plaquearon 10  $\mu$ L por quintuplicado de cada dilución en cajas de Petri con medio sólido de agar. Se incubó a 28 °C por 30-48 h y se contaron las UFC (unidades formadoras de colonias). Los resultados se expresaron como el log de UFC/ cm<sup>2</sup> de hoja (Wilson *et al.* 1999; Tornero y Dangl, 2001).

## 5.5 Índice de Enfermedad (IE)

El progreso de la infección por un patógeno en los folíolos infectados se evaluó por medio del Índice de Enfermedad, al cual se le asigna un valor según sea el tamaño de las lesiones en una población expuesta al patógeno. A cada lesión se le asignó un valor de IE de acuerdo con la siguiente escala (Yang *et al.* 2002): 1+ = 1- 19 % de lesión en el sitio de infiltración, 2+ = 20- 39 %, 3+ = 40- 59 %, 4+ = 60- 79 %, 5+ = 80- 100%.

El Índice de Enfermedad se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$IE = \frac{(\# \text{ folíolos grado } 5 \times 5) + (\# \text{ folíolos grado } 4 \times 4) + (\# \text{ folíolos grado } 3 \times 3) + (\# \text{ folíolos grado } 2 \times 2) + (\# \text{ folíolos grado } 1 \times 1)}{\# \text{ total de folíolos}}$$

## 5.6 Obtención de la fracción de vesículas de membrana plasmática

Para la obtención de la fracción de homogenado y microsomal de hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se usaron plantas de aproximadamente 30 a 35 días de edad que previamente fueron seleccionadas e infiltradas. Se cosecharon los folíolos e inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Los folíolos congelados se pesaron y se cortaron en trozos pequeños, se colocaron dentro de un vaso de licuadora. Se añadió el amortiguador de homogenización en una relación 1:3 (p:v), los folíolos se molieron a baja velocidad por 10 segundos y posteriormente a alta velocidad hasta que se observó una suspensión homogénea. Se filtró a través de 4 capas de gasa previamente humedecida con agua destilada, aquí se obtuvo la **fracción de homogenado**. La fracción microsomal de los folíolos de frijol se obtuvo a partir de la fracción de homogenado, ésta se distribuyó en tubos y se centrifugó a 11,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min en microfuga refrigerada Jouan MR1812 utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad. Se tomó el sobrenadante cuidadosamente con pipeta Pasteur y se distribuyó en tubos de policarbonato de 26.3 mL de capacidad y se centrifugó a 45 000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora en una Ultracentrifuga Beckman utilizando el rotor 60 Ti. El botón se resuspendió en amortiguador de ajuste de peso con la ayuda de un pincel y se agregó inhibidores de proteasas al volumen total de **fracción microsomal (FM)** obtenido. La FM se almacenó en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para la obtención de vesículas enriquecidas en membrana plasmática (**VMP**) se partió de la fracción microsomal obtenida en el apartado anterior, y se hizo de acuerdo al método de reparto de un sistema de dos fases acuosas dextran-poli-etilenglicol reportado por Larsson *et al.* (1994) y modificado por Carmona (2006). A la fracción microsomal se le midió la cantidad de proteína y se calculó el volumen necesario para tener 7.2 mg de proteína. Esta se añadió a una mezcla de fases (MF) que se preparó un día antes de su uso. Una vez agregada la proteína, se ajustó el peso a 9 g con amortiguador de ajuste de peso, se mezcló perfectamente bien, invirtiendo el tubo lentamente 25 veces, para después centrifugar a 4,000 rpm por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en microfuga refrigerada Jouan MR1812 utilizando el rotor para

tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad. De esta centrifugación se logró separar dos fases, la fase superior que corresponde al PEG y se le denominó U1 (constituida principalmente por las vesículas de membrana plasmática) y la fase inferior que corresponde al dextran, se le denominó L1 (constituida por otras vesículas celulares), para obtener una mayor pureza de las VMP se transfirió la fase U1 a un sistema de fase (SF) el cual se preparó junto con la mezcla de fase. Al SF se le retiró la fase de PEG (que no contiene membranas) para sustituir esta fase con la fase U1 de la mezcla de fases anterior, se mezcla perfectamente bien, invirtiendo el tubo lentamente 25 veces para después centrifugar a 4,000 rpm por 20 min a 4 °C en microfuga refrigerada Jouan MR1812, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad, de esta segunda centrifugación se logró separar dos fases, de éstas sólo se usó la fase superior U2 que corresponde al PEG; la fase U2 se transfirió a un segundo SF y se mezcla perfectamente bien, invirtiendo el tubo lentamente 25 veces para después centrifugar en las mismas condiciones anteriores, con esta tercera centrifugación se obtienen dos fases más, una fase superior U3, la cual está enriquecida en VMP y que corresponde a la fase de PEG. Por último, la fase U3 se separó cuidadosamente de la fase L3 (fase inferior que corresponde al dextran) y se diluyó 1:3 con amortiguador de lavado y se centrifugó a 45 000 rpm (rotor Beckman 60 Ti) por 1:30 h a 4 °C. El botón obtenido se resuspendió en amortiguador de lavado (100–500 µL), se le agregó inhibidores de proteasas al volumen total y se almacenó en alícuotas a –70 °C. Esta es la **fracción enriquecida en VMP** de folíolos de frijol.

Reactivos utilizados para la obtención de membranas plasmáticas de folíolos de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Amortiguador	Composición
De homogenización	Sorbitol 620 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, β-Mercaptoetanol 15 mM, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 3 mM, pH 8.0, DTT 1 mM, KCl 1 mM, PVP 0.6%, BSA 0.2% y cocktail de inhibidores de proteasas 40 µg/mL
De resuspensión del botón microsomal y De ajuste de peso	Sorbitol 620 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM, pH 7.8, KCl 3 mM, DTT 1 mM y EDTA 0.1 mM, pH 8.0
De lavado	Sorbitol 350 mM, HEPES/MES 2 mM, pH 7.6, DTT 1 mM, KCl 1 mM
*Mezclas de fases	Dextran T500 6.2%, Polietilenglicol 3350 (PEG) 6.2 %, Sorbitol 0.62 M, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM, pH 7.8, KCl 3 mM, DTT 1 mM y EDTA 0.1 mM, pH 8.0, y H <sub>2</sub> O cbp 27 g.
*Sistemas de fases	Dextran T500 6.2%, Polietilenglicol 3350 (PEG) 6.2 %, Sorbitol 0.62 M, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM pH 7.8, KCl 3 mM, DTT 1 mM y EDTA 0.1 mM, pH 8.0, y H <sub>2</sub> O cbp 36 g.

\*La mezcla y sistemas de fases se pueden preparar el día anterior y guardarse a 4°C. Si se prepara el mismo día de la extracción de membranas, tener mucho cuidado de mantener la temperatura de las mezclas y sistemas a 4°C, ya que de no ser así, puede formarse una solución homogénea en lugar de ocurrir la separación de fases.

## 5.7 Determinación de la concentración de proteína para las fracciones microsomal y de membrana plasmática

Se determinó la concentración de proteína de la fracción microsomal, y de las vesículas de membrana plasmática por el método de Lowry modificado por Peterson (1977).

Reactivo A	Mezclar en partes iguales: H <sub>2</sub> O; NaOH 0.8 N; SDS 10 %; CTC (10% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0.1% CuSO <sub>4</sub> y 0.2% tartrato de Na o K).
Reactivo B	Mezclar un volumen del reactivo Folin Cocalteau con 5 volúmenes de agua.

El procedimiento se indica en la siguiente tabla:

Tubo	H <sub>2</sub> O (μL)	BSA (3 μg/μL)	Muestra (μL)	Amortiguador	NaDOC 0.15% (mL)	REACTIVO A (mL)	REACTIVO B (mL)
1	900	-	-	-	0.1	1.0	0.5
2	900	-	-	-	0.1	1.0	0.5
3	899	1	-	-	0.1	1.0	0.5
4	898	2	-	-	0.1	1.0	0.5
5	897	3	-	-	0.1	1.0	0.5
6	895	5	-	-	0.1	1.0	0.5
7	894	6	-	-	0.1	1.0	0.5
8	892	8	-	-	0.1	1.0	0.5
9	890	10	-	-	0.1	1.0	0.5
10	885	15	-	-	0.1	1.0	0.5
11	880	20	-	-	0.1	1.0	0.5
12	875	25	-	-	0.1	1.0	0.5
13	898	-	2	-	0.1	1.0	0.5
14	898	-	2	-	0.1	1.0	0.5
15	898	-	2	-	0.1	1.0	0.5
16	898	-	-	2	0.1	1.0	0.5
17	898	-	-	2	0.1	1.0	0.5
18	898	-	-	2	0.1	1.0	0.5

Notas:

- Se debe agitar después de adicionar el NaDOC y en especial después de agregar el reactivo A.
- Después de agregar el reactivo B se debe incubar 30 min a temperatura ambiente.
- Leer a 750 nm.
- Amortiguador, éste es el amortiguador donde se encuentra diluida la proteína, ya sea de la fracción microsomal o de las vesículas de membrana plasmática.

## 5.8 Extracción de lípidos de fracciones membranales de frijol con acetato de etilo

El procedimiento está basado en la referencia de Castegnaro *et al.* (1998).

A un tubo limpio con tapa se le agregó 1.5 mL de solución de KCl al 0.8 %, 50  $\mu$ L de KOH 1 mM, 4 mL de acetato de etilo ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), la D-esfingosina (SO) como estándar interno (2.166 nmoles) y la fracción membranal en un volumen total de 100  $\mu$ L. Se tapó el tubo y por agitación suave durante 40 min se llevó a cabo la extracción. Se separaron las fases por centrifugación a 1,100 g durante 15 min. La fase orgánica (fase superior) se transfirió a un tubo de vidrio limpio y se evaporó a 55 °C bajo corriente de nitrógeno; cuando el volumen fue menor o igual a 1.5 mL, se transfirió a un vial de vidrio donde se continuó la evaporación hasta sequedad total. Reactivos requeridos:

Reactivos	Concentración
KCl	0.8 % (1.5 mL)
KOH	1 mM (50 $\mu$ L)
Acetato de etilo	4 mL
Estándar interno	40 $\mu$ M
D-esfingosina	(2.166 nmoles)
Fracc. membranal	300 $\mu$ g prot.

### 5.9 Hidrólisis alcalina de esfingolípidos e identificación de bases de cadena larga (LCB)

El procedimiento está basado en la referencia de Markham *et al.* (2006).

A un tubo limpio de vidrio con tapa, se agregaron 2 nmoles de estándar interno d-eritro-20-esfingosina (d20:1), 1 mL de dioxano ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), 1 mL de  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  al 10% y la fracción microsomal en un volumen equivalente a 1 g de tejido fresco. El tubo se tapó con teflón y después con la tapa. La hidrólisis de las muestras se llevó a cabo colocando los tubos en un Termoblock (Fisher Scientific) a 110°C durante 16 h. Posteriormente, se agregó al tubo 2 mL de sulfato de amonio al 2% y 2 mL de dietileter, se agitó en vortex y se transfirió la fase orgánica (fase superior) a un tubo de vidrio limpio y seco donde se evaporó a 55 °C bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad total.

La identificación de las LCB se llevó a cabo derivatizando con NDA para su análisis por HPLC.

### 5.10 Detección de bases de cadena larga por cromatografía en capa fina (TLC)

El extracto lipídico se resuspendió en 100  $\mu$ L de etanol absoluto y se agitó en vortex para mezclar muy bien, se aplicó a placas de TLC (silica gel 60 F<sub>254</sub>) y se eluyó con el método usado para bases esfingoideas ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$  2N (65 mL/25 mL/4 mL)), se aplicaron de 10 a 20  $\mu$ L de extracto lipídico en forma de banda a las placas de TLC. Lo que sobró de extracto lipídico se guardó a -4 °C bien etiquetado. Se aplicaron al TLC estándares de esfingosina, fitoesfingosina, esfinganina en un intervalo de 10 a 30 nmoles. Las bases esfingoideas se revelaron sumergiendo las placas en una solución de coomassie brilliant blue G (CBB), o en una solución de ninhidrina al 2% (para este revelado se utilizaron placas de TLC de aluminio (silica gel 60 F<sub>254</sub>) y se sometió la placa a una temperatura de 160° C por 3 a 5

min. Las bases esfingoideas también eluyeron en placas de TLC (silica gel 60 F<sub>254</sub>) de aluminio y se revelaron con una solución de CuSO<sub>4</sub> a una temperatura de 160 °C por 5 a 10 min.

Sol. Reveladora	Concentración	Solución reveladora	Concentración	Sol. Reveladora	Concentración
CBB		Ninhidrina		CuSO <sub>4</sub>	
CBB	0.005 %	Ninhidrina	a) 0.2% en butanol	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	10 %
NaCl	0.1 M	Ac. acetico	b) al 10%		
Metanol grado reactivo	25 %	95 partes de a) y 5 partes de b)		H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8 %

### 5.11 Detección y cuantificación de bases de cadena larga por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

La detección y cuantificación de bases esfingoideas se realizó mediante una reacción de derivatización con NDA (Naftalen-2,3-dicarboxialdehído), la cual se basa en hacer reaccionar el reactivo NDA con el grupo amina primario de la base esfingoidea para formar un cianobenzoisindol en presencia de cianida (Yang-Hyeok *et al.* 2002).

1. El reactivo NDA se preparó a una concentración de 2.5 mM.
2. El derivado se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O 0.05 M pH 9.5	140 µL
Acetonitrilo	95 µL
KCN 2.5 mM	30 µL
Muestra	5 µL
Incubación a temp. ambiente	5 min.
Reactivo NDA 2.5 mM	30 µL
Incubación a temp. ambiente	20 min.

Nota: Todas las soluciones se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm, y las mezclas se sonicaron en un frasco cerrado durante 20 min.

1. Se tomó una alícuota de 50 µL del derivado y se inyectan 20 µL, que es la cantidad que toma el inyector del equipo de HPLC.
2. Para el análisis cuantitativo se utilizó un cromatógrafo SHIMADZU compuesto por una bomba modelo LC-10AD, detector de UV modelo SPD-10AV y un procesador de datos modelo C-R5a. La separación de las muestras se realizó por fase reversa en una columna SUPELCOSIL™ LC-18Si (15 cm x 4.6 mm), y un tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol grado HPLC y buffer de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM), en una proporción de 88:12 (v/v) con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.

### **5.11.1 Elaboración de curvas de calibración**

Se construyeron curvas patrón de los estándares de bases esfingoideas fitoesfingosina, esfingosina, esfinganina y d-eritro-20-esfingosina (estándar interno) en un intervalo de 4 a 12 pmol.

### **5.11.2 Cuantificación de bases esfingoideas en extractos de las diferentes fracciones membranales de tejido de frijol**

A partir del derivado preparado para cada uno de los extractos obtenidos de las diferentes fracciones membranales de tejido de frijol, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  al equipo de HPLC. Las bases esfingoideas se separaron en la columna  $\text{C}_{18}$  por elución con la mezcla de metanol (88 %) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 mM (12%) y se detectaron a una longitud de onda de absorción de ( $\lambda$  254 nm). Las alturas de los picos correspondientes a las bases esfingoideas se interpolaron en las curvas de calibración correspondientes para calcular la cantidad de cada una de las bases en los extractos de tejido. Los resultados se expresaron en pmol de base esfingoidea por miligramo (mg) de tejido fresco.

## **5.12 Procedimientos estadísticos utilizados**

En las determinaciones de bases esfingoideas se realizó un mínimo de tres repeticiones por experimento con muestras provenientes de 3-7 preparaciones membranales independientes. A estos datos se les determinó la media y la desviación estándar.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Infiltración de los disolventes H<sub>2</sub>O, silwet L-77 y MgCl<sub>2</sub> en hojas de frijol

Una vez que las semillas de frijol germinaron y las plantas alcanzaron la edad de 4 semanas con un tamaño adecuado y el desarrollo de por lo menos 3 trifolios totalmente expandidos, los folíolos fueron infiltrados para determinar el efecto causado por la acción de la FB1 y patógenos bacterianos. Primero se hicieron pruebas de infiltración con los diferentes disolventes en que se encontraban la FB1, la miriocina y las diferentes cepas bacterianas, para asegurar que estos compuestos por sí solos no estaban generando ningún daño. El medio de disolución de la FB1 fue H<sub>2</sub>O; el MgCl<sub>2</sub> fue el medio de resuspensión de las bacterias patógenas y para la miriocina, que es un compuesto hidrofóbico, se utilizó el detergente silwet L-77 a una concentración de 0.05 % (Singh y Roberts, 2004).

En la Fig.11 se presenta parte del registro fotográfico de los folíolos infiltrados, pudiéndose observar que tanto con el H<sub>2</sub>O, el silwet L-77 y el MgCl<sub>2</sub> los folíolos presentaron dos días después una marca causada por el contacto de la jeringa con la que se hizo la infiltración; al paso de los días, la lesión se intensificó ligeramente, pero después de los 7 días las marcas permanecieron sin cambio. Ninguna de las tres soluciones infiltradas causó un daño considerable y progresivo en el tejido de la hoja de frijol.

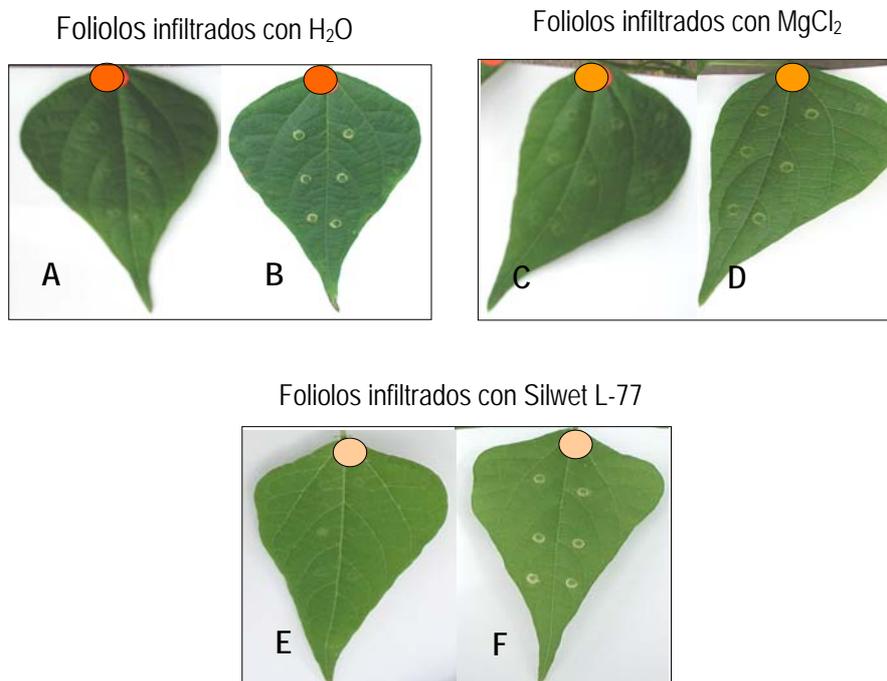


Fig.11 Infiltración de los disolventes en hojas de frijol. Efecto causado por el H<sub>2</sub>O (A,B), MgCl<sub>2</sub> (C,D) y silwet L-77 (E,F) a los 2 y 7 días después de la infiltración. Los folíolos de frijol fueron infiltrados con 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, silwet L-77 al 0.05% y MgCl<sub>2</sub> 10 mM respectivamente. El registro fotográfico de la evolución de la aplicación se realizó durante 17 días. Se muestra el registro a los 2 días (A, C, E) y 7 días (B, D, F) después de la infiltración. Se infiltraron 6 folíolos de diferentes plantas para cada condición.

## 6.2 Infiltración de hojas de frijol con bacterias patógenas

Otro de los objetivos a cumplir fue exponer hojas de plantas de frijol a la acción de un patógeno bacteriano, al que el frijol es resistente, en este caso se infiltraron las cepas de *Erwinia carotovora* 71 (*Ec*), *Erwinia chrysanthemi* 3937 (*Ech*) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 RPM1 (*Pst*) contra las que presentaría una HR. También se utilizó una cepa bacteriana a la que frijol es susceptible, en este caso *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (*Xapf*). Para cumplir con estos objetivos, se infiltraron las diferentes cepas bacterianas, *Ec*, *Ech*, *Pst*, y *Xapf* (Fig. 12).

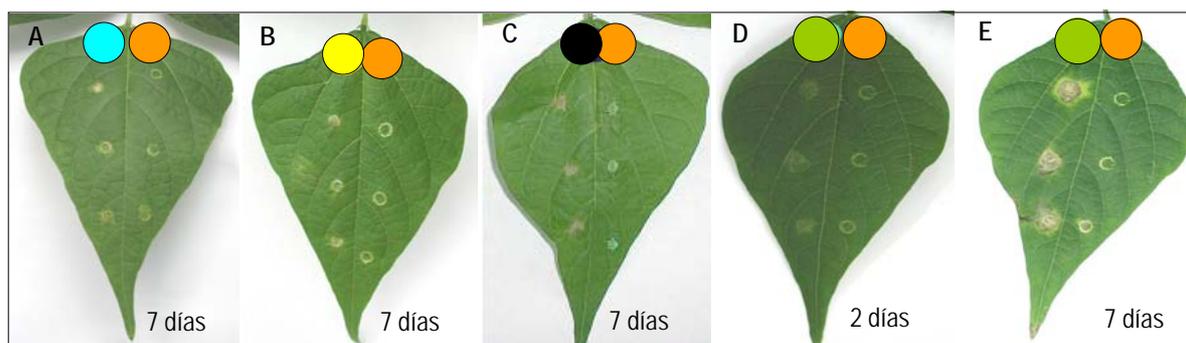


Fig.12 Infiltración de hojas de frijol con patógenos bacterianos. Se infiltraron 20  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^8$  UFC/ mL de las cepas bacterianas (lado izquierdo del foliolo) A. *Ec* (azul), B. *Ech* (amarillo), C. *Pst* (negro) y *Xapf* (verde), del lado derecho del foliolo se infiltraron 20  $\mu$ L de  $MgCl_2$  10 mM (anaranjado). Se llevó un registro fotográfico de la evolución del sitio de infiltración durante 17 días. Se muestran los registros fotográficos de la infiltración con *Xapf* a los 2 dpi (C) y 7 (D) dpi. Se infiltraron 6 foliolos para cada condición en tres experimentos independientes.

Cuando se infiltraron las cepas bacterianas, *Ec*, *Ech* y *Pst* se observó una muy clara HR inducida por las tres cepas bacterianas (*Ec*, *Ech*, *Pst*) y que fue visible desde los 2 dpi (datos no mostrados). Es decir, la HR se manifestó como una lesión de 4-10 mm de diámetro en el sitio de infiltración semejando una mancha seca del tejido. En la Fig.12 se muestra la lesión de HR a los 7 dpi. Se infiltró la cepa de *Xapf* como un control negativo a la presencia de la HR, ya que esta bacteria sí resulta patógena para frijol. *Xapf* causó necrosis en los sitios de infiltración desde los 2 días, misma que se generalizó progresivamente, alcanzando la totalidad de la hoja a los 11 dpi.

Para evaluar si la reacción que estaba promoviendo la FB1 era una respuesta similar a la HR que desencadenara reacciones de defensa, se exploró la posibilidad de que la toxina tuviera un "efecto protector" contra la infección por *Xapf*, haciendo una estimación de la magnitud del daño provocado por *Xapf* en frijol en presencia y ausencia de la infiltración de FB1 mediante el registro fotográfico y la determinación del Índice de Enfermedad (ID), así como de la cuantificación del crecimiento bacteriano *in planta*.

### 6.3 Infiltración de hojas de frijol con FB1

Uno de los objetivos fue exponer por infiltración a los folíolos de plantas de frijol a la acción de la FB1 para explorar si la adición del compuesto producía una respuesta semejante a la HR como se ha demostrado en *Arabidopsis* (Stone *et al.* 2000). Para ello, se infiltraron 20  $\mu\text{L}$  de FB1 disuelta en  $\text{H}_2\text{O}$  a concentraciones de 0.01, 0.1, 1.0, 5.0, y 10.0  $\mu\text{M}$ , llevándose un registro fotográfico a partir del primer día posterior a la infiltración hasta los 7 dpi (Fig. 13).

En la figura 13 se encontró que en los sitios en donde se infiltró la FB1 se desarrolló una lesión muy parecida a la HR que es claramente visible a los dos días de haber sido infiltrada. La lesión se produjo a partir de 1  $\mu\text{M}$  de FB1, siendo más evidente a concentraciones de 5.0 y 10.0  $\mu\text{M}$  y a los siete días después de haber sido infiltrada (dpi). Se observó que la lesión no se extiende en tiempos posteriores.

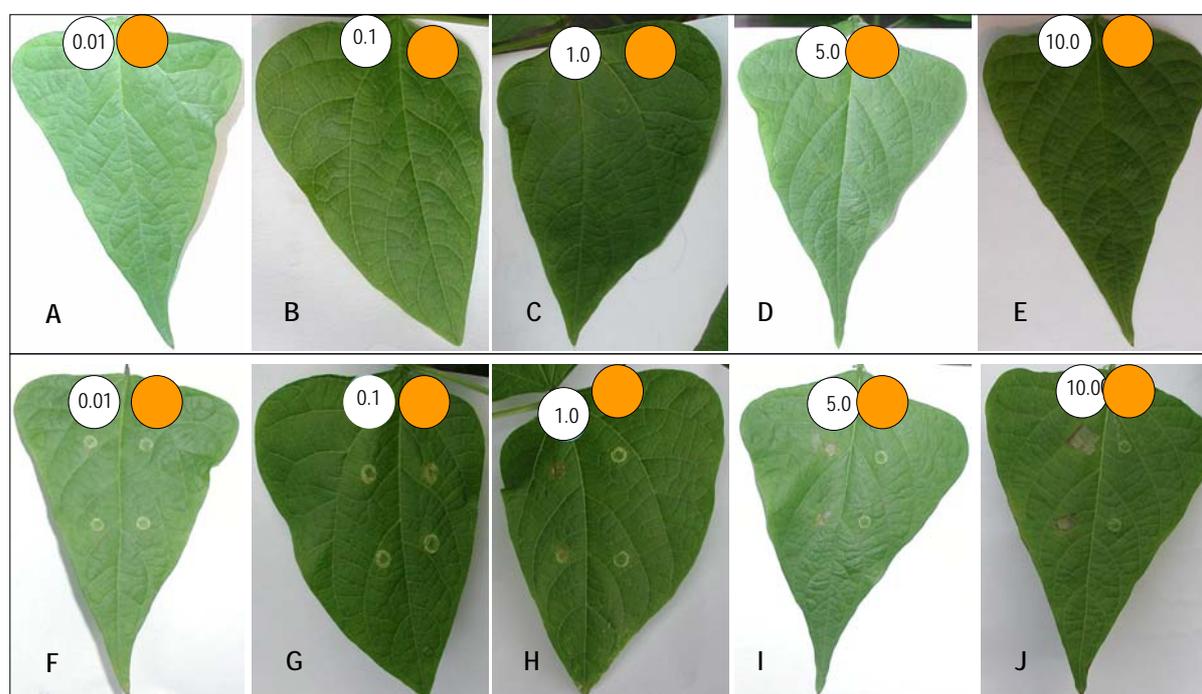


Fig. 13 Infiltración de hojas de frijol con diferentes concentraciones de FB1. Se usaron concentraciones de 0.01, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{M}$  de FB1 y se llevó el registro fotográfico durante siete días. En cada uno de los folíolos se infiltraron 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones de FB1 (blanco) (lado izquierdo del folíolo) y 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  (anaranjado) como control (lado derecho del folíolo). (A-E) presenta los folíolos 2 dpi, (F-J) presenta los folíolos 7 dpi. Se realizaron tres experimentos independientes usando tres plantas para cada uno y 9 folíolos para cada concentración.

### 6.4 "Efecto protector" de la FB1, *Ech* y *Pst* en hojas infiltradas con *Xapf*

Para probar si la FB1 estaba promoviendo reacciones de defensa se determinó si la toxina era capaz de contener el desarrollo de *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* var *fuscans* (*Xapf*). Se probaron tres condiciones: 1) se infiltró la toxina FB1 y la cepa de *Xapf* de manera simultánea, 2) se infiltró la cepa

de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) y la cepa de *Xapf* y 3) se infiltró la cepa de *Erwinia chrysanthemi* (*Ech*) y la cepa de *Xapf* (Fig.15). La evolución del daño se siguió por 28 días.

Como un control, se realizó un experimento de crecimiento bacteriano en medio sólido de agar en presencia de FB1 (Fig. 14), con el fin de descartar que la FB1 tuviera un efecto tóxico sobre *Xapf* y por tanto, estuviera inhibiendo su crecimiento en la hoja, pues de ser así, el efecto protector podría ser un resultado positivo de protección falso. El experimento consistió en colocar discos impregnados de FB1 a los medios de cultivo que contenían a las diferentes cepas bacterianas recién sembradas, *Ech* (medio LB), *Pst* (medio de B King) y *Xapf* (medio YDC), incubándose 1 h en refrigeración para dar tiempo a la difusión de la FB1 en el medio, seguida de una incubación a 29 °C. En la figura 14B se puede observar que ninguna de las tres cepas bacterianas utilizadas en este trabajo (*Xapf*, *Ech* y *Pst*) tuvo un crecimiento sensible a la FB1, ya que mostraron un crecimiento normal en el medio en presencia de FB1, contrario a lo que se observa en la placa en presencia de los antibióticos polimixina B (PX), kanamicina (KA) y tetraciclina (TE) de la figura 14A, en donde el crecimiento de la bacteria fue inhibido por efecto de los antibióticos. Con este resultado, se descartó un efecto tóxico de la FB1 en las cepas bacterianas usadas.

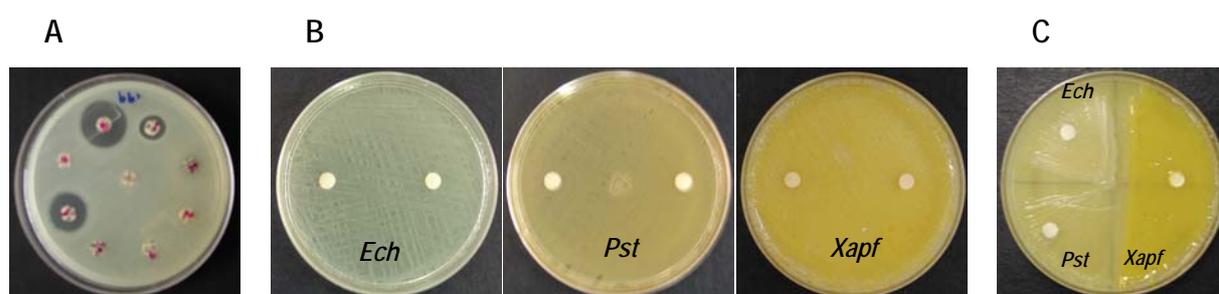


Fig. 14. Prueba de sensibilidad de las cepas de *Ech*, *Pst* y *Xapf* a la FB1. Se sembraron bacterias en medio sólido de agar con discos impregnados con 35  $\mu$ L de FB1 10  $\mu$ M cada uno. A) Reacción positiva de sensibilidad de una cepa bacteriana (*Estenotrophomonas maltophilia*) expuesta a diferentes antibióticos (PX, E, RF, ES, Pe, KA, LI, TE, DC), B) Reacción de sensibilidad de las cepas *Ech*, *Pst* y *Xapf* a FB1; C) Control negativo de sensibilidad (discos impregnados con  $MgCl_2$  10 mM).

#### 6.4.1 Registro fotográfico de la evolución de la infección bacteriana

En la figura 15 se observa que tanto la toxina FB1 como las cepas bacterianas de *Pst* y *Ech* confirieron protección al foliolo contra la infección por *Xapf* a partir del cuarto día, hasta el día 28, que es cuando se observa el mayor daño, en el control de enfermedad (Fig. 15E). En éste, la infección avanzó progresivamente hasta el día 11, cuando la mayor parte del foliolo había sido invadida por *Xapf*.

#### 6.4.2 Determinación del Índice de Enfermedad

En relación al efecto protector, nuestras observaciones se sistematizaron siguiendo el progreso de la infección durante 14 dpi, asignándose un valor al tamaño de la lesión (Fig. 16) y calculando el Índice de Enfermedad (IE) que se determinó de acuerdo a la siguiente relación (Yang *et al.* 2002):

$$IE = \frac{(\# \text{ foliolo grado } 5 \times 5) + (\# \text{ foliolo grado } 4 \times 4) + (\# \text{ foliolo grado } 3 \times 3) + (\# \text{ foliolo grado } 2 \times 2) + (\# \text{ foliolo grado } 1 \times 1)}{\# \text{ total de foliolos}}$$

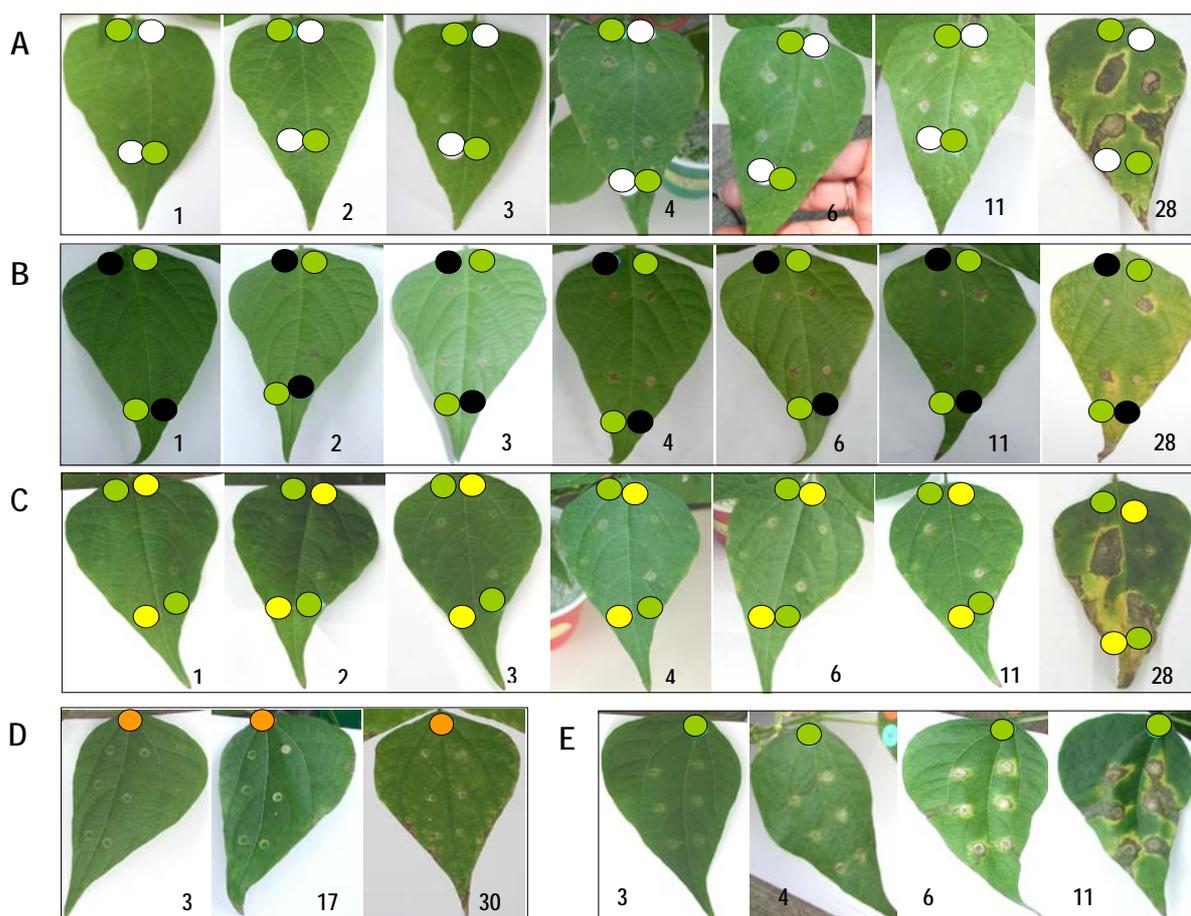


Fig.15 Curso temporal del "efecto protector" de la FB1, *Pst* y *Ech* en hojas infiltradas con *Xapf*. A). Se infiltraron folíolos de frijol con 20  $\mu$ L de FB1 (en blanco) a una concentración de 10  $\mu$ M, seguida de la infiltración de 20  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de *Xapf* (en verde). B). Foliolos infiltrados con 20  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de *Pst* (en negro) seguida de la infiltración de 20  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de *Xapf*. C). Foliolos infiltrados con 20  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de *Ech* (en amarillo) seguida de la infiltración de 20  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de *Xapf*. D) Se incluyó un grupo de folíolos infiltrados con 20  $\mu$ L de  $MgCl_2$  10 mM (en naranja) y E) folíolos infiltrados con una suspensión bacteriana de *Xapf* que contenía  $1 \times 10^8$  UFC/ mL. Cada una de las suspensiones bacterianas contenía  $1 \times 10^8$  UFC/ mL. Estos ensayos se realizaron por duplicado en tres experimentos diferentes con variaciones climáticas en el invernadero. Se muestra la progresión de la lesión a los días indicados en la parte inferior de cada panel. Se realizaron tres experimentos independientes con seis plantas para cada uno.

En la figura 16A se ilustra la evaluación de la progresión de la enfermedad basándonos en el tamaño de la lesión. Una vez asignado el valor a cada folíolo se calculó el IE para cada condición (Fig. 16B). Como resultado se obtuvo que los folíolos infiltrados con las combinaciones *Xapf*/FB1 y *Xapf*/Ech presentaron un IE menor para todos los días post infiltración (dpi) comparados con el IE calculado para *Xapf*/MgCl<sub>2</sub>. Cuando la infiltración se hizo en diferentes folíolos de un mismo trifolío, sólo con FB1 se observó protección del día 4 al 12 dpi, posteriormente, las lesiones tenían la misma apariencia en las tres condiciones (Fig. 16C). Cuando la infiltración se hizo en diferentes trifolios no se observó protección con FB1 ni con *Erwinia chrysanthemi* (*Ech*) en ningún día después de la infiltración. En resumen se encontró que tanto *Ech* como FB1 confirieron protección al daño causado por *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*

var *fuscans* (*Xapf*), siendo más evidente este efecto protector cuando *Ech* o la FB1 se infiltraron en el mismo foliolo con *Xapf* respectivamente. Se observó una ligera protección a tiempos cortos en los folíolos que fueron infiltrados con FB1 en diferente foliolo y en el mismo trifolío y en folíolos infiltrados en diferentes trifolios de la planta no se observó protección.

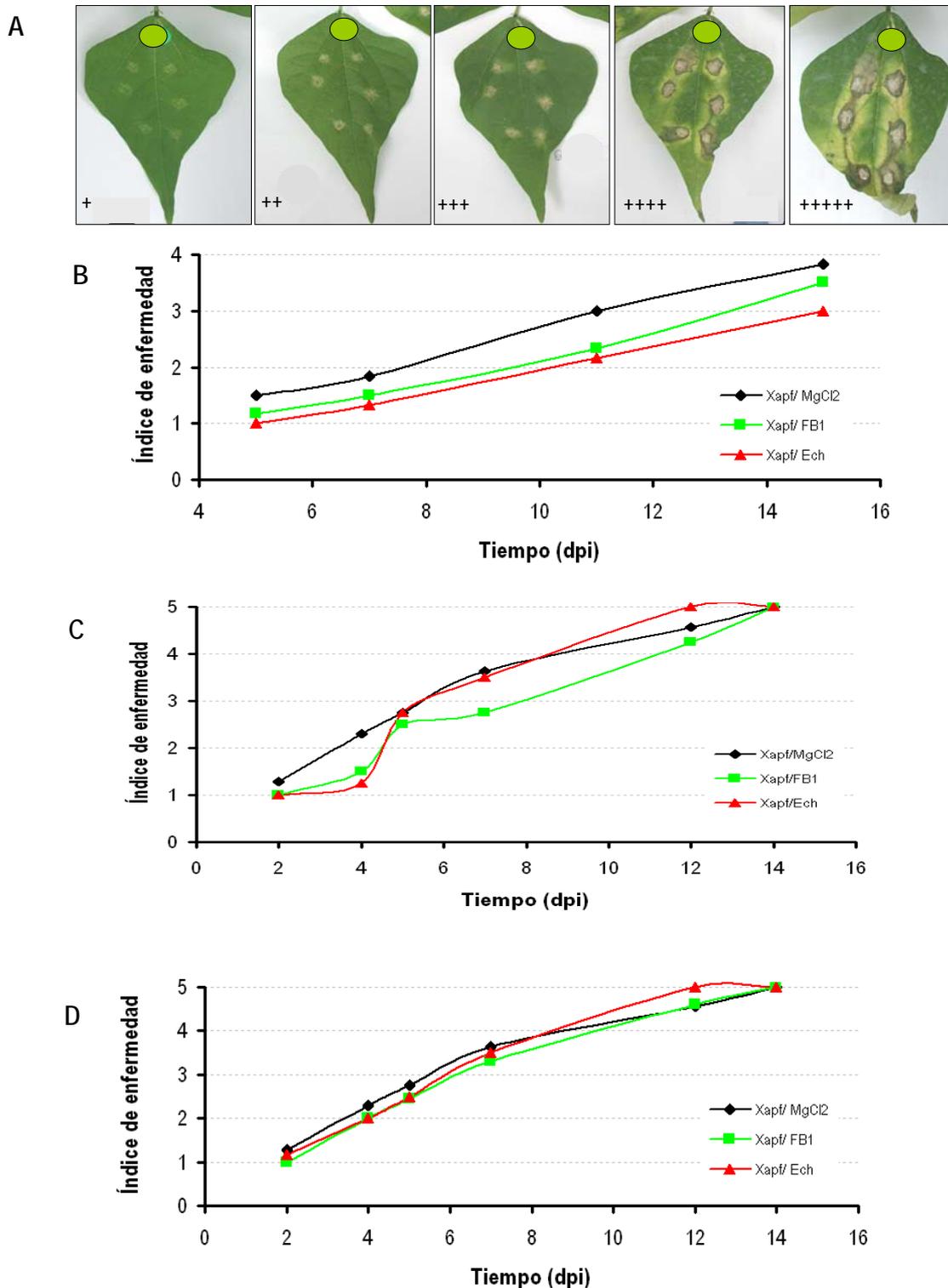


Fig. 16 Progreso de la infección ocasionada por la cepa *Xapf* en coinfección con MgCl<sub>2</sub>, FB1, o *Ech* evaluada por el Índice de Enfermedad (IE). A) A cada foliolo se le asignó un valor según el tamaño de lesión presente en el sitio de infiltración, lo cual se hizo con la siguiente escala: 1+ = 1-19 % de lesión en el sitio de infiltración, 2+ = 20-39 %, 3+ = 40-59 %, 4+ = 60-79 %, y 5+ = 80-100 %. B) Efecto protector causado tanto por la FB1 como por *Ech* en los folíolos infiltrados con la cepa patógena *Xapf*

(cuando ambos agentes se infiltraron en el mismo foliolo), la gráfica representa el promedio de dos experimentos, con una n = 18 para cada condición. C) Efecto protector de 20  $\mu$ L de FB1 10  $\mu$ M y de *Ech* ( $1 \times 10^8$  UFC/ mL), cuando se infiltraron junto con *Xapf* ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) en diferente foliolo y mismo trifolío y (D) en diferente trifolío, las gráficas representan el promedio de dos experimentos, con una n = 28 para cada condición.

#### 6.4.3 Determinación del crecimiento bacteriano

Por otra parte, se realizó la cuantificación del crecimiento bacteriano en los folíolos de plantas de frijol para determinar el efecto de la FB1 y *Erwinia chrysanthemi* (*Ech*) en el crecimiento de la bacteria patógena *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* var *fuscans* (*Xapf*). Para ello, se preparó un macerado de los folíolos infiltrados con *Xapf* y FB1 por un lado, y de los folíolos infiltrados con *Xapf* y *Ech* por otro; se realizaron diluciones de este macerado, mismos que se plaquearon para cuantificar el crecimiento bacteriano de *Xapf* en medio sólido.

La figura 17 muestra como *Xapf* presentó un crecimiento en el foliolo con un patrón lineal en los primeros 2 días, posteriormente la población bacteriana alcanzó un máximo que se mantuvo hasta los 5 dpi.

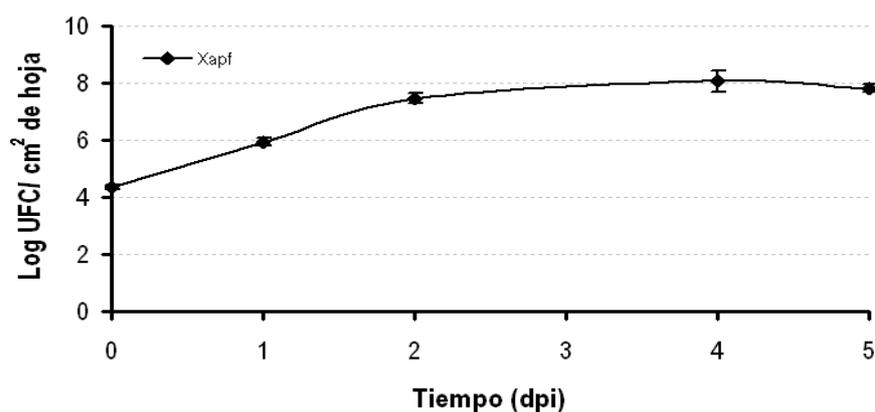


Fig. 17 Curso temporal del crecimiento bacteriano de *Xapf* en hojas infiltradas. En cada foliolo se infiltrará 20  $\mu$ L de una suspensión bacteriana que contenía  $1 \times 10^8$  UFC/ mL. Se muestra el promedio de los resultados de dos experimentos.

Posteriormente se realizaron experimentos en donde se evaluó el efecto de la FB1 y *Ech* sobre el crecimiento bacteriano de *Xapf* en folíolos de frijol (Fig. 18A)

Como se puede observar en la figura 18A *Xapf* creció de manera exponencial hasta el sexto día y posteriormente decayó en la zona infiltrada. En todos los casos en donde se cuantificó el crecimiento de *Ech* (Fig. 18A) y *Pst* (Fig. 18B) se observó que su crecimiento prácticamente no varió o decayó muy lentamente, lo cual constituye un control positivo que pone en evidencia el crecimiento del patógeno en condiciones de HR. En el sitio en donde se infiltró sólo  $MgCl_2$  no hubo crecimiento bacteriano.

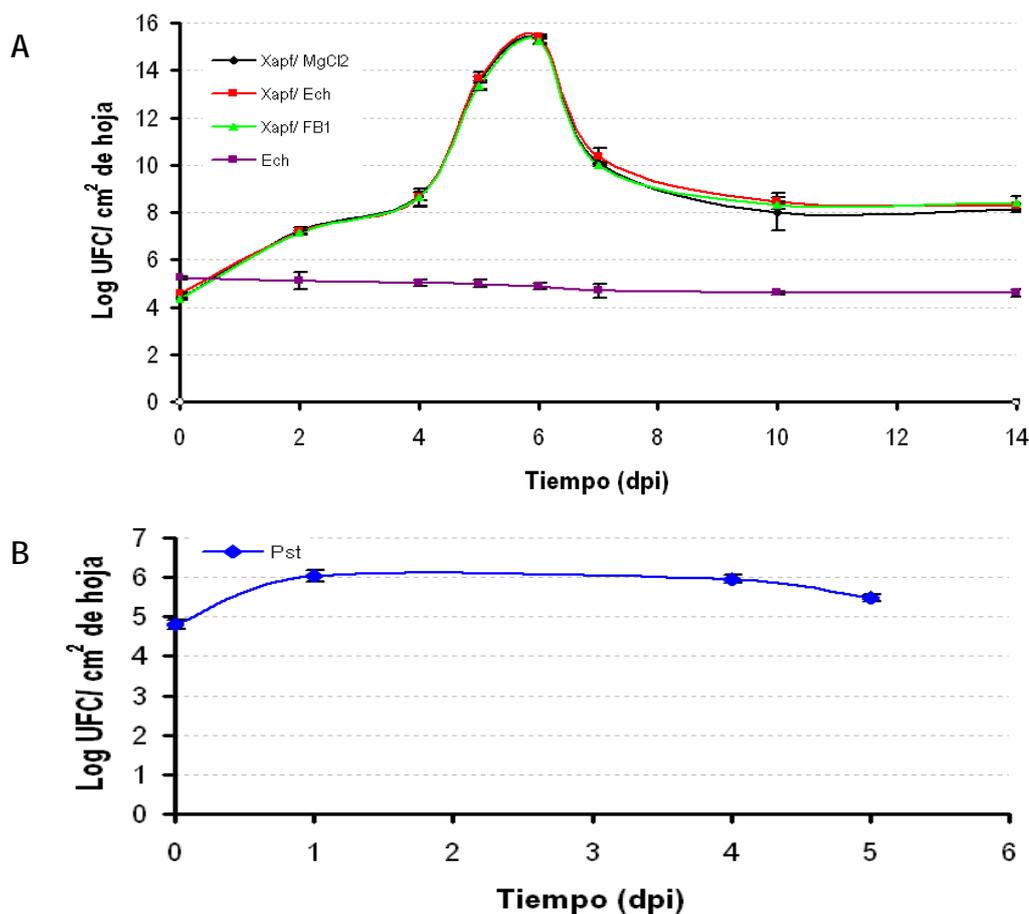


Fig. 18 Crecimiento de *Xapf*, *Ech* y *Pst* en hojas de frijol. El crecimiento bacteriano de *Xapf*, *Ech* y *Pst* se determinó a partir de las bacterias aisladas de las secciones de hojas infiltradas. Se presentan los resultados de varios ensayos efectuados en fechas diferentes. A) crecimiento de *Xapf* coinfiltrada con MgCl<sub>2</sub> (negro), crecimiento de *Xapf* coinfiltrada con *Ech* (rojo), crecimiento de *Xapf* coinfiltrada con FB1 (verde) y crecimiento de *Ech* (lila), se realizaron tres ensayos por triplicado B) crecimiento de *Pst* (azul), un ensayo realizado por triplicado.

## 6.5 Detección de bases esfingoideas por TLC

Una vez que se obtuvieron las diferentes fracciones membranales de plantas de frijol infiltradas con FB1 y patógenos bacterianos, se llevó a cabo la determinación de los niveles endógenos de bases esfingoideas, detectándolas inicialmente en placas de TLC.

Se realizó la extracción de la fase lipídica de las fracciones microsomales provenientes de folíolos de frijol infiltrados con FB1 y H<sub>2</sub>O y se aplicó a placas de TLC (Fig.19) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se incluyeron tres diferentes estándares de compuestos esfingoideos: esfingosina (SO), fitoesfingosina (PS) y esfinganina (SN). La adición de esfingosina se hizo para calcular la recuperación de bases al cabo del proceso extractivo y la de fitoesfingosina y esfinganina se hizo para identificar aquellas bases que se incrementaran por la adición de FB1 y que en maíz son la SN y PS.

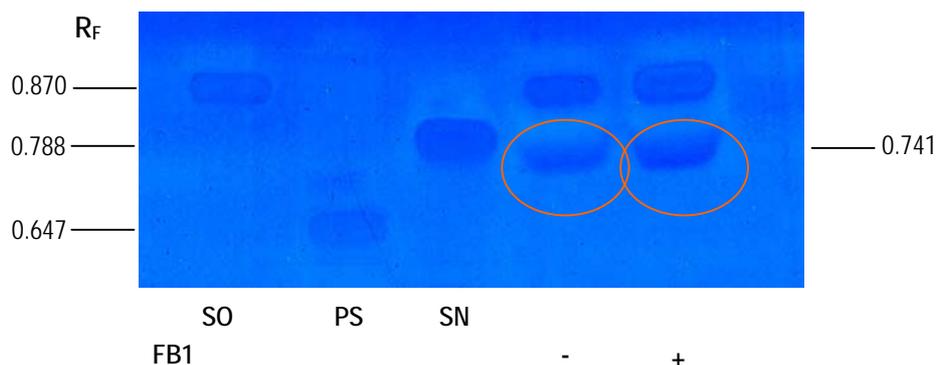


Fig.19 Placa de TLC teñida con CBB (coomassie brillant blue). Se aplicaron a la placa 20 nmoles de estándares de SO, SN y PS. Se aplicaron extractos lipídicos obtenidos de las fracciones microsomaes de hojas de frijol expuestas a FB1 por 36 h. Se indicó el R<sub>F</sub> para cada uno de los compuestos.

En la Fig.19 se observa una banda muy abundante en los extractos lipídicos que no correspondió a ninguno de los estándares utilizados (SN y PS). Probablemente se trate de una base de cadena larga (LCB), ya que se tiñe con azul de coomassie (CBB) y su migración (R<sub>F</sub>= 0.741) es muy parecida a la migración de las bases de cadena larga (LCB) esfinganina (R<sub>F</sub>= 0.788) y fitoesfingosina (R<sub>F</sub>= 0.647). Es posible que se trate de la dehidrofitoesfingosina (t18:1), ya que se ha reportado en frijol, en tomate, en arabis y en otros tejidos (Carter y Koob, 1969 y Markham *et al.* 2006).

Tratando de conseguir una mejor separación de las bandas de estándar interno y en particular de la posible LCB no identificada que migra como una banda muy gruesa, se probaron diferentes fases móviles (Fig. 20).

Como se observa en las placas, las fases: (B) CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH 2 N (65:25:4) y (C) CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH: NH<sub>4</sub>OH 2 N (40:10:1) dieron buenos resultados, ya que se logró la separación de al menos tres componentes en el extracto de frijol.

Estos resultados nos llevaron a plantear las siguientes preguntas: 1. ¿Cuáles de estas bases se acumulan por acción de FB1 o patógeno en frijol? 2. ¿Qué tanto se acumulan en las membranas? 3. ¿A qué LCB corresponden? ¿Es dehidrofitoesfingosina una de ellas? Para contestar estas preguntas, primero se realizó la cuantificación por densitometría de una base esfingoidea estándar SO, separándola en una placa de TLC revelada con CuSO<sub>4</sub> y calor (Fig. 21).

Con los resultados obtenidos a partir de los experimentos de la figura 21 se logró establecer el porcentaje de recuperación de la LCB a partir del extracto lipídico. Para ello, se corrió una nueva placa, la cual se reveló sólo con agua para poder establecer la posición de las bandas en la placa de TLC, se marcaron y rasparon para luego ser reextraídas con solvente. Para la reextracción de la base esfingoidea se probaron tres diferentes solventes (acetato de etilo, cloroformo y metanol) (Fig. 22).

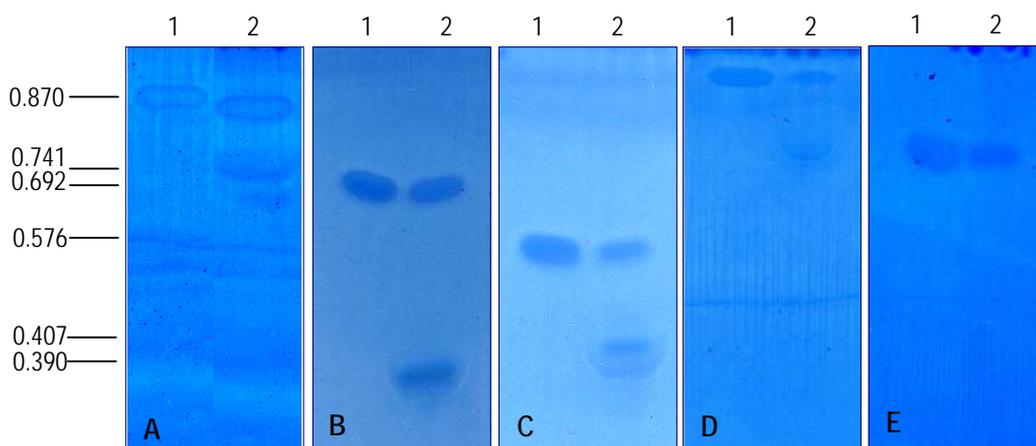


Fig. 20 Separación de LCB con diferentes fases móviles. Se presentan las cinco diferentes fases utilizadas para el corrimiento de las placas de TLC A)  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ , 8.3 N (53:41:5.8); B)  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ , 2 N (65:25:4); C)  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ , 2 N (40:10:1); D)  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ , 4.2 N (9:7:2); E)  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$  (25:15:4:2). Se indica el Rf para cada uno de los compuestos. En cada placa, se aplicó un estándar de SO (carril 1) y en extracto lipídico de frijol con SO como estándar interno (carril 2). El experimento mostrado es representativo de una serie de tres experimentos independientes.

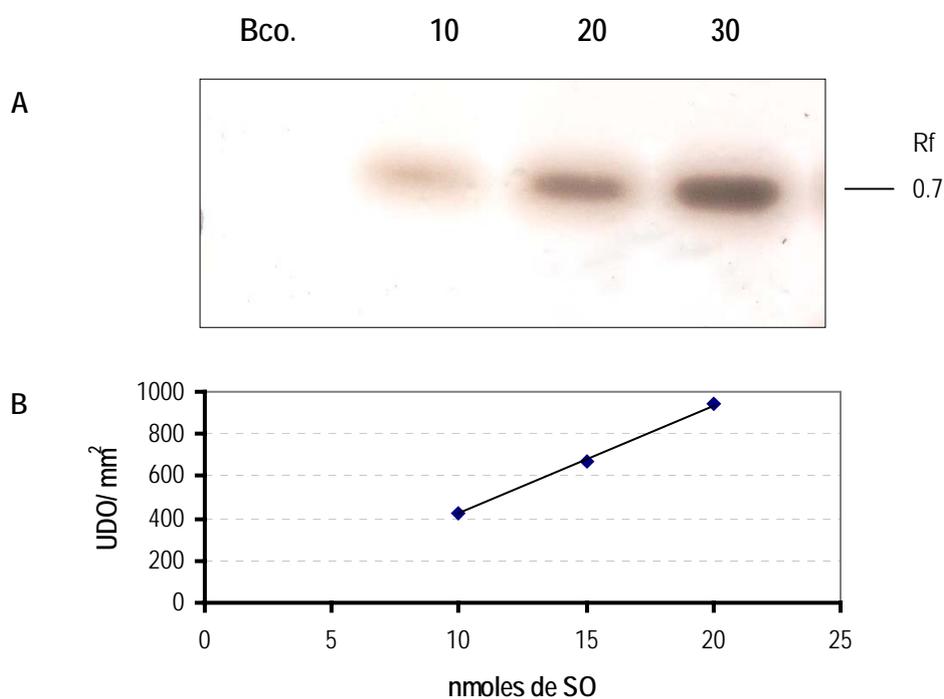


Fig. 21 Cuantificación por densitometría de una LCB (SO). A. Placa de TLC con 10, 20 y 30 nmoles de SO y teñida con  $\text{CuSO}_4$  y calor. B. Cuantificación de las bandas de SO en A mediante densitometría. Se presentan los valores promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes.

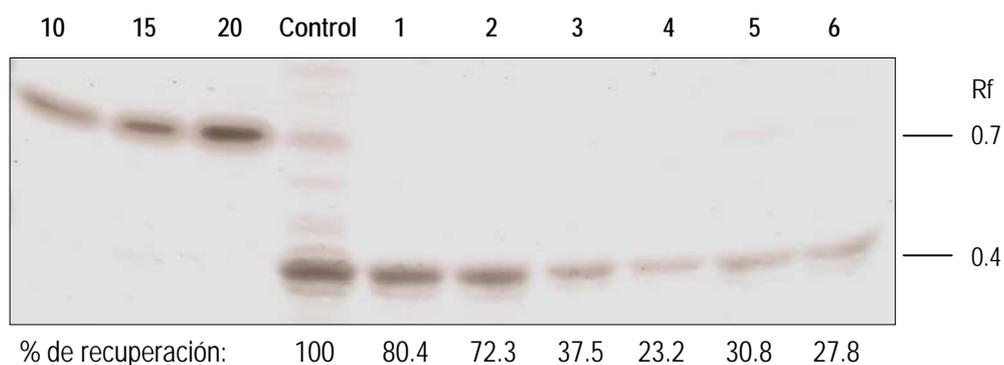


Fig. 22 Porcentaje de recuperación del compuesto no identificado (o putativamente una LCB) a partir del extracto lipídico. El compuesto recuperado del extracto de frijol separado en TLC, fue reextraído usando tres diferentes solventes: acetato de etilo (1 y 2), cloroformo (3 y 4) y metanol (5 y 6).

Se logró una recuperación de aproximadamente el 80 % de la LCB putativa utilizando acetato de etilo (Fig. 22), mientras que con metanol se logró una mejor recuperación de las bases utilizadas como estándares. Hasta el momento, el proceso de detección de LCB en extractos de hoja de frijol en placas de TLC se ha realizado con CBB (coomassie brillant blue), con esta tinción se reveló la presencia de varias bandas (Fig.23A), entre éstas, una banda ancha (con un Rf de 0.4 aprox) la cual fue raspada de la placa y analizada por HPLC. Con el fin de determinar de manera más precisa cuáles de estas bandas son LCB, y, considerando, que las bases esfingoideas presentan en su estructura un grupo amino libre, se probó la tinción con ninhidrina (Fig. 23B y C) que es un compuesto utilizado como revelador de proteínas pues se une específicamente al grupo amino primario. Con esta tinción se reveló la presencia de al menos tres bandas que podrían ser BCL (Fig. 23B), una de éstas podría ser SO endógena según su Rf, el mismo que se acerca mucho al Rf del estándar de SO y que en otra placa de TLC se encontró enriquecida en VMP (Fig. 23C). También, se encontró que las otras dos bandas (Rf= 0.34- 0.41) de la figura 23B se encuentran en la misma posición de Rf de la banda amplia teñida con CBB de la figura 23A.

#### 6.5.1 Perfil de bases de cadena larga de fracción microsomal de hojas de frijol expuestas a FB1 y a patógenos bacterianos.

Como ya se sabe, la planta de frijol resultó un buen modelo de expresión de una respuesta de defensa macroscópica inducida por FB1 y por patógenos. Considerando estas condiciones, se hizo una curva de tiempo (de 0.5 a 48.0 h) de hojas de frijol control (infiltradas con  $MgCl_2$ ) e infiltradas con FB1 y con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), se aislaron las fracciones membranales respectivas y se hizo la correspondiente extracción de lípidos, los cuales fueron aplicados a una placa de TLC con el fin de relacionar el efecto de la FB1 y de la *Pst* con una acumulación de BCL endógenas (Fig. 24).

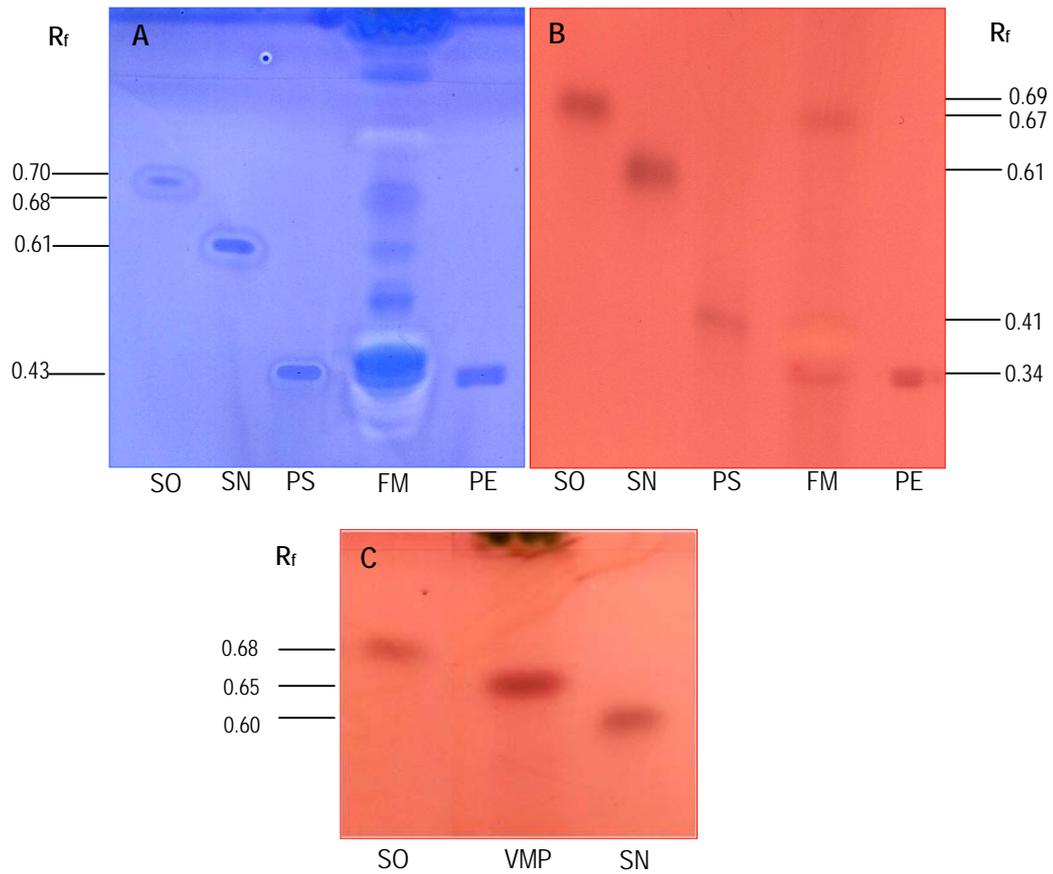


Fig. 23. Detección de posibles LCB en los extractos de hojas de frijol con dos diferentes compuestos reveladores en TLC. Se aplicó a cada placa 20 nmoles de estándares de SO, SN, PS y PE (fosfatidiletanolamina) y extractos lipídicos obtenidos de 1 mg de FM y MVP de hojas de frijol (sin SO como estándar interno). A) Placa de TLC revelada con CBB; B) Placa de TLC de fracción microsomal (FM) revelada con ninhidrina y C) Placa de TLC de una fracción de membrana plasmática (VMP) revelada con ninhidrina.

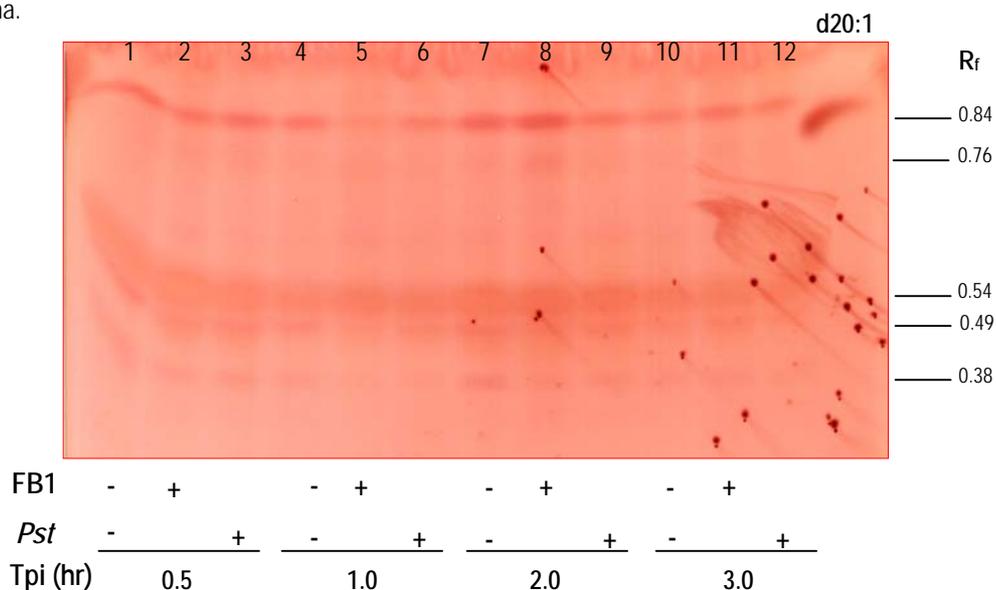


Fig. 24 Perfil de LCB de fracciones microsomales (FM) de hojas de frijol infiltradas con 20  $\mu$ L de una solución 10  $\mu$ M de FB1 y hojas infiltradas con 20  $\mu$ L de una solución 1 x 10<sup>8</sup> ufc/ ml del patógeno *Pst* a los tiempos post infiltración de 0.5 a 3.0 h. La extracción de lípidos se realizó con el método de Markham *et al.* (2006) y partiendo de FM. En cada carril se cargó el equivalente a 1 mg de tejido fresco. Se utilizó la d-eritro-20-esfingosina (d20:1) como estándar interno.

En la figura 24, sólo se muestran los tiempos de 0.5 a 3.0 hpi. En esta placa de TLC se puede observar que utilizando el método de extracción de Markham *et al.* (2006) se recuperó un mayor número de bandas que se tiñeron con ninhidrina y que posiblemente fueron LCB. Por otra parte, se pudo observar que aún cuando la recuperación del estándar interno fue menor en algunos carriles (5,6 y 9), sí es posible observar una ligera acumulación de la banda que tiene un  $R_f$  de 0.54 a los tiempos de 0.5 y 1.0 h y de otra banda con un  $R_f$  de 0.76 al tiempo de 2.0 h, estas bandas provienen de extractos de hojas infiltradas con 10  $\mu$ M de FB1. En este mismo experimento de la figura 24, no se encontró la acumulación de alguna de las bandas presentes en los extractos de hojas infiltradas con patógeno, al menos a tiempos cortos de 0.5 a 3.0 hpi.

#### 6.6 Determinación de bases de cadena larga por HPLC. Reacción de derivatización de una base de cadena larga con naftalen-2,3-dicarboxialdehído (NDA)

Una vez que se determinaron las condiciones de extracción de lípidos de las fracciones microsomales, se hizo la reextracción del TLC de las posibles bases de cadena larga (LCB) endógenas de frijol, obteniéndose una muestra en cantidad suficiente para su análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Para esto, se utilizó una técnica donde las LCB estándar y las presentes en las muestras de extractos lipídicos de frijol se derivatizaron en una reacción con NDA (naftalen-2,3-dicarboxialdehído) (Fig.25), el producto resultante de esta reacción es un cianobenzoisindol, el cual fue inyectado al HPLC, separado isocráticamente en una columna de fase reversa y detectado por su capacidad de absorber luz UV a 254 nm.

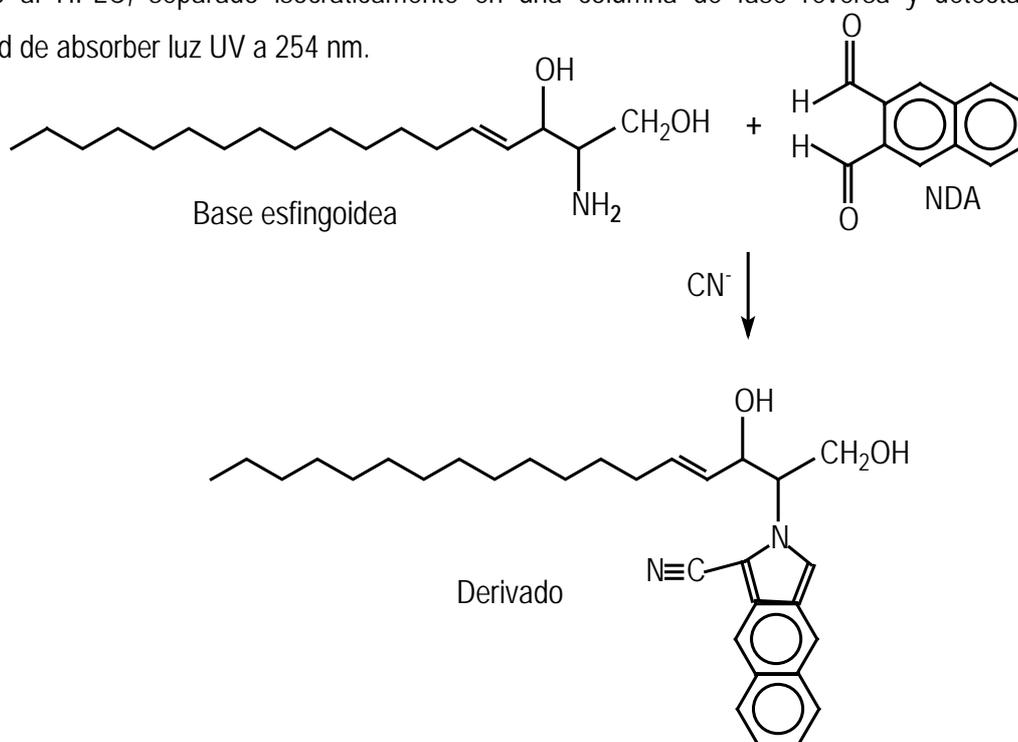


Fig. 25 Reacción de derivatización de una base de cadena larga con NDA (Naftalen-2,3-dicarboxialdehído) en presencia de cianuro. La detección se realizó por UV a 254 nm (Yang-Hyeok *et al.* 2002).

### 6.6.1 Separación de bases de cadena larga por HPLC utilizando diferentes condiciones cromatográficas

1. Fase estacionaria de uso prolongado y fase móvil **A**: metanol:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM (93.5: 6.5)

a) Separación y detección de estándares de LCB

El análisis por HPLC se realizó utilizando una fase estacionaria de uso prolongado y una fase móvil **A** compuesta de metanol (93.5 %) y un amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM (6.5%). Primero se llevó a cabo la detección del derivado de tres estándares de bases esfingoideas y se determinaron los tiempos de retención (TR= minutos) de cada uno de ellos, siendo éstos: fitoesfingosina (TR= 4.673), esfingosina (TR= 5.796) y esfinganina (TR= 8.062) (Fig. 26).

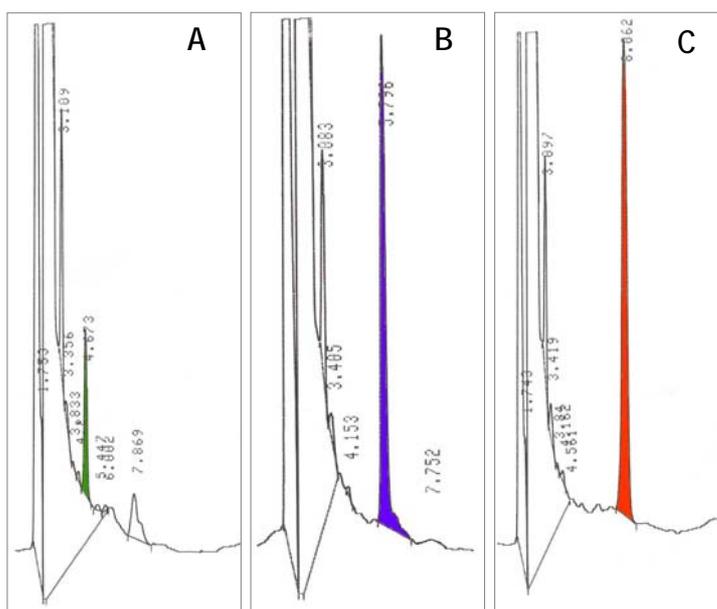


Fig. 26 Cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa de derivados de tres estándares de LCB. **A**, PS; **B**, SO; **C**, SN. Los derivados se detectaron por absorción de luz UV (254 nm). Se inyectaron 10 pmoles de cada estándar en 20  $\mu\text{L}$ . Fase móvil: metanol:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM (93.5: 6.5). Flujo: 1 mL/min.

Por otra parte, se inyectó al sistema HPLC una mezcla de estándares (Fig. 27) con la cual se determinó que los TR de estas LCB no cambiaban cuando se inyectan de manera individual o en mezcla. También se verificó que los picos obtenidos con cada uno de los estándares realmente correspondieran al producto de la reacción con NDA, para lo cual fue necesario hacer en paralelo una reacción con todos los reactivos y omitiendo el NDA (Fig. 27B). Como se muestra, no se observó ningún compuesto que absorba luz UV de forma significativa en esta mezcla a los tiempos de retención de las LCB utilizadas. Cabe hacer notar, que aunque la elución de estas LCB fue buena y que los picos tienen muy buena resolución, están muy cercanos entre sí, y a los picos del frente del cromatograma, lo que podría causar error en el análisis de los resultados obtenidos con los extractos de frijol. Este problema se solucionó como se puede ver más adelante.

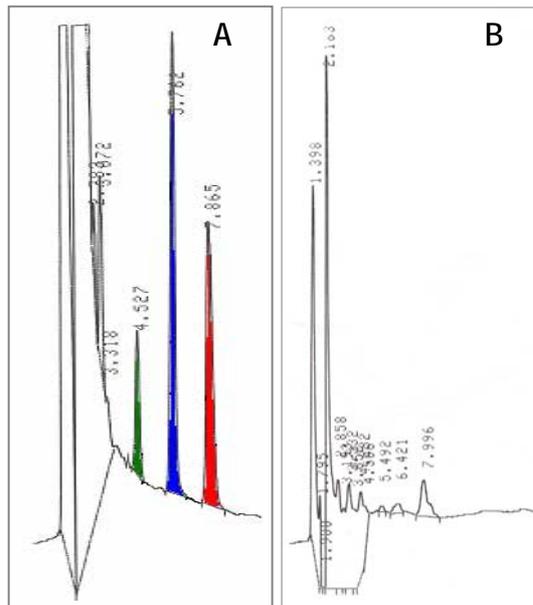


Fig. 27 Detección de LCB por HPLC. A. Cromatograma del producto de reacción de una mezcla de estándares con NDA. B. Cromatograma del producto de reacción de una mezcla de estándares sin NDA. En ambos cromatogramas se inyectaron 10 pmoles de LCB en 20  $\mu$ L. Fase móvil: metanol:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM (93.5: 6.5). Flujo: 1 mL/min.

#### b) Cuantificación de estándares de LCB

Para poder realizar la cuantificación de las LCB presentes en los extractos lipídicos de frijol se obtuvo el rango de linealidad de la respuesta de detección mediante la realización de curvas patrón, determinándose un intervalo de 4 a 12 pmoles para cada uno de los estándares utilizados, lo cual se muestra en la figura 28. En esta figura se muestran las curvas resultantes de la inyección de 4, 8, 10 y 12 pmoles de PS (Fig. 28A), SO (Fig. 28B), y SN (Fig. 28C), cuya detección fue perfectamente cuantificable y reproducible.

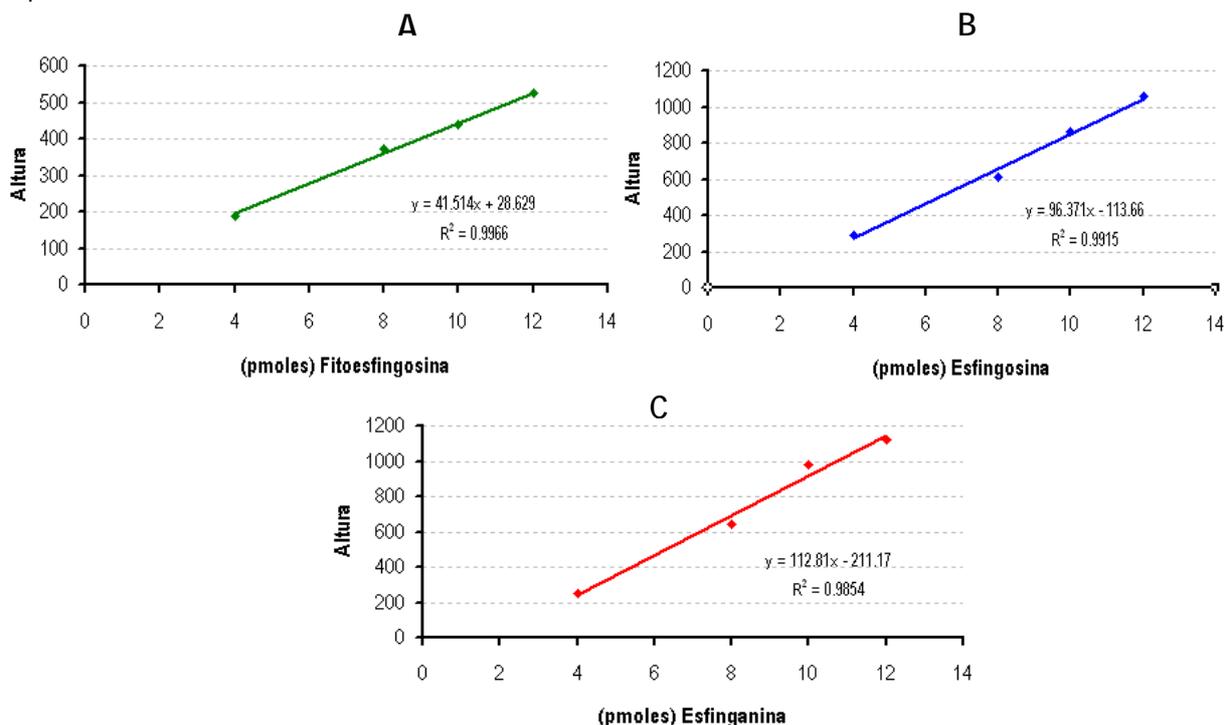


Fig. 28 Curvas patrón de LCB las cuales se construyeron con cada uno de los estándares. A, PS; B, SO; C, SN.

## 2. Fase estacionaria de nueva adquisición y fase móvil B: metanol: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM (88: 12)

### a) Identificación de LCB

Se realizó un nuevo análisis por HPLC de los estándares de PS, SO, SN y se incluyó un nuevo estándar, la d-eritro-C20-esfingosina (d20:1), para este nuevo análisis se utilizó una fase estacionaria de nueva manufactura y una fase móvil B compuesta de metanol (88 %) y un buffer de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM (12%). En estas condiciones se llevó a cabo la detección del derivado de una mezcla que incluye a los cuatro diferentes estándares de bases esfingoideas (Fig. 28A) y se determinaron sus TR, siendo estos: fitoesfingosina (TR= 10.573), esfingosina (TR= 15.659), esfinganina (TR= 25.44) y d-eritro-C20-esfingosina (TR= 27.775) (Fig. 28). Como se muestra en la figura 29A, los estándares presentaron muy buena separación entre ellos y con respecto al frente de elución, por lo que el cambio en las proporciones de la mezcla de disolventes en la fase móvil resultó una buena opción para el análisis de las LCB presentes en las muestras de frijol.

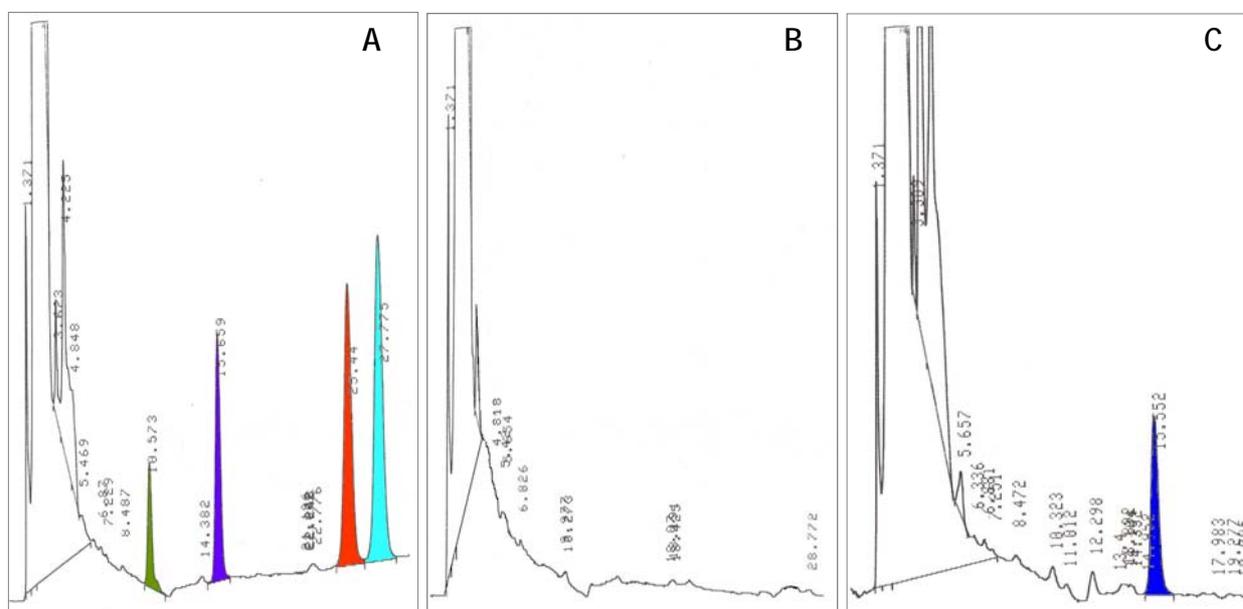


Fig. 29 Cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa de cuatro estándares diferentes (PS, SO, SN, y d20:1) A, Cromatograma del producto de reacción de una mezcla de estándares con NDA. B, Cromatograma del producto de reacción de una mezcla de estándares sin NDA. C, Cromatograma del producto de reacción de SO con NDA Los derivados se detectaron por absorción de luz UV (254 nm). Se inyectaron 8 pmoles de cada estándar en 20  $\mu$ L. Fase móvil: metanol: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM (88: 12). Flujo: 1 mL/ min.

### b) Cuantificación de LCB

La cuantificación de las LCB presentes en los extractos lipídicos de frijol se obtuvo estableciendo primero curvas patrón de cada uno de los estándares como se muestra en la figura 28. Se incluyó un estándar de la d-eritro-C20-esfingosina, el cual se utilizó como estándar interno (Fig. 30). En esta figura se

muestra la curva resultante de la inyección de 4, 8, 10 y 12 pmoles de d20:1, la señal detectada fue perfectamente cuantificable y reproducible.

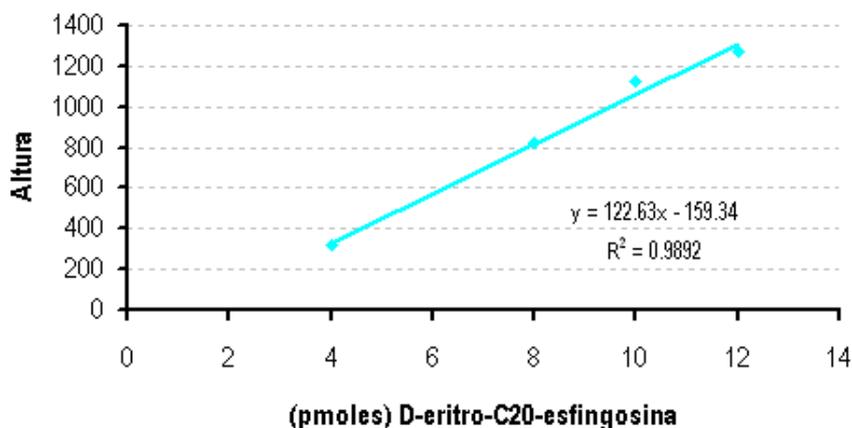


Fig. 30. Curva patrón de la LCB d20:1 como estándar interno.

Se hizo la comparación de los TR de los diferentes estándares, utilizando dos diferentes condiciones cromatográficas, las cuales fueron descritas previamente y se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Comparación de la separación de LCB con dos diferentes condiciones cromatográficas. Primera condición: Columna de uso prolongado fase móvil A: MeOH: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5mM (93.5: 6.5). Segunda condición: columna de nueva adquisición y fase móvil B: MeOH: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5mM (88: 12).

Estándares	Columna de uso prolongado y fase móvil A	Columna de nueva adquisición y fase móvil B
	TR (min)	TR (min)
PS	4.52	10.74
SO	5.76	15.91
SN	7.86	25.95
D20:1	8.28	28.35

Las diferencias mostradas en los TR de cada uno de los estándares fueron muy evidentes (Tabla II y Fig. 27 y 29). Utilizando la fase móvil A, las muestras eluyeron dentro de los primeros 10 min con el problema de que la PS (TR 4.52 min) quedaba muy cerca del frente haciendo difícil su identificación, mientras que con la fase móvil B se logró una muy buena separación de los picos, ya que éstos se presentaban en un rango de 10 a 30 min. El uso de dos diferentes columnas evidenció una mejor separación de los picos cuando se utilizó la columna de nueva adquisición con la fase móvil B, sin embargo, las diferencias observadas entre ambas columnas utilizando la fase móvil A no fueron muy marcadas (datos no mostrados).

### 6.6.2 Identificación de bases de cadena larga de extractos lipídicos

Extracción de LCB según Castegnaro *et al.* (1998)

a) Detección de LCB por HPLC de muestras lipídicas reextraídas de TLC

Una vez que se realizaron las curvas de calibración para cada uno de los estándares y se determinaron los TR de cada uno, se hizo el derivado y el análisis por HPLC de los estándares reextraídos del TLC, encontrándose que los tiempos de retención obtenidos no sufrieron ningún cambio con respecto a los estándares que no fueron reextraídos de la placa. Por otra parte, se hizo el derivado y análisis por HPLC de cada una de las bandas que fueron reextraídas del TLC, incluyéndose un control de la reacción en la que no se añadió el agente derivatizante (NDA) (Fig. 31).

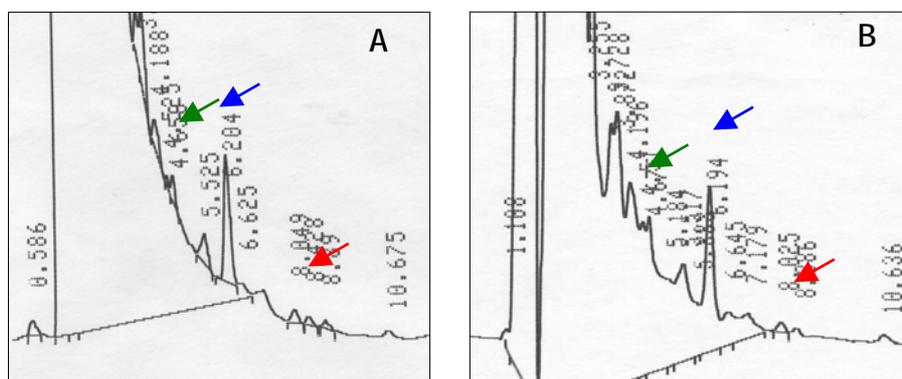


Fig. 31 Cromatograma de detección de las LCB por HPLC. Se hizo el derivado de los extractos reextraídos del TLC. **A.** Muestra reextraída del TLC, obtenida de la banda ancha con  $R_f = 0.4$  y tratada con NDA; **B.** Muestra reextraída del TLC, obtenida de la banda ancha con  $R_f = 0.4$  sin NDA. Fase móvil: metanol:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM (93.5: 6.5). Flujo: 1 mL/min.

El perfil del cromatograma de ambas reacciones (con y sin NDA) fue el mismo (Fig. 31), lo cual indica que el pico más prominente no es el producto de la derivatización del compuesto inyectado y posiblemente se trate de un compuesto lipídico diferente a una BCL y que se tiñe con CBB por la presencia de un grupo amino que no necesariamente es primario. Se realizaron varias reextracciones de las diferentes bandas encontradas en TLC y en ningún caso se logró detectar la presencia de alguna BCL. Las flechas de color indican los TR en los que se hubiera eluido el producto de la derivatización de la PS, SO y SN respectivamente.

#### b) Detección de LCB por HPLC en extractos lipídicos de raíz de frijol

Ya que uno de nuestros objetivos fue detectar y cuantificar BCL presentes en extractos lipídicos de plantas de frijol tratadas con FB1 y patógenos, y al no lograr ver esas bases por HPLC cuando se hace la reextracción de las bandas del TLC, se decidió hacer un análisis por HPLC de un extracto lipídico de homogenados de radículas de frijol tratados con y sin FB1 como prueba (Fig. 32), de este modo, se eliminaba el paso de reextracción del TLC y los pigmentos verdes presentes en el extracto de las hojas. Este mismo extracto de radículas de frijol se corrió en placas de TLC teñidas con CBB y ninhidrina, presentando el mismo patrón de bandas encontrado en extractos de hoja (placas no mostradas).

En los cromatogramas de la figura 32 se detectaron cuatro picos que correspondieron a LCB, ya que éstos desaparecieron cuando la reacción se hizo sin NDA y por sus TR, uno de ellos resultó ser la PS y otro la SN, los otros dos picos presentaron TRs muy parecidos al de la SO, sin embargo, no eran SO y

no se pudieron identificar. Estas bases se encontraron presentes en ambos homogenados, control y con FB1, (Tabla III). En presencia de la toxina, los homogenados presentaron un ligero aumento de PS y no así de SN.

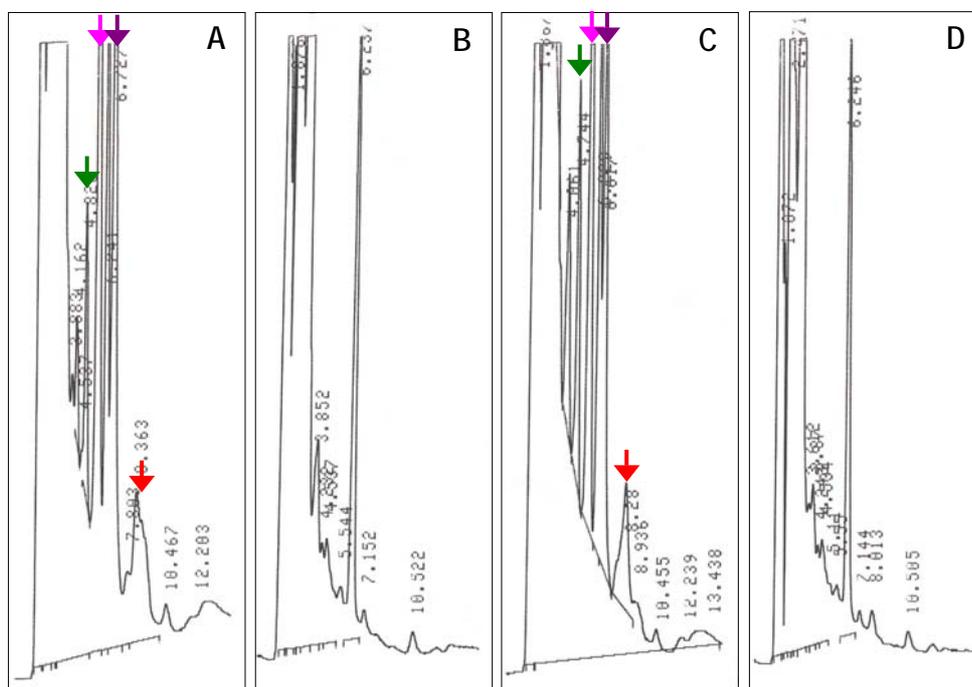


Fig.32 Separación de las LCB presentes en homogenados de radículas de frijol por HPLC. Cromatogramas de dos extractos de homogenados de radículas de frijol germinados durante 68 h; A, homogenado control; B, homogenado control sin NDA ;C, homogenado FB1 10 $\mu$ M; D, homogenado FB1 10 $\mu$ M sin NDA. Fase móvil: metanol: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM (93.5: 6.5). Flujo: 1 mL/ min.

Tabla III. Identificación de LCB en homogenados de radículas de frijol. Se muestran los TR de los diferentes picos detectados por HPLC en homogenados de radículas de frijol en una reacción con y sin NDA.

Muestra	Picos detectados				BCL identificada
	TR (min) sin NDA	Altura	TR (min) con NDA	Altura	
H. control			4.826	465	PS
			5.648	1745	¿?
	6.237	1100	6.241	1214	
			6.727	1277	¿?
			8.363	236	SN
H. FB1			4.744	642	PS
			5.554	1457	¿?
	6.246	1048	6.229	1026	
			6.617	957	¿?
			8.28	203	SN

### 6.6.3 Comparación de la extracción de lípidos membranales por los métodos de Castegnaro *et al.* (1998) y de Markham *et al.* (2006).

Se realizó la extracción de lípidos de la fracción microsomal de hojas de frijol control utilizando los métodos de extracción de Castegnaro *et al.* (1998) y Markham *et al.* (2006) y añadiendo a cada muestra la LCB d20:1 como estándar interno para determinar el % de recuperación (Fig. 33).

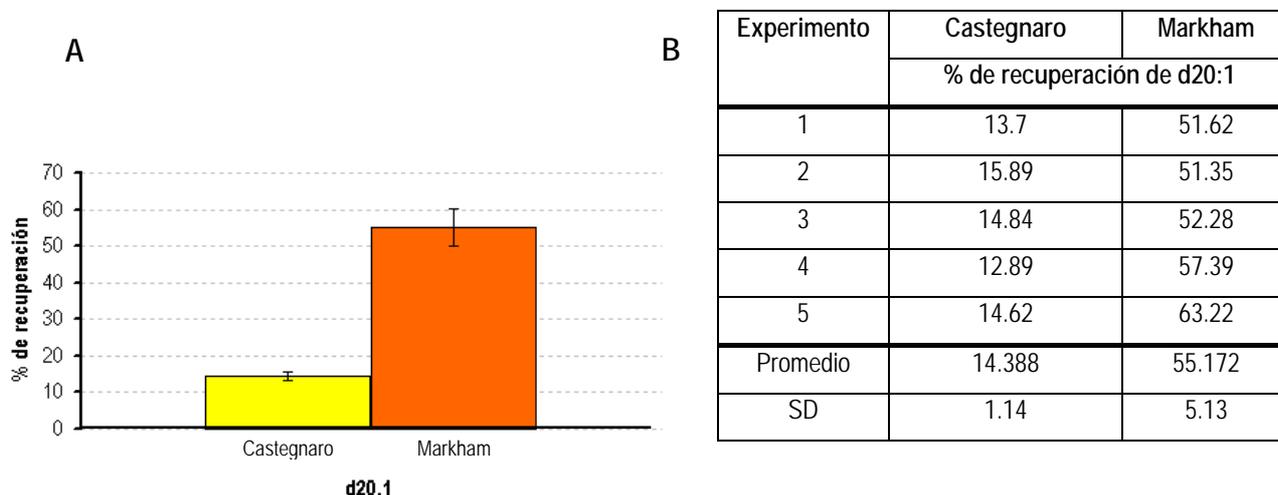


Fig.33 Comparación de la recuperación del estándar interno d20:1 por los métodos de extracción de Castegnaro y Markham. A; representación gráfica; B, representación numérica del % de recuperación, n= 5.

Los resultados obtenidos (Fig. 33) muestran que el método de extracción de Markham (hidrólisis alcalina de esfingolípidos) proporciona un porcentaje de recuperación del estándar interno (d20:1) bastante aceptable ( $55.172 \pm 5.13$ ), comparado con el método de extracción de Castegnaro ( $14.388 \pm 1.14$ ). El método de Markham fue el elegido para la extracción de LCB de hojas de frijol.

### 6.6.4 Derivatización de extractos lipídicos de hojas de frijol expuestas a diferentes tratamientos

Se infiltraron hojas de frijol con  $MgCl_2$ , FB1 y *Pst*. Las hojas fueron cosechadas a diferentes tiempos post infiltración (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 y 48 hpi), se obtuvo la fracción microsomal y se realizó la extracción de lípidos con el método de Markham *et al.* (2006). El perfil de LCB detectadas por HPLC de hojas de frijol control ( $MgCl_2$ ) y tratadas con FB1 y *Pst*, presentó diferencias muy claras entre los tratamientos (Fig. 34).

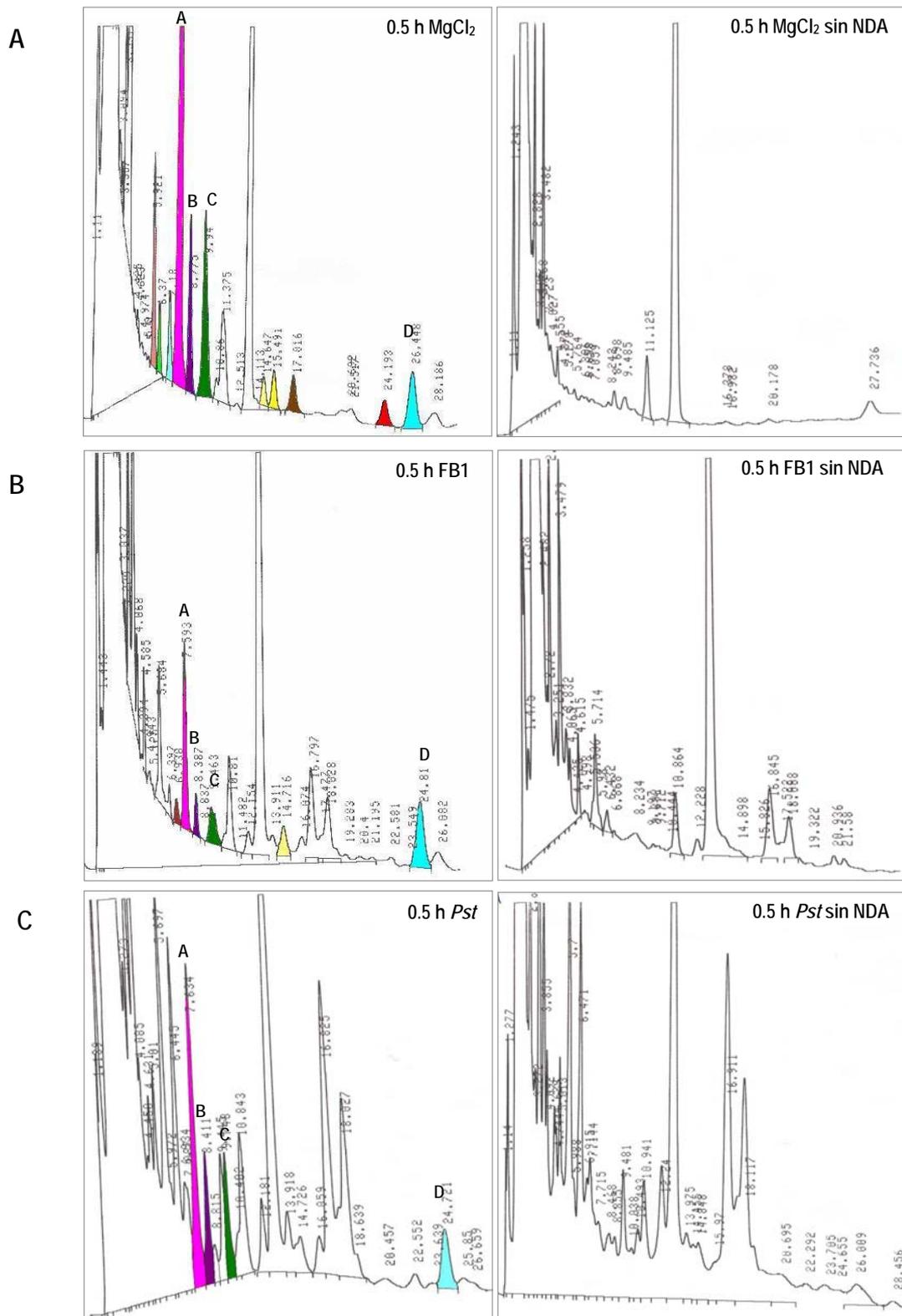


Fig. 34. Cromatogramas de detección de LCB por HPLC en extractos lipídicos de fracciones microsomales de hojas de frijol expuestas a FB1 y *Pst*. Las muestras de hojas fueron obtenidas 0.5 hpi y los extractos fueron hechos de acuerdo a Markham *et al* (2006). **A.** Cromatograma de un extracto de hojas infiltradas con MgCl<sub>2</sub> y que corresponde a un control de 0.5 hpi con y sin NDA. **B.** Cromatograma de un extracto de hojas infiltradas con FB1 y cosechadas 0.5 hpi con y sin NDA. **C.** Cromatograma de un extracto de hojas infiltradas con *Pst* y cosechadas 0.5 hpi con y sin NDA. Para cada cromatograma se inyectó 1 mg de tejido equivalente en 20 µL. Fase móvil: metanol: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM (88: 12). Flujo: 1 mL/ min.

Como se puede ver en los paneles A, B y C de la figura 34, el perfil de LCB presente en cada uno de los tratamientos fue distinto, tanto en número de picos que representan a las LCB como en el tamaño de cada pico; algunos de los picos que siempre fueron muy consistentes y que se presentaron en todas las muestras a todos los tiempos estudiados, fueron los picos marcados como A y B que son picos desconocidos, pero que por las condiciones de extracción y formación del derivado con NDA se puede inferir que son LCB con un grupo amino primario, al igual que C (que corresponde a la PS endógena) y D (que corresponde al estándar interno d20:1). Se encontraron otros picos de menor tamaño que sólo se presentan en algunas muestras, tal es el caso de la LCB SN la cual se encontró en muy poca cantidad (Fig. 34A) y en la mayoría de las muestras no fue detectada. En la Tabla IV, se presentan los resultados obtenidos de hojas infiltradas con los diferentes tratamientos y cosechadas 24 hpi, y en donde se puede corroborar la presencia de los picos A, B y C, que corresponden a LCB endógenas en frijol.

Tabla IV. LCB encontradas en hojas de frijol (picos derivatizados con NDA). Se muestran todos los picos del perfil de elusión. Sólo las fracciones designadas como A y B, además de las identificadas como PS y SN, y el estándar interno fueron diferencialmente derivatizados con NDA. La LCB empleada como estándar interno fue la d20:1 (d-eritro-C20- esfingosina). Los picos fueron designados como equivalentes en los diferentes tratamientos con base en la comparación de los perfiles respectivamente derivatizados y sin derivatizar con NDA.

MgCl <sub>2</sub> 24 h				FB1 24 h				Pst 24 h			
Pico	TR	Alt	pmol/ mg tejido	Pico	TR	Alt	pmol/ mg tejido	Pico	TR	Alt	pmol/ mg tejido
	6.652	1352			6.698	530			6.616	2950	
<b>A</b>	<b>7.379</b>	<b>589</b>			7.048	504			7.098	1047	
<b>B</b>	<b>8.089</b>	<b>1221</b>		<b>A</b>	<b>7.792</b>	<b>1430</b>		<b>A</b>	<b>7.321</b>	<b>1152</b>	
	8.598	257		<b>B</b>	<b>8.59</b>	<b>538</b>		<b>B</b>	<b>8.005</b>	<b>1598</b>	
	8.972	374		<b>PS</b>	<b>9.972</b>	<b>520</b>	<b>12.6</b>		8.819	878	
<b>PS</b>	<b>9.936</b>	<b>430</b>	<b>7.43</b>		10.574	153		<b>PS</b>	<b>9.828</b>	<b>1321</b>	<b>23.14</b>
	10.274	411			11.181	520			10.33	963	
	10.91	244			12.306	370			10.816	705	
	11.686	377			13.195	3390			11.47	897	
	12.756	381			14.343	131			12.638	1206	
	13.722	2323			17.112	411			13.555	3512	
	14.618	217			18.347	266			14.467	720	
	15.119	213		<b>SN</b>	<b>23.602</b>	<b>294</b>			15.417	524	
	15.543	189		<b>D</b> (std. Int)	<b>25.75</b>	<b>391</b>			17.612	3096	
	16.69	100							18.892	1824	
	17.786	1173							21.16	150	
	18.412	286							21.587	159	
	19.07	674						<b>D</b> (std. Int)	<b>26.789</b>	<b>221</b>	
<b>D</b> (Std. Int)	<b>27.283</b>	<b>215</b>									

El haber encontrado diferentes LCB, aun cuando sean de identidad desconocida, resulta de gran interés, pues se sabe que en plantas, existe una gran heterogeneidad estructural entre estos compuestos, debido

principalmente a la inserción de insaturaciones o hidroxilaciones sobre el esqueleto de esfinganina (Dunn *et al.* 2004).

### 6.6.5 Cuantificación de la base de cadena larga fitoesfingosina en fracción microsomal de hojas de frijol

A partir del análisis por HPLC realizado a las diferentes muestras de hojas de frijol control e infiltradas con FB1 y *Pst*, se realizó la cuantificación de la fitoesfingosina ya que fue la única LCB conocida que se encontró consistentemente en todas las muestras analizadas.

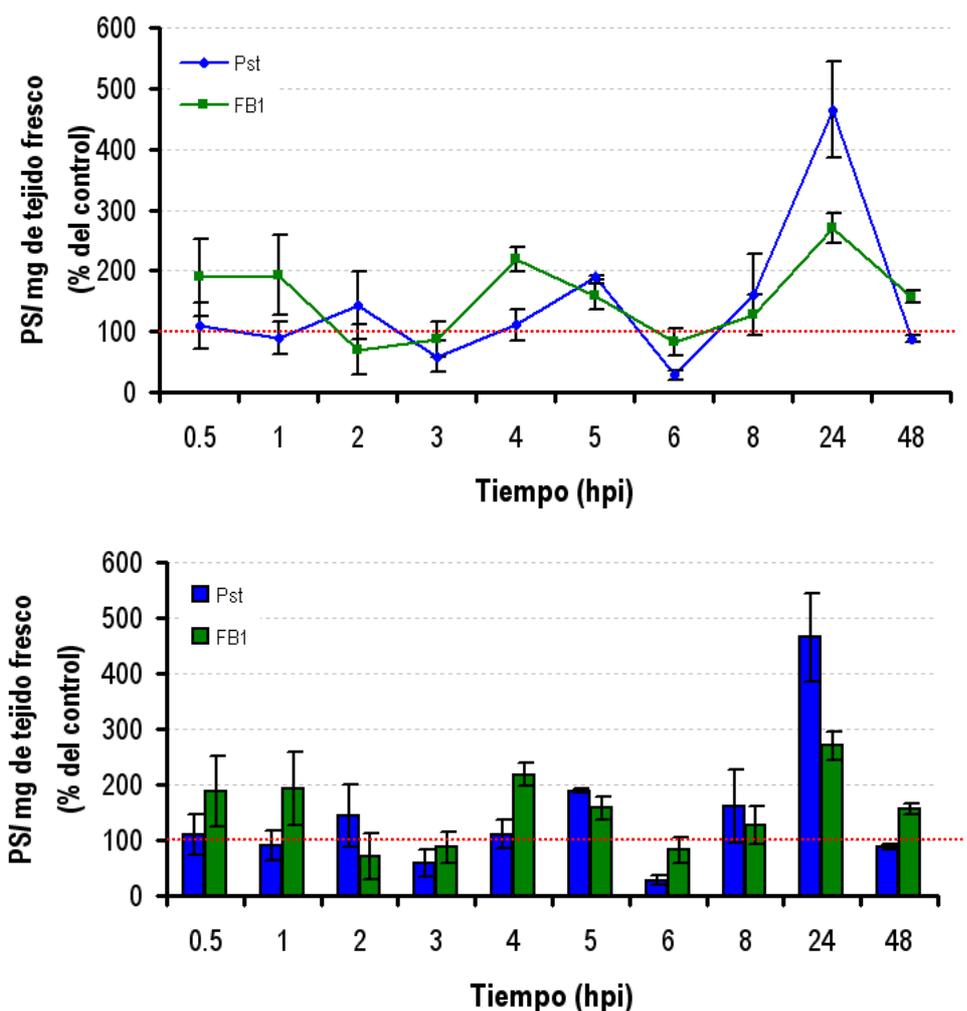


Fig. 35. Cuantificación de fitoesfingosina (PS) en FM de hojas de frijol. Hojas de frijol expuestas por infiltración a 20  $\mu$ L de una solución  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Pst* (azul) y hojas de frijol expuestas por infiltración a 20  $\mu$ L de una solución de FB1 10  $\mu$ M (verde); n= 30 para cada tratamiento (MgCl<sub>2</sub>, FB1 y *Pst*) en 3 experimentos independientes.

En la figura 35 (barras en verde) se muestra el perfil de acumulación de la LCB fitoesfingosina total presente en la fracción microsomal de hojas de frijol expuestas por infiltración a la FB1. La acumulación de PS se presentó de manera diferencial a los tiempos de 0.5, 1, 4, 5, 24 y 48 hpi, siendo a las 24 hpi el tiempo de mayor acumulación, i.e; de 2.7 veces ( $270 \pm 25.45$  pmoles/mg de tejido fresco) con respecto al control, seguido por 4 hpi (2.18 veces con respecto al control) y 0.5 y 1 hpi (1.9 veces con respecto al control); los tiempos en los que se presentó la menor acumulación de PS con respecto al control fueron a

las 5 y 48 hpi (1.57 veces). Por otra parte, las hojas de frijol que fueron tratadas con *Pst* (barras en azul) mostraron un incremento en la acumulación de PS a las 24 hpi que fue de 4.65 veces ( $465 \pm 79.8$  pmoles/mg de tejido fresco) con respecto a su control y a las 5 hpi de 1.9 veces ( $188.9 \pm 2.73$  pmoles/mg de tejido fresco). Estos tiempos de acumulación de PS de 5 y 24 hpi coinciden en ambos tratamientos (FB1 y *Pst*).

Por otra parte, aunque la identidad de los compuestos representados por los picos A y B es desconocida (se comportaron como LCB) (Fig. 34), también se analizó su abundancia relativa en las hojas de frijol infiltradas con FB1 y *Pst* (Fig. 36).

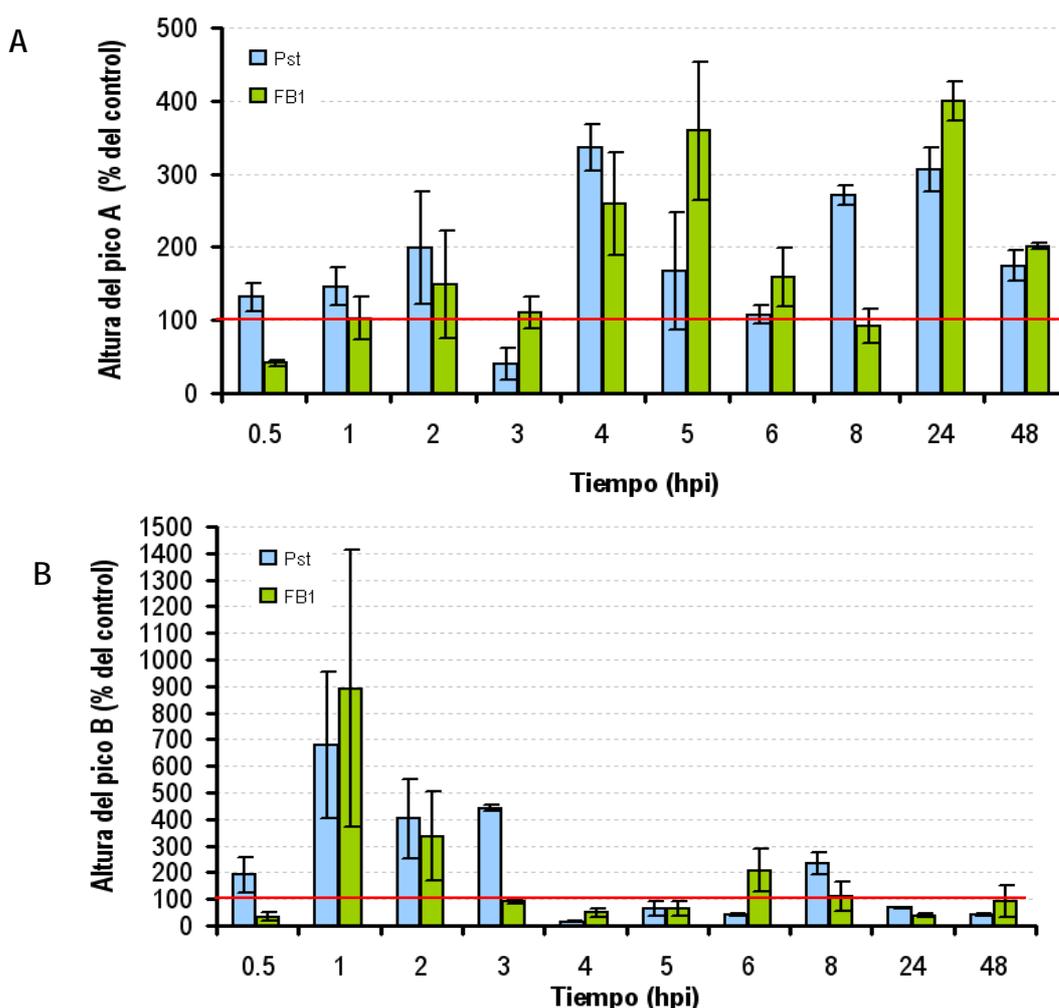


Fig. 36. Perfil de acumulación del pico A y del pico B en FM de hojas de frijol. A) Altura del pico A (% con respecto al control; B) altura del pico B (% con respecto al control). Los valores están expresados como altura del pico/ mg de tejido fresco (% con respecto al control). Hojas de frijol expuestas por infiltración a 20  $\mu$ L de una solución de FB1 10  $\mu$ M (en verde) y hojas de frijol expuestas por infiltración a 20  $\mu$ L de una solución  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Pst* (en azul); n= 30 para cada tratamiento (MgCl<sub>2</sub>, FB1 y *Pst*) en 3 experimentos independientes.

En la figura 36A, cuando las hojas fueron tratadas con *Pst* (barras en azul), se encontró que hay un incremento significativo en la altura del pico A, a los tiempos de 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 hpi, siendo a las 4 y

24 hpi los tiempos de mayor acumulación de esta base que son de 3.4 y 3 veces ( $335.7 \pm 32$  y  $306 \pm 30$  % de la altura del pico/mg de tejido fresco) con respecto al control, respectivamente. Por otra parte, cuando las hojas fueron tratadas con FB1 (barras en verde, Fig. 36A), se encontró un incremento a los tiempos de 4, 5, 6, 24 y 48 hpi, siendo los de 24, 5 y 4 hpi en los que se encontró la mayor acumulación de 4, 3.6 y 2.6 veces con respecto al control, respectivamente ( $400 \pm 27$ ,  $359 \pm 94$  y  $259.5 \pm 70$ ). En cuanto al pico B, (Fig. 36B), encontramos que el tratamiento con *Pst* (barras en azul) indujo la acumulación de esta base a tiempos cortos que van de 0.5, 1, 2, 3, y 8 hpi, presentándose el máximo a la 1 hpi y que fue de 6.8 veces ( $678.6 \pm 275.6$  altura del pico/mg de tejido fresco) con respecto al control. La FB1 (barras en verde), sólo indujo la acumulación de este pico B a las 1, 2 y 6 hpi, siendo el máximo a la 1 hpi, que fue de 8.9 veces ( $890.7 \pm 520$  altura del pico/mg de tejido fresco) con respecto al control, lo cual indica que esta base sólo se acumula a tiempos cortos.

Los resultados encontrados para la PS y la LCB indicada como pico **A**, muestran que hay coincidencia en los tiempos de mayor acumulación de estas bases y con ambos tratamientos que son FB1 y *Pst*, por ejemplo, para la PS los tiempos donde coinciden son 5 y 24 hpi y para el pico A los tiempos donde coinciden son 4, 24 y 48 hpi. En cuanto al pico B, resultó ser muy notable el modo en que cambia, pues se encontró que esta base sólo se acumula a tiempos cortos y el nivel máximo de acumulación, que fue de 1 hpi, coincidió en ambos tratamientos.

## 7 DISCUSIÓN

En este trabajo, se estableció la relación entre esfingolípidos membranales y la respuesta de defensa a patógenos. Para ello, se determinaron los niveles de esfingolípidos endógenos en fracciones membranales de hojas de *Phaseolus vulgaris* en condiciones en que la planta presenta una respuesta de hipersensibilidad, característica macroscópica de defensa en una planta resistente al ataque de un patógeno. La estrategia fue utilizar un sistema de interacción planta-patógeno en el cual, plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) fueron expuestas a patógenos virulentos, patógenos avirulentos y FB1, como formas naturales y artificiales, respectivamente, de inducir cambios en los niveles endógenos de esfingolípidos y/o de sus precursores, según la hipótesis que originó el trabajo.

Varios estudios han demostrado la participación de los esfingolípidos en la transducción de señales y la regulación del crecimiento celular (Dagan *et al.* 2003), algunos de éstos, han involucrado a las micotoxinas análogas a esfinganina (SAMs) y han proporcionado evidencias de la participación de los esfingolípidos y ceramidas en la señalización que lleva a la PCD durante las respuestas a la enfermedad en plantas. Entre las SAMs más abundantes y activas se encuentran las toxinas AAL y la fumonisina B1 (FB1). Se ha demostrado que estas toxinas inducen necrosis, fragmentación de DNA y acumulación de bases de cadena larga (LCB) libres en diferentes tejidos vegetales, lo cual puede ser atribuido a que estas toxinas inhiben competitivamente a la esfinganina-*N*-aciltransferasa (ceramida sintasa) en plantas (Wang *et al.* 1996; Moore *et al.* 1999; Asai *et al.* 2000). Con lo anterior, algunos autores han sugerido que las LCB están implicadas en la muerte celular manifestada en la HR (Spassieva *et al.* 2002).

En organismos multicelulares, la muerte celular ocurre como necrosis o como muerte celular programada (PCD), la cual está genéticamente definida. En la necrosis, las células mueren en respuesta a un trauma y tienen poco o nulo control sobre los procesos que llevan a la muerte. En contraste, la PCD es un proceso activo que involucra vías de señalización que controlan el desmantelamiento de la célula. En plantas, la PCD no sólo es reconocida como un importante proceso en el desarrollo de la planta, sino también como un componente esencial en las respuestas de defensa contra patógenos. La rápida y localizada muerte celular conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR) en plantas resistentes a patógenos puede ser activada a través de interacciones gen por gen: entre genes de resistencia (*R*) de la planta y genes de avirulencia (*avr*) del patógeno (Flor, 1971; Hammond-Kosack y Jones, 1997). Sin embargo, ni todas las respuestas de defensa efectiva requieren de la manifestación de la HR, ni la presencia de ésta asegura una resistencia absoluta a la enfermedad (Stone *et al.* 2002; Asai *et al.* 2002; Spassieva *et al.* 2002; Tao *et al.* 2003; Kiba *et al.* 2006).

## La respuesta de enfermedad o de defensa en el sistema Phaseolus-FB1-Patógeno

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos de los dos primeros objetivos particulares establecidos en este trabajo de tesis y que son: explorar si la adición de FB1 produce una respuesta de defensa en *Phaseolus vulgaris*, e inducir una respuesta de enfermedad o de resistencia en *Phaseolus vulgaris* por patógenos bacterianos.

Una de las condiciones iniciales importantes de satisfacer en el sistema experimental que se usó, era verificar que las soluciones utilizadas como disolventes (H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, y silwet L-77) por sí solas no generaran ningún daño que interfiriera en nuestros resultados. El resultado que se obtuvo fue conveniente, ya que ninguna de las soluciones infiltradas (H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, y silwet L-77) causó daño ni severo ni progresivo en el tejido de la hoja, lo cual nos permitía continuar con la caracterización del tipo de lesión que produce la toxina FB1 y cada una de las cepas bacterianas utilizadas, cuando éstas fueron infiltradas en hojas de frijol. Como patógeno virulento de frijol, se utilizó la cepa bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (*Xapf*). Cabe mencionar que *Xapf* es una bacteria patógena virulenta de frijol y, cuando éste es infectado, se dañan severamente el follaje y las vainas (Cruz *et al.* 2001). La infiltración de esta bacteria (*Xapf*) dió como resultado grandes zonas de clorosis y necrosis en el foliolo entero, síntomas que fueron claramente visibles desde las 48 h post infiltración, alcanzándose el daño total del foliolo entre los días 7 y 11 post infiltración; este resultado se caracterizó como una respuesta de enfermedad en *Phaseolus vulgaris*. Por otra parte, la infiltración de las bacterias *Erwinia chrysanthemi* (*Ech* 3937), *Erwinia carotovora* (*Ec* 71) y *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst* DC3000 avrRPM1) en hojas de *Phaseolus vulgaris*, dió como resultado una lesión típica de HR, característica de una respuesta de resistencia de la planta en una interacción incompatible. Hay que recordar que muchas de las interacciones planta-patógeno incompatibles (de no-enfermedad) no dependen del modelo clásico de resistencia gen por gen, así que es posible que el tipo de resistencia que se estaba presentando (y en el que no hay una interacción génica *R/Avr*) se debiera a un tipo de resistencia no específica, la cual puede generarse de tres diferentes maneras: la primera, que se presente una interacción del patógeno con una planta no hospedera (*nonhost interaction*, Talarczyk y Henning, 2001), en la que la planta no está habilitada para satisfacer los requerimientos del patógeno, resultando éste incapaz de crecer bajo estas condiciones; la segunda es que se presente una resistencia a un patógeno por una planta no hospedera (*nonhost resistance*, Talarczyk y Henning, 2001), en la cual, el hospedero cuenta con suficientes sistemas de defensa preformados, tales como barreras estructurales o compuestos tóxicos que limitan el crecimiento y/o desarrollo del patógeno y, la última, de *resistencia*, en la que los mecanismos de defensa inducibles del hospedero son suficientes para restringir el crecimiento y/o desarrollo del patógeno (Talarczyk y Henning, 2001).

Cuando la infiltración se realizó con la FB1, el resultado obtenido fue muy interesante, pues la toxina indujo la formación de lesiones necróticas de localización discreta alrededor del sitio de infiltración y

similares a las lesiones inducidas por patógenos avirulentos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Stone *et al.* (2000), en donde las plantas de *Arabidopsis* expuestas a 1 y 10  $\mu\text{M}$  de FB1 presentaron lesiones macroscópicas similares a las lesiones inducidas por patógenos. Es importante mencionar que tanto en el trabajo de Stone *et al.* (2002) como en el de Asai *et al.* (2002), si bien relacionaron la acción de la FB1 con reacciones de defensa en *Arabidopsis*, nunca abordaron la naturaleza del mecanismo por el cual se presentaba esta asociación, pero enfatizaron la asociación entre las toxinas y la manifestación de la muerte celular. En este sentido, un resultado importante es el de Kuroyanagi *et al.* (2005), quienes demostraron que la enzima procesadora vacuolar (VPE: vacuolar processing enzyme) desencadena la fragmentación de la membrana vacuolar durante la muerte celular inducida por la FB1, la cual es seguida por la formación de lesiones necróticas en hojas de *Arabidopsis*. Lo anterior sugiere que tanto la muerte celular inducida por FB1 como la muerte celular hipersensible observada en hojas de *Arabidopsis* pueden compartir el mecanismo de lisis vacuolar mediado por VPE (Kuroyanagi *et al.* 2005). Estos resultados son consistentes con el esquema de muerte celular al que conduce el rompimiento de la vacuola y que es propio de la autofagia, por lo cual la FB1 resultaría estar desencadenando un proceso de autofagia que se expresa fenotípicamente como una lesión tipo HR, en cuanto a que está asociada a la contención de la diseminación del patógeno. Esto último estaría apoyado por los resultados del laboratorio de Ausubel en *Arabidopsis* (Stone *et al.* 2002, Asai *et al.* 2002) y de los del presente trabajo en frijol. Es importante hacer notar que los trabajos mencionados en la literatura no determinaron niveles de esfingolípidos complejos ni de sus precursores.

#### **“Efecto protector” de FB1 y de bacterias patógenas avirulentas**

Para evaluar si la reacción inducida por la FB1 en frijol era similar a una HR en la que se despliegan respuestas moleculares de defensa ante la presencia de un patógeno, se planteó la siguiente hipótesis: “Si la FB1 está promoviendo reacciones de defensa, el desarrollo de un patógeno en el foliolo se verá contenido por la infiltración de la FB1”. Lo mismo sucedería con la infiltración de un patógeno avirulento que induce HR. Según la hipótesis general del presente trabajo (basada en antecedentes de la literatura y de nuestro laboratorio), el denominador común entre ambos inductores serían los niveles endógenos de esfingolípidos. El resultado que se obtuvo al infiltrar de manera casi simultánea FB1 y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (*Xapf*), *Ech* y *Xapf*, y por último *Pst* y *Xapf*, fue que en los tres casos, tanto la FB1 como la *Ech* y la *Pst* confirieron protección contra la infección por *Xapf*. Este efecto protector se observó en hojas infiltradas en el mismo foliolo, pero en distinto punto de infiltración (Fig. 14). También se observó el efecto protector, aunque en menor grado, cuando la infiltración se realizó en diferentes foliolos de un mismo trifolio y no se observó protección cuando la infiltración se hizo en diferentes trifolios (datos no mostrados). Estos resultados indican que cualquiera que sea la vía por la que estos factores están induciendo un fenotipo de defensa, ésta tiene un radio de acción de corto alcance que no alcanza a ser sistémico.

Por otra parte, se determinó el *Índice de Enfermedad* (IE) para estimar el progreso de la infección (Yang *et al.* 2002) causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (*Xapf*). Los resultados obtenidos indicaron que en todos los casos donde *Xapf* fue infiltrada, el IE fue mayor al calculado cuando se infiltró con FB1 y/o *Ech*. Aunque estos datos representan un parámetro cualitativo de defensa, sí constituyen una clara evidencia de que la FB1 está inhibiendo el daño ocasionado por *Xapf*, por lo que la lesión causada por la FB1 en hojas de frijol puede estar compartiendo características de una lesión de HR, en la que se están promoviendo reacciones de defensa. Los controles diseñados para descartar que la FB1 no causaba ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Xapf*, *Ech*, o *Pst* indicaron que el efecto de protección causado por la FB1 estaba dado por un mecanismo inherente a la planta y no a la toxicidad directa de la FB1 sobre la bacteria. Estos resultados tienen que ser comparados con la cuantificación de UFC que se realizó para *Xapf* en presencia de FB1 y *Ech* en hoja y en los que se encontró que ni la FB1, ni *Ech* inhibían el crecimiento de *Xapf*, ya que el perfil cuantitativo de crecimiento de *Xapf* (determinado como UFC/cm<sup>2</sup> de hoja, en el sitio de infiltración) fue el mismo cuando se co-infiltró con FB1, *Ech* o MgCl<sub>2</sub>. Estos resultados ponen de relieve una observación importante: el número de colonias de *Xapf* fue el mismo tanto en aquellas hojas que fueron protegidas por la FB1 o por el patógeno avirulento, como en las que presentaron un claro fenotipo de enfermedad. Sin embargo, en estas últimas, el avance de la infección fue notorio, mientras que en las hojas "protegidas" por la toxina o el patógeno avirulento, la expansión del patógeno virulento fue contenida espacialmente. Lo anterior indica que la infección está siendo controlada en las hojas protegidas (y que muestran una lesión tipo HR), no por una menor proliferación bacteriana, sino por una contención en su diseminación por el tejido adyacente al sitio de infiltración. Este resultado sugiere que la respuesta molecular de defensa de la planta contra el patógeno está relacionada con el proceso de control del número de las células que experimentan muerte ante el patógeno, para detener su diseminación, lo cual corresponde a la definición de HR.

El crecimiento de *Erwinia chrysanthemi* (*Ech*) y *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (avrRPM1) (*Pst*) prácticamente no varió o decayó muy lentamente a través del tiempo muestreado, lo cual pone en evidencia su carácter de controles positivos como patógenos con crecimiento circunscrito al área de inoculación (y que inducen una HR). Los resultados reseñados están de acuerdo con el crecimiento bacteriano producido por el patógeno avirulento *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* en *Arabidopsis thaliana*, el cual probó ser el mismo, tanto en la cepa silvestre, como en dos mutantes resistentes a FB1, las cuales expresan menos genes de defensa y un fenotipo de muerte extendida en las zonas de inoculación del patógeno (Stone *et al.* 2002).

Una forma de explicar el efecto de protección causado por la FB1 es que la toxina podría estar presentando un fenómeno análogo al de protección cruzada. Éste se presenta por la infección de la planta por cepas no virulentas, ya sean de virus, hongos, bacterias, o por la presencia de productos metabólicos de éstos y que inducen resistencia ante el ataque de patógenos virulentos, posiblemente debido a la

activación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Fulton, 1986; Platero Sanz y Fuchs, 2005). En términos de la hipótesis de este trabajo, se tendría que postular que el o los mecanismos de defensa inducidos por estos patógenos avirulentos y la FB1 serían los mismos. Siin embargo, se sabe muy poco de las bases moleculares del mecanismo de protección cruzada.

Existen varios reportes que indican que la toxina FB1 induce respuestas de defensa en *Arabidopsis*, entre éstas, se encuentra la deposición de compuestos fenólicos y callosa, producción de ROS (especies reactivas de oxígeno), acumulación de camalexina, expresión de genes PR, fragmentación del DNA, activación de nucleasas, e inducción de PCD vinculada a vías de transducción de señales dependientes de jasmonato, etileno y salicilato (Asai *et al.* 2000, Stone *et al.* 2000). Nuestros resultados en frijol son consistentes con estos reportes, y podrían deberse a la activación de respuestas de resistencia inducidos en la planta por mecanismos conservados. En este caso, dado los antecedentes que sugieren a esfingolípidos o a sus precursores como moléculas señalizadoras de vías de defensa y dado el mecanismo de inhibición metabólica de la FB1, la pregunta siguiente fue: estas respuestas de defensa que tienen en común la expresión de la HR, ya sea producida por un patógeno avirulento o por la FB1, ¿están asociadas a cambios en los niveles endógenos de esfingolípidos?

#### **Detección de bases de cadena larga en condiciones de HR**

El siguiente paso fue la determinación de los niveles endógenos de bases esfingoideas membranales en condiciones en las que se presentaban reacciones de defensa inducidas por FB1 o por un patógeno bacteriano avirulento. Para ésto, se aislaron fracciones membranales totales de hojas de frijol controles (infiltradas con MgCl<sub>2</sub>) e infiltradas con FB1 y el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 (avrRPM1) (*Pst*), se hizo la extracción de lípidos y se determinaron los niveles de LCB por TLC o HPLC.

Los resultados recientes en el análisis de esfingolípidos en plantas revelan una gran complejidad en su identificación y cuantificación, dadas su estructura y diversidad (Markham *et al.* 2006; Markham y Jaworsky, 2007). Lo anterior ha llevado a la implementación de técnicas que van desde la extracción selectiva de estos lípidos hasta su identificación y cuantificación. Para ello han sido empleadas las técnicas de cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y cromatografía en capa fina (TLC), entre otros métodos analíticos.

Una de las técnicas utilizadas en este trabajo fue la cromatografía en capa fina (TLC), debido a que es un método rápido en el que se pueden comparar varias muestras en una misma cromatografía, además de ser una técnica relativamente económica. Con esta técnica se compararon dos extractos lipídicos de frijol, uno control y el otro de hojas infiltradas con FB1 (Fig. 19), además se incluyeron tres estándares de LCB (PS, SN, y SO; esta última se incluyó como estándar interno), lográndose la detección de las bandas correspondientes a los estándares de LCB utilizados, además se reveló una banda desconocida teñida muy intensamente con el colorante azul de Coomassie (CBB) (banda densa) y que no

correspondió a ninguno de los tres estándares utilizados. Por reportes en la literatura es posible que se trate de la LCB dehidrofitoesfingosina (t18:1), ya que es una base muy abundante en frijol y en otros tejidos vegetales (Carter y Koob, 1969; Markham *et al.* 2006). Debido a que las LCB difieren estructuralmente en el número de hidroxilaciones e insaturaciones, así como en la longitud de su cadena hidrocarbonada, éstas pueden migrar diferencialmente según el grado de polaridad que presenten; de acuerdo a lo anterior, se probaron diferentes fases móviles en TLC que diferían entre ellas en su polaridad, con el fin de encontrar una condición que permitiera una mejor separación de las LCB estándar y en particular de la LCB que no correspondía a ninguno de los estándares. La fase móvil encontrada (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH 2 N (65:25:4) permitió detectar al menos tres bandas en los extractos lipídicos de frijol, lo cual sugería que podría haber más LCB además de la detectada previamente por su tinción con el colorante azul de Coomassie (CBB) (Hanada y Nishijima, 2000). Esta tinción se basa en interacciones electrostáticas en medio ácido entre moléculas del colorante y los grupos amino, que en este caso serían los grupos amino de las LCB. Para verificar estos resultados, se probó la tinción con ninhidrina, ya que este es un colorante que se une de manera más específica al grupo amino primario, mismo que presentan las LCB. Con esta tinción también se encontró la presencia de al menos tres LCB, de las cuales una podría ser la fitoesfingosina (PS) (Rf= 0.41, que coincide con el Rf del estándar de PS que se utilizó).

Ya que nuestro interés en este trabajo era determinar los niveles endógenos de bases esfingoideas membranales en condiciones en que se presentaban reacciones de defensa inducidas por FB1 o patógenos bacterianos, se hizo una curva de tiempos (de 0.5 a 3 hpi) de hojas de frijol control (infiltradas con MgCl<sub>2</sub>) e infiltradas con FB1 y con el patógeno *Pst*. Se aislaron sus fracciones membranales y se hizo la correspondiente extracción de lípidos, los cuales fueron aplicados a una placa de TLC con el fin de caracterizar el efecto de la FB1 y de la *Pst* en los niveles de LCB. Fue posible observar una ligera acumulación de una banda con Rf de 0.54 a los tiempos de 0.5 y 1.0 h y de otra banda con un Rf de 0.76 al tiempo de 2.0 h; estas bandas provenían de extractos de hojas infiltradas con 10 µM de FB1. Por esta técnica no se detectó la acumulación de alguna de las bandas presentes en los extractos de hojas infiltradas con el patógeno, al menos a tiempos cortos de 0.5 a 3.0 hpi. Cabe mencionar que estas bandas no corresponden a ninguno de los estándares utilizados. La presencia de estas posibles LCB nos llevaron a plantear las siguientes preguntas: ¿Cuáles de estas bases se acumulan por acción de FB1 o de patógenos en frijol? ¿Qué tanto se acumulan en las membranas?, ¿Es dehidrofitoesfingosina una de ellas? Para contestar estas preguntas se extrajo directamente de la placa de TLC el compuesto lipídico presente en cada una de las bandas para su análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), ya que es un método con mayor sensibilidad de detección de LCB (>2 pmoles) que la técnica de TLC (>5 000 pmoles). Se hizo una cromatografía en fase reversa, en la que la fase estacionaria era no polar y la fase móvil era polar, lo que permitió resolver las especies de LCB individuales evitando la interferencia entre ellos. Este método proporciona un nivel de identificación basado en los tiempos de

retención (TR) de los estándares conocidos. Para el análisis de LCB se utilizó como agente derivatizante al NDA (naftalen-2,3-dicarboxialdehído), cuya reacción en presencia de cianuro se une de manera muy específica al grupo amino primario de la LCB, revelando de esta manera la presencia de LCB en las muestras analizadas. Se realizaron curvas de concentración de los estándares de LCB (PS, SO, SN y la *D*-eritro-C20-esfingosina (d20:1)), comparando los TR de cada uno de éstos y utilizando dos diferentes condiciones cromatográficas: 1) columna de uso prolongado (la fase estacionaria estaba muy usada) y fase móvil **A** (metanol: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM (93.5: 6.5)) y 2) columna de nueva adquisición (fase estacionaria de nuevo uso) y fase móvil **B** (metanol: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM (88: 12)). Las diferencias encontradas en los TR observados para cada uno de los estándares, mostraron la importancia de elegir una fase móvil adecuada. En nuestro caso, en comparación de la fase móvil **A**, la fase móvil **B** permitió una buena separación de los picos (compuestos presentes en la muestra y que absorben a 254 nm), tanto alejados del frente del cromatograma como con TR diferentes entre ellos (mejor resolución), permitiendo hacer una mejor identificación. En una separación por fase reversa, la fuerza eluyente disminuye a medida que la fase móvil se hace más polar y esto se observó cuando se utilizó la fase móvil **A** (Figs. 26A y 31), mientras que, cuando se aumentó la fuerza eluyente (fase móvil **B**) se consiguió una mejor separación de los picos (Figs. 28A y 33).

Entre las LCB más abundantes identificadas recientemente en hojas de tres especies vegetales (*Arabidopsis*, tomate y frijol de soya) se encuentran la t18:0 (fitoesfingosina), t18:1 (fitoesfingenina o dehidrofitoesfingosina), d18:2 (esfingadienina), d18:1 (esfingosina) y d18:0 (esfinganina). En frijol de soya se reportó que la base más abundante es la t18:1, seguida por la t18:0 (Markham *et al.* 2006). Con estos antecedentes se esperaba detectar en las bandas reextraídas del TLC al menos a estas dos LCB, sin embargo, los resultados no mostraron indicios de la presencia de alguna de estas bases, debido posiblemente a que la cantidad de muestra reextraída no fue suficiente para lograr su detección ni por TLC ni por HPLC. La re-extracción del compuesto de la placa de TLC se hizo también con el fin de obtener un compuesto más puro que facilitara la identificación de la LCB, ya que las muestras provenían de tejido fotosintético, con una gran variedad de compuestos que pueden absorber luz UV a 254 nm, lo que podría afectar el análisis de las muestras por HPLC. Los resultados de la detección de 4 LCB derivatizables con (NDA), (una correspondiente a la LCB fitoesfingosina y otra a esfinganina), en raíces de frijol sugirieron que se podrían encontrar esas mismas bases en tejido de hojas, ya que el perfil de bandas en placa de TLC fue el mismo que se encontró en extractos de hoja.

La forma de extracción de lípidos es un paso importante en este trabajo, pues se requería de un método eficiente que rindiera una buena recuperación de las LCB endógenas de nuestro tejido de estudio. Para esto, se probaron dos métodos de extracción, el primero fue reportado para el análisis de LCB libres a partir de suero humano y utiliza acetato de etilo para la extracción (Castegnaro *et al.* 1998). Con este método, la recuperación máxima alcanzada fue del 13-16% (14.388 ± 1.14 %) de acuerdo al estándar

interno añadido (D-eritro-C20-esfingosina, que es una base ausente en tejidos vegetales y cuyo TR en los cromatogramas obtenidos por HPLC no interfería con los TR de los picos presentes en las muestras analizadas). El segundo método, fue reportado para la identificación de LCB a partir de la hidrólisis de esfingolípidos complejos (Markham *et al.* 2006) a partir de una hidrólisis fuerte con Ba(OH)<sub>2</sub> y calor (16h a 110°C). Con este método se logró la recuperación de un 51-63 % (55.172 ± 5.13) de bases de cadena larga totales, mismas que fueron determinadas a partir del estándar interno utilizado y que ha sido utilizado para el análisis y comparación de bases de cadena larga presentes en hojas de tres especies vegetales diferentes: Arabidopsis, tomate y frijol de soya (Markham *et al.* 2006).

### **Efecto de la FB1 y de la inoculación con la bacteria *Pst* DC3000 (avrRPM1) en los niveles de bases de cadena larga**

Como resultados iniciales, habíamos determinado que la FB1 y patógenos bacterianos que resultaron no virulentos para frijol inducían un "efecto protector" contra la infección por *Xapf* en las hojas de la planta. Lo anterior y los antecedentes de la literatura (Asai *et al.* 2000, Stone *et al.* 2000) hacían suponer que se estaban llevando a cabo reacciones de defensa inducidas tanto por FB1 como por *Ech* y *Pst*. Ya que un mecanismo de acción de la FB1, es su inhibición sobre la esfinganina *N*-acil transferasa, enzima que produce ceramida con una concomitante acumulación de sus sustratos, se determinaron los niveles de las LCB tanto en las fracciones membranales de hojas infiltradas con una de las cepas bacterianas que resultaba avirulenta (*Pst*) y que inducía una respuesta de HR en las hojas, como en las de hojas infiltradas con FB1.

Como sabemos, los esfingolípidos además de formar parte de las membranas celulares, tienen funciones de señalización. Nosotros exploramos si en las condiciones en que se estaban llevando a cabo reacciones de defensa en una planta completa, encontrábamos cambios en los niveles de algunas LCB y a los tiempos a los que se llevaban a cabo estos cambios. Los resultados indicaron que efectivamente hay cambios en los niveles de LCB presentes en los tratamientos, encontrándose tres picos que se presentaban de manera consistente en todas las muestras y que por su reacción con NDA presumiblemente son bases de cadena larga, siendo uno de esos picos identificado como PS de acuerdo a su tiempo de retención. Cuantitativamente, encontramos que la PS (t18:0) en hojas tratadas con FB1 y *Pst*, fue una de las LCB que sufre cambios en estas condiciones de estudio, y que presenta elevaciones transitorias a los tiempos de 0.5, 1, 4 (2.18 veces), 5 (1.6 veces), 24 (2.7 veces) y 48 hpi en hojas infiltradas con FB1. Cuando el tratamiento fue con *Pst*, la acumulación de PS se dio a los tiempos de 5 (1.9 veces) y 24 (4.65 veces) hpi. Aunque la magnitud de los incrementos a estos tiempos no coincidió con los inducidos por FB1, sí fue evidente que se presentaron incrementos en ambos tratamientos. Los resultados en la acumulación diferencial de fitoesfingosina inducida por la FB1 concuerdan con los ya reportados para otras especies vegetales, por ejemplo, en embriones de maíz se encontró que a las 24 h

hay una acumulación de PS (4 veces) en FM y de SN (10 veces) en vesículas de membrana plasmática por acción de la toxina (Gutiérrez-Nájera, 2005). También, se ha encontrado que en lenteja de agua, tomate y tabaco, las LCB que se acumulan por acción de la FB1 son la PS y la SN (Abbas et al. 1994; Abbas et al. 1998). En nuestro modelo de estudio, la SN sólo se detectó en muy pocas muestras y con un patrón un tanto errático, siendo a las 48 hpi con FB1, el tiempo al cual se presentó una máxima acumulación con más consistencia y que fue de 2.5 veces con respecto al control en FM (datos no mostrados).

En nuestro sistema, otras posibles LCB (designadas como pico A y pico B) también presentaron cambios en los niveles de acumulación a los diferentes tiempos y con los dos tratamientos (FB1 y *Pst*). Los cambios en los niveles del pico A en muestras tratadas con FB1 y con *Pst* mostraron un comportamiento muy parecido al perfil de la PS. Específicamente, el pico A en las muestras tratadas con FB1 coincidió claramente con la PS a los tiempos de 4, 5, 24 y 48 hpi, mientras que en las muestras tratadas con *Pst* concordó en las 24 hpi. Estos datos sugieren que tanto la PS como el pico A son LCB que podrían estar fluctuando en paralelo en asociación a una respuesta de defensa en plantas. En cuanto al pico B, éste presentó un comportamiento algo diferente, pues esta base sólo se acumuló en las primeras 3 hpi y presentó una acumulación máxima al tiempo de 1 hpi con ambos tratamientos. Una de las características cromatográficas de las probables LCB A y B es que en el HPLC éstas eluyen antes que la PS, lo que sugiere una naturaleza más polar. Esta polaridad, puede deberse a la presencia de un doble enlace, lo cual las haría más polares que la PS. El reporte de Markham *et al.* (2006) muestra un perfil cromatográfico de HPLC de diferentes LCB (Fig. 37A) que, comparado con el perfil obtenido en este trabajo (Fig. 37B) sugeriría que los picos A y B podrían corresponder a la dehidrofitoesfingosina (t18:1) con sus dos diferentes isómeros: t18:1 (8Z) (pico 3, Fig. 37A) que coincide con la posición del pico A en la fig. 37B y t18:1(8E) (pico 4, Fig. 37A) que concuerda con la posición del pico B de la figura 37B. Un dato que apoya esta propuesta es que la t18:1 es una de las bases más abundantes en frijol (Carter y Koob, 1969 y Markham *et al.* 2006).

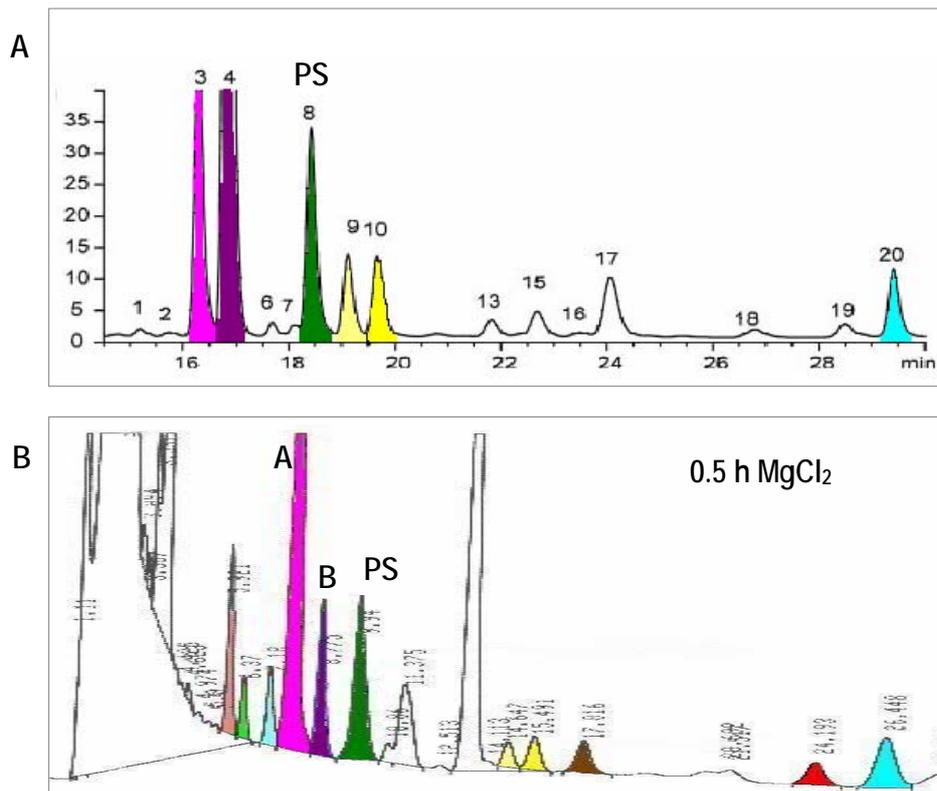


Fig. 37 Perfil de bases de cadena larga. A) Cromatograma de Markham *et al.* 2006; B) Cromatograma obtenido en este trabajo.

Acerca del modo de acción de la PS y de las otras posibles LCB en la generación de un fenotipo de defensa contra patógenos semejante al de una HR, se puede proponer a las LCB detectadas en *Phaseolus vulgaris* como candidatos para la generación de señales de muerte celular programada en plantas, ya que su acumulación se encontró en condiciones en que las hojas presentaban una lesión de HR o del tipo de HR. Consistente con esta asociación, se ha reportado que hojas de tomates tratadas con la toxina AAL o FB1 y que presentan muerte celular programada, acumulan a las LCB dihidroesfingosina (DHS: esfinganina) y fitoesfingosina (PS) (Abbas *et al.* 1994; Spassieva *et al.* 2002). Adicionalmente, los experimentos realizados por Kuroyanagi *et al.* (2005) sugieren que la muerte celular inducida por la FB1 se debe a la inhibición de la síntesis de ceramida (y por tanto a un aumento en LCB), que estaría asociada a la pérdida de integridad de la membrana vacuolar (enriquecida en esfingolípidos). Con ello, la modulación en la composición lipídica de las membranas de la vacuola podría llevar a un colapso vacuolar desencadenado por VPE y que desembocaría en la autofagia, que es una forma de muerte celular programada. Esta muerte serviría para detener la diseminación del patógeno contribuyendo al fenotipo de resistencia. Si bien los trabajos de los grupos de Ausubel (Stone *et al.* 2000; Asai *et al.* 2000) y Kuroyanagi *et al.* (2005) no establecieron los niveles de LCB en las condiciones en las que la FB1 indujo muerte celular y respuestas de defensa, sí es posible suponer que hubo un aumento de estos compuestos en esas condiciones experimentales, dadas las concentraciones de la toxina que usaron y su mecanismo

universal de acción, con lo que sus experimentos constituyen un punto adicional de soporte para la asociación LCB-HR-Muerte Celular-Defensa.

¿Cuál sería con precisión el papel de estas bases de cadena larga en el proceso de muerte celular? Ésta es la pregunta que ahora procede hacerse. En el mismo sistema de frijol, nuestro grupo ha descrito que hay MAP cinasas que se activan por LCB, en particular por la SN, que es la que se ha probado hasta ahora. Aparentemente, la MAPK activada es una que participa en vías de defensa contra patógenos y la cinética de activación coincide con los incrementos transitorios de la PS y de la LCB putativa correspondiente al pico A. Por lo tanto, estas bases podrían estar funcionando como segundos mensajeros. A este respecto justamente la PS es sustrato de una cinasa de esfingosina que participa en la vía de transducción para el cierre de estomas y que es el único sistema en plantas en el que se han descrito esfingolípidos como moléculas transductoras en vías de señalización (Coursol *et al.* 2005). Otra forma posible de participación de la PS es como agente perturbador de la membrana mitocondrial en la vía de muerte celular, como se ha reportado en la apoptosis de células de linfoma (Nagahara *et al.* 2005). A este respecto, es procedente mencionar que en embriones de maíz, la FB1 promueve un aumento de PS de 7 veces en las membranas microsomas, las cuales contienen membranas de todas las organelas, incluyendo mitocondrias. En el presente trabajo, las fracciones en las que se cuantificaron las LCB fueron membranas microsomas, por lo que es posible que la PS esté enriquecida en sólo un tipo de las endomembranas que contiene la fracción microsomal. Incidentalmente, el origen de las LCB detectadas en los aumentos transitorios observados en frijol es desconocido. Ya que fueron extraídas por hidrólisis fuertemente alcalina, es posible que vengan de la hidrólisis de esfingolípidos complejos, pero también que vengan de la poza de LCB libres sintetizadas *de novo*. El hecho de que la infiltración de las hojas con FB1 promueva los aumentos en PS y los otros picos no identificados sugiere que un componente muy significativo de los incrementos de LCB es la poza de LCB sintetizadas *de novo* y acumuladas por la acción de la toxina.

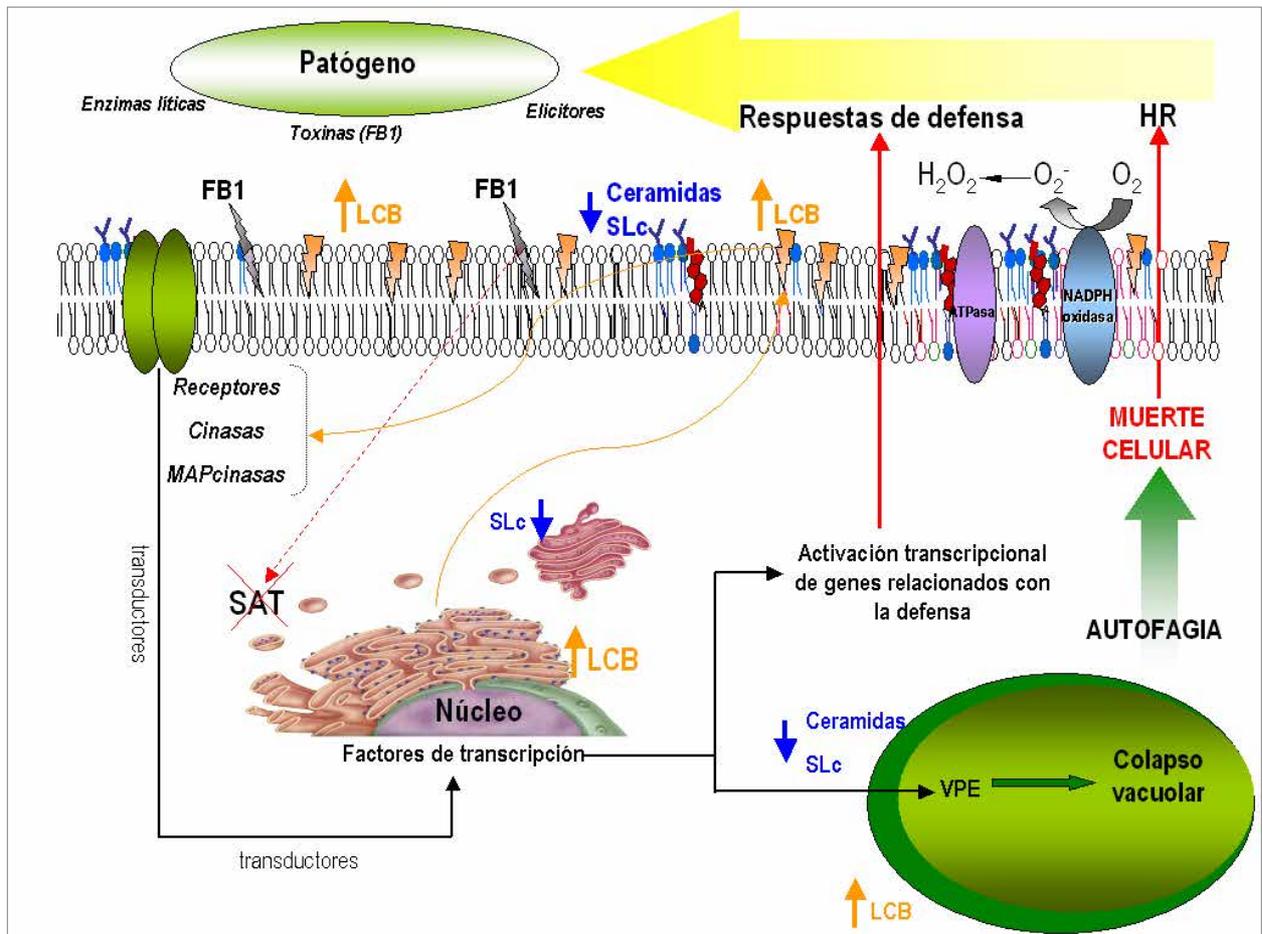


Fig. 38 Modelo del posible mecanismo de acción de patógenos bacterianos y FB1 como elicitores de defensa y muerte celular programada a través de la acumulación de LCB en *Phaseolus vulgaris*. Se propone que el aumento en los niveles de LCB membranales acumuladas debido a la infección por un patógeno o por la toxina FB1, puede inducir la activación de respuestas de defensa como la explosión oxidativa, la formación de calosa, fitoalexinas y proteínas de defensa, así como la manifestación de la muerte celular. Los mecanismos detrás de estas respuestas, según los datos de la literatura y los aportados por nuestro grupo, involucrarían a las LCB membranales en vías de señalización que son operadas por transductores como MAP cinasas y factores de transcripción para estimular la lectura de genes de defensa o para regular la muerte celular a través de la expresión del gen *VPE*, el cual conduce a un tipo de muerte celular conocido como autofagia, que se manifiesta como una lesión de HR.

## 8 CONCLUSIONES

La toxina FB1 produce una lesión parecida a una respuesta de hipersensibilidad con características macroscópicas similares a las lesiones causadas por las bacterias *Ec*, *Ech* y *Pst*, quienes causaron una lesión consistente con una lesión de HR.

Tanto la toxina FB1 como las bacterias *Ech* y *Pst* confieren protección a la planta contra la infección por *Xapf*, confirmando que la lesión causada por la FB1 comparte características morfológicas y funcionales con las típicas lesiones HR, en donde se están promoviendo reacciones de defensa.

En las condiciones en las que la planta presenta una lesión de HR, es decir, ya sea por la infiltración de la FB1 o por la de *Pseudomonas syringae tomato*, se induce en la planta la elevación de PS a las 5 y 24 hpi, y al menos la elevación de otra LCB de identidad desconocida (presumiblemente dehidrofitoesfingosina, t18:1).

El mecanismo por el cual el patógeno induce la elevación de LCB es desconocido. Sin embargo, esta elevación en los niveles de LCB membranales ante la presencia de un patógeno o FB1 y la manifestación concomitante de una reacción de defensa expresada como HR sugiere que la acción de las LCB es a través de los mecanismos que promueven o controlan la muerte celular localizada para prevenir la diseminación del patógeno.

Por todas las evidencias anteriores podemos decir que las LCB están involucradas en las vías de defensa contra patógenos en plantas.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. 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 sphingolipids metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology*. 106: 1085-1093.
2. Agrios, GN (1997). *Plant Pathology*. 4th Edition, Academic Press, N.Y. pp. 3-7, 83-91, 93-113.
3. Ahmed SN; Brown DA; London E (1997). On the origin of sphingolipid/ cholesterol- rich detergent- insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent- insoluble, liquid- ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*. 36:10944-10953.
4. Alcántara Sánchez, F (1998) Efecto de la fumonisina B1 en la integridad del ADN genómico de maíz durante la germinación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
5. Alemany R, Meyer zu Heringdorf D, van Koppen CJ, Jakobs KH (1999). Formyl peptider receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 3994-3999.
6. Amano, M; Toyada, K; Ichinose, Y; Yamada, T; y Shiraishi, T (1997). Association between ion fluyes and defense responses in pea and cowpea tissues. *Plant and Cell Physiology*. 38(6): 698-706.
7. Asai, T; Stone, JM; Heard, JE; Kovtun, Y; Yorgey, P; Sheen, J; y Ausubel, FM (2000). Fumonisin B1- induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate- dependent signaling. *The Plant Cell* 12: 1823-1836.
8. Bhat RA y Panstruga R (2005). Lipids rafts in plants. *Planta*. 223: 5-19.
9. Bielawska, A; Crane, HM; Liotta, D; Obeid, LM; y Hannun, YA (1993). *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 26226- 26232.
10. Birch, PRJ; Avrova, AO; Ducan, JM; Lyon, GD y Toth, RL (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12: 356-361.
11. Bolwell, JP; y Wojtaszek, P (1997). Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense- a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 51:347- 366.
12. Brown Da y London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cellular Developmental Biology*. 14: 111-136.
13. Brown DA y London E (2000). Structure and funtion of sphingolipid- and colesterol-rich membrane rafts. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 17221-17224.
14. Bonas, U y Lahaye, T (2002). Plant disease resístanse triggered by pathogen-derive molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 44-50.

15. Burgos, PA; y Donaire, JP (1996). Phospholipids, free sterols, fluidity, and ATPase activity of plasma membrana- enriched vesicles from sunflower and joroba roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 34: 315-324.
16. Carmona, SL (2006). Aislamiento y caracterización de membranas resistentes a detergentes (DRM) en diferentes especies vegetales. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
17. Cassab, GI (1998). Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:281-309.
18. Castegnaro, M; Garren, L; Galendo, D; Galderblom, WCA; Chelule, P; Dutton, MF y Wild, CP (1998). Analytical method for the determination of sphingosine in a serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *Journal of Chromatography B*. 720: 15-24.
19. Callow, JA; y Green, JR (1996). The plant plasma membrane in fungal disease. En: *Membranes: Specialized Functions in Plants*. Smallwood, M; Knox, JP; Bowles, DJ (1996) Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. Cap.31; pag. 543- 562.
20. Clarkson, DT ; Hall, KC ; y Roberts, KM (1980). Phospholipid composition and fatty acid desaturation in the roots of rye during acclimatization to low temperature. *Planta*. 149: 464- 471
21. Cohen- Kupiec, R; y Chet, I (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*. 9: 270- 277.
22. Coney , DP; Schuster,ML y Hill, K (1973).Genetic control of reaction to common blight bacterium in bean (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by plant age and bacterial multiplication. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 98: 94-99.
23. Coursol, S; Fan, LM; Le Stunff, H; Spiegel, S; Gilroy, S; Assmann, SM (2003). Sphingolipid signaling in Arabidopsis guard cell involves heterotrimeric G proteins. *Nature*. 423: 651.754.
24. Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, y Spiegel S (2005). Arabidopsis Sphingosine kinase and effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiology* 137: 724-737.
25. Cruz-Izquierdo, S; Ramírez-Vallejo, P; Tlapal-Bolaños, B; Ramírez, RI; García, ER, Sandoval, IJS; Vastillo, GF (2001). Producción masiva de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. *Agrociencia*. 35: 575-581.
26. 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.
27. Dagan, A; Wang, C; Fibach, E; Gatt, S (2003). Synthetic, non-natural sphingolipid analogs inhibit the biosynthesis of cellular sphingolipid, elevate ceramide and induce apoptotic cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1633: 161-169.

28. Dressier KA y Kolesnick RN (1990). Ceramide-1-phosphate, a novel phospholipid in human leukaemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 14917-14921.
29. Durrat, WE; y Dong, X (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42: 185-209.
30. Edidin, M; y Stroynowski, I (1991). Differences between the lateral organization of conventional and inositol phospholipids- anchored membrane proteins. A further definition of micrometer scale membrane domains. *Journal of Cell Biology*. 112: 1143- 1150.
31. Falk J; Thoumine O; Dequidt C; Choquet D; Faivre-Sarrailh C (2004). NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. *Molecular Biology of the Cell*. 15: 4695- 4709.
32. Flor, H (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9: 275-296.
33. Fujita T, Yoneta M, Hirose R (1995). Simple compounds, 2-alkyl-2-amino-1,3-propanediols have potent immunosuppressive activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 5: 847-852.
34. Fulton RW (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review of Phytopathology*. 24: 67-81.
35. Gajate C; Mollinedo F (2005). Cytoskeleton- mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis- promoting clusters in cancer chemotherapy. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 11641- 11647.
36. Garcia A; Cayla X; Fleischer A; Guergnon J; Canas FAF; Rebollo MP; Roncal F; Rebollo A (2003). Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution. *Biochimie*. 85: 727-731.
37. Gómez-Gómez L y Boller T (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Science*. 7: 251-256.
38. Gómez-Muñoz A, Duffy PA, Martin A, O'Brien L, Byun HS, Bittman R, Brindley DN (1995). Short-chain ceramide-1-phosphate are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Molecular Pharmacology*. 47: 883-889.
39. Gómez-Muñoz A, Frago LM, Alvarez L, Varela-Nieto I (1997). Stimulation of DNA síntesis by natural ceramide-1-phosphate. *Biochemical Journal*. 325: 435-440.
40. Gutierrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Plasencia J, y Gavilanes-Ruíz M (2005). Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*. 221: 589-596.

41. Gutierrez-Nájera (2005) Interacción de la fumonisina B1 con la membrana plasmática: Efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.
42. Hahlbrock, K; Scheel, D; Logemann, E; Nürnberger, T; Parniske, M; Reinold, S; Sacks, WR; y Schmelzer, E (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92: 4150- 4157.
43. Hakomori, S (1990). Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 18713-18716.
44. Hall, R (1991). *Compendium of bean diseases*. The American Phytopathological Society. Pag. 3, 29-30.
45. Hammond-Kosack, KE; Jones, JDG (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 575-607.
46. Hannun, YA; Loomis, CR; Merrill, AH; Jr; y Bell, RM (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *The Journal of Biological Chemistry*. 261: 12604-12609.
47. Hannun, YA (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*. 274: 1855-1859.
48. 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. *Biochemical Pharmacology*. 59: 1211-1216.
49. 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 Journal*. 18: 5252-5263.
50. Helms JB; Zurzolo C (2004). Lipids as targeting signals: Lipids rafts and intracellular trafficking. *Traffic*. 5: 247-254.
51. Hoessli DC; Ilangumaran S; Soltermann A; Robinson PJ; Borisch B; Din NU (2000). Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: The concept of signaling platform. *Glycoconjugate Journal*. 17: 191-197.
52. Imai, H; Ohnishi, M; Hotsubo, K; Konoshita, M; Kojima, M y Ito, S (1995). Structure and distribution of cerebroside containing unsaturated hydroxy fatty acids in plant leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 59: 1309-1313.
53. Imai, H; Ohnishi, M; Hotsubo, K; Kojima, M y Ito, S (1997a). Sphingoid base composition of cerebroside from plant leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61: 351-353.

54. Imai, H; Ohnishi, M; Kojima, M y 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.
55. Isaac, S (1991), Fungal-plant Interactions. Chapman Hall, 1<sup>st</sup> edition. UK, pp. 106-115, 147-157, 252-253.
56. Ishitsuka R; Sato SB; y Kobayashi T (2005). Imaging lipids rafts. Journal of Biochemistry. 137, 249-254.
57. Jenkins GM y Hannun YA (2001). Role for de novo sphingoid base biosíntesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 276: 8574-8581.
58. 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*. The Journal of Biological Chemistry. 272: 32566-32572.
59. Kawaguchi, M; Imai, H; Naoe, M; Yasui, Y y Ohnishi, M (2000). Cerebrosides in grapevine leaves: distinct composition of sphingoid bases among the grapevine species having different tolerances to freezing temperature. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 64: 1271-1273.
60. Kiba A, takata O, Ohnishi K y Hikichi Y (2006). Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant. Planta 224: 981-994.
61. Koga J; Yamauchi T; Shimura M; Ogawa N; Oshima K; Umemura K; Kikuchi M y Ogasawara N (1998). Cerebrosides A y C, Sphingolipid elicitor of hipersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. The Journal of Biological Chemistry. 273 (48): 31985- 31991.
62. Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M y Hara-Nishimura I (2005). Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry. 280: 32914-32920.
63. Larsson, C; Sommarin, M y Widell, S (1994). Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. Methods in Enzymology 228: 451-469.
64. Lavie, Y; Piterman, O; Liscovitch, M (1990). Inhibition of phosphatidic phosphohidrolase activity by sphingosine: Dual action of sphingosine in diacylglycerol signal termination. FEBS Letters. 277: 7-10.
65. 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-couple receptor EDG-1. Science. 279: 1552-1555.

66. Lee MJ, Thagada 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: 301-012.
67. Lommerse, PHM; Spaik, HP; y Schmidt, T (2004). *In vivo* plasma membrane organization: results of biophysical approaches. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1664: 119-131.
68. Lubert, C y Hannun, YA. (2000) Use of short-chain ceramides. *Methods in Enzymology*. 312: 407-420.
69. Lynch, DV (2000). Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. *Methods in Enzymology* 311: 130-149.
70. Lynch, DV y Steponkus, PL (1987). Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedling (*Secale cereale* L. cv Puma) *Plant Physiology*. 83: 761-767.
71. Manners, JG (1982). *Principles of Plant Pathology*. Cambridge University Press, 1<sup>st</sup> edition, pp. 41-102.
72. Markham, JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG (2006). Separation and identification of major sphingolipid classes from leaves. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 22684-22694.
73. Markham, JE, y Jaworski, JG (2007). Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 21: 1304-1314.
74. Megidish T, Hamaguchi A, Iwabuchi K, Hakomori SI (2000) Assays of sphingosine-dependent kinase for 14-3-3 protein. *Methods in Enzymology*. 312: 381-387.
75. Merrill HJ, Schmelz EM, Dillehay DLÑ, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss KA, Wang E (1997). Sphingolipids: the enigmatic lipid class: Biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 142: 208-225.
76. Merril, AH; Echten, GV; Wang, E y Sandhoff, K (1993). Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) *N*-aciltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in culture neurons *in situ*. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 27299-27306.
77. Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T (1995) Serine palmitoiltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 211: 396-403.
78. Mas, A; Navarro. Pedreño, J; Cooke, DT; y James, CS (1994). Characterization and lipid composition of the plasma membrane in grapes leaves. *Phytochemistry*. 35: 1249- 1253.
79. Mongrand S; Morel J; Laroche J; Claverol S; Carde JP; Hartmann MA; Bonneau M; Simon-Plas F; Lessire R; Bessoule JJ (2004). Lipid rafts in higher plant cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 3677- 3686.

80. Moore, T; Martineau, B; Bostock, RM; Lincoln, JE; y Gilchrist, GD (1999). Molecular and genetic characterization of ethylene involvement in mycotoxins- induced plant cell death. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 54, 73-85.
81. 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 $\xi$ . *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 15884-15891.
82. Munnik, T (2003). Phosphatidic acid; an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science*. 6: 227-233.
83. Munro S (2003). Lipid rafts: Elusive or Illusive? *Cell*. 115: 377-388.
84. Nagara Y, Shinomiya T, Kuroda S, Kaneko N, Nishio R y Ikekita M (2005). Phytisphingosine induced mitochondria-involved apoptosis. *Cancer Science*. 96: 83-92.
85. 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 mouse cytotoxic T-cell line, CTLL-2. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 1255-1257.
86. Napoli KL (2000). The FTY720story. *Ther Drug Monitor*. 22: 47-51.
87. Ng, C. K-Y; Carr, K; McAinsh, MR; Powell, B; y Hetherington, AM (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 410: 596-599.
88. Norberg, P; Mansson, JE; Liljenberg, C (1991). Characterization of glucosylceramide from plasma membranes of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1066:257-260.
89. Obeid, LM; Linardic, CM; Karolak, LA; y Hannun, YA (1993). *Science* 214: 577-578.
90. Ohlrogge, J; y Browse, J (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*. 7: 957- 970.
91. Okamoto T; Schlegel A; Scherer PE; Lisanti MP (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane". *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 5419- 5422.
92. Oliferenco S; Paiha K; Harder T; Gerke V; Schwarzler C; Schwarz H; Beug H; Gunthert U; Huber LA (1999). Analysis of CD44- containing lipid rafts: recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*. 146: 843- 854.
93. Olivera A y Spiegel S (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*. 365: 557-560.
94. Olsson, M; Nilsson, R; Norberg, P; von Arnold, S; y Liljenberg, C (1994). Maturation in Norway spruce: alterations in lipid composition. *Plant Physiology and Biochemistry*. 32: 225- 232.
95. Palacios Bahena, S (2002). Efecto de la FB1 sobre la peroxidación de lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

96. Pandey, S; Assmann, SM (2004). The Arabidopsis putative G protein-couple receptor GCR1 interacts with the G protein subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *The Plant Cell*. 16: 1616-1632.
97. Peterson, GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 83: 346-356.
98. Platero Sanz M y Fuchs A (2005). Short-lived protection of pea plants against mycosphaerella pinodes by prior inoculation with *Pseudomonas phaseolicola*. *European Journal of Plant Pathology*. 86:3. 181-190.
99. Resterucci, C; Montillet, J.L; Agnel, J.P; Battesti, C; Alonso, B; Knoll, A; Bessoule, J.J; Etienne, P; Suty, L; Blein, J.P; y Triantaphylides, C. (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroxyperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *The Journal of Biological Chemistry*. 17: 36446-36455.
100. Rivas San Vicente, LM (2004). Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
101. Rosenberger CM; Brumell JH; Finlay BB (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Current Biology*. 10: R823-R825.
102. Ryu, SB (2004). Phospholipid- derived signaling mediated by phospholipasa A in plants. *Trnds in Plant Science*. 9: 229- 234.
103. San Juan Badillo (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 Química, UNAM.
104. Shah, J (2005). Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 8.1-8.32.
105. Sharp, JK; Valent, B; y Albersheim, P (1984). *The Journal of Biological Chemistry*. 259: 11312-11320.
106. Shingal R, Scheller RH, Bajjalieh SM (1993). Ceramide 1-phosphate phosphatase activity in brain. *Journal of Neurochemistry*. 61: 2279-2285.
107. Simons K, van Meer G (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. 27: 6197-6202.
108. Simons K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387: 569-572.
109. Simons K, y Toomre D (2000). Lipids rafts and signal transduction. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 1: 31-39.
110. Simpson-Holley M, Ellis D; Fisher D; Elton D; McCauley J; Digard P (2002). A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology*. 301: 212- 225.

111. 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*. *Journal of Bacteriology*. 181: 1134-1140
112. Somssich, IE y Hahlbrock, K (1998) Pathogen defence in plants- a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*. 3: 86-90.
113. Spassieva, SD; Markham, JE y Hille, J (2002). The plant disease resistance gene *ASC-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin- induced programmed cell death. *The Plant Journal*. 32: 561-572.
114. Sperling, P y Heinz, E (2003). Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1632: 1-15.
115. Stallaert, VM; y Geuns, JM (1994). Phospholipid and free sterol composition of hypocotyl plasma membranes of ageing mung bean seedlings. *Phytochemistry*. 36: 1177- 1180.
116. Stone, JM; Heard, JE; Asai, T; y Ausubel, FM (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1- resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *The Plant Cell* 12: 1811- 1822.
117. Talarczyk, A y Hennig, J (2001). Early defense responses in plant infected with pathogenic organisms. *Cellular and Molecular Biology Letters* 6: 955-970.
118. Tornero P; y Dangi JL (2001). A high- throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 28: 475- 481.
119. Tornero P; y Dangi JL (2001). A high- throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 28: 475- 481.
120. Uemura, M y Steponkus, PL (1994). A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiology*. 104:476-496.
121. Uemura, M; Joseph, RA y Steponkus, PL (1995). Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiology*. 109: 15-30.
122. van Blitterswijk WJ; van der Meer BW; Hilkmann H (1987). Quantitative contributions of cholesterol and individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un) saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*. 26: 1746-1756.
123. Van Meer, G y Lisman, Q (2002). Sphingolipid transport: Rafts and translocators. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 25855- 25858.
124. Van Blitterswijk, WJ; van der Meer, BW; y Hilkmann, H (1987). Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*. 26: 1746- 1756.

125. Vera-Estrella, R; Barkla, BJ; Higgins, VJ; y Blumwald, E (1994). Plant defense response to fungal pathogens. *Plant Physiology*. 104: 209-215.
126. Vereb, G; Szollosi, J; Matkó, J; Nagy, P; Farkas, T; Vigh, L; Mátyus, L; Waldmann, TA; y Damjanovich, S (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades later the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100: 8053-8058.
127. Wang, E; Norred, WP; Bacon, CW; Riley, RT y Merrill, AHJ (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *The Journal of Biological Chemistry*. 266: 14486-14490.
128. Wang, C; y Wang, X (2001). A novel phospholipase D of Arabidopsis that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane. *Plant Physiology*. 127: 1102- 1112.
129. Wang, H; Li, J; Bostock, RM; y Gilchrist, DC (1996). Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell*. 8: 375-391.
130. Wang, X ( 2004). Lipid signaling. *Current Opinion in Biotechnology*. 7: 329- 336.
131. Weber, H (2002). Fatty acid- derives signals in plants. *Trends in Plant Science*. 7: 217- 224.
132. Wessel, D y Flügge, UI (1984). A method for the quantitative recovery of protein in diluted solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*. 138: 141-143.
133. Wickström SA; Alitalo K; Keski- Oja J (2003). Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down- regulation of RhoA activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 37895- 37901.
134. Wilson M; Hirano SS; Lindow SE (1999). Location and survival of leaf- associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1435- 1443.
135. Wittstock, U; y Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxin and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 300-307.
136. Worrall, D; Ng, C. K-Y y Hetherington, AM (2003). Sphingolipid, new player in plant signaling. *Trends in Plant Science*. 8: 317-320.
137. Xu, X; Bittman, R; Duportail, G; Heissler, D; Vilcheze, C; y London, E (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/ sterol domains (rafts). *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 33540- 33546.
138. Yamaguchi, T; Minami, E; Euki, J y Shibuya, N (2005). Elicitor- induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension – culture rice cells. *Plant and Cell Physiology*. 46: 579- 587.
139. Yamada, K y Sakane, F (1993). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1169:211-216.

140. Yang, CH; Gavilanes-Ruiz, M; Okinaka, Y; Vedel, R; Berthuy, I; Boccara, M; Chen, J; Perna, NT y Keen, NT (2002). Hrp genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15: 472-480.
141. Yang-Hyeok, C; Hwan-Soo, Y; Jung-Kee, M; Eun-Young,L; Seon-Pyo, H; Young-Bok, C; Yong\_Moon, L (2002). Comparative study of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and  $\alpha$ -phthalaldehyde fluorogenic reagents for chromatographic detection of sphingoid bases. *Journal of Chromatography A*, 977: 69-76.
142. Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S (1991). Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid involved in cellular proliferation. *The Journal of Cell Biology*. 114: 155-167.
143. Zhang YH, Yao B, Delikat S, Bayoumy S, Lin XH, Basu S, McGinley M, Chan-Hui PY, Lichenstein H, Kolesnik R (1997). Kinase Soppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell*. 89: 63-72.
144. Zweerink, MM; Edison, GB; Wells, W; Lester, RL. (1992) *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 25032-25038.