



9
00551

2ej

Universidad Nacional Autónoma de México

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Efecto de la Herida y del Metil-Jasmonato, sobre la Expresión de 3 Miembros de la Familia de las Lipoxigenasas de Phaseolus vulgaris.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A
JORGE TREJO GUTIERREZ

274753

Cuernavaca, Mor.
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutora: Dra. Helena Porta Ducoing por su dirección, asesoría y apoyo, que fueron determinantes para concluir este trabajo de posgrado.

A mis Sinodales: Dr. Miguel Lara, Dr. Francisco Campos, Dra. Gladys Cassab, Dr. Baltazar Becerril por su Contribución para el mejoramiento del Escrito.

Al Dr. Mario Rocha y a la Bióloga Berenice García por sus acertados comentarios y sugerencias a lo largo de todo el trabajo realizado.

A la Bióloga Patricia Rueda Benítez por su apoyo técnico y eficiencia en la provisión del material necesario para llevar a cabo mi trabajo de maestría.

A todos mis compañeros del laboratorio en general porque siempre conté con su ayuda y apoyo.

A la Dra. Elsy del Carmen Quevedo Tejero ya que gracias a su insistencia finalmente terminé este escrito.

A CONACYT por su apoyo económico, a través de una beca de maestría, durante la mayor parte de mi posgrado.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme cumplir una vez mas con mi objetivo y por que nunca me ha dejado solo.

A MIS PADRES TIMOTEO TREJO Y MICAELA GUTIERREZ

**Porque siempre han CREIDO
en mi.**

A MIS HERMANOS MAYORES JUAN JOSE Y ALICIA

Porque aún esperan mucho de mi.

A MI HIJO JORGE ALBERTO

Que es una de las razones principales para esforzarme y mejorar cada día.

A ALICIA CITLALLI

Como una muestra de que la esperanza que tiene en mi no es en vano, y porque es otra de mis razones para llegar a la meta.

....."Los que tienen nada quieren ALGO, los que tienen algo quieren TODAVIA MAS".....

Silvio Rodríguez

....."PORQUE SOY COMO EL ARBOL TALADO QUE RETOÑA.....¡AUN TENGO LA VIDA!".....

Joan Manuel Serrat

"La Naturaleza no se equivoca, los que se equivocan son quienes pretenden -entender- su lenguaje"
-(.....Tienen ojos, pero no ven; tienen oídos, pero no escuchan.....)-

El Viejo Ingeniero tomó entre sus manos amorosamente las figuritas de una de las cajas, las observó largo rato, y luego como un padre orgulloso le dijo al Visitante:

"-Este es nuestro último modelo, le llamamos a uno macho y al otro hembra, se reproducen a sí mismos cuando llegan a cierta edad. En realidad ambos tienen el mismo equipo, en mayor o menor medida, se conoce como *Homo sapiens*, aunque por el momento parecen haber perdido la sapiencia, funciona a control remoto. Sin embargo, últimamente no responden a las señales enviadas, no dan la información correcta.....¡¡no sé qué hacer con ellos!!-

INDICE

No. pag.

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
LAS LIPOXIGENASAS	2
LA VIA DE LAS LIPOXIGENASAS	3
FUNCION DE LAS LIPOXIGENASAS	7
LOX DURANTE CRECIMIENTO Y DESARROLLO	7
LA LOX COMO PROTEINA DE ALMACENAMIENTO VEGETATIVO	8
LOX Y LA SENEENCIA	9
RESPUESTA A PATOGENOS	10
INDUCCION POR ESTRES HIDRICO	11
LA PARTICIPACION DE LOX EN LA HERIDA	11
SINTESIS DEL ACIDO JASMONICO	13
LOCALIZACION DE LAS LOX	15
LAS LIPOXIGENASAS SON UNA FAMILIA GENICA	16
RT-PCR, UNA OPCION PARA ANALIZAR FAMILIAS GENICAS	16
ASPECTOS TECNICOS DEL RT-PCR	17
RT-PCR ACOMPETITIVO	21

OBJETIVO	2 2
ANTECEDENTES DEL PROYECTO	2 2
MATERIALES Y METODOS	
CRECIMIENTO Y TRATAMIENTO DE LAS PLANTAS	2 3
DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS	2 5
CLONACION DE LOS FRAGMENTOS GENERADOS POR RT-PCR.	2 5
SECUENCIAMIENTO DE DNA Y ANALISIS DE LA SECUENCIA	2 8
PREPARACION DE LOS RNAS	2 8
RT-PCR	2 9
DETERMINACION DE LA FASE DE SATURACION PARA LA REACCION DE RT-PCR	2 9
RESULTADOS	
CLONACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR RT-PCR	3 0
ANALISIS DE LAS CLONAS	3 0
SECUENCIACION DE LAS CLONAS	3 4
IDENTIFICACION DEL NUMERO PROBABLE DE GENES DE LOX	3 8
DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS 75 Y 1565	4 3
CINETICA DE HERIDA	4 3
CINETICA DE ACIDO JASMONICO	4 5
DIGESTIONES CON PST I Y CON HIND III	4 5

DISCUSION

48

BIBLI0GRAFIA

52

RESUMEN

Las lipoxigenasas (LOXes) son enzimas que en plantas, están involucradas en muchos procesos importantes tanto de desarrollo como de respuesta a situaciones adversas del medio ambiente. Esta enzima es la primera de la ruta de biosíntesis de la fitohormona ácido jasmónico (también conocida como vía de los octadecanoides), que modula la expresión de un grupo de genes cuyos productos son conocidos como proteínas inducidas por jasmónatos (JIP's), las cuales tienen distintas funciones, y de algunas aún se desconoce su papel. En la mayoría de plantas, las LOXes pertenecen a familias génicas de más de 2 miembros, tienen una similitud de secuencia alta (arriba del 60%), y exhiben un patrón de expresión complejo. Dada la gran similitud de secuencia, no es posible discriminar la expresión de las diferentes LOXes a través de ensayos como "northern blot", de tal manera que para un análisis de expresión detallado, es necesario una técnica más sensible. Haciendo uso de la técnica de RT-PCR junto con análisis de restricción hemos caracterizado la expresión de 3 miembros de la familia génica de lipoxigenasa en frijol cultivar Negro Jamapa, en respuesta a herida y a inducción con metil-jasmonato (MeJA). PvLOX2 y PvLOX4 mostraron un máximo de expresión en ambos tratamientos en el mismo punto, siendo mayor la expresión de PvLOX2. No observamos expresión de PvLOX5 en respuesta a la herida, ni en el tratamiento con JA.

Los genes PvLOX4 y PvLOX5, presentan una identidad de alrededor del 98 %, la cual dificulta el análisis de su expresión, sin embargo, usando la técnica del RT-PCR, fue posible diferenciar la expresión de estos genes.

INTRODUCCION

LAS LIPOXIGENASAS

Las lipoxigenasas (LOXes) son enzimas ubicuas en todos los eucariotes que catalizan la dioxigenación estereoespecífica de los ácidos grasos que contienen estructura *cis,cis*-1,4-pentadieno. Una de las características estructurales de las LOXes, es contener un átomo de hierro en ausencia del grupo hemo. En los animales, las lipoxigenasas, forman parte de las rutas metabólicas que llevan a la formación de compuestos biológicamente activos como los leucotrienos y las lipoxinas, sintetizados a partir de ácido araquidónico (C20:3). Estos mediadores de origen lipídico, están involucrados en las reacciones alérgicas e inflamatorias. A nivel de estructura primaria, las LOXes de origen vegetal comparten el 25% de identidad con su contraparte de mamífero. Sin embargo, su dominio catalítico esta muy conservado a nivel de estructura terciaria, lo cual sugiere una función relacionada (Funk *et al.*, 1990). En plantas, el ácido araquidónico es inexistente, por lo tanto la función de LOX no parece ser la síntesis de leucotrienos. Sin embargo, incrementos en la expresión de los genes de la LOX, en plantas, se detectan como respuesta a diferentes tipos de estreses, que incluyen: la respuesta al ser comidas por insectos, infecciones por bacterias y hongos, bajo potencial hídrico y daño mecánico (Siedow, 1991). Las LOXes, también se requieren para sintetizar el regulador del crecimiento vegetal llamado ácido jasmónico (JA). El JA y sus análogos estructurales, los jasmonatos, inducen un grupo de genes (Sembdner y Parthier, 1993) cuyas proteínas (proteínas inducidas por jasmonatos, JIPs en Inglés), participan en una variedad de procesos fisiológicos de las plantas que incluyen: crecimiento y desarrollo vegetal, movilización de lípidos de reserva durante la germinación, y como proteínas de almacenamiento vegetativo (vsp) (Siedow, 1991). Por otro lado, el JA es un mediador en la respuesta de defensa de las plantas a la herida y al ataque por patógenos (Farmer, 1994). Los ácidos grasos que son substratos de las LOXes, son el ácido linolénico (C18:3) y el ácido linoléico (C18:2) (Nishiuchi *et al.*, 1997; Conconi *et*

al., 1996; Farmer y Ryan, 1992.). Estos ácidos grasos, son los mas abundantes en los lípidos de las membranas vegetales.

Así pues, las LOXes de plantas de manera similar a las LOXes de animales participan en los mecanismos de respuesta a situaciones de estrés.

LA VIA DE LAS LIPOXIGENASAS.

Las LOXes pueden diferir en un número de características tales como: preferencia por su substrato, parámetros de cinética, y especificidad posicional de oxigenación del substrato. En cuanto a la especificidad posicional de oxigenación del substrato, las LOXes, catalizan la adición de oxígeno molecular en el carbono 9 (C-9) ó en el carbono 13 (C-13) de los ácidos linoléico y linolénico. Esta etapa de oxigenación es un punto de divergencia al inicio de la cascada de reacciones referida como la "vía de la lipoxigenasa", en la cual los hidroperóxidos producidos por la actividad de las LOXes en el carbono 13 son substratos para la subsecuente acción de la hidroperóxido liasa (HL) o de la aleno óxido sintasa (AOS) (figura 1). El destino de los 9-hidroperóxidos no es muy claro aún (Vick, B.A. 1993), pero se sabe que no conducen a la formación de ácido jasmónico (Vick *et al.*, 1980).

En una de las ramas de la "vía de la lipoxigenasa" (figura 1), la actividad 13-LOX conduce a la formación de ácidos 13-hidroperoxi-linoléico y linolénico. Cuando el ácido 13-hidroperoxi-linolénico es substrato de la HL se obtiene la traumatina, compuesto relacionado con la cicatrización en la herida. Cuando actúa la AOS sobre este mismo substrato, se obtiene como producto final (Vick y Zimmerman, 1984; Siedow, 1991), el ácido jasmónico (JA). Esta es la llamada vía de los octadecanoides (figura 2). La actividad de las 13-LOX puede ser determinante para la regulación de los niveles intracelulares de JA y para el control de los procesos afectados por esta fitohormona (Royo *et al.*, 1996). Por el otro lado de la vía de las LOXes, los 13-hidroperóxidos resultantes de la acción de LOX, que no son substratos de la AOS, pero si lo son de la HL, dan origen a aldehídos y oxoácidos de 9 carbonos (figura 3), los cuales son causantes de olores y sabores en hojas y frutos (Royo *et al.*, 1996). Los derivados lípidicos de 9

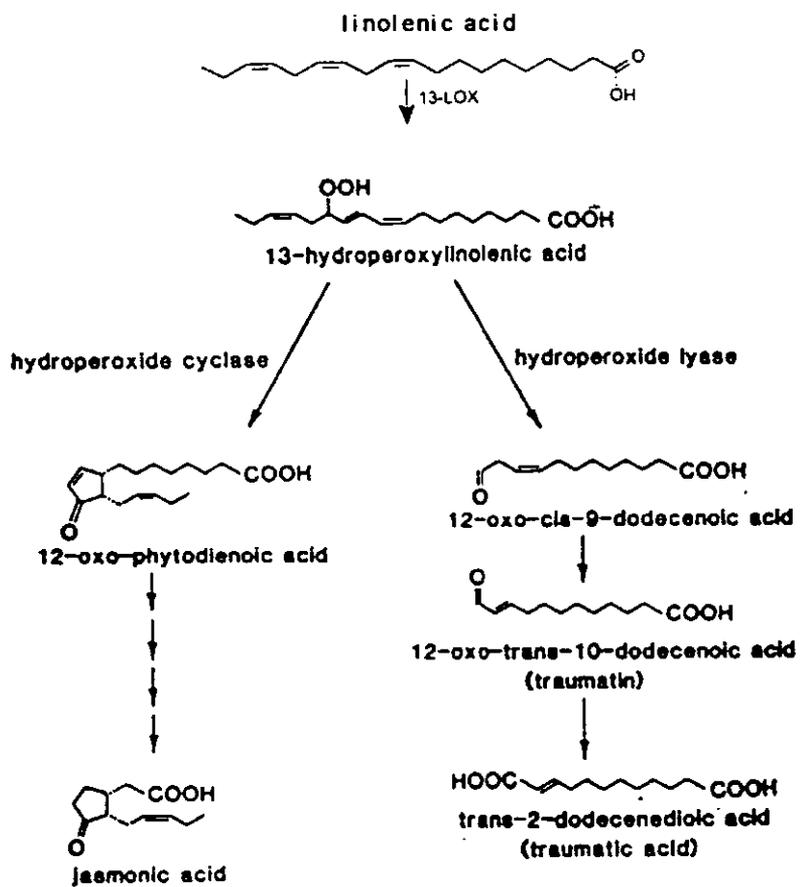
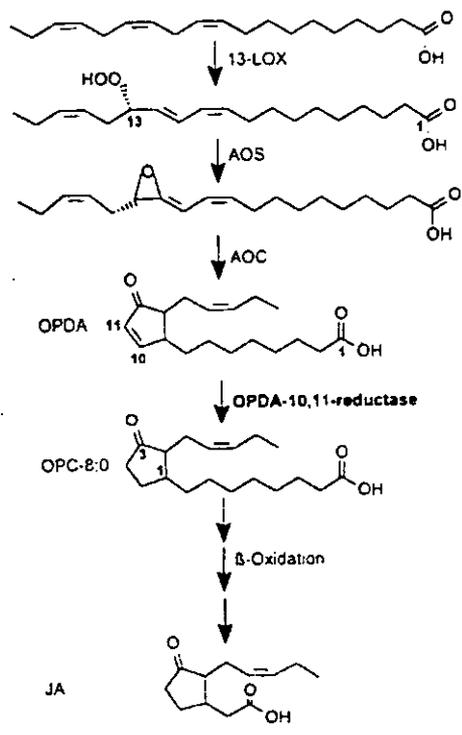


Figura 1. Vía de las 13-LOX.



**Figura 2. Vía de los octadecanoides.
Biosíntesis del ácido jasmónico.**

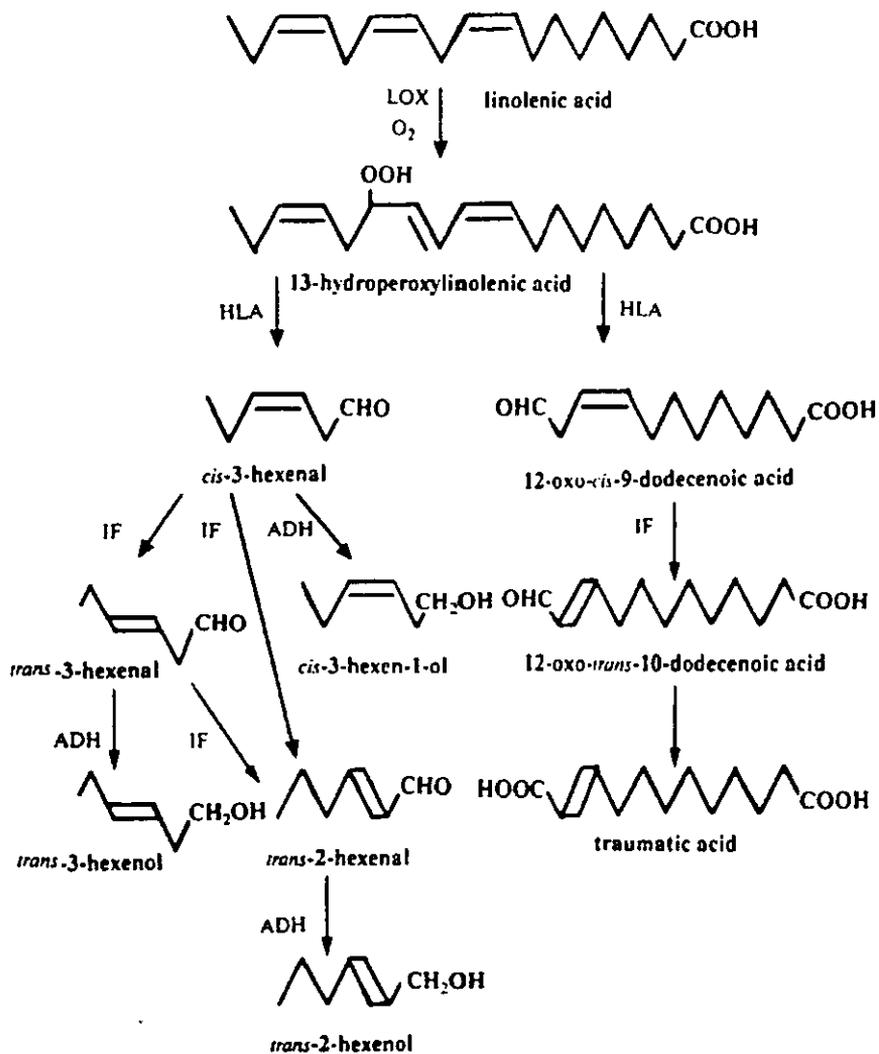


Figura 3. Compuestos volátiles, producto de la actividad de la hidropéroxido-liasa.

carbonos, no son los únicos productos de la acción de HL sobre ácido linoléico y ácido linolénico. Cuando las plantas son heridas, la HL, también sintetiza compuestos volátiles de 6 carbonos (C-6). De manera similar al al metil-jasmonato (MEJA), estos compuestos actúan activando genes involucrados en la respuesta a herida pero de una manera mas moderada (Bate y Rothstein, 1998).

FUNCION DE LAS LIPOXIGENASAS

Como ya se mencionó anteriormente, las LOXes, están relacionadas con diversos aspectos de la biología de la planta, entre los que se pueden destacar: 1) crecimiento y desarrollo, 2) distribución de la reserva de nitrógeno, 3) senescencia, 4) respuesta al ataque de patógenos, 5) estrés hídrico, 6) respuesta a herida, y 7) síntesis de JA (Creelman y Mullet, 1995; Macarrone *et al.*, 1995; Grimes *et al.*, 1993; Hildebrand *et al.*, 1988; Siedow, 1991).

LOX DURANTE CRECIMIENTO Y DESARROLLO

En cuanto a la participación de LOX durante el crecimiento y desarrollo, todo se basa en la correlación entre la duración de la actividad de la enzima y una etapa específica de desarrollo. En las semillas maduras de soya, los niveles de las tres LOX asociadas a este órgano aumentan durante un período de 5 a 10 días antes de que la semilla alcance la madurez fisiológica. Este incremento de actividad está asociado con la síntesis de novo de la proteína LOX (Siedow, 1991). Park y Polacco (1989) reportaron un marcado incremento en actividad de LOX en el eje en expansión (hipocotilo/radicula) después de la germinación, consistente con estudios inmunológicos (Peterman y Siedow, 1985). Las LOXes que aparecen en el eje del tejido diferenciado son diferentes de las isoenzimas encontradas en el cotiledón. La expresión de las tres isoenzimas de cotiledón es consistente con el de otras proteínas de almacenamiento conocidas. Por otro lado, el hecho de que niveles altos de actividad de LOX se encuentren en hipocotilo y radícula en rápido crecimiento sugiere que esas LOXes, sintetizadas nuevamente, juegan un papel importante en el crecimiento de la plántula (Parck y Polaco, 1989). Los incrementos en la actividad de la lipoxigenasa inmediatamente

después de la germinación se han reportado para el arroz (Otha *et al.*, 1986), el trigo (Guss *et al.*, 1968), la mostaza (Oelze-Karow *et al.*, 1970), y el pepino (Matsui *et al.*, 1988). La mayoría de los estudios correlacionan velocidades de crecimiento y actividad de lipoxigenasa y usan tejidos que podrían ser mejor descritos como "asociados a retoños". Sin embargo, niveles relativamente altos de actividad de la LOX se han reportado en el tejido de la radícula, mientras que, muy poca actividad se detectó en las raíces de la planta de soya madura, sugiriendo que la misma correlación general podría mantenerse para la porción subterránea de la planta.

En el frijol, se observa la acumulación del mRNA de LOX durante la germinación, en raíces jóvenes y durante el desarrollo del nódulo y se sugiere la participación de la LOX en la movilización de lípidos, en tejido en crecimiento activo y/o en la síntesis de JA como regulador de crecimiento (Porta *et al.*, 1999).

En resumen, parece haber una correlación entre la actividad de la LOX encontrada en un tejido de la planta y su velocidad de elongación, los niveles mas altos de LOX se han encontrado en los tejidos en rápido desarrollo.

LA LOX COMO PROTEINA DE ALMACENAMIENTO VEGETATIVO.

Con respecto a la modulación del nivel de nitrógeno en la planta, se les denomina "proteínas de almacenamiento vegetativo" (vsp, de sus iniciales en Inglés) a aquellas proteínas cuya función es servir como almacenes temporales de nitrógeno, para su posterior uso en el crecimiento reproductivo. En la planta de soya, dos proteínas, de 27 kD (vsp27) y de 29 kD (vsp29) se acumulan en las células del parénquima en empalizada y en las células del mesófilo paravenial durante el crecimiento normal (Witenbach, 1982). Posteriormente, Trangaber y colaboradores (1991) identificaron una vsp de 94 kD como una LOX (pvmLOX, pvm por su detección en las células del mesófilo paraveinal). Luego de la remoción de los tejidos "poza" reproductores, pvmLOX se acumula principalmente en las vacuolas de las células del mesófilo paravenial. Grimes y colaboradores (1992) sugirieron que la pvmLOX era probablemente el producto de un solo miembro de la familia génica de lipoxigenasa,

pero posteriormente se encontró que más de una isoenzima de LOX, en las hojas de soya, respondía al balance de nitrógeno en la hoja (Grimes *et al.*, 1993). La LOX4, fue la primer lipoxigenasa de soya que se identificó con una expresión incrementada luego de remover el tejido "poza" reproductivo (Kato *et al.*, 1993). Bunker y colaboradores (1995) demostraron que los transcritos de al menos dos genes de LOX de soya diferentes, se incrementan abundantemente luego de la remoción del tejido "poza" o reproductivo. Recientemente (Saravitz y Siedow, 1996) mediante análisis de "northern blot" demostraron el aumento de la expresión de LOX7 y LOX8 en plantas sin tejidos "poza" reproductivos comparado con plantas control que si los tenían, juntos estos últimos resultados indican que al menos 5 genes de LOXes de hojas de soya, muestran un aumento de su expresión luego de eliminar el tejido "poza" reproductivo. El incremento de la expresión de múltiples genes de LOX en las hojas de soya no es inesperado dado que la observación de la mayoría, sino es que todas, las isoenzimas de LOX presentes en hojas se incrementan abundantemente luego de la remoción de los tejidos "poza" (Saravitz y Siedow, 1996).

LOX Y LA SENEENCIA

La descripción del papel de la LOX durante la senescencia, es una de las primeras teorías acerca de la función de esta enzima. Las razones para esto son obvias: la senescencia es esencialmente un proceso degradativo, el cual incluye la pérdida de integridad de la membrana. La fuente potencial de substrato para LOX se encuentra en los ácidos grasos polinsaturados presentes en los lípidos de la membrana. De la misma manera, los productos de la reacción de la lipoxigenasa son muy reactivos y eso puede resultar en una deterioración posterior de la membrana y aumentar la permeabilidad, entre otras posibilidades. Varios estudios indican que el incremento en la actividad de la lipoxigenasa es una característica común de los tejidos senescentes de plantas, y que el retardamiento de este proceso se logra con la adición de citocininas o antioxidantes que reducen el nivel de actividad de LOX endógena (Siedow, 1991).

RESPUESTA A PATOGENOS

Estudios iniciales de la respuesta de la LOX a la infección por patógenos indicaron que su actividad en tubérculos de la papa aumentaba por un período de 4 semanas después de la infección con el hongo *Phoma exigua*. Similarmente, la actividad de LOX aumentaba mas de 7 veces en las hojas de tabaco durante un período de 11 días luego de la infección con *Erysiphe cichoracearum*. Numerosos reportes similares han aparecido desde esas observaciones iniciales del incremento de la actividad de la LOX en un tiempo tan corto como 6 horas después de la infección (Peever y Higgins, 1989). Además, el incremento de la actividad de la LOX se induce ya sea por el patógeno o por un elicitor (que son oligosacáridos que componen la pared celular del patógeno o de la planta, o incluso puede ser sintético o de un organismo que jamás sería patógeno de una planta), lo que sugiere que la inducción de esta enzima representa un verdadero componente del mecanismo de defensa de la planta y no simplemente el resultado del daño mecánico en el tejido durante el proceso de infección (Siedow, 1991). Actualmente ya se tienen resultados de trabajos que apoyan dicha participación directa de LOX en el mecanismo de defensa, como el de las plantas transgénicas de tabaco expresando secuencias antisentido de la LOX (Rancé *et al.*, 1998) y en las que se desarrolló una marcada susceptibilidad a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* raza 0, que normalmente es incapaz de infectar la planta, lo que enfatiza la importancia de LOX en la defensa de la planta contra patógenos.

La inducción de LOX en plantas provocada por agentes biológicos (patógenos) como bacterias y hongos, puede resultar ventajoso por los procesos que LOX desarrolla. Una marcada y rápida inducción de LOX que acompaña el daño físico de la célula podría llevar a la producción de hidroperóxidos de ácidos grasos, varias especies que contienen radicales libres, y sus productos de descomposición acompañantes los cuales a su vez, podrían ayudar a estimular el catabolismo de las membranas celulares originando una muerte celular localizada asociada con la "reacción hipersensible" (Dixon y Lamb, 1990). Los radicales hidroperóxido pueden también ayudar a promover el proceso de lignificación que acompaña la

reacción hipersensible, aunque este papel es mas comúnmente asignado a los radicales derivados de la peroxidasa. Jugando un papel mas directo, los productos de la reacción de la lipoxigenasa podrían actuar como agentes tóxicos al patógeno invasor (Hildebrand, 1988).

INDUCCION DE LOX POR ESTRES HIDRICO

Durante el estrés por sequía o de déficit por agua, LOX es fuertemente inducida, jugando un papel importante para contrareestar esta situación negativa, esto es, removiendo todos los productos de descomposición para su posterior metabolismo. (Creelaman y Mullet, 1995; Macarrone *et al.*, 1995). Entre los rápidos cambios metabólicos que suceden durante el estrés hídrico, se puede mencionar la inhibición del aparato fotosintético, una disminución del potencial hídrico, y la generación de radicales superóxido (Macarrone *et al.*, 1995; Navari-Izzo *et al.*, 1990). En soya, se ha visto la modulación de la expresión de dos LOXes (LOX-1 y LOX-2), durante el déficit de agua (Macarrone *et al.*, 1995), en donde se observó que el aumento del estrés llevaba a un aumento paralelo en la transcripción y en la actividad de LOX. Durante este estrés, los resultados sugieren que hay una deterioración de la membrana (aumento en la permeabilidad y en el flujo de iones, desmantelamiento de la bicapa lipídica a través de la oxidación de sus componentes), activación de una fosfolipasa que libera acidos grasos polinsaturados, los que son substratos para LOX que lleva a la biosíntesis de JA, el cual finalmente activa un grupo de genes que ayudan a la planta soportar la situación adversa (Macarrone *et al.*, 1995; Navari-Izzo *et al.*, 1990).

LA PARTICIPACION DE LOX EN LA HERIDA

Como ya se mencionó al principio de esta introducción, el papel de las LOXes de plantas en la respuesta al estrés provocado por la herida, podría tener una homología funcional con la formación de leucotrienos y lipoxinas. Estos compuestos, sirven como una señal para iniciar las respuestas al estrés en animales (Samuelson *et al.*, 1987).

Actualmente, ya se han publicado trabajos en los que la participación de LOX en la herida es clara. En *Arabidopsis thaliana*

AtLOX2, un gen de LOX cloroplástica, fue suprimido en plantas transgénicas, lo que provocó un abatimiento de la expresión de este gen, luego de herir a la planta, y del concomitante nivel de JA derivado de la actividad de esta enzima comparado con la planta control (Creelman y Mullet, 1995). En la papa, (Royo *et al.*, 1996) *Lox2* y *Lox3* muestran distintos patrones de expresión luego de que la planta es herida, *Lox2* mantiene el aumento de su expresión por un tiempo de 24 h y se expresa solo en hojas, por el contrario *Lox3* tiene el máximo de su expresión a los 30 min en hojas y luego declina, en raíces mantiene una expresión constitutiva que aumenta al herir la planta. Tanto *Lox3* como *Lox2* y *AtLOX2* responden al tratamiento con JA. En la planta de soya (Saravitz y Siedow, 1996) *LOX7* y *LOX8* se inducen por herida 8 h después del tratamiento, pero solo *LOX7* mostró una inducción de tipo sistémica (en las partes circunvecinas al sitio de herida) y disminuyó su expresión a niveles basales a las 24 h, en cambio *LOX8* solo se indujo localmente y el aumento del transcrito se mantuvo desde las 8 hasta las 24 h. Tanto *LOX7* como *LOX8*, se inducen también por JA. Como puede observarse, las respuestas de LOX a la herida en cada una de las plantas analizadas es distinta y diversa, ya que mientras que algunas se inducen a tiempos cortos y luego disminuyen su expresión, otras mantienen un nivel basal que es aumentado como respuesta al estímulo, otras, mantienen el nivel de expresión por un período prolongado. Existe también diferencia en su expresión espacial, algunas se expresan localmente (solo en el sitio de la herida) y otras de manera sistémica (en las partes aledañas al sitio de la herida). Es también notable que la mayoría de las LOXes inducidas por herida, si no es que todas, se inducen por JA.

En hojas de frijol, el mRNA de LOX se acumula como una consecuencia de la herida de manera local y sistémica (Porta *et al.* 1999). Esta acumulación, se piensa, está relacionada a la formación de JA como mediador de la respuesta al daño membranal o la síntesis de compuestos volátiles de seis carbonos. Integrando todos los resultados que aquí citamos, podríamos decir que las LOXes inducidas por herida son esenciales para la biosíntesis de JA que posteriormente regula un grupo de genes, cuyos productos

contrarrestan el estrés. En papa y tomate (figura 4), se demostró que se requiere de la síntesis de JA de novo para la inducción del inhibidor de proteinasa II (*pin2*), al igual que para otros genes inducibles (Peña-Cortés *et al.* 1993).

SINTESIS DEL ACIDO JASMONICO

Desde hace algunos años, se demostró que el JA, es una fitohormona involucrada en la inducción de genes como respuesta al daño mecánico. El ejemplo mejor estudiado, es la inducción de los inhibidores de proteinasas (*Pin*), en la papa y el tomate después de herir a la planta (Farmer y Ryan, 1990). No solo el JA participa en la inducción de *Pin*, sino también el ácido linolénico y los intermediarios de la biosíntesis de JA como el ácido hidroperoxilínolénico (HPLNA) y el ácido fitodienoico (OPDA) (Farmer y Ryan, 1992). Una evidencia más directa de que JA es un componente esencial en la vía de transducción en la herida, fue al probar medicamentos anti-inflamatorios para mamíferos (Peña-Cortés *et al.*, 1993), los inhibidores de la ciclo-oxigenasa, aspirina y propilgalato, y los inhibidores de la lipoxigenasa ácido salicilhidroxámico (SHAM) y ZK139817 bloquearon de manera efectiva la acumulación de JA después del daño mecánico, cabe señalar que cuando la biosíntesis de JA es bloqueada por estos inhibidores y la planta es subsecuentemente dañada, no hay activación de los genes *pin* en las hojas.

Otro punto de apoyo del involucramiento de JA en la vía de transducción desarrollada por daño mecánico, son las mutantes en los genes de desaturasas del ácido linolénico (LA). En *A. thaliana*, la triple mutante *fad3-2fad7-2fad8* tiene niveles muy bajos de LA y es incapaz de acumular JA en respuesta a herida (McConn y Browse, 1996). La aplicación de LA a las plantas resulta en la acumulación de JA (Farmer y Ryan, 1992). En un estudio, el nivel de LA libre medido antes de la herida fue muchas veces más alto que la acumulación después del estímulo (Conconi *et al.*, 1996). El nivel de LA, aumentó al doble una hora después de la herida, mientras que los niveles de JA aumentaron 10 veces, por lo tanto, el incremento en el nivel de JA inducido por herida puede ser el resultado de la liberación de LA de

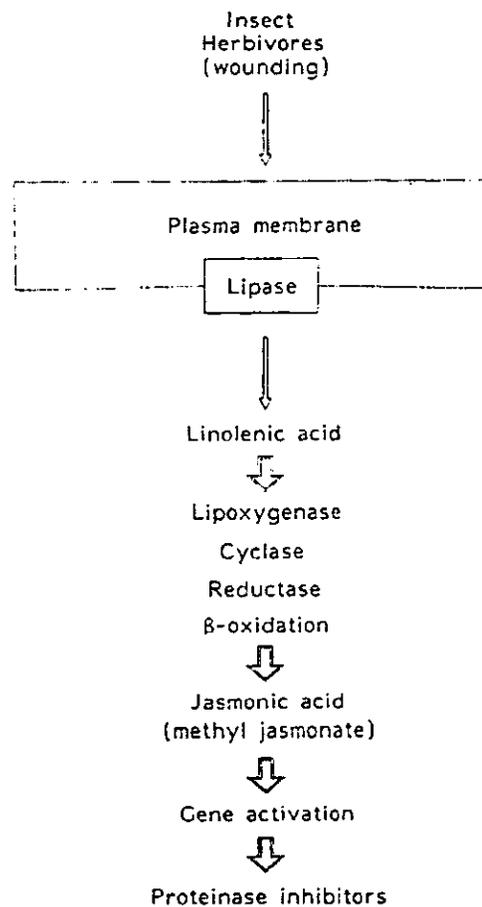


Figura 4. Activación de inhibidores de proteinasas (Pin) por herida en plantas.

los fosfolípidos, o de la utilización de LA presente antes de la herida para la biosíntesis de JA (Conconi *et al.*, 1996). Como puede verse, la cascada intracelular de señalización en respuesta a herida involucra la ruta biosintética derivada de lípidos que da como producto final JA, y en la que LOX juega un papel clave para su desarrollo.

LOCALIZACION DE LAS LOX

Es difícil de analizar el papel de la LOX en los procesos señalados, no solo por la diferente especificidad de estas enzimas, sino también porque LOX está presente en más de un compartimiento subcelular.

Se han desarrollado trabajos relacionados con la localización intracelular y distribución tejido específica de LOX, con el fin de obtener información acerca de su posible función fisiológica. Por ejemplo, en las hojas de soya, LOX se acumula en las vacuolas de las células del mesófilo paravenial, y en el citoplasma de los tejidos de almacenamiento, por lo que posiblemente la LOX estaría sirviendo como una vsp, por otro lado, también se detectó que la LOX está asociada con células epidermales y corticales presente en vacuolas y plástidos (Grimes *et al.*, 1992). Una LOX inducida por MeJA, es secuestrada en los cuerpos de inclusión de proteínas. Esto puede ser importante para restringir la interacción de LOX con ácidos grasos (Grimes *et al.*, 1992). En *A. thaliana*, la *AtLox1* se expresa en hojas, raíces, inflorescencias, y plántulas jóvenes. Debido a que *AtLox1* no tiene secuencia de péptido de tránsito a plástido es muy probable que se localice en citoplasma y esté controlando el desarrollo de órganos jóvenes durante el crecimiento de la planta (Melan *et al.*, 1993). Por el contrario, *AtLox2* posee dicha secuencia y está localizada en cloroplasto. En plantas heridas, en las que el mensajero de *AtLox2* se inhibió por cosupresión, los niveles de JA fueron abatidos, de tal manera que se puede deducir que el papel de esta LOX es la participación en la biosíntesis de JA en respuesta a herida (Creelman y Mullet, 1995). En cebada, las isoenzimas de LOX inducidas por JA están localizadas en plástidos y es posible que participen en la vía de transducción causada por herida (Feussner *et al.*, 1995).

LAS LIPOXIGENASAS SON UNA FAMILIA GENICA

Como ya se pudo notar, en las especies de plantas estudiadas hasta ahora, las lipoxigenasas son codificadas por familias de genes. Por lo regular, la expresión de sus miembros individuales, está sujeta a un estricto control durante el desarrollo, aunque frecuentemente mas de un gen es activo en un estado de desarrollo particular. En las semillas de soya, uno de los ejemplos mejor estudiados, la expresión de tres isoformas disminuye durante la germinación, apareciendo dos isoformas nuevas en los hipocotilos en expansión y en las radículas (Creelman y Mullet, 1992). En hojas de plantas maduras de soya, las LOXes presentes y su relativa permanencia varía durante todo el desarrollo y con la herida (Saravitz y Siedow, 1996). En la papa (Royo *et al.*, 1996), se reportó la existencia de tres genes de LOX: Lox1 que se expresa mayormente en tubérculos y raíces, Lox2 en hojas, y Lox3 en hojas y raíces. En *A. thaliana*, existen dos LOXes (Bell y Mullet, 1993), *AtLOX1* se expresa durante el desarrollo, principalmente en los órganos jóvenes y *AtLOX2* que es cloroplástica, se induce por herida. En la cebada, se han identificado hasta el momento 3 LOXes inducibles por MeJA (Feussner *et al.*, 1995; Vörös *et al.*, 1998): LOX-92, -98 y -100, 2 de ellas son cloroplásticas (LOX-92 y LOX-100).

RT-PCR, UNA OPCION PARA ANALIZAR FAMILIAS GENICAS

Tomando en cuenta que los diferentes miembros de LOX presentan alta similitud en su secuencia, hemos decidido utilizar la técnica de RT-PCR, para analizar su expresión individual en *Phaseolus vulgaris*. A continuación se mencionan algunos aspectos teóricos que apoyan nuestro diseño experimental.

Desde que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada en 1985, se han reportado numerosos trabajos en los que se enfatiza la versatilidad de la técnica. Entre muchas de sus aplicaciones están la obtención de cDNA (conjuntamente con la retrotranscripción o RT-PCR) y la clonación de genes, caracterización del "splicing" del RNA, la detección de las interacciones DNA-proteína, secuenciamiento del DNA, diagnósticos clínicos y forenses, mutagénesis y la síntesis de sondas de ácidos nucleicos (Foley *et al.*, 1993).

Aunque la técnica de PCR tiene un profundo impacto en muchas áreas de la investigación, su aplicación para la cuantificación de ácidos nucleicos se ha encontrado con obstáculos. El principal inconveniente se debe a la naturaleza exponencial del PCR, esto es, que pequeñas variaciones en la eficiencia de la amplificación (entre ensayo y ensayo), afectan de forma dramática la cantidad de producto obtenido. De la misma manera, desviaciones mínimas de la temperatura en los pozos del termociclador, provocan diferencias significativas en el grado de amplificación de las muestras en una misma corrida.

A pesar de estos inconvenientes, la cuantificación de RNA puede lograrse usando la transcripción reversa acoplada a las reacciones de PCR (RT-PCR). Indudablemente, en muchas situaciones el RT-PCR tiene ventajas sobre los experimentos mas tradicionales con RNA, por ejemplo el RT-PCR, es notablemente mas sensible y puede en teoría, detectar desde una copia del RNA de interés en una población compuesta por mezclas de diferentes RNAs, aunque en la practica la detección de 10 ó mas copias es un resultado mas realista. Las condiciones del RT-PCR pueden optimizarse para una máxima especificidad, al grado de discriminar entre dos secuencias diferentes en menos de 5 nucleótidos, esta misma técnica, quizá mas que alguna otra, es adecuada para el análisis de varias muestras a la vez o para diferenciar los miembros de una familia génica. Las ventajas anteriormente citadas, hacen del RT-PCR un ensayo muy útil, capaz de generar datos que no se podrían (o difícilmente) obtener mediante alguna otra técnica. Es importante destacar que mediante una cuidadosa validación de los resultados obtenidos por RT-PCR, se consigue una excelente correlación con los datos obtenidos por northern, hibridación *in situ* y "primer extension" (Foley *et al.*, 1993).

ASPECTOS TECNICOS DEL RT-PCR.

Además de los parámetros involucrados en el PCR, como la temperatura de alineamiento y el diseño de los oligonucleótidos, y la concentración de Mg^{+2} , en el RT-PCR, es importante la etapa de síntesis de cDNA, ya que es una fuente de error en los experimentos cuantitativos frecuentemente omitida. Dado que el RT-PCR puede ser

realizado a partir de RNA poli(A)⁺ o RNA total, es mas recomendable usar RNA total ya que minimiza diferencias en la calidad y recuperación de la muestra: 1 ó 2 µg de este templado es mas que suficiente. Los hexanucléotidos al azar y los oligos poli(dT) son igualmente efectivos para permitir el análisis de varios RNAs a partir del mismo cDNA. Tomando en cuenta que la eficiencia en la síntesis de cDNA es susceptible de variar, se han diseñado protocolos para estandarizar las condiciones de esta etapa. En este aspecto, una de las tendencias es el diseño de ensayos competitivos, que consisten básicamente en coamplificar un RNA control junto con el RNA de interés, usando el mismo par de oligonucleótidos.

La generación de estándares internos adecuados y la elección del par de primeros están entre los aspectos mas cruciales para establecer un protocolo de RT-PCR competitivo. Los controles internos pueden ser RNAs de genes que mantienen su nivel de expresión constante bajo las condiciones de análisis, o RNAs sintéticos hechos a partir de secuencias conocidas y a las que se flanquea con secuencias de sitios de corte, se clonan y luego se transcriben (Wang *et al.*, 1989). Un procedimiento muy utilizado para el RT-PCR competitivo, y que al parecer produce resultados confiables (Wang *et al.*, 1989; Siebert y Larrick, 1992; Cottrez *et al.*, 1994; Riedy *et al.*, 1995), consiste en mezclar una cantidad constante y conocida del RNA control con diferentes diluciones del RNA problema, de cada cDNA resultante se toman dos muestras, una para cada par de primeros, se realiza un PCR en la fase exponencial (previamente determinada), y los productos resultantes se separan en un gel de secuencia o de agarosa, dependiendo de la diferencia en el tamaño de ambos productos, y se cuantifican por densitometría, por fluorescencia (si se usan primeros fluorescentes), o en un contador de centelleo (si se usaron primeros radioactivos). En la mezcla donde la cantidad de producto del transcrito problema sea igual a la cantidad del producto control, se asume que se tiene una relación 1:1, es decir, que la cantidad de RNA control conocida es igual a la cantidad de RNA problema, obteniéndose directamente el valor desconocido.

Cuando se genera un RNA sintético (ó heterólogo), se puede usar como control para evaluar varios RNAs independientemente de

la especie evaluada, lo cual es ventajoso, sin embargo, la metodología no es simple y podría llegar a consumir mucho tiempo, restándole eficacia al método de cuantificación por RT-PCR. Quizá lo mas conveniente sería el uso de RNAs de expresión constitutiva, y dejar como segunda alternativa el uso de RNAs sintéticos como control, o buscar otra metodología.

Un factor de suma importancia, es la determinación de la etapa de la reacción de PCR (puesto que sigue un comportamiento exponencial) durante la cual se realizará la cuantificación. La mayoría de los trabajos de cuantificación se han evaluado en la fase exponencial de la reacción. Para determinar la fase exponencial lo que se hace normalmente es remover alícuotas cada cierto número de ciclos durante la reacción de PCR, hasta que la cantidad de producto se mantenga constante, en este punto, se ha llegado al "plateau", por lo que la fase exponencial estará determinada por el número de ciclos antes de este último punto (Foley y Engel, 1992).

El argumento que se asume, para realizar la cuantificación en la fase exponencial es que después de ésta, en la fase "plateau" o fase de saturación, la eficiencia de amplificación disminuye y la cantidad de los productos comienza a variar por factores tales como: saturación de la polimerasa por el substrato, la desnaturalización incompleta de las secuencias que funcionan como templado y la competición entre el "auto-alineamiento" de los productos y el "alineamiento" de los primeros (Foley *et al.*, 1993). Sin embargo, ya se han desarrollado trabajos en los que se demuestra que las cinéticas de amplificación de ambos productos es igual mas allá de la fase exponencial (Bouaboula *et al.*, 1992; Cottrez *et al.*, 1994; Siebert y Larrick, 1992; Morrison y Gannon, 1994), aunque uno de los trabajos evaluado en esta fase de saturación (Pannetier *et al.*, 1993), recomienda que las secuencias del RNA control y el RNA problema deben ser muy similares para garantizar que la eficiencia de la reacción es igual para ambos, todos los demás trabajos cuantificados en esa etapa no apoyan semejante aseveración.

Para la detección y análisis de los productos, se emplean una variedad de procedimientos. Lo que generalmente determina la elección es el grado de detección requerida por un lado, y por el otro

evitar manipulaciones adicionales, lo que no solo toma mas tiempo, sino que incrementa la posibilidad de una cuantificación inexacta.

Los productos de PCR de diferentes tamaños son normalmente separados por la convencional electroforesis en gel, electroforesis capilar de gel o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método mas fácil y comúnmente usado es la electroforesis de gel, para la separación de los productos de PCR y visualización de las bandas teñidas con bromuro de etidio. Los geles se pueden hacer con agarosa o poliacrilamida. Para la cuantificación de las respectivas bandas de DNA, un sistema de análisis de imagen por video puede ser usado. Los geles pueden ser escaneados directamente del transiluminador, o después de ser fotografiados. Un procedimiento mas sensible que el anterior, es con frecuencia usado para la cuantificación, y consiste en el uso de dNTPs u oligonucleótidos marcados radioactivamente o con fluorescencia, después de la separación electroforética, las bandas marcadas radioactivamente pueden cortarse del gel y usar un contador de centelleo para medir la radioactividad. Sin embargo, secando los geles, pueden ser directamente expuestos a una autoradiografía y luego escanearse, lo cual implica menos manipulación y posiblemente mas precisión. La desventaja de este marcaje radioactivo, es que también se visualizan las bandas no específicas. Una manera de contrarrestar esta desventaja es que después de la separación electroforética se transfiere el material a una membrana y se hace la cuantificación después de hibridar con una sonda de DNA marcada radioactivamente o marcada con digoxigenina (Zimmermann y Mannhalter, 1996). Asimismo, los productos obtenidos usando primeros marcados por fluorescencia, pueden ser separados en geles de poliacrilamida y cuantificados usando un secuenciador láser de DNA fluorescente. Esta fluorescencia inducida por láser (LIF) es una metodología altamente sensible y puede ser aplicada a la cuantificación de los productos de PCR después de electroforesis capilar. Finalmente, HPLC ha sido recientemente usada para separación y determinación de productos de ensayos cuantitativos. Para conseguir una cuantificación mas automatizada, hay métodos que involucran la captura de los productos de PCR en soportes sólidos

(por ejemplo microplatos o pequeñas esferas magnéticas) seguida de la cuantificación del material capturado. El procedimiento usado con mas frecuencia, involucra las amplificaciones del control y del templado problema en presencia de primeros biotinados, seguido de la captura de los productos de PCR en microplatos cubiertos con estreptoavidina, alternativamente los productos de PCR pueden ser capturados en pozos carboxilados de los microplatos, o pueden ser capturados por sondas covalentemente unidas a superficies de platos activados con organosilano. los productos de PCR capturados en cualquiera de las formas anteriormente descritas son hibridadas con sondas específicas para las secuencias control o problema. Las sondas usualmente son marcadas radioactivamente o tienen la capacidad de interactuar con enzimas. La cuantificación es realizada midiendo la radioactividad incorporada o contenido de digoxigenina o por detección inmunoenzimática.

RT-PCR ACOMPETITIVO

Toda la metodología anteriormente mencionada, usa como punto de comparación un templado que se retrotranscribe y se amplifica conjuntamente con la secuencia que se desea analizar, la base de esos protocolos es tener una forma de validar que la eficiencia de la amplificación no influyó para obtener la cantidad de producto resultante.

Recientemente Halford y colaboradores (1999) han desarrollado un método de cuantificación de RNA por medio de la reacción de RT-PCR, demostrando que, la cantidad de producto obtenida después del PCR, es linealmente dependiente del logaritmo de la cantidad de transcrito presente al inicio del experimento, obteniendo un coeficiente de correlación alrededor del 98% en su análisis de regresión, lo cual valida estadísticamente su método. Para su cuantificación, usan series logarítmicas y semilogarítmicas del RNA problema con un RNA de expresión constitutiva para la elaboración del cDNA. Realizan un PCR acompetitivo, en el que para cada dilución manejan sendos tubos, en uno agregan los primeros específicos y en el otro los primeros para el gen constitutivo. La evaluación se realiza en la fase de saturación (previamente determinada) con el fin de

tener suficiente material y analizarlo en un gel de agarosa normal. Lo que se obtiene es un decremento gradual en la cantidad del transcrito problema, y una cantidad constante del transcrito control en todas las diluciones. Cabe señalar que aunque se hacen diferentes diluciones, siempre se parte de la misma cantidad de templado (por ejemplo 2 microgramos del RNA de cada dilución), de tal manera que el resultado obtenido muestra que la disminución en el producto problema es originado única y exclusivamente por la proporción cada vez menor del transcrito, y no de cualquier otro factor.

Tomando en cuenta que la metodología de Halford *et al.* (1999) ofrece la misma exactitud y confiabilidad que un protocolo competitivo, sin estar limitado por aspectos como la cuantificación en la fase logarítmica, el diseño de templados sintéticos o la diferente eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos, se ha decidido aplicar esta técnica para analizar la expresión de 3 miembros de la familia génica de lipoxigenasa en frijol (*Phaseolus vulgaris*) cv Negro Jamapa.

OBJETIVO

Aislar y caracterizar el gen o los genes de lipoxigenasa en frijol que responden a la herida.

Analizar la expresión de la familia génica de las lipoxigenasas de frijol, que responden a la herida y al tratamiento con MEJA.

ANTECEDENTES DEL PROYECTO

En frijol, se han reportado 3 LOXes. Una de ellas denominada LOX1, es una clona genómica, que se expresa en tejidos jóvenes durante el desarrollo de la planta y no se induce por JA (Eiben y Slusarenko, 1994). La segunda denominada pLOX3, es una clona aislada de un banco de cDNA de la que se conoce su secuencia parcial y que se induce por inoculación con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Meier *et al.*, 1993). Recientemente se reportó un gen nuevo de LOX, la PvLOX2, aislada en nuestro laboratorio de un banco

tener suficiente material y analizarlo en un gel de agarosa normal. Lo que se obtiene es un decremento gradual en la cantidad del transcrito problema, y una cantidad constante del transcrito control en todas las diluciones. Cabe señalar que aunque se hacen diferentes diluciones, siempre se parte de la misma cantidad de templado (por ejemplo 2 microgramos del RNA de cada dilución), de tal manera que el resultado obtenido muestra que la disminución en el producto problema es originado única y exclusivamente por la proporción cada vez menor del transcrito, y no de cualquier otro factor.

Tomando en cuenta que la metodología de Halford *et al.* (1999) ofrece la misma exactitud y confiabilidad que un protocolo competitivo, sin estar limitado por aspectos como la cuantificación en la fase logarítmica, el diseño de templados sintéticos o la diferente eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos, se ha decidido aplicar esta técnica para analizar la expresión de 3 miembros de la familia génica de lipoxigenasa en frijol (*Phaseolus vulgaris*) cv Negro Jamapa.

OBJETIVO

Aislar y caracterizar el gen o los genes de lipoxigenasa en frijol que responden a la herida.

Analizar la expresión de la familia génica de las lipoxigenasas de frijol, que responden a la herida y al tratamiento con MEJA.

ANTECEDENTES DEL PROYECTO

En frijol, se han reportado 3 LOXes. Una de ellas denominada LOX1, es una clona genómica, que se expresa en tejidos jóvenes durante el desarrollo de la planta y no se induce por JA (Eiben y Slusarenko, 1994). La segunda denominada pLOX3, es una clona aislada de un banco de cDNA de la que se conoce su secuencia parcial y que se induce por inoculación con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Meier *et al.*, 1993). Recientemente se reportó un gen nuevo de LOX, la PvLOX2, aislada en nuestro laboratorio de un banco

tener suficiente material y analizarlo en un gel de agarosa normal. Lo que se obtiene es un decremento gradual en la cantidad del transcrito problema, y una cantidad constante del transcrito control en todas las diluciones. Cabe señalar que aunque se hacen diferentes diluciones, siempre se parte de la misma cantidad de templado (por ejemplo 2 microgramos del RNA de cada dilución), de tal manera que el resultado obtenido muestra que la disminución en el producto problema es originado única y exclusivamente por la proporción cada vez menor del transcrito, y no de cualquier otro factor.

Tomando en cuenta que la metodología de Halford *et al.* (1999) ofrece la misma exactitud y confiabilidad que un protocolo competitivo, sin estar limitado por aspectos como la cuantificación en la fase logarítmica, el diseño de templados sintéticos o la diferente eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos, se ha decidido aplicar esta técnica para analizar la expresión de 3 miembros de la familia génica de lipoxigenasa en frijol (*Phaseolus vulgaris*) cv Negro Jamapa.

OBJETIVO

Aislar y caracterizar el gen o los genes de lipoxigenasa en frijol que responden a la herida.

Analizar la expresión de la familia génica de las lipoxigenasas de frijol, que responden a la herida y al tratamiento con MEJA.

ANTECEDENTES DEL PROYECTO

En frijol, se han reportado 3 LOXes. Una de ellas denominada LOX1, es una clona genómica, que se expresa en tejidos jóvenes durante el desarrollo de la planta y no se induce por JA (Eiben y Slusarenko, 1994). La segunda denominada pLOX3, es una clona aislada de un banco de cDNA de la que se conoce su secuencia parcial y que se induce por inoculación con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Meier *et al.*, 1993). Recientemente se reportó un gen nuevo de LOX, la PvLOX2, aislada en nuestro laboratorio de un banco

de cDNA de nódulo (cv. Negro Jamapa) y que tiene 84.2% de identidad con LOX1 y 72.7% con pLOX3 a nivel proteína.

Por experimentos de tipo "southern blot", y empleando como sonda un fragmento interno de la PvLOX2, sabemos que en la variedad de frijol Negro Jamapa, se detectan entre 3 y 4 bandas, lo que sugiere la presencia de al menos tres genes de la LOX en frijol (fig. 5)

Además, en nuestro grupo, se tiene una clona aislada de un banco genómico que contiene dos genes de LOX diferentes a los reportados. Nuestro interés principal es caracterizar los genes de LOX presentes en frijol, con un énfasis en aquellos que están involucrados en la respuesta de la planta del frijol a la herida. Mientras mas conozcamos de los componentes de la respuesta al daño presentada por las plantas, mas nos acercaremos a mejorarlas para resistir mejor este tipo de estrés.

MATERIALES Y METODOS

CRECIMIENTO Y TRATAMIENTO DE LAS PLANTAS

Las semillas de frijol de Negro Jamapa se esterilizaron superficialmente con 15 % de hipoclorito de sodio, se lavaron y se germinaron en la oscuridad a 25 oC con 100 % de humedad relativa.

Las plantas crecieron en vermiculita regadas cada tercer día, con 50 % de solución nutritiva o con agua (Somerville y Ogren, 1982), para el experimento de herida; o en hidroponia suplementada con 50 % de solución nutritiva, para los tratamientos con MEJA, en una cámara de crecimiento con 16 h de luz y 8 h de oscuridad hasta los 21 días. En este día de edad, las plantas tienen dos trifolios expandidos.

Para el tratamiento de herida, las plantas de 21 d de edad se hirieron con pinzas de diálisis en todos los trifolios y se colectaron todas las hojas heridas en los tiempos determinados.

Para el tratamiento con metil-jasmonato, éste se diluyó hasta 50 μ M en la solución nutritiva y se mantuvo a las plantas de 21 días en esta solución a lo largo de los tiempos señalados en la cinética de MEJA. Tanto para la cinética de herida como para la de MEJA, las

de cDNA de nódulo (cv. Negro Jamapa) y que tiene 84.2% de identidad con LOX1 y 72.7% con pLOX3 a nivel proteína.

Por experimentos de tipo "southern blot", y empleando como sonda un fragmento interno de la PvLOX2, sabemos que en la variedad de frijol Negro Jamapa, se detectan entre 3 y 4 bandas, lo que sugiere la presencia de al menos tres genes de la LOX en frijol (fig. 5)

Además, en nuestro grupo, se tiene una clona aislada de un banco genómico que contiene dos genes de LOX diferentes a los reportados. Nuestro interés principal es caracterizar los genes de LOX presentes en frijol, con un énfasis en aquellos que están involucrados en la respuesta de la planta del frijol a la herida. Mientras mas conozcamos de los componentes de la respuesta al daño presentada por las plantas, mas nos acercaremos a mejorarlas para resistir mejor este tipo de estrés.

MATERIALES Y METODOS

CRECIMIENTO Y TRATAMIENTO DE LAS PLANTAS

Las semillas de frijol de Negro Jamapa se esterilizaron superficialmente con 15 % de hipoclorito de sodio, se lavaron y se germinaron en la oscuridad a 25 oC con 100 % de humedad relativa.

Las plantas crecieron en vermiculita regadas cada tercer día, con 50 % de solución nutritiva o con agua (Somerville y Ogren, 1982), para el experimento de herida; o en hidroponia suplementada con 50 % de solución nutritiva, para los tratamientos con MEJA, en una cámara de crecimiento con 16 h de luz y 8 h de oscuridad hasta los 21 días. En este día de edad, las plantas tienen dos trifolios expandidos.

Para el tratamiento de herida, las plantas de 21 d de edad se hirieron con pinzas de diálisis en todos los trifolios y se colectaron todas las hojas heridas en los tiempos determinados.

Para el tratamiento con metil-jasmonato, éste se diluyó hasta 50 μ M en la solución nutritiva y se mantuvo a las plantas de 21 días en esta solución a lo largo de los tiempos señalados en la cinética de MEJA. Tanto para la cinética de herida como para la de MEJA, las

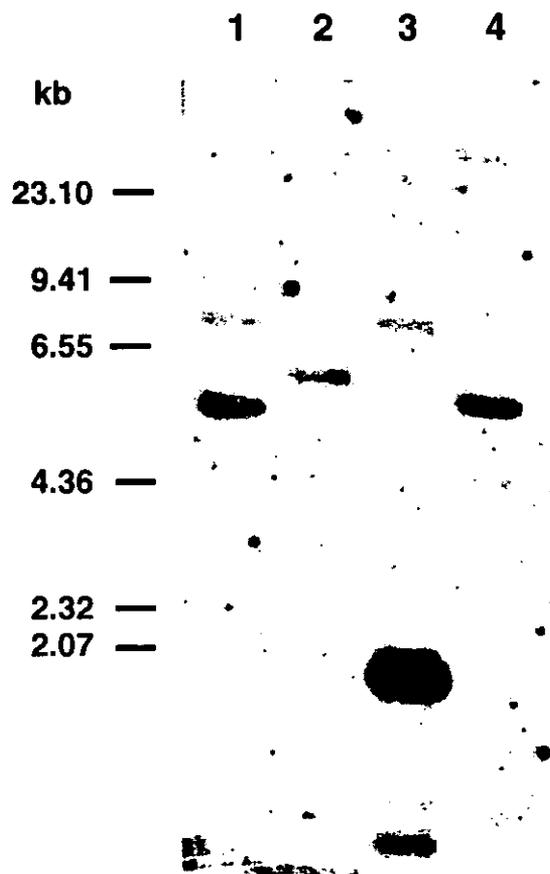


Figura 5. Análisis de "southern blot" de la familia génica de LOX. El DNA de frijol fue digerido con las siguientes enzimas de restricción: (1) Eco RV, (2) Eco RI, (3) Bgl II y (4) Bam HI.

hojas se colectaron y se congelaron inmediatamente a -79 °C hasta la obtención del RNA.

DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS

Para el diseño de oligonucleótidos se hizo el alineamiento de las tres LOX de frijol reportadas en el banco de datos: LOX1 (Eiben y Slusarenko, 1994), corresponde a la secuencia genómica completa de la que solo se tomaron los exones, pLOX3 (Meier *et al.*, 1993) contiene una secuencia incompleta de cDNA a la que le faltan ambos extremos, y la PvLOX2 que es una clona completa aislada de un banco de cDNA de nódulo (Porta *et al.*, 1999). Los oligonucleótidos diseñados en las regiones conservadas entre estas tres secuencias fueron Pv5, 5'-TACCCTCGCAGAGGAAGAAC-3' y Pv3, 5'-TTCATGGTGTACGATAGTG-3' (figura 6). Utilizando estos oligonucleótidos en una reacción de RT-PCR se amplifica un fragmento de 968 pares de bases. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de estos genes: para PvLOX2, lox2, 5'-AGGCACCAGCCAGCGACAC-3'; para pLOX3, lox3 5'-CGATGGAAATCTTTGAGCC-3' (Figura 6); para PvLOX5, gen aislado en nuestro laboratorio; 1565, 5'-GAGTTAAGCAAGC CGCATGA-3'; para el fragmento aislado por RT-PCR; 75, 5'-GAGTTAAGTAAGCCGCATCC-3' (figuras 6 y 13). Los oligonucleótidos AC3 5'-TTGCGCATCGTTTGGCATCG-3' y AC5 5'-CGCCGCTGTTTGGAGCCCTCG-3' se diseñaron sobre la secuencia de cDNA de una acuaporina de frijol (Campos *et al.*, 1997), que sirvió como control de expresión constitutiva.

CLONACION DE LOS FRAGMENTOS GENERADOS POR RT-PCR

El RNA total de hojas heridas de plantas de frijol de 21 días, se purificó aplicando el protocolo de Logemann *et al.* (1987). El RNA se trató con DNAsa de acuerdo a Ausubel *et al.* (1992) y posteriormente se uso para la reacción de reverso transcripción. La mezcla de reacción (20 µl), contuvo 5 µg de RNA, buffer de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH=8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM) 10 U de RNAsina (Boheringer, Mannheim), 1 mM de dNTP, 10 mM de ditiotreitól, 1 mM del oligonucleótido Pv3. Esta mezcla se calentó a 67°C por 5 min, se incubó 10 min a 37°C, para la desnaturalización y posterior

	1	P v 5			50
LOX1	<u>TACCCCTCGCA</u> <u>GGGGAAGAAC</u>	TGGTAGAAAA	TCAACAAGGA	AAGACCCTAA	
PvLOX2	<u>TACCCCTCGCA</u> <u>GAGGAAGAAC</u>	TGGGAGAAAA	GCATCAAAAA	GAGATCCATA	
pLOX3	<u>TACCCCTCGCA</u> <u>GAGGAAGAAC</u>	GGGAAGACCA	AAAACATAAA	AAGATCCATA	
	51	1 o x 2			100
LOX1	GTGTGAGATA	CCAACCAGTG	ACACCTACAT	TCCAAGAGAT	GAAAACTTTG
PvLOX2	GAGT <u>GAGGCA</u> <u>CCAGCCAGCG</u> <u>ACAC</u>	TTACAT	TCCAAGAGAT	GAAAAATTTG	
pLOX3	CAGTGAGAAG	CCCAGTGA	TTGTTTACCT	TCCAAGAGAT	GAAGCATTTG
	101				150
LOX1	GTCATTTGAA	GTCAGGAGAC	TTTCTTACCT	ATGCAATAAA	GTCCTTAACT
PvLOX2	GTCACTTGAA	GTCATCAGAC	TTTCTTACAT	ATGGAATAAA	GTCCTTTGGCT
pLOX3	GTCACTTGAA	GTCATCCGAT	TTTCTTGCTT	ACGGATTGAA	ATCTGTATCC
	151	1 o x 3			200
LOX1	CAAAATGTGT	TACCTACATT	TCAAAAGGCA	TT.....	.TGTTTCAA
PvLOX2	CAAAGTGTCT	TACCTCAATT	TCAATCTGCA	TT.....	.TGTTTAAA
pLOX3	CAAGATGTGT	TGCCAGTGTT	GACTGATGCA	TT <u>CGATGGAA</u>	<u>ATCTTTTGAG</u>
	201				250
LOX1	CAATGAGTTT	GATACCTTTG	AAGACGTGCG	TGGACTCTTT	GAAGGTGGAC
PvLOX2	TGCTGAGTTT	GATAAGTTTG	ATGACGTTTC	TGGATTCTTT	<u>GAAGGTGGAA</u>
pLOX3	<u>CC</u> TTGAGTTT	GATAACTTCG	CTGAAGTGCA	<u>CAAGCTTTAT</u>	GAAGGTGGAC
				Hind III (lox3)	Eco RI (lox2)
	251				300
LOX1	TTTATCTCCC	TACAGATGTA	ATCAGCAAAA	TTAGCCCCAT	ACCAGTGCTT
PvLOX2	<u>TT</u> CATCTTCC	TACAGACGTA	ATAAGCAACA	TTAGCCCCTT	ACCAGTGATA
pLOX3	TTACATTGCC	TACAAACTTT	CTCAGCAAAAT	ACGCTCCTAT	ACCAATTGTC
	301				350
LOX1	AAGGAAATCC	TCCGCACTGA	TGGTGAGCAA	GTCCTCAAGT	TTCCACCACC
PvLOX2	AAGGAAATCT	TCCGCACTGA	TGGTGAACAA	GTCCTCAAGT	TTCCACCACC
pLOX3	AAGGAAATTT	TCCGATCTGA	TGGTGAACAG	TTCTCAAGT	ATCCACCACC
	351				400
LOX1	TCACGTCATC	AGAGTTACTA	AGTCTGCATG	GATGACTGAT	GAAGAATTTG
PvLOX2	TCATGTCATC	CAAGTTAGTA	AGTCTGCATG	GATGACTGAT	GAAGAATTTG
pLOX3	TAAAGTCATG	CAAGTCAATA	AGTCTGCATG	GATGACCGAT	GAAGAATTTG
	401				450
LOX1	GAAGAGAGAT	GCTTGCTGGT	GTTAATCCTT	GCCTAATTCA	ACGCCTTCAA
PvLOX2	GAAGAGAGAT	GCTTGCTGGT	GTTAATCCTT	GCCTAATTCA	ACGCCTTCAA
pLOX3	CAAGAGAAAC	CATTGCTGGT	GTTAATCCTA	ATGTCATTAA	GAGTCTTGAG
	451				500
LOX1	GAGTTCCCTC	CAAAAAGCAA	GCTAGATGTT	ACGGTGTATG	GTGATCAAAC
PvLOX2	GAGTTCCCTC	CAAAGAGCAA	GCTAGATGCC	TCTGTGTATG	GTGATCAAAC
pLOX3	GAATTTCCAC	CACGAAGCAA	GCTGGATACT	CAATCCTTTG	GTGATCATA
	501				550
LOX1	TAGTACAATG	ACCAAAGAAC	ACTTGGAGAT	CAACCTTGGT	GGACTCACTG
PvLOX2	TAGCACAATT	ACTAAAGAAA	ATTTGGAGAT	CAACCTTGGT	GGACTCACTG
pLOX3	TTCCATTATA	ACGAAAGAAC	ATTTGGAGAT	TAACCTTAGGT	GGGCTCACTG

	551				600
LOX1	TGGAAGAGGC	ACTGCATGGT	AACAGATTGT	TCATATTAGA	TCATCATGAT
PvLOX2	TGGAAGAGGC	ATTGAATGGT	AACAAACTGT	TCATATTAGA	TCACCATGAT
pLOX3	TTGAGCAGGC	TATCCAAAGC	AAGAAGTTGT	TCATTTTGGG	TCACCATGAC
	601				650
LOX1	GCATTCATAC	CATATTTGGA	AAGGATCAAT	GACCTTCCCA	CTGCAAAGTG
PvLOX2	GCATTCCTAC	CATATCTGAG	GAAGATCAAT	GACCTACCCA	CCGCAAAGTC
pLOX3	TATCTCATTC	CATATTTGAG	GAGAATAAAT	GCATCTGCCA	...CAAAGAC
	651				700
LOX1	TTATGCCACA	AGAACTATCC	TTTTCTTGAA	AGATGACAAC	ACATTGAAGC
PvLOX2	TTATGCCACA	AGGACAAATCC	TTTTCTTGAA	AGATGATGGC	ACATTGAAGC
pLOX3	TTATGCTACA	AGAACCATAT	TTTTCTTGAA	AAGTGATGGA	ACTTTGGCAC
	701		7 5		750
LOX1	CACTAGCCAT	TGAATTAAGT	TTGCCAAATC	CTGGGGGAAAGGGT
PvLOX2	CATTGGCTAT	TGAATTAAGT	CTTCCACATC	CTAGGGGAGA	TGAGTTTGGT
pLOX3	CATTGGCCAT	TGAGTTAAGT	AAGCCGCATC	CTCAGGGCGA	CGAACATGGT
	751		Pst 1 (lox1, lox2)		800
LOX1	GCCAATAGTA	GAGTAATCTT	GCCTGCAGAT	GGAGGTGCTG	AAAGCACAAT
PvLOX2	GCTGTTAGCA	GAGTTATCTT	GCCTGCAGAC	CAAGGCGCTG	AAAGCACAAT
pLOX3	CCTGTTAGCG	AAGTCTATGT	TCCTGCATAC	GAGGGAGTTG	AAGCTTACAT
					Hind III (lox3)
	801				850
LOX1	TTGGTTACTT	GCAAAGGCTT	ATGTTGTTGT	GAATGACTCC	TGCTACCATC
PvLOX2	TTGGCTATTG	GCTAAGGCTT	ATGTTGTAGT	AAATGACTCT	TGCTATCATC
pLOX3	TTGGTTACTG	GCAAAGGCTT	ATGTTGTTGT	GAACGACTCG	TGCTACCATC
	851				900
LOX1	AACTCATGAG	CCATTGGTTG	AATACTCATG	CCGTAATGGA	ACCGTTTGTG
PvLOX2	AACTCATGAG	CCACTGGCTA	AATACCCATG	CCACAATTGA	GCCCTTTGTC
pLOX3	AACTTGTTAG	CCATTGGCTA	AACACTCATG	CAGTTGTTGA	ACCATTTCGTC
	901				950
LOX1	ATAGCAACAA	ACAGACATTT	GAGTGTGCTC	CACCCTATTT	ATAAACTTCT
PvLOX2	ATAGCAACAA	ATAGGCATCT	CAGTGTGCTC	CACCCTATAT	ACAAACTCTT
pLOX3	CTAGCAACAA	ACAGGCAACT	GAGTGTGGTT	CACCCTGTTT	ACAAACTCCT
	951		P v 3		977
LOX1	GTTGCCT	CAT TATCGTGACA CTATGAA			
PvLOX2	GTCGCCT	CAC TATCGTGACA CCATGAA			
pLOX3	GTTTCCT	CAC TATCGTGACA CCATGAA			

Figura 6. Alineamiento de la región que comprende los oligonucleótidos Pv5 a Pv3 de las tres LOXes de Frijol reportadas. Los oligonucleótidos específicos se indican, así como los sitios de corte exclusivos para cada LOX.

alineamiento del oligonucleótido, respectivamente. Se agregaron 200 U de la reverso-transcriptasa del virus murino de la leucemia Moloney (RT) (GIBCO, BRL), y se continuó la reacción a 42°C por 1 hora. Al finalizar este tiempo, se inactivó la RT calentando a 95°C por 5 min. Para la reacción de PCR, se utilizó todo el cDNA obtenido, llevando la mezcla de reacción a 100 µl finales, la mezcla contuvo buffer de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH=8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM), 0.1mM de los oligonucleótidos Pv5 y Pv3, 0.1mM de dNTPs, y 2.5 U de Taq polimerasa (Boherinnger, Mannheim). Las condiciones de la reacción fueron: 5 min de desnaturalización a 95 °C, 30 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C 1 min, 52 °C 2 min, y 1 min a 72 °C, finalizando la reacción con 10 min a 72 °C. El producto obtenido se purificó por el método PEPSIs (Glen y Glen, 1994) y se clonó en el vector pBluescript II KS.

SECUENCIAMIENTO DE DNA Y ANALISIS DE LA SECUENCIA

El DNA de las clonas obtenidas se secuenció por el método de Sanger *et al.* (1977), usando un kit Sequenase II (Amersham Pharmacia Biotech, USA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El análisis de la secuencia se hizo utilizando el paquete de computadora Wisconsin Version 10, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.

PREPARACION DE LOS RNAS

RNA total fue extraído de plantas de frijol cv. Negro Jamapa, de 21 días, ya sea heridas o tratadas con 50 mM de JA, se utilizó para el análisis de la expresión de los genes PvLOX2, LOX4 y la clona 75. Los puntos tomados para el análisis fueron, para herida: control al inicio, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36 y 48 h. Para el tratamiento con MEJA: 4.5, 6, 9, 12, 15 h y control 15 h. Los RNAs fueron tratados con DNAsa siguiendo el protocolo de Ausubel *et al.*, (1992), previo a su uso en los experimentos de RT-PCR.

RT-PCR

Todos los cDNAs fueron obtenidos usando un oligonucleótido (dT₂₅)VN, 2 µg de RNA, 200 U de RT del virus murino de la leucemia Moloney (GIBCO, BRL), siguiendo el protocolo recomendado para la RT-SuperScript™ II (GIBCO, BRL), con la variante de que el alineamiento e incubación con la retro-transcriptasa se hicieron a 37 °C. La mezcla de PCR contuvo: buffer de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH=8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM), 0.1mM del oligonucleótidos Pv3, común para todos las LOXes y la misma cantidad del oligonucleótido específico, 0.1mM de dNTPs, y 2.5 U de Taq polimerasa (Boherinnger, Mannheim). Las condiciones fueron: 3 min de desnaturalización a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C 1 min, 1.5 min a la temperatura de alineamiento del par de oligonucleótidos, (62 °C para LOX2; 56 °C para 1565, 75 y AC) y 1 min a 72 °C, finalizando la reacción con 10 min a 72 °C.

DETERMINACION DE LA FASE DE SATURACION DE LA REACCION DE RT-PCR

Basándose en el trabajo de Halford y colaboradores (Halford *et al.*, 1999), la fase de saturación de la reacción de RT-PCR, se determinó tomando alícuotas de 5 µl a los 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos, usando el RNA que mostró una expresión máxima (determinada en una reacción de RT-PCR exploratoria, tanto para la cinética de herida como para la de MEJA).

El cDNA fue sintetizado de la manera ya mencionada anteriormente. La mezcla de PCR contuvo 2.5 µl de cDNA, 2.5 U de Taq polimerasa (Boherinnger, Mannheim), buffer PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH=8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM), 0.1 mM de cada oligonucleótido, 0.1 mM de dNTP, en un volumen total de 50 µl. Todos los PCRs se hicieron por duplicado. Las bandas de los productos fueron resueltas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 ó 1.5% dependiendo del tamaño del producto, y fueron teñidas con bromuro de etidio para su posterior visualización en un videosistema EagleEye II (Stratagene, La Jolla, CA). El análisis densitométrico de las imágenes de los geles fue realizada usando el programa NIH Image

1.61, se graficó el promedio de los valores producto específico/producto control, con su respectiva desviación estándar.

RESULTADOS

CLONACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR RT-PCR

Como una estrategia para aislar los miembros de LOX que se expresaran en herida, se empleó la técnica de RT-PCR. Previo al uso de los RNAs en el RT-PCR, se hizo un "northern blot", para saber si había expresión de LOX en esas condiciones, usando un fragmento interno de 1770 pares de bases de la clona PvLOX2 al que se designó fBgl II. Los RNAs analizados se aislaron de hojas de plantas de 21 días heridas durante a) 1 h, b) 2h, y c) control tomado a las 48 h. Como se observa en la figura 7a, se detectó una baja expresión de LOX en los RNAs 1 y 2 h de herida y prácticamente nula en el control. Con estos RNAs, se procedió a sintetizar la cadena complementaria con el oligonucleotido Pv3. Para la reacción de PCR, se emplearon los oligonucleótidos Pv3-Pv5, diseñados sobre secuencias conservadas en las tres LOX de frijol conocidas (figura 6). En la figura 8B se observa el producto del RT-PCR esperado de 968 pares de bases, en los RNAs de 1, 2 h de herida. No se observa contaminación de los RNAs con DNA en los controles sin RT (líneas 2 y 4). Además, el PCR sobre DNA genómico, muestra productos con un tamaño mayor debido a la presencia de intrones en la región amplificada por estos oligonucleótidos. Estos productos, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con fBgl II, para comprobar que eran productos específicos de una secuencia de LOX (figura 8A). Los productos de PCR se clonaron en el vector pBluescript II KS en el sitio Eco RV, y de un rastreo en colonia de 200 clonas, se obtuvieron 6 colonias positivas, las que fueron designadas arbitrariamente por su número: 25, 75, 90, 159, 162 y 190 (figura 9).

ANALISIS DE LAS CLONAS

Debido a que el diseño de los oligonucleótidos se hizo alineando 3 diferentes LOX de frijol, cabría la posibilidad de clonar secuencias homólogas a cualquiera de ellas, por tanto, un recurso para conocer

1.61, se graficó el promedio de los valores producto específico/producto control, con su respectiva desviación estándar.

RESULTADOS

CLONACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR RT-PCR

Como una estrategia para aislar los miembros de LOX que se expresaran en herida, se empleó la técnica de RT-PCR. Previo al uso de los RNAs en el RT-PCR, se hizo un "northern blot", para saber si había expresión de LOX en esas condiciones, usando un fragmento interno de 1770 pares de bases de la clona PvLOX2 al que se designó fBgl II. Los RNAs analizados se aislaron de hojas de plantas de 21 días heridas durante a) 1 h, b) 2h, y c) control tomado a las 48 h. Como se observa en la figura 7a, se detectó una baja expresión de LOX en los RNAs 1 y 2 h de herida y prácticamente nula en el control. Con estos RNAs, se procedió a sintetizar la cadena complementaria con el oligonucleotido Pv3. Para la reacción de PCR, se emplearon los oligonucleótidos Pv3-Pv5, diseñados sobre secuencias conservadas en las tres LOX de frijol conocidas (figura 6). En la figura 8B se observa el producto del RT-PCR esperado de 968 pares de bases, en los RNAs de 1, 2 h de herida. No se observa contaminación de los RNAs con DNA en los controles sin RT (líneas 2 y 4). Además, el PCR sobre DNA genómico, muestra productos con un tamaño mayor debido a la presencia de intrones en la región amplificada por estos oligonucleótidos. Estos productos, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con fBgl II, para comprobar que eran productos específicos de una secuencia de LOX (figura 8A). Los productos de PCR se clonaron en el vector pBluescript II KS en el sitio Eco RV, y de un rastreo en colonia de 200 clonas, se obtuvieron 6 colonias positivas, las que fueron designadas arbitrariamente por su número: 25, 75, 90, 159, 162 y 190 (figura 9).

ANALISIS DE LAS CLONAS

Debido a que el diseño de los oligonucleótidos se hizo alineando 3 diferentes LOX de frijol, cabría la posibilidad de clonar secuencias homólogas a cualquiera de ellas, por tanto, un recurso para conocer

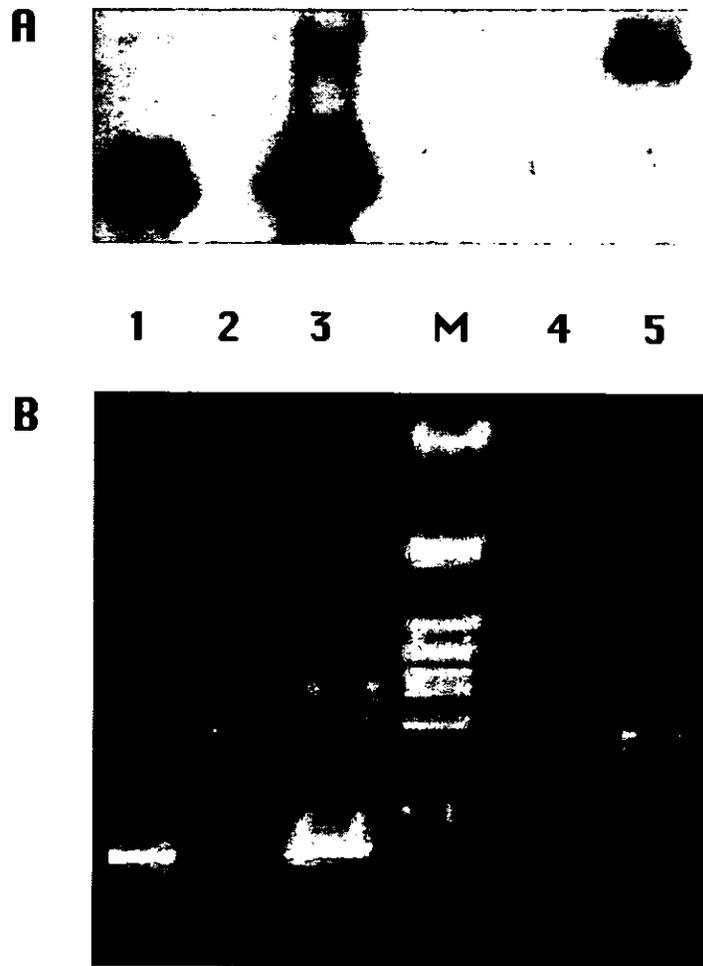


Figura 8. Productos de RT-PCR sobre RNA de hojas heridas 1 y 2h y de PCR sobre DNA genómico de frijol obtenido con Pu5-Pu3. A) Southern blot usando la sonda fBgl II de los productos obtenidos en B). B) Tinción con bromuro de etidio de; 1, 3 y 5; productos obtenidos con RNA de hojas heridas 1h y 2h, y con DNA genómico de frijol, respectivamente. 2 y 4 control sin RT. M: marcador lambda Pst I.

25 75 90 M 159 162 190

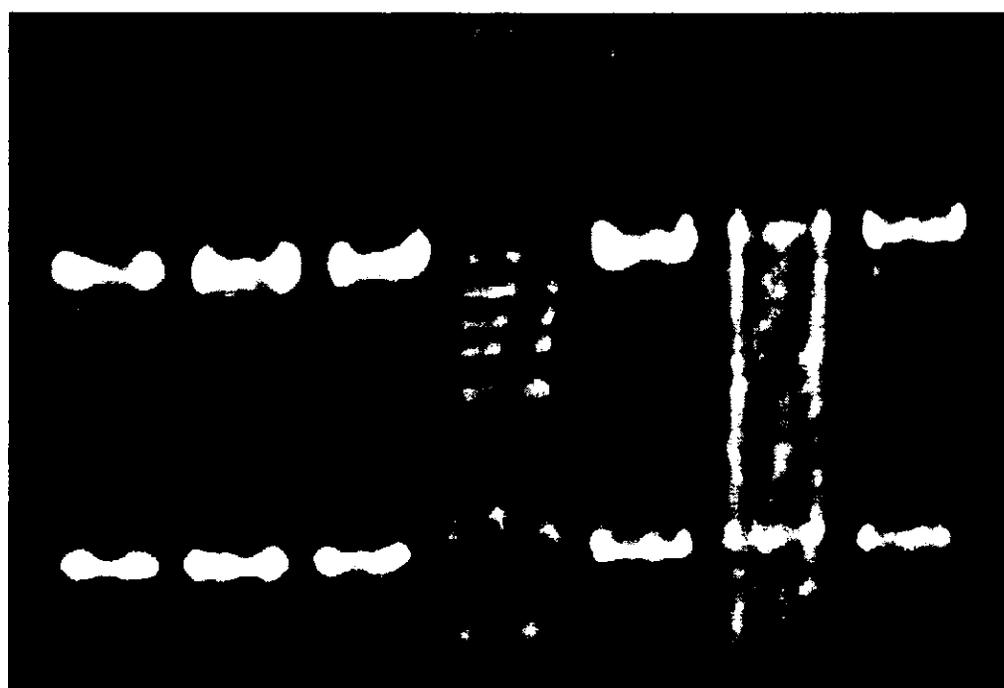


Figura 9. Clonas con el inserto de 968 pb generado por RT-PCR sobre RNA de hojas de frijol heridas (25, 75, 90, 159, 162 y 190). M) Marcador: lambda Pst I.

cuantas LOX diferentes se habían clonado, es buscar secuencias de sitios de corte exclusivas para cada tipo de LOX. Así, las 6 clonas se cortaron con Eco RI para distinguir a la PvLOX2, dividiendo al fragmento de 968 pb en fragmentos de 260 y 708 pb; para distinguir a la pLOX3, se empleó Hind III, que corta fragmentos de 232, 558 y 178 pb. PvLOX2 y la LOX1 comparten un sitio de Pst I, produciendo fragmentos de 777 y 191 pb (figura 10). Si el fragmento de 968 pb se corta con Pst I y no con Eco RI, entonces se tendría una secuencia tipo LOX1. En la figura 10 se observa el resultado de las digestiones con Eco RI y Hind III. Las clonas 25, 75, 190 se cortaron con Hind III de la manera esperada para pLOX3. Las clonas 90 y 159 se cortaron con Eco RI distinguiéndose como PvLOX2. La clona 162, no se cortó con Eco RI y si con Hind III, pero de una forma distinta a las otras clonas, de tal forma que se supuso que se tenía otro tipo de LOX. Ninguna de las clonas se digirió únicamente con Pst I, lo que descartó que alguna de las clonas fuera LOX1. En resumen, se habían clonado 3 tipos de LOX, 3 homólogas a pLOX3, 2 homólogas a PvLOX2 y una diferente.

SECUENCIACION DE LAS CLONAS

Para secuenciar, se eligieron las clonas 75, 90 y la 162. La secuencia de la clona 75 es 94.76 % idéntica a nivel de DNA, con la pLOX3 (figura 11), lo que podría sugerir que aislamos un gene equivalente, sin embargo los cambios en nucleótidos que se observan son reales (se cotejaron después de repetidas secuenciaciones) y eso estaría indicando que se trata de un gen distinto, por lo cual se decidió denominarlo PvLOX4. La clona 90, resultó ser idéntica a PvLOX2, es decir, es el mismo gen, y 162 resultó ser un híbrido, producto ilegítimo de la reacción de PCR, que en su extremo 5' tenía secuencia de PvLOX5 y en su otro extremo secuencia PvLOX2 (datos no mostrados), por lo tanto no seguimos trabajando con esta clona. En resumen, bajo condiciones de herida usando los oligonucleótidos Pv5 y Pv3, solamente se aislaron dos LOXes: PvLOX2 y PvLOX4.

pLOX3 1 TACCCTCGCAGAGGAAGAACGGGAAGACAAAACTAAAAAAGATCCTAA 50
 |||
75 1 TACCCTCGCAGAGGAAGAACAGGAAGAGCAAAAACAAAAAAGATCCTAA 50
 |||
 51 CAGTGAGAAGCCCAGTGACTTTGTTTACCTTCCAAGAGATGAAGCATTG 100
 |||
 51 CAGTGAGAAGCCCAGTGACTTTGTTTACCTTCCAAGAGACGAAGCATTG 100
 |||
 101 GTCAC TTGAAGTCATCCGATTTTCTTGCTTACGGATTGAAATCTGTATCC 150
 |||
 101 GTCAC TTGAAGTCATCAGATTTTCTCGCTTACGCATTGAAATCTGTATCC 150
 |||
 151 CAAGATGTGTTGCCAGTGTGACTGATGCATTCGATGGAAATCTTTTGAG 200
 |||
 151 CAAGATGTGTTGCCAGTGTGACTGATGCATTCGATGGAAATCTTTTGAG 200
 |||
 201 CCTTGAGTTTGATAACTTCGCTGAAGTGCACAAGCTTTATGAAGGTGGAG 250
 |||
 201 CCTTGAGTTTGATAACTTCGCTGAAGTGCACAAGCTTTATGACGGTGGAG 250
 |||
 251 TTACAT TGCCCTACAACTTTCTCAGCAAATACGCTCCTATACCAATTGTC 300
 |||
 251 TTACAT TGCCCTACAGGCTTTCTTAGCAAATACGCTCCTATACCAATTGTC 300
 |||
 301 AAGGAAATTTTCCGATCTGATGGTGAACAGTTCCTCAAGTATCCACCACC 350
 |||
 301 AAGGAAATTTTCCGATCTGATGGTGAACAGTTCCTCAAGTATCCACCACC 350
 |||
 351 TAAAGTCATGCAAGTCAATAAGTCTGCATGGATGACCGATGAAGAATTTG 400
 |||
 351 TAAAGTCATGCAAGTGGATAAGTCTGCATGGATGACTGATGAAGAATTTG 400
 |||
 401 CAAGAGAAACCAT TGCTGGTGTAAATCCTAATGTCATTAAGAGTCTTGAG 450
 |||
 401 CAAGAGAAACCAT TGCTGGTGTAAATCCTAATGTCATTAAGATTCTCAAG 450
 |||
 451 GAATTTCCACCACGAAGCAAGCTGGATACTCAATCCTTTGGTGATCATAAC 500
 |||
 451 GAGTTCCACCACGTAGCACGCTGGACACTCAAGCCTATGGTGATCACAC 500
 |||
 501 TTCCATTATAACGAAAGAACATTTGGAGATTAACCTTAGGTGGGCTCACTG 550
 |||
 501 CTCTATCATAACGAAAGAACATTTGGAGCCTAAATTAGGAGGGCTCACTG 550
 |||
 551 TTGAGCAGGCTATCCAAAGCAAGAAGTTGTTTCATTTTGGATCACCATGAC 600
 |||
 551 TTGAGCAGGCTATCGAGAACAAGAAGTTGTTTCATCTTGGATCACCATGAC 600
 |||
 601 TATCTCATTCATATTTGAGGAGAATAAATGCATCTGCCACAAAGACTTA 650
 |||
 601 TATCTCATTCATATTTGAGGAGAATAAATGCATCTACCACAAAGACTTA 650
 |||
 651 TGCTACAAGAACCATATTTTCTTGAAAAGTGATGGAACTTTGGCACCAT 700
 |||
 651 TGCTACAAGAACCATCTTTTCTTGAAAAGATGATGGAACTTTGGCACCAT 700
 |||

IDENTIFICACION DEL NUMERO PROBABLE DE GENES DE LOX

Con la idea de identificar si con los oligonucleótidos Pv3 y Pv5, se podían amplificar algún otro gen que no se hubiera expresado como respuesta a la herida, se empleó DNA genómico como templado. También se diseñaron oligonucleótidos específicos para la PvLOX2 y la PvLOX4, denominados lox2, y lox3 (figura 6). Con el par Pv5-Pv3, se amplifican 3 bandas (figura 12, línea 1), que muy probablemente correspondan a LOX1, PvLOX2 y PvLOX4, ya que sobre estas secuencias fueron diseñados los oligonucleótidos. Con el par lox2-Pv3 se obtuvo una sola banda (figura 12, línea 2), indicando que el oligonucleótido lox2 es específico para la PvLOX2. Con lox3-Pv3, se amplificaron 3 fragmentos de diferente tamaño (figura 12, línea 3). Una de estas bandas debe corresponder a PvLOX4. El otro de los fragmentos puede ser PvLOX2 ya que la secuencia del oligonucleótido lox3, comparte 4 nucleótidos del extremo 3' con una región de PvLOX2, por lo tanto puede ser un producto inespecífico. La tercera banda parece ser una LOX con una identidad alta con PvLOX4.

Al incrementar 2 °C la temperatura de apareamiento durante el PCR, se amplifican solo dos bandas sobre DNA genómico con lox3-Pv5 (figura 12, carril 5), y con Pv3-Pv5 (figura 12, carril 7).

Por otro lado, en el laboratorio hemos aislado una clona de LOX de un banco genómico de frijol. Con el fin de identificar si esta clona contenía el gen de algunas de las tres LOXes de frijol conocidas, se emplearon los pares de oligonucleótidos lox2-Pv3, lox3-Pv3 y Pv5-Pv3, usando como templado DNA de la clona genómica. Con el par de oligonucleótidos lox2-Pv3, no hubo amplificación, por lo tanto la clona genómica no es PvLOX2 (figura 12, línea 9). Con los oligonucleótidos Pv5-Pv3, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1565 pb, (Figura 12, línea 8). Este fragmento se clonó y secuenció. La comparación entre la secuencia del fragmento 1565 y la clona 75 muestran una identidad de 98.76% (figura 13). Esta identidad es alta, sin embargo, luego de repetidas secuenciaciones (tanto manuales como con secuenciador automático), y de comparar su secuencia a nivel de proteína (figura 14), los cambios presentados son reales, por lo que pensamos se trata de genes diferentes. La secuencia de estos dos genes se está completando, así que con la comparación de las

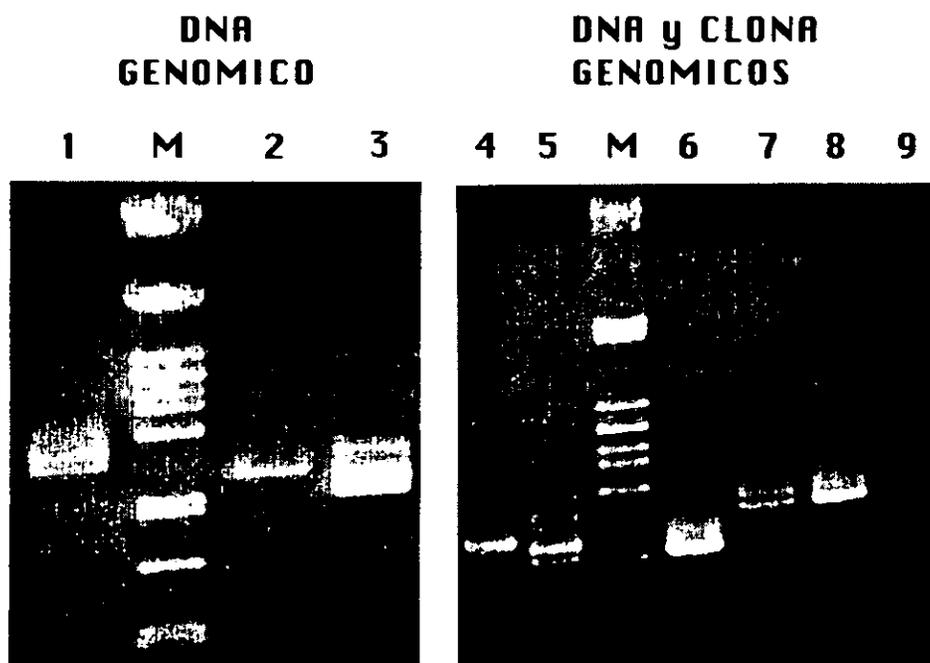


Figura 12. PCRs sobre DNA genómico de frijol y la clona genómica de LOX.
 Líneas 1, 2 y 3 productos obtenidos sobre DNA genómico con los pares de oligonucleótidos Pu5-Pu3, lox2-Pu3 y lox3-Pu3, respectivamente, a 56 grados Celsius de temperatura de alineamiento.
 Líneas 4, 5 y 7, PCRs a una Tm=58 grados Celsius, con los pares lox2-Pu3, lox3-Pu3 y Pu5-Pu3 sobre DNA genómico. Líneas 6, 8 y 9 PCRs sobre la clona genómica con lox3-Pu3, Pu5-Pu3 y lox2-Pu3 a una Tm=58 grados Celsius.

1565 1 TACCCTCGCAGAGGAAGAACAGGAAGAGCAAAAACCAAAAAAGAAACAGA
 |||
75 TACCCTCGCAGAGGAAGAACAGGAAGAGCAAAAACCAAAAAAGA

51 TCCTAACAGTGAGAAGCCCGACGACTTTGTTTACCTTCCAAGAGACGAAG
 |||
 TCCTAACAGTGAGAAGCCCGACGACTTTGTTTACCTTCCAAGAGACGAAG

101 CATTGGTCACTTGAAGTCATCAGATTTTCTCGCTTACGCATFGAAATCT
 |||
 CATTGGTCACTTGAAGTCATCAGATTTTCTCGCTTACGCATFGAAATCT

151 GTATCGCAAGATGTGTTGCCAGTGTTGACTGATGCATTCGATGGAAGTCT
 |||
 GTATCGCAAGATGTGTTGCCAGTGTTGACTGATGCATTCGATGGAAGTCT

201 TTTGAGCCTTGAGTTTGATAACTTCGCTGAAGTGCACAAGCTTTATGACG
 |||
 TTTGAGCCTTGAGTTTGATAACTTCGCTGAAGTGCACAAGCTTTATGACG

D d e I

251 GTGGAGTTACATTGCCTACAGGCTTTCTTAGCAAATACGCTCCTATACCA
 |||
 GTGGAGTTACATTGCCTACAGGCTTTCTTAGCAAATACGCTCCTATACCA

301 ATTGTCAAGGAAATTTTCCGATCTGATGGTGAACAGTTCCTCAAGTATCC
 |||
 ATTGTCAAGGAAATTTTCCGATCTGATGGTGAACAGTTCCTCAAGTATCC

351 ACCACCTAAAGTCATGCAAGTGGATAAGTCTGCATGGATGACTGATGAAG
 |||
 ACCACCTAAAGTCATGCAAGTGGATAAGTCTGCATGGATGACTGATGAAG

401 AATTTGCAAGAGAAACCATTGCTGGTGTGAATCCTAATGTCATTAAGATT
 |||
 AATTTGCAAGAGAAACCATTGCTGGTGTGAATCCTAATGTCATTAAGATT

451 CTCAAGGAGTCCCACCACGTAGCACGCTGGACACTCAAGCCTATGGTGA
 |||
 CTCAAGGAGTCCCACCACGTAGCACGCTGGACACTCAAGCCTATGGTGA

501 TCACACCTCTATCATAACGAAAGAACATTTGGAGCCTAAATTAGGAGGGC
 |||
 TCACACCTCTATCATAACGAAAGAACATTTGGAGCCTAAATTAGGAGGGC

551 TCACTGTTGAGCAGGCTATCGAGAACAAGAAGTTGTTTCATCTTGGATCAC
 |||
 TCACTGTTGAGCAGGCTATCGAGAACAAGAAGTTGTTTCATCTTGGATCAC

601 CATGACTATCTCATTCCATATTTGAGGAGAATAAATTCATCTACCACAAA
 |||
 CATGACTATCTCATTCCATATTTGAGGAGAATAAATTCATCTACCACAAA

651 GACTTATGCTACAAGAACCATCTTTTTCTTCAAAGATGATGGAACATTGG
 |||
 GACTTATGCTACAAGAACCATCTTTTTCTTCAAAGATGATGGAACATTGG

1 5 6 5

701 CACCATTAGCCATTGAGTTAAGCAAGCCGCATAGTCAGGGTGACGAGCAT
 |||
 CACCATTAGCCATTGAGTTAAGTAAGCCGCATC@TCAGGGCGACGAACAT

7 5 D d e I

751 GGCCTGTCAGCGAAGTCTATGTGCCTGCATACGAGGGAGTTGAAGCTTA
 |||
 GGCCTGTTAGCGAAGTCTATGTTCTGCATACGAGGGAGTTGAAGCTTA

801 CATTTGGTTACTGGCAAAGCCTTATGTTGTTGTGAACGACTCATGCTACC
 |||
 CATTTGGTTACTGGCAAAGCCTTATGTTGTTGTGAACGACTCGTGCTACC

851 ATCAAATCGTTAGCCATTGGCTAAACACTCATGCAGTTGTTGAACCATTC
 |||
 ATCAACTTGTAGCCATTGGCTAAACACTCATGCAGTTGTTGAACCATTC

D d e I

901 GTGATAGCAACAAACAGGCACTGAGTGTGGTTCACCCTGTTTACAACT
 |||
 GTGATAGCAACAAACAGGCACTGAGTGTGGTTCACCCTGTTTACAACT

951 CCTGTTTCCTCACTATCGTGACACCAGAA. 979
 |||
 CCTGTTTCCTCACTATCGTGACACCATGAA

Figura 13. Alineamiento de las clonas 1565 y 75. Se señalan los sitios de restricción de Dde I y los oligonucleótidos específicos.

P1015	1	---
P1013	1	---
P1014	1	---
P1012	1	---
P1015	1	---
P1013	86	---
P1014	96	---
P1012	96	---
P1015	16	---
P1013	71	---
P1014	180	---
P1012	191	---
P1015	110	---
P1013	163	---
P1014	272	---
P1012	284	---
P1015	205	---
P1013	258	---
P1014	367	---
P1012	376	---
P1015	299	---
P1013	352	---
P1014	461	---
P1012	471	---
P1015	394	---
P1013	447	---
P1014	566	---
P1012	566	---
P1015	542	---
P1013	661	---
P1012	661	---
P1015	637	---
P1013	756	---
P1012	756	---
P1015	732	---
P1013	850	---
P1014	850	---
P1012	850	---

Figura 14. Alineamiento de las secuencias P1012, P1014, P1015 y P1013. Los (*) señalan los residuos de aminoácidos involucrados con la unión del átomo de hierro.

secuencias completas sabremos si son realmente diferentes. Con el par de oligonucleótidos lox3-Pv3, se amplificó un fragmento (figura 12 línea 6) este fragmento no se clonó, pero el oligonucleótido lox3, está contenido en la secuencia del fragmento Pv5-Pv3, así que este fragmento debe corresponder a la misma clona. Datos de secuencia de la clona aislada del banco genómico, indican que hay dos genes orientados cola con cola en esta clona. Ninguno de estos dos genes corresponde a la secuencia de LOX1, PvLOX2 o PvLOX4.

Con estos pares de oligonucleótidos, podemos detectar 4 genes de LOX en *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa: LOX1, PvLOX2, PvLOX4 y PvLOX5. El quinto gen está codificado en la clona genómica y le llamamos PvLOX6.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS 75 Y 1565

El análisis de la secuencia de las clonas 75 y 1565, mostró que ambos fragmentos tienen una identidad alta con pLOX3: 94.7 % y 93.52 %, respectivamente. De hecho el oligonucleótido, lox3, no las diferencia. De tal modo, que se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de ellas, basadas en un sitio de restricción único de Dde I que no está contenido en la clona 1565 (figura 13), llamados 75 y 1565, para PvLOX4 y PvLOX5, respectivamente. Se utilizó como oligonucleótido 3', a Pv3, de tal manera que los productos esperados son: 248 pares de bases para ambas en una reacción de RT-PCR y 348 para una reacción de PCR sobre DNA genómico. Se realizaron PCRs para fijar las condiciones de la reacción para cada uno de los pares de oligonucleótidos, quedando las condiciones para 75-Pv3 $T_m=60$ °C y 1mM de $MgCl_2$, y para 1565-Pv3 $T_m=56$ °C y 1.5mM de $MgCl_2$. Teniendo ya los oligonucleótidos específicos para tres miembros de la familia génica de LOX en frijol, nos propusimos evaluar su expresión en las cinéticas de herida y ácido jasmónico.

CINETICA DE HERIDA

En la Figura 15 se puede observar la expresión de LOX en hojas de frijol de 21 días en respuesta a la herida. Las PvLOX2 y PvLOX4, mostraron un comportamiento muy similar: su expresión inicia desde las 6 horas, aumentando hasta alcanzar su máximo a las 24 h,

CINETICA HERIDA

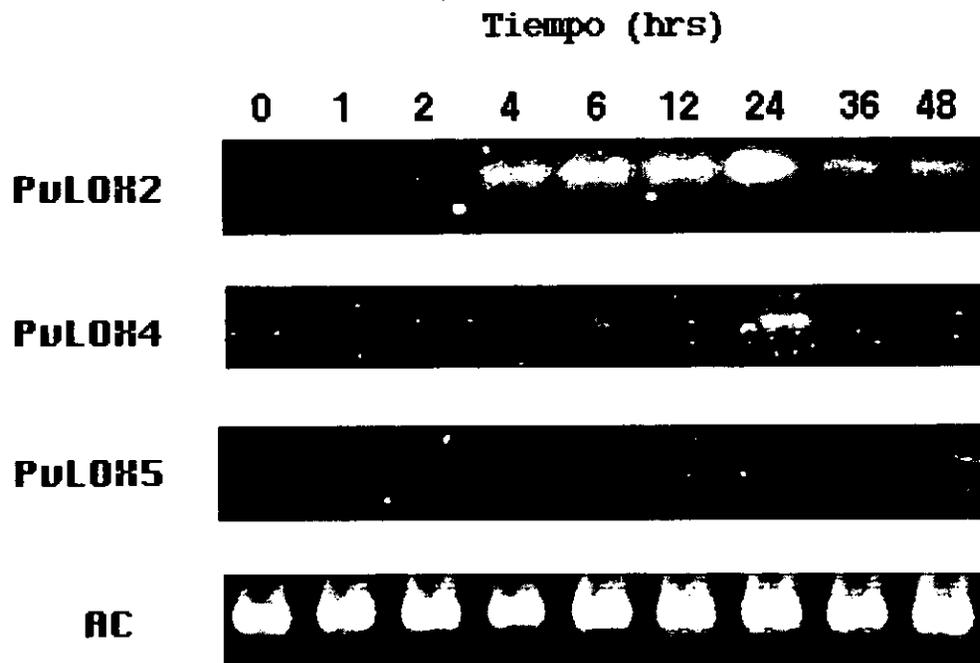


Figura 15. Expresión de los diferentes miembros de LOX en la cinética de herida.

disminuye a su valor basal a las 36 y 48 horas. Se aprecia una expresión mayor para la PvLOX2 comparada con la PvLOX4. Esta diferencia en la expresión del mensajero de PvLOX2 y PvLOX4 pudiera estar indicando el grado de inducción por herida entre estos dos genes, lo cual queda reflejado en la reacción de PCR. No se observó la expresión de PvLOX5 en ningún punto de la cinética de herida. La expresión del gen de acuaporina (Campos *et al.*, 1997), se usó como control constitutivo.

CINETICA DE ACIDO JASMONICO

En la figura 16, se muestra la expresión de las LOXes en hojas de plantas de frijol tratadas con MEJA a diferentes tiempos. La PvLOX2 muestra un incremento considerable en su expresión a las 9 h, que decrece entre las 12 y 15 horas; en el control tomado a las 15 horas no se detectó expresión. La expresión de PvLOX4, se observa desde las 4.5 h de tratamiento con MEJA, su punto máximo de expresión es a las 9 h y entre las 12 y las 15 h desciende sin llegar al basal. El control negativo tomado a las 15 h no muestra expresión. El punto de la expresión máxima para ambos genes, fue las 9 horas. PvLOX5 no se expresó en ningún punto de la cinética. Se observa una expresión mayor para el gen PVLOX2, comparada con PvLOX4.

DIGESTIONES CON PST I Y CON HIND III

El hecho de que PvLOX2 y PvLOX4 dieran un patrón de expresión semejante, nos llevó a revisar la especificidad del oligonucleótido 75 sobre la secuencia de PvLOX2. Ciertamente, el oligonucleótido 75, es específico para discriminar entre PvLOX4 y PvLOX5, pero cabría la posibilidad de estar amplificando también secuencia de PvLOX2, ya que en esa región la secuencia de PvLOX4 es casi idéntica a PvLOX2. Desafortunadamente, como las secuencias de PvLOX4 y PvLOX5 tienen una identidad alta, no teníamos otra región para diseño de oligonucleótidos, así que una manera de esclarecer la expresión exclusiva de PvLOX2 o de PvLOX4, en las cinéticas de herida y de MEJA, era digerir los productos de RT-PCR resultantes de amplificar con 75-Pv3, con Pst I, que digiere PvLOX2 y con Hind III, que digiere PvLOX4. En la figura 17, se muestra el

CINETICA JA

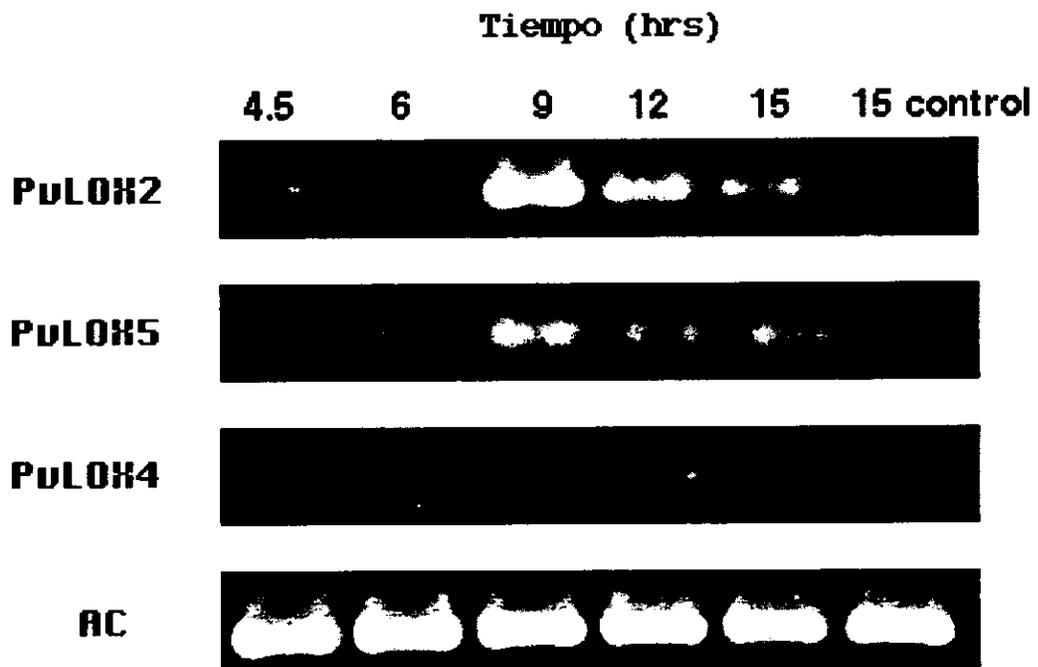


Figura 16. Expresión de los diferentes miembros de LOX en la cinética de JA.

CINETICA HERIDA

CINETICA JA

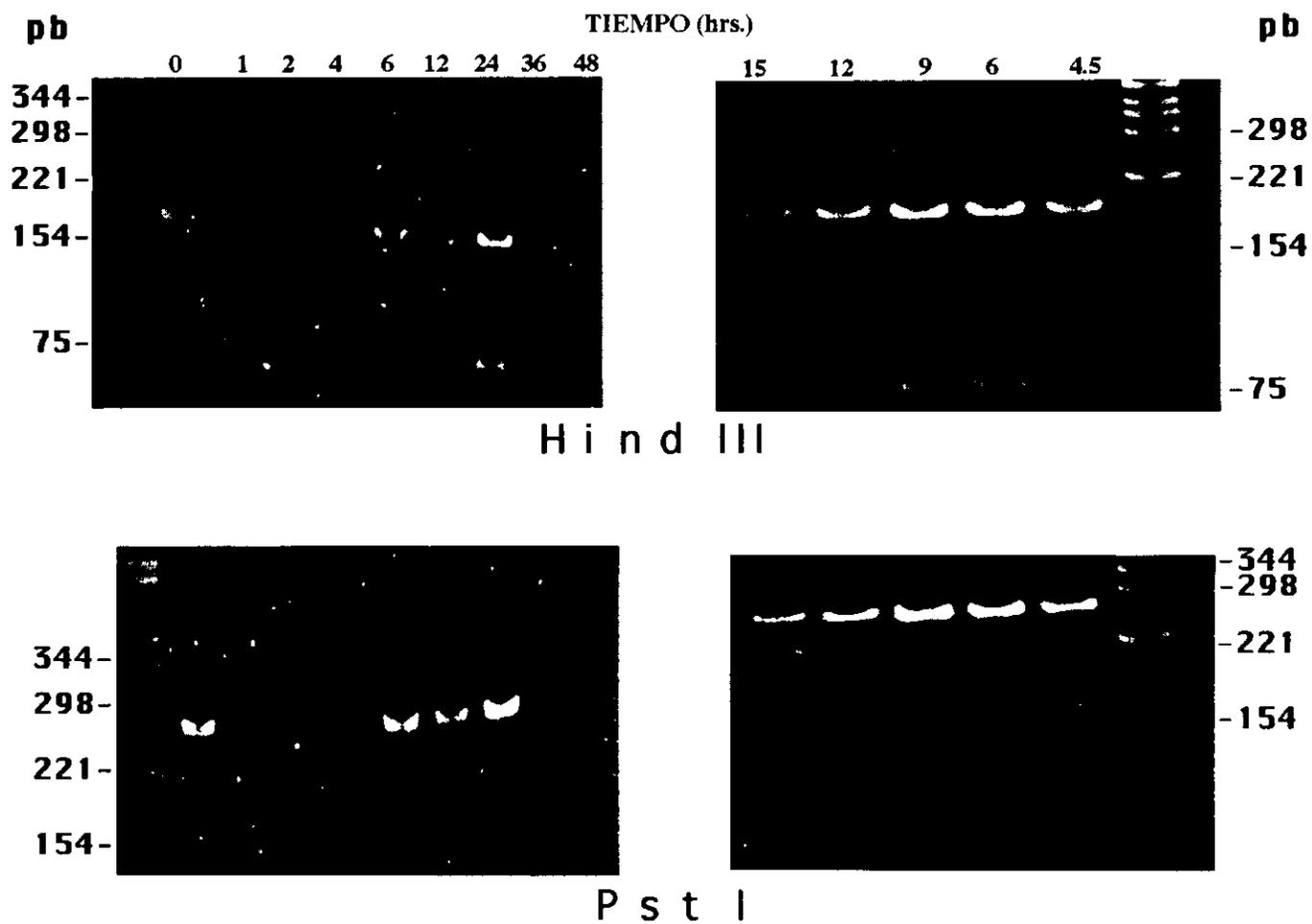


Figura 17. Digestión de los productos PuLOX4 con Hind III y Pst I en cada una de las cinéticas.

resultado de las digestiones. Para la cinética de herida, los productos del RT-PCR se cortaron únicamente con Hind III, por lo tanto corresponden a la expresión del gene PvLOX4. En la cinética de MEJA, los productos del RT-PCR son cortados con Hind III principalmente, sin embargo, se observa digestión con Pst I, en menor proporción que con Hind III. En este caso se observó la suma de la expresión del gen correspondiente a la clona PvLOX4 principalmente, y en menor proporción, PvLOX2.

DISCUSION

La actividad de LOX y la expresión de sus genes, se ha demostrado ampliamente en respuesta a la herida y a la aplicación de MEJA, y el frijol no es la excepción. En este trabajo, se muestra la activación de la expresión de dos genes de LOX llamados PvLOX2 y PvLOX4, en respuesta a la herida y en respuesta a la aplicación exógena de MEJA.

Nosotros empleamos el RT-PCR, para aislar genes que se expresan en una determinada condición, esto es, durante respuesta a la herida de las hojas y para analizar su expresión en el tiempo y en respuesta a un inductor de genes implicados en la respuesta a herida: el MEJA.

En lo tocante al aislamiento de genes relacionados a la herida, pudimos aislar solo dos genes: el PvLOX2, aislado de un banco de cDNA de frijol (Porta *et al.*) y la PvLOX4. La PvLOX4, tiene una identidad de 94.7% con una secuencia incompleta de un cDNA de frijol llamado pLOX3 (Meier *et al.*, 1993), al que le falta la región 5' y algunos nucleótidos de la región 3'.

En cuanto al análisis de la expresión de estos genes, la expresión de LOX durante el desarrollo y bajo condiciones de estrés, se reportó previamente en frijol (Porta *et al.*, 1999). Sin embargo en este estudio se empleó una sonda de PvLOX2 que puede estar funcionando como una sonda genérica que no distingue entre diferentes LOXes. En este trabajo, empleamos oligonucleótidos específicos para determinar la expresión de 3 genes de LOX: PvLOX2,

resultado de las digestiones. Para la cinética de herida, los productos del RT-PCR se cortaron únicamente con Hind III, por lo tanto corresponden a la expresión del gene PvLOX4. En la cinética de MEJA, los productos del RT-PCR son cortados con Hind III principalmente, sin embargo, se observa digestión con Pst I, en menor proporción que con Hind III. En este caso se observó la suma de la expresión del gen correspondiente a la clona PvLOX4 principalmente, y en menor proporción, PvLOX2.

DISCUSION

La actividad de LOX y la expresión de sus genes, se ha demostrado ampliamente en respuesta a la herida y a la aplicación de MEJA, y el frijol no es la excepción. En este trabajo, se muestra la activación de la expresión de dos genes de LOX llamados PvLOX2 y PvLOX4, en respuesta a la herida y en respuesta a la aplicación exógena de MEJA.

Nosotros empleamos el RT-PCR, para aislar genes que se expresan en una determinada condición, esto es, durante respuesta a la herida de las hojas y para analizar su expresión en el tiempo y en respuesta a un inductor de genes implicados en la respuesta a herida: el MEJA.

En lo tocante al aislamiento de genes relacionados a la herida, pudimos aislar solo dos genes: el PvLOX2, aislado de un banco de cDNA de frijol (Porta *et al.*) y la PvLOX4. La PvLOX4, tiene una identidad de 94.7% con una secuencia incompleta de un cDNA de frijol llamado pLOX3 (Meier *et al.*, 1993), al que le falta la región 5' y algunos nucleótidos de la región 3'.

En cuanto al análisis de la expresión de estos genes, la expresión de LOX durante el desarrollo y bajo condiciones de estrés, se reportó previamente en frijol (Porta *et al.*, 1999). Sin embargo en este estudio se empleó una sonda de PvLOX2 que puede estar funcionando como una sonda genérica que no distingue entre diferentes LOXes. En este trabajo, empleamos oligonucleótidos específicos para determinar la expresión de 3 genes de LOX: PvLOX2,

PvLOX4, que se aislaron de cDNA de herida, y PvLOX5 codificado en la clona genómica aislada en nuestro laboratorio, y de la cual no conocíamos su expresión. La expresión de estos tres genes de LOX se analizaron durante la herida y la inducción con MEJA.

Los resultados de la cinética de herida indican que la expresión de PvLOX2 se presente entre las 4 y las 48 h, mientras que la PvLOX4 tiene una expresión en un periodo de tiempo mas corto, yendo de las 6 a las 24 h, decayendo bruscamente, después de su máximo a las 24 h. Ambos genes presentan una expresión máxima a las 24 h. Este comportamiento es similar al que presentan la LOX7 y la LOX8 de hojas de soya heridas (Saravitz y Siedow, 1996), en donde incrementos en los niveles de transcrito de ambos genes, se detectan después de las 8 h de herir. LOX7, tiene una expresión transitoria y después de 24 h no se detecta, (similar a PvLOX4). En contraste, los niveles de LOX8 se mantuvieron desde las 8 a las 72 h. Este patrón de expresión se parece al de PvLOX2.

Con respecto a la inducción por MEJA, la expresión de PvLOX2 responde con un aumento importante a las 9 h. Los niveles de transcrito de PvLOX4, muestra un incremento paulatino alcanzando un máximo a las 9 h sin llegar a los niveles de PvLOX2 y ambas descienden al mismo nivel. De manera similar, tratamientos de plantas de soya con MEJA resulta en la elevación de los niveles de transcrito en hojas de LOX7 y de LOX8 (Saravitz y Siedow, 1996).

El incremento en los niveles de PvLOX2 y PvLOX4 después de la herida o de tratamientos con MEJA, sugiere su participación en la respuesta de defensa de la planta, ya que en general las LOXes que responden a estos dos estímulos se ha visto que inducen genes, cuya función parece ser el contrarrestar el estrés, aunque las proteínas codificadas por estos genes, también pueden participar en los procesos fisiológicos de plantas. No se detectó la expresión de PvLOX4, en hojas heridas, ni en la inducción con MEJA. Este gene se expresa escasamente en nódulos (H. Porta, comunicación personal).

Los genes PvLOX2 y PvLOX4, no contienen secuencia que codifique para un péptido de tránsito a cloroplasto. Sin embargo alguno de estos genes podría participar en la inducción de genes que codifican enzimas que biosintetizan los compuestos volátiles, que

poseen propiedades antimicrobianas (Croft *et al.*, 1993; Bate y Rothstein, 1998; Koch *et al.*, 1999). Otra alternativa, podría ser la que estuvieran funcionando como vsp inducibles por herida (Saravitz y Siedow, 1996). Una alternativa mas, puede ser su participación en la biosíntesis de JA que a su vez puede inducir genes del metabolismo secundario, enzimas que participan en la síntesis de fenilpropanoides y monómeros de cutina, cuya función sea la reparación del daño (Sembder y Parthier, 1993; Creelman y Mullet, 1995).

La expresión de PvLOX2, además de responder a herida y a la presencia de MEJA, se detecta durante el desarrollo del nódulo; en raíces de 3 a 21 días de desarrollo inoculadas con *Rhizobium etli*, y en no inoculadas; y en botón floral. No se detectó en semilla (datos nos mostrados). Esto hechos sugieren un papel central de PvLOX2 durante el desarrollo, la respuesta a la herida. En el caso de PvLOX4, se expresa también en raíces inoculadas y no inoculadas de 3 días de edad, en botón y muy escasamente, en semilla. No se observa su expresión en nódulo (H. Porta, comunicación personal). Hasta el momento no hay reportes de LOX en semilla de frijol.

Dado que se ha demostrado la participación de las LOXes cloroplásticas en la síntesis de JA en respuesta a la herida (Melan *et al.*, 1993), uno de los atractivos iniciales de este proyecto, era aislar a una LOX con función en cloroplasto. Como antecedente, sabemos que se observa la presencia de una banda de M_r de aproximadamente 100 kDa que es el peso molecular esperado para una LOX funcional en cloroplasto. Este resultado se obtuvo utilizando extracto de proteínas de cloroplastos puros de frijol y un anticuerpo antiLOX de soya. Sin embargo con los oligonucleótidos Pv5-Pv3 no pudimos aislar ningún gene con una secuencia de péptido de tránsito a cloroplasto (ya tenemos la región 5' de PvLOX4 y no es cloroplástica). Una estrategia para aislar estos genes puede ser diseñar oligonucleótidos sobre un alineamiento múltiple de LOXes cloroplásticas y usar la técnica de RT-PCR sobre RNA de hojas heridas, o bien, hacer un banco de cDNA en un vector de expresión de proteína y utilizar los anticuerpos antiLOX de soya como detector,

posteriormente se haría un análisis de restricción para detectar las cloroplásticas.

La técnica de RT-PCR, es una herramienta poderosa para aislar, y analizar genes con expresión baja. Además, es muy útil para analizar la expresión diferencial de familias génicas. Algunos ejemplos incluyen: el análisis de la expresión de 4 genes de ferritina de *Vigna unguiculata* en diferentes órganos de la planta (Wardrop *et al.*, 1999), y el análisis de la expresión de 4 genes de asociados a la germinación de semillas de chícharo. Con ese estudio, se definió a un miembro de la familia de LOX, como un nuevo marcador del crecimiento del eje de la semilla (Chateigner *et al.*, 1999). El uso del RT-PCR, nos permitió diferenciar la expresión de PvLOX2 y PvLOX4 lo que no es posible empleando sondas en análisis tipo northern, ya que son genéricas y no diferencian entre genes con secuencias con una alta identidad. Es mas, empleando la región 3' no traducida del gene de PvLOX2 en un southern genómico, se distinguen dos bandas. Por lo tanto, si empleáramos la región 3' no traducida como sonda, que teóricamente no esta conservada entre genes de la misma familia, podríamos estar reconociendo la expresión de mas de un gen. Así pues la técnica del RT-PCR nos brinda mas ventajas para diferenciar la actividad de los miembros de la familia génica de LOX, ya que se pueden diseñar oligonucleótidos específicos, y en caso de no serlo, se pueden digerir con enzimas de restricción que son exclusivas para cada gene de LOX.

BIBLIOGRAFIA

- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidmann, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (eds.)** Current protocols in molecular biology, Suppl. 20. Wiley, N.Y. 1992.
- Bate, N.J. and Rothstein, J.S.** 1998. C₆-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *The Plant J.* 16(5): 561-569.
- Beaudoin, N. and Rothstein, S.** 1997. Developmental regulation of two tomato lipoxygenase promoters in transgenic tobacco and tomato. *Plant Mol. Biol.* 1997. 33: 835-846.
- Bell, E.; Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 8675-8679.
- Bögre, L.; Ligterink, W.; Meskiene, I.; Barker, P.J.; Heberle-Bors, E.; Huskisson, N.S. and Hirt, H.** 1997. Wounding induced the rapid and transient activation of a specific MAP Kinase pathway. *Plant Cell* 9: 75-83.
- Bunker, T.W.; Koetje, D.S.; Stephenson, L.C.; Creelman, R.A.; Mullet, J.E. and Grimes, H.D.** 1995. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell.* 7: 1319-1331.
- Campos, F.; Solórzano, R.M.; Garcarrubio, A.; Colmenero-Flores, J.M. and Covarrubias, A.A.** 1997. A *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding a putative aquaporin. *Plant Physiol.* 115: 313.

- Chateigner, A.; Deunff, Y.L. and Jalouzot, R.** 1999. Germination-associated changes in the transcript content of pea seedling lipoxygenase-g: a new marker of axis growth resumption. *Planta*. 208: 606-613
- Conconi, A.; Miquel, M.; Browse, J.A. and Ryan, C.A.** 1996. Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111: 797-803.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 4114-4119.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** 1997. Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 335-381.
- Croft, K.P.C.; Jüttner; F. and Slusarenko, A.J.** 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *Plant Physiol.* 101: 13-24.
- Damman, C.; Rojo, E. and Sánchez-Serrano, J.J.** 1997. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *The Plant J.* 11(4): 773-782.
- Dixon, R.A. and Lamb, C.J.** 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 339-367.
- Eiben, H.G. and Slusarenko, A.J.** 1994. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. *The Plant J.* 5(1): 123-135.

- Farmer, E.E.** 1994. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganism. *Plant Mol. Biol.* 26: 1423-1437.
- Farmer, E.E. and Ryan, C.A.** 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 7713-7716.
- Farmer, E.E. and Ryan, C.A.** 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.* 4: 129-134.
- Feussner, I.; Hause, B.; Vörös, K.; Parthier, B. and Wasternack, C.** 1995. Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplast of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *The Plant J.* 7(6): 949-957.
- Foley, K.P. and Engel, J.D.** 1992. *Genes Dev.* 6: 730-744.
- Foley, K.P.; Leonard, M.W. and Engel, J.M.** 1993. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends in Genetics.* 9(11): 380-385.
- Funk, M.O.; Carroll, R.T.; Thompson, J.F.; Sands, R.H. and Dunham, W.R.** 1990. Role of iron in lipoxygenase catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 5375-5376.
- Glen, T.C. and Glen, S.J.** 1994. Rapid elutions of DNA from agarose gels using polyester plug spin inserts (PEPSIs). *Technical Tips. Trends in Genetics.* 10(10).
- Greenberg, J.T.** 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 525-545.

- Grimes, H.D.; Koetje, D.S. and Franceschi, V.R.** 1992. Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 100: 433-443.
- Grimes, H.D.; Tranbarger, T.J. and Franceschi, V.R.** 1993. Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxygenase in soybeans. *Plant Physiol.* 103: 457-466.
- Gus, P.L.; Macko, V.; Richardson, T. and Stahman, M.A.** 1968. Lipoxidase in early growth of wheat. *Plant Cell Physiol.* 9: 415-422.
- Harms, K.; Ramírez, I.; Peña-Cortés, H.** 1998. Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiol.* 118: 1057-1065
- Heitz, T.; Bergey, D.R. and Clarence, A.R.** 1997. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 114: 1085-1093.
- Hildebrand, D.F.; Hamilton-Kemp, T.R.; Legg, C.S. and Bookjans, G.** 1988. Plant Lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 7: 201-219.
- Kato, T.; Ohta, H.; Tanaka, K. and Shibata, D.** 1992. Appearance of new lipoxygenase in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. *Plant Physiol.* 98: 324-330.

- Koch, T.; Krumm, T.; Jung, V.; Engelberth, J. and Boland, W.** 1999. Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol.* 121: 153-162.
- Koiwa, H.; Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M.** 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science.* 2(10):379-384.
- Kubigsteling, I.; Laudert, D. and Weiler, E.W.** 1999. Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta.* 208: 463-471.
- Laudert, D. and Weiler E.W.** 1998. Allene Oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant J.* 15(5): 675-684.
- Lee, J.; Parthier, B. and Löbler, M.** 1996. Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta.* 199: 625-632.
- Loake, G.J.** 1996. Jasmonates: global regulators of plant gene expression. Chapter 13th. *Membranes: Specialized functions in plants.* Bios Scientific Publishers. Oxford, U.K.
- Logemann, J.; Schell, J. and Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163: 16-20.
- Macarrone, M.; Veldink, G.A.; Agró, A.F.; Vliegenthart, J.F.G.** 1995. Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit. *FEBS letters.* 371: 223-226.

- Matsui, K.; Kajiwara, T.K.; Hayashi, K. and Hatanaka, A.** 1988. Tissue specific heterogeneity of lipoxygenase in cucumber seedlings. *Agric. Biol. Chem.* 52: 3219-3221.
- McConn, M. and Browse, J.** 1996. The critical requirement for linoleic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell.* 8: 403-416.
- Meier, B.M.; Shaw, N. and Slusarenko, A.J.** 1993. Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. *MPMI.* 6(4): 453-466.
- Melan, M.A.; Dong, X.H.; Endara, M.E.; Davis, K.R.; Ausubel, F.M. and Peterman, T.K.** 1993. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 101: 441-450.
- McConn, M.; Creelman, R.A.; Bell, E.; Mullet, J.E. and Browse, J.** 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 5473-5477.
- Navari-Izzo, F.; Vangioni, N. and Quartacci, M.F.** 1990. Lipids of soybean and sunflower seedlings grown under drought conditions. *Phytochemistry.* 29(7): 2119-2123.
- Nishiuchi, T.; Hamada, T.; Kodama, H. and Iba, K.** 1997. Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid w-3 fatty acid desaturase gene (FAD7) through different signal transduction pathways. *The Plant Cell.* 9: 1701-1712.
- Oelse-Karrow, H.; Schopfer, P. and Mohr, H.** 1970. Phytochrome-mediated repression of enzyme synthesis (lipoxygenase: a threshold phenomenon). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 65: 51-57.

- Ohta, H.; Ida, S.; Mikami, B. and Morita, Y.** 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol.* 27: 911-918.
- Orozco-Cárdenas, M. and Ryan, C.A.** 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6553-6557.
- Parck, T.C. and Polacco, J.C.** 1989. Distinct lipoxygenase species appear in the hypocotyl/radicle of germinating soybean. *Plant Physiol.* 90: 285-290.
- Penninckx, I.A.M.A.; Thomma, B.P.H.J.; Buchala, A.; Métraux, J. and Broekaert, W.F.** 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 10: 2103-2113.
- Peña-Cortés, H.; Albretch, T.; Prat, S.; Weiler, E.W and Willmitzer L.** 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta.* 191: 123-128.
- Peña-Cortés, H; Fisahn, J. and Willmitzer, L.** 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:4106-4113.
- Peterman, T.K. and Siedow, J.N.** 1985. Immunological comparison of lipoxygenase-1 and -2 with soybean seedling lipoxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 476-483.

- Porta, H.; Rueda, P.; Campos, F.; Colmenero-Flores, J.M.; Colorado, J.M.; Carmona, M.J.; Covarrubias, A.A. and Rocha, M.** 1999. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 40(8): 850-858.
- Peever, T.L. and Higgins, V.J.** 1989. Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxydation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fuldum*. *Plant Physiol.* 90: 867-875.
- Rance, I; Fournier, J. and Esquerre-tugaye, M.T.** 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6554-6559.
- Reinbothe, S.; Reinbothe, C.; Heintzen, C.; Seidenbecher, C. and Parthier, B.** 1993. A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcl* transcript in barley. *EMBO J.* 12(4): 1505-1512.
- Royo, J.; Vancanney, G.; Pérez, A.G.; Sanz, C.; Störmann, K.; Rosahl, S. and Sánchez-Serrano, J.J.** 1996. Characterization of three potato lipoxygenase with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 271(35): 21012-21019.
- Rouster, J.; Leah, R.; Mundy, J. and Cameron-Mills, V.** 1997. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *The Plant J.* 11(3): 513-523.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Samuelsson, B.; Dahlen, S.E.; Lindgren, J.A.; Rouzer, C.A. and Serhan, C.N.** 1987. Leucotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science*. 237: 1171-1176.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
- Saravitz, D.M. and Siedow, J.N.** 1996. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. *Plant. Physiol.* 110: 287-299.
- Schaller, F. and Weiler, E.W.** 1997. Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *Eur. J. Biochem.* 245: 294-299.
- Schaller, A. and Oecking, C.** 1999. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *The Plant Cell*. 11: 263-272.
- Sembdner, G. and Parthier, B.** 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Mol.* 44: 569-89.
- Start, W.G.; Ma, Y.; Polacco, J.C.; Hildebrand, D.F.; Freyer, G.A. and Mitchell, A.** 1986. *Plant Mol. Biol.* 7: 11-23.
- Siedow, J.N.** 1991. Plant Lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 145-188.

- Seo, S.; Sano, H. and Ohashi, Y.** 1999. Jasmonate-based wounding signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*. 11: 289-298.
- Schaller, F.; Henning, P. and Weiler, E.W.** 1998. 12-Oxophytodienate-10,11-reductase: occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid. *Plant Physiol*. 118: 1345-1351.
- Titarenko, E.; Rojo, E.; León, J. and Sánchez-Serrano, J.J.** 1997. Jasmonic acid-dependent and independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 115: 817-826.
- Vijayan, P.; Shockey, J.; Lévesque, C.A.; Cook, R.J. and Browse, J.** 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 7209-7214.
- Vick, B.A.** 1993. Oxygenated fatty acid of the lipoxygenase pathway in "Lipid Metabolism in Plants". Moore, T.S., ed. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 167-191.
- Vick, B.A. and Zimmerman, D.C.** 1984. Biosynthesis of jasmonic acid in plants. *Plant Physiol*. 75: 458-461.
- Vick, B.A.; Feng, P. and Zimmerman, D.C.** 1980. *Lipids*. 15: 468-471.
- Vörös, K.; Feussner, I.; Kühn, H.; Lee, J.; Graner, A.; Löbner, M.; Parthier, B. and Wasternack, C.** 1998. Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) *Eur. J. Biochem.* 251: 36-44.
- Wasternack C. and Parthier B.** 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science*. 2(8): 302-307.

Wasternack, C.; Ortel, B.; Miersch, O.; Kramell, R.; Beale, M.; Greulich, F.; Feussner, I.; Hause, B.; Krumm, T.; Boland, W. and Parthier, B. 1998. Diversity in octadecanoid-induced gene expression of tomato. *J. Plant Physiol.* 152: 345-352.

Weber, H.; Vick, B.A. and Farmer, E.A. 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10473-10478.