

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Estudio de la inducción de la síntesis de
betacianinas en hojas de betabel (*Beta vulgaris*)
por la herida y la infiltración con bacterias”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

GABRIELA SEPULVEDA JIMENEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO ROCHA SOSA

México, D.

Octubre del 2004



COORDINACIÓN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

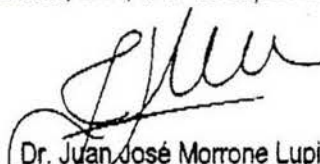
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de septiembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna GABRIELA SEPÚLVEDA JIMÉNEZ con número de cuenta 80178419 y número de expediente 75584, con la tesis titulada: "ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE BETACIANINAS EN HOJAS DE BETABEL (*Beta vulgaris*) POR LA HERIDA Y LA INFILTRACIÓN CON BACTERIAS.", bajo la dirección del Dr. Mario Rocha Sosa.

Presidente:	Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Vocal:	Dra. Gladys Cassab López
Vocal:	Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia
Vocal:	Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
Secretario:	Dr. Mario Rocha Sosa
Suplente:	Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz
Suplente:	Dr. Víctor Manuel Valdés López

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de septiembre del 2004.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Gabriela Sepúlveda Jiménez
FECHA: 18 - octubre - 2004
FIRMA: [Firma]

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Mario Rocha Sosa.

RECONOCIMIENTOS.

- ✓ A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo económico recibido a través de los proyectos de Tesis Doctoral (PAEP 201328 y 201329).
- ✓ A la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA) y al Comité Técnico de Prestaciones a Becarios (COTEPABE) del Instituto Politécnico Nacional por la beca otorgada durante la realización del trabajo.
- ✓ Al Dr. Mario Rocha Sosa, quien dirigió esta propuesta y con el que compartí enriquecedoras discusiones, que nos llevaron a alcanzar nuestras metas.
- ✓ A los miembros del comité tutorial:
 - Dra. Gladys Iliana Cassab López
 - Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz
 - Dr. Mario Rocha Sosa,que con sus críticas y comentarios no solo enriquecieron el trabajo, sino también mi persona.
- ✓ A la Dra. Helena Porta, que con sus puntos de vista también fortaleció este trabajo.
- ✓ A las Biólogas: Lorena López y Magali Zacarias del IBT por todo su apoyo técnico en el análisis por microscopia.
- ✓ A la Biol. Patricia Rueda Benítez por todo su apoyo técnico en la obtención del ARN y en los tratamientos que se hicieron a las plantas.
Gracias por tu amistad.
- ✓ Al Dr. Mario Rodríguez Monroy del CEPROBI-IPN, por toda su colaboración en el manejo de los cultivos de células.
- ✓ A todos mis compañeros del laboratorio del Dr. Mario Rocha/Dra. Patricia León por todos los momentos que compartimos.
- ✓ A mis compañeros (docentes y no docentes) del CEPROBI-IPN, que de una forma u otra me brindaron su apoyo.

DEDICATORIAS

*Este logro es el producto de la constancia de la
familia Rodríguez Sepúlveda:*

Mario, el compañero de mi vida

y

*nuestros hijos: Mario César y Martha Eloisa Rodríguez Sepúlveda,
que son lo más importante y valioso de nuestras vidas.*

*Con cariño a mi hermano Heleodoro y a mi cuñada Silvia, quienes me
brindaron su casa, apoyo y cariño en el inicio de este proyecto tan
importante de mi vida.*

Con cariño y orgullo:

A la Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

CONTENIDO	Página
NOMENCLATURA	1
1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUCCION.	8
4. ANTECEDENTES.	
4.1. La respuesta de defensa de las plantas a la herida y al ataque de microorganismos	9
4.2. Generalidades de las betacianinas.	15
<i>Distribución.</i>	15
<i>Estructura y características químicas</i>	17
<i>Biosíntesis.</i>	21
<i>El cultivo de células vegetales como un modelo de estudio de la síntesis de betacianinas.</i>	23
<i>Función biológica.</i>	27
<i>Actividad antioxidante</i>	27
5. OBJETIVOS	30
6. RESULTADOS	31
6.1. Betacyanin synthesis in red beet (<i>Beta vulgaris</i>) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst.	33
6.2. An UDP-glucosyltransferase of red beet (<i>Beta vulgaris</i>) is induced by wounding and bacterial infiltration.	44
6.3. Efecto del metil jasmonato en cultivos verdes de <i>B. vulgaris</i> en suspensión	68
6.4. Análisis de la expresión diferencial de los ADNc obtenidos de los callos verdes y rojos de betabel.	71
7. DISCUSION GENERAL	
7.1 Las betacianinas: ¿Cuál es su posible participación en la defensa de las plantas de betabel sometidas a la herida ó a la infiltración con bacterias?	85
7.2 ¿Las especies reactivas de oxígeno y el metil jasmonato son parte del mecanismo para inducir la síntesis de betacianinas?	87
7.3 El fragmento de un gen de una glucosiltransferasa codifica para una enzima probablemente involucrada en la síntesis de betacianinas.	89
7.4 El ADNc de la clona 18 que se expresa diferencialmente en callos rojos y verdes de betabel codifica para una proteína rica en glicina.	90

8. CONCLUSIONES	93
9. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS	94
10. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA	96
ANEXOS	
1. La participación de los metabolitos secundarios en la respuesta de defensa de las plantas	104
2. Crecimiento de bacterias " <i>in planta</i> " y en cultivos líquidos con y sin betanina.	113
3. Purificación y obtención de la curva patrón de betanina.	117

NOMENCLATURA

En este estudio, hay siglas de las abreviaturas que se mantuvieron en el idioma inglés o español de acuerdo a la frecuencia con la que se usan en el vocabulario científico. En el caso de los términos que se conservaron en el idioma inglés, éstos se muestran en el texto entre comillas y en letra cursiva.

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
d.i	diámetro interno
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
dGTP	Trifosfato de desoxiguanocina
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
dNTP	Trifosfato de desoxinucleosido
Dopa	L-3,4-Dihidroxifenilalanina
EDTA	Acido etilendiamino tetra acético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GT	Glucosiltransferasa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HR	Respuesta hipersensible
nm	nanómetro
oligodC	Oligo-desoxicitidina
PF	Peso fresco
poliG	Polímero de guanidina
PR	Proteínas relacionadas a la patogénesis

PRG	Proteína rica en glicina
RACE	Amplificación rápida de extremos de ADNc
RNasa	Ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Solución salina de citrato de sodio
Taq DNA pol	Polimerasa de ácido desoxirribonucleico obtenida de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
UDP	Difosfato de uridina

1. RESUMEN

Las betacianinas son metabolitos secundarios que dan una coloración rojo-violeta a flores y frutos de plantas del orden Caryophyllales. En el betabel (*Beta vulgaris* L.), la betanina es la principal betacianina que se acumula en la raíz de almacenamiento y en el tejido vascular. Sin embargo, las condiciones adversas tanto abióticas como bióticas que inducen la síntesis de betacianinas en las hojas, así como la participación de éstos metabolitos secundarios en la respuesta de defensa, son aspectos que no se han analizado. Por lo anterior, se probó si la herida ó la infiltración con dos bacterias (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* y *Agrobacterium tumefaciens*) son condiciones que inducen la síntesis de betacianinas en hojas de betabel. Mientras que, para estudiar los efectos de éstas condiciones se decidió aislar genes que codifican para las enzimas de la ruta de síntesis a través de dos estrategias. En la primera, se usaron callos verdes y rojos (productores de betacianinas) de *B. vulgaris*, originados por la técnica de cultivo de células vegetales, para obtener a través de "differential display" los patrones de los ADNc de los ARNm expresados diferencialmente en ambos tejidos. En tanto, que con la segunda estrategia, por medio de PCR y del uso de oligonucleótidos degenerados, se aisló el fragmento de una glucosiltransferasa de *B. vulgaris*.

Los resultados de este trabajo documentaron por primera vez que la herida ó la infiltración con bacterias son condiciones que inducen la síntesis de betacianinas en hojas de betabel. La infiltración con bacterias indujo la acumulación de los pigmentos en la epidermis y ésta es precedida por una producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Así mismo, la infiltración con un sistema que genera H₂O₂

(glucosa/glucosa oxidasa) también indujo la acumulación de los pigmentos. Mientras que, el tratamiento con cloruro de difenileno-yoduro (DPI), un inhibidor de la NADPH oxidasa, enzima implicada en la generación de ERO en respuesta a distintos tipos de estrés, redujo la acumulación de betacianinas en las hojas infiltradas con *A. tumefaciens*. Estos resultados sugirieron que las ERO participa como una señal para inducir la acumulación de betacianinas y que la NADPH oxidasa es una de las enzimas relacionadas en la producción de las ERO. En cultivos verdes de células en suspensión de *B. vulgaris*, el metil jasmonato indujo la acumulación de betacianinas, indicando que esta hormona vegetal quizás también participa en la inducción de la síntesis de los pigmentos.

Un ADNc que codifica para una proteína rica en glicina (BvPRG) fue aislado de los callos de betabel y aunque se encontró una mayor expresión en los callos rojos que en los verdes, la acumulación del ARNm en los distintos tejidos sugiere que esta proteína no está relacionada con la síntesis de betacianinas. Por el contrario, la expresión del fragmento del gen de la glucosiltransferasa de betabel (*BvGT*) obtenido de plantas de *B. vulgaris*, se indujo bajo las mismas condiciones en las que se acumularon las betacianinas: la herida, la infiltración con bacterias y un sistema que genera H₂O₂. Así mismo, el tratamiento con DPI bloqueó la expresión del gen *BvGT* y la expresión transitoria de una construcción en antisentido del mismo gen, llevó a la reducción de la acumulación tanto de betanina como del ARNm del gen que se indujo por la infiltración con *A. tumefaciens*. Todos estos resultados sugirieron que el gen *BvGT* codifica para una enzima involucrada en la glucosilación de las betacianinas de betabel y que las ERO son una señal que se requiere para la

inducción tanto de la expresión del gen *BvGT* como de la acumulación de betacianinas.

Las evaluaciones del crecimiento de las bacterias cultivadas en medios líquidos con betanina, indicaron que la betanina no afectó el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, como se conoce que las betacianinas tienen actividad antioxidante, se propone que estos metabolitos secundarios reaccionan con las ERO que se producen tanto por la herida como por la infiltración de bacterias, contribuyendo a mantener el estado redox celular.

2. ABSTRACT

Betacyanins are secondary metabolites that give a red-violet coloration to flowers and fruits of plants of the order Caryophyllales. Red beet (*Beta vulgaris*) accumulates betacyanins, betanin principally, in root storage and vascular tissue. However, abiotic and biotic stress conditions inducing the betacyanin synthesis in leaves and their participation in the defense response have not been analyzed. In this study, the accumulation of the compound was analyzed in wounded or bacteria-infiltrated leaves (with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* or *Agrobacterium tumefaciens*). To analyze the effect of these treatments, the isolation of genes encoding enzymes involved in betacyanin synthesis was attempted using two strategies. The first one made use of green callus and red callus (producing betacyanins) obtained for the technique of plant cell culture. A differential display was developed to obtain the cDNA profile of differentially expressed genes in the two tissues. Whereas, as a second strategy, a glucosyltransferase gene of red beet was isolate using degenerated oligonucleotides and PCR.

In this study, it is reported for first time that wounding or bacterial infiltration were conditions that induce the synthesis of betacyanins in red beet leaves. Bacterial infiltration induced pigment accumulation in the epidermis which is preceded by the production of reactive oxygen species (ROS). Furthermore, the infiltration with a system generating H₂O₂ (glucose/glucose oxidase) induced pigment accumulation; whereas, the inhibition with diphenylene iodonium chloride (DPI) of NADPH oxidase, an enzyme that generate ROS, reduced the betacyanins production in *A. tumefaciens*-infiltrated leaves. These results suggest that ROS are a signal inducing

betacyanins accumulation and that ROS are produced by the activity of a NADPH oxidase. Because in green suspension cultures, methyl jasmonate induced betacyanins accumulation, this phytohormone may participate too in the pigment synthesis.

A cDNA encoding a glycine rich protein (BvGRP) was isolated of red beet callus and a major expression in red callus than in green callus was found. However, the expression profile in different tissues suggests that BvGRP does not is relate with the betacyanin biosynthesis. In contrast, the glucosyltransferase gene fragment (*BvGT*) obtained of red beet plant was expressed in the same conditions inducing betacyanin accumulation: wounding, bacterial infiltration, and a system generating ROS. Besides, the treatment with DPI also reduced the *BvGT* gene expression and the transient expression of a *BvGT* antisense construct lead to the reduction of betanin and *BvGT* transcript accumulation. These results suggest a role of BvGT in betacyanin glucosylation and that ROS act as a signal to induce *BvGT* gene expression and betacyanin accumulation.

To determine the function of betacyanins which is accumulated after bacterial infiltration, the bacterial growth was evaluated in bacteria cultures grown in liquid media with betanin. It was found that betanin does not have antimicrobial activity. However, due to its antioxidant property, it is proposed that betacyanins act as scavengers of the ROS produced by wounding or bacterial infiltration, contributing to the maintenance of the cellular redox-state.

3. INTRODUCCION

Las betacianinas son cromoalcaloides, derivados de tirosina que dan color a frutos y flores, por lo que durante la polinización probablemente participan como atrayentes de insectos. Estos pigmentos también se acumulan en órganos vegetativos tales como la raíz, el tallo y en el tejido vascular de hojas de betabel (*Beta vulgaris*). Escasos estudios señalan que plantas de betabel que acumulan betacianinas son más resistentes al hongo *Pythium debaryanum* causante de la enfermedad conocida como "damping off" si se les compara con las plantas que no acumulan el pigmento (Mabry, 1980). Sin embargo, no se conocen los mecanismos por los que las betacianinas participan en la defensa del betabel, así como las condiciones de estrés tanto abióticas como bióticas que pudieran inducir su acumulación en los tejidos vegetativos. Por lo cual, en este estudio se evaluó si la herida ó la infiltración con bacterias de hojas de plantas de *B. vulgaris* son factores que inducen la acumulación de betacianinas. Así mismo, para evaluar el efecto de éstos factores, se propuso aislar genes que codifican para las enzimas de la vía de la síntesis de los pigmentos.

Al respecto, recientemente un gen que codifica para una 4,5-dioxigenasa involucrada en la síntesis de betacianinas fue aislado de flores de *Portulaca grandiflora* (Laurent y col, 2004). Mientras que en cultivos en suspensión de *Dorotheanthus bellidiformis*, un ADNc que codifica para la betanidina 5-O glucosiltransferasa se clonó y fue expresado en *E. coli*. La proteína recombinante mostró una mayor especificidad por la betanidina como sustrato, similar a la enzima nativa extraída de los cultivos en suspensión (Vogt y col, 1999a). Sin embargo, son

necesarios los estudios que conlleven al aislamiento y la caracterización de otras de las enzimas de la ruta de la biosíntesis y de los genes que las codifican.

Por otra parte, en estudios previos hechos por Ontiveros, (1994) se obtuvieron callos verdes y rojos (productores de betacianinas) de betabel. Estas diferencias de color encontradas entre los callos, sugirieron una relación del color de los callos con la expresión diferencial de genes que pudieran codificar para proteínas de la biosíntesis de las betalaínas, de las regulatorias, o bien, de las proteínas involucradas con los mecanismos de transporte para su almacenamiento en compartimentos celulares tales como las vacuolas. Por lo cual, con el objeto de aislar los genes de las enzimas de la biosíntesis de betacianinas en plantas y para usarlos como un marcador molecular de las condiciones que inducen las síntesis de betacianinas, en este estudio como una primer estrategia, se utilizaron los callos rojos y verdes para obtener a través de la técnica de "differential display", los patrones de ADNc de los ARNm que se expresan diferente entre los dos callos. Así mismo, como una segunda estrategia, a través de PCR y usando oligonucleótidos específicos, se propuso aislar el gen de una glucosiltransferasa de las plantas de betabel, que pudiera estar relacionada con la síntesis de los pigmentos.

4. ANTECEDENTES

4.1 La respuesta de defensa de las plantas a la herida y al ataque de microorganismos.

El ataque por patógenos y la herida producida tanto por la depredación por insectos como por el daño mecánico inducido por factores físicos, son condiciones

traducidas en una respuesta de defensa de la planta que involucra la activación transcripcional de diversos genes relacionados con la defensa. La herida puede ser una condición extrema de estrés y provocar la muerte de toda la planta. El daño por la mordedura de un insecto u otro daño mecánico es una forma de remover capas protectoras que normalmente cubren a la planta completa y a su vez, proveer un sitio de entrada para patógenos. Ante esta condición de estrés, las plantas responden induciendo genes de proteínas para la cicatrización de la herida y la prevención de la invasión de patógenos. Estos genes codifican para proteínas involucradas: a) en el reforzamiento de la pared celular, como es la formación de callosa, lignina y las proteínas ricas en hidroxiprolina, b) en la producción de inhibidores de proteasas y de enzimas líticas tales como las quitinasas y glucanasas y c) en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, como es el caso de las fitoalexinas. Por otra parte, se conoce que la expresión de estos genes es modulada por diversas sustancias tales como el etileno, el ácido abscísico y el ácido jasmónico (Peña-Cortés y Willmitzer, 1995).

La respuesta de defensa ante el ataque de patógenos está coordinada tanto espacial como temporalmente para una contención rápida del patógeno, por lo que puede ser local o en sitios lejanos al daño, conocida como la respuesta sistémica. La local esta asociada a una respuesta hipersensible (HR) caracterizada por una muerte rápida de las primeras células infectadas y la restricción de la expansión del patógeno al resto de la planta (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Entre los eventos tempranos que desencadenan la HR esta: a) la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidróxilo (OH^{\cdot}) y el peróxido (H_2O_2), b) la apertura de canales iónicos y c) la inducción de eventos de

fosforilación y desfosforilación de proteínas. Posteriormente, se da un aumento de los niveles de ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno, la acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), un aumento de la producción de metabolitos secundarios con actividad de fitoalexinas o de antioxidantes y el fortalecimiento de la pared celular, que conducen al establecimiento de la respuesta local (Sepúlveda y col, 2003; **anexo 1**). Por su parte, entre los eventos de la respuesta sistémica está la producción de glucanasas, quitinasas, peroxidasas y de otras PR (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

El mecanismo de defensa de las plantas involucra un conjunto de vías de transducción de las señales que llevan a la respuesta local y sistémica. La expresión de los genes de defensa es regulada por moléculas tales como el ácido salicílico, el etileno, las ERO, así como del ácido jasmónico y de su éster de metilo, el metil jasmonato, llamados colectivamente jasmonatos (Reymond y Farmer, 1998). En particular, los jasmonatos son compuestos claves para la expresión de los genes de la respuesta de defensa de las plantas sometidas a condiciones de estrés abiótico o biótico como es la herida o el ataque por patógenos (Creelman y Mullet, 1995). Estos compuestos son sintetizados a partir de ácido linolénico y en las plantas activan a los genes que codifican para los inhibidores de proteasas que interactúan con proteínas del tracto digestivo de herbívoros, afectando la proteólisis del tejido vegetal ingerido y así, retardando el crecimiento y el desarrollo del herbívoro (Reinbothe y col, 1994; Creelman y Mullet, 1997). El ácido jasmónico modula la expresión de las proteínas de la pared celular como son las proteínas ricas en prolina, así como la expresión de los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios tales como la acetil CoA carboxilasa, la chalcona sintasa, la fenilalanina amonio liasa

(PAL), la hidroximetil-glutaril-CoA reductasa y las polifenoles oxidadas, entre otras (Figura 1; García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000; Wasternack y Parthier, 1997).

Por otra parte, la producción de las ERO es también un componente central en la adaptación de las plantas al estrés abiótico y biótico. Estas condiciones no solamente incluyen la herida y el ataque de patógenos, sino también la desecación, la salinidad, la radiación UV, el choque por calor o frío, la carencia de nutrientes y la exposición a metales pesados y a ozono. Bajo tales condiciones, las ERO pueden tener dos funciones, en la primera puede aumentar el daño producido por el estrés y en la segunda, pueden actuar como una señal para la activación de las respuestas de defensa. Las ERO son producidas por diversas vías en la célula vegetal, entre las más comunes está la fotosíntesis y la respiración. Otros orígenes de las ERO son la fotorespiración en peroxisomas por la enzima glicolato oxidasa, por las NADPH oxidadas de la membrana plasmática, amino oxidadas y las peroxidasas de pared celular (Dat y col, 2000).

En el establecimiento de la resistencia de las plantas a una enfermedad, las ERO son un componente integral de la respuesta de defensa local y sistémica (Figura 2). En la respuesta hipersensible, las ERO pueden limitar la expansión del patógeno causando la muerte celular de la célula vegetal huésped y/o matando directamente al patógeno. Esta muerte celular puede resultar de procesos de oxidación tales como la peroxidación de lípidos de membranas, la oxidación de proteínas, la inhibición de enzimas y daños al ADN y al ARN. El entrecruzamiento oxidativo con componentes de la pared celular vegetal como son las proteínas ricas en prolina y los polisacáridos, es un mecanismo que puede reducir el ingreso del patógeno y/ o atraparlo en la célula huésped destinada a morir (Lamb y Dixon, 1997).

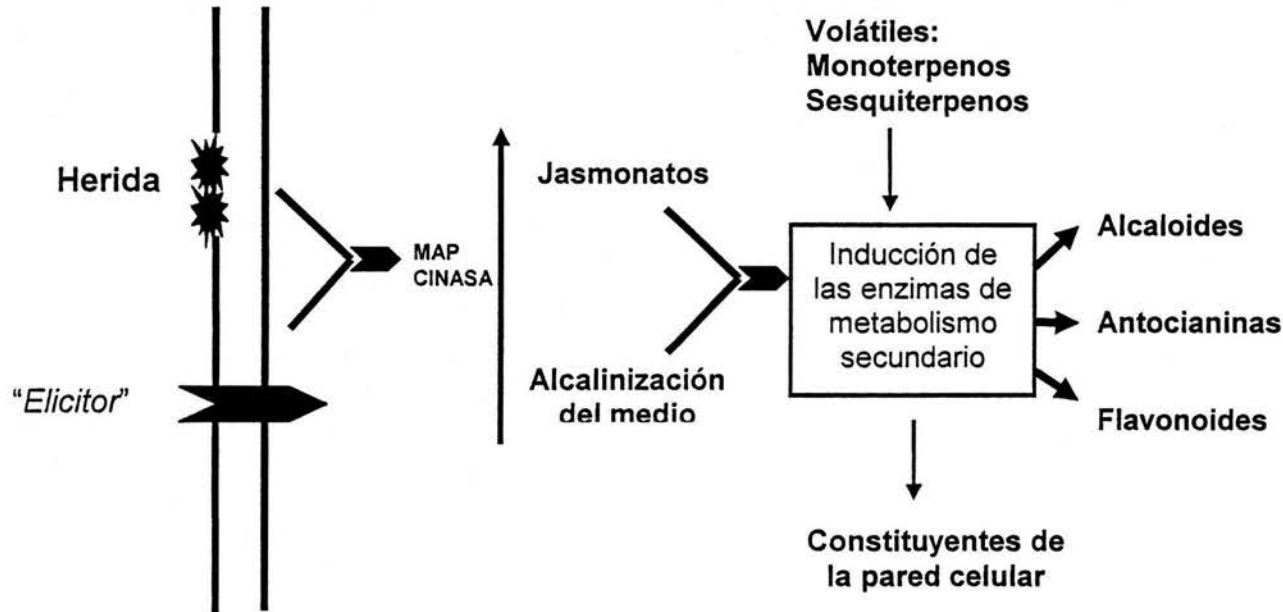


Figura 1. Los jasmonatos inducen la síntesis de metabolitos secundarios. La herida o el tratamiento con un "elicitador" llevan a una alcalinización del medio y a un aumento de ácido jasmónico que induce la expresión de genes que codifican para enzimas del metabolismo secundario. Los compuestos volátiles funcionan en las interacciones planta-insecto. Los alcaloides y fitoalexinas son compuestos antimicrobianos, mientras que flavonoides y antocianinas quizás protegen a la planta contra un estrés oxidativo. El entrecruzamiento de compuestos con constituyentes de la pared celular induce un reforzamiento que contribuye a las reacciones de defensa (Wasternack y Parthier, 1997).

En su función como molécula señal, las ERO pueden inducir la expresión de genes de enzimas antioxidantes que intervienen en regular sus niveles excesivos y tóxicos tales como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa. La inducción de la expresión de genes de enzimas para la síntesis de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante como es el ácido ascórbico, α -tocoferol, los carotenoides y flavonoides. En particular, la inducción de la expresión del gen de la

enzima PAL conduce a la síntesis del ácido salicílico, que a su vez regula la expresión de genes de las proteínas PR. El ácido salicílico quizás también inhiba la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes y refuerce la producción del superóxido generado por NADP oxidaxas (Grant y Loake, 2000; Mittler, 2002).

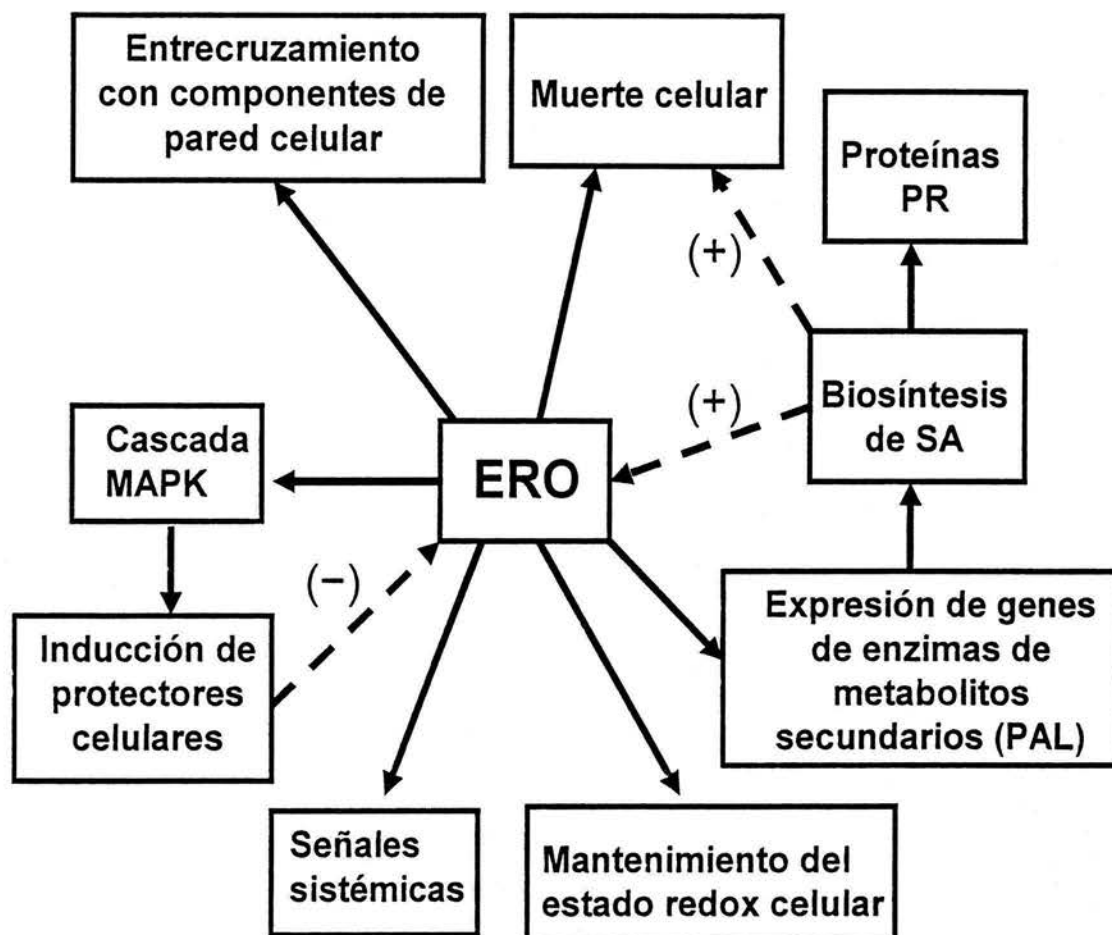


Figura 2. Integración funcional de las respuestas de defensa inducidas por las ERO. PAL es la fenilalanina amonio liasa, SA es el ácido salicílico. En líneas discontinuas se señalan algunos de los eventos que aumentan (+) o reducen (-) el efecto de los niveles excesivos de las ERO (Adaptado de Grant y Loake, 2000).

4.2 Generalidades de las betacianinas.

Distribución.

Las betacianinas son pigmentos (rojo-violeta) que junto con las betaxantinas (amarillas) forman parte de un grupo de metabolitos secundarios conocidos como betalainas y que se encuentran almacenadas en las vacuolas. Estos compuestos se derivan de tirosina, son clasificados como alcaloides y se acumulan tanto en tejidos reproductivos como en tejidos vegetativos de plantas de las familias agrupadas dentro del orden Caryophyllales. Se conoce que nueve de las once familias que forman parte de este orden, sintetizan betalainas (Cuadro 1). Mientras que las dos familias restantes: la Caryophyllaceae y la Molluginaceae, acumulan antocianinas en lugar de betalainas. De hecho, antocianinas y betalainas no se han encontrado en una misma planta, aunque, su distribución tanto en tejidos reproductivos como en vegetativos es similar. Esta exclusividad mutua entre betalainas y antocianinas tiene tanto relevancia quimiotaxonómica como evolutiva. Se propone dividir al orden Caryophyllales en dos líneas filogenéticas: la Chenopodineae, productoras de betalainas y la Caryophyllineae, productoras de antocianinas (Strack y col, 1993).

Cuadro 1. Distribución de las betalaínas en plantas de las familias del orden Caryophyllales. Las betalaínas caracterizadas para cada especie son las reportadas por Steglich y Strack (1990).

Familias	Ejemplos	Betalaínas
Aizoaceae	<i>Mesembryanthemum edule</i> L.	Betanina, betanidina
Amaranthaceae	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	Amarantina
	<i>Celosia argentea</i> var. <i>cristata</i> (L.) Kuntze	Amarantina y miraxantina V
Cactaceae	<i>Phyllocactus hybridus</i> Hort.	Filocactina, indicaxantina, miraxantina II, vulgaxantina I y II
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i> L.	Betanina, neobetanina, prebetanina, miraxantina II, vulgaxantina I y II
	<i>Chenopodium rubrum</i> L.	Betanina, amarantina, celosiana I y II, vulgaxantina I y II
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy.	Bouganvilleina
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i> L.	Betanina, prebetanina
Portulacaceae	<i>Portulaca grandiflora</i> Hook.	Betanina, betanidina, gomfrenina V, neobetanina, indicaxantina, miraxantina II, humilixantina

Estructura y características químicas

Desde el punto de vista de su estructura química, las betacianinas están formadas por una unidad básica o aglicona conocida como betanidina, que es un compuesto resultante de la conjugación de una molécula de ácido betalámico con una molécula de ciclo-dopa (Figura 3). El residuo 5-OH de la ciclo-dopa es el que con más frecuencia es glucosilado, aunque 6-O-glucósidos también son detectados en las estructuras de las betacianinas. A su vez, estos glucósidos pueden ser esterificados con ácido cumárico, ferúlico, malónico o sulfúrico dando lugar a las betacianinas aciladas (Cuadro 2). Así es como se pueden encontrar en las plantas, betacianinas de estructuras sencillas como es el caso de la betanina, que es un 5-O-mononucleósido de betanidina, hasta estructuras muy complejas que son oligonucleósidos poliacetilados como son las betacianinas de las brácteas de *Bougainvillea glabra* (Strack y col, 1993). La fuente más importante de obtención de betacianinas es la raíz de almacenamiento del betabel (*Beta vulgaris* subs. *vulgaris*), donde la betanina es la betacianina que se encuentra en mayor abundancia (0.5 g betanina/kg de raíz; Strack y col, 2003). Otras betacianinas como la prebetanina y la neobetanina que confieren una coloración violeta y naranja respectivamente, también se reportan formando parte de la raíz de almacenamiento del betabel (Figura 4). Sin embargo, mientras que betanina puede constituir hasta un 98% de un extracto de la raíz, la prebetanina y la neobetanina son constituyentes menores (Steglich y Strack, 1990).

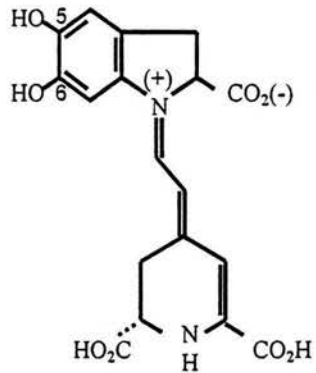


Figura 3. La betanidina es la unidad estructural básica de las betacianinas. Los grupos 5-OH y 6-OH del anillo de ciclo dopa son glucósilados y esterificados.

Por su solubilidad en agua y su estabilidad a pH entre 3 y 7, las betacianinas son pigmentos que podrían ser utilizados en productos alimenticios, farmacéuticos y en cosméticos. Esto es de particular interés, por los problemas de toxicidad que se les atribuye a los colorantes de tipo sintético (Francis, 1994). Las betacianinas presentan un máximo de absorción a los 540 nm y las betaxantinas lo presentan a 480 nm. Por lo cual, los dos tipos de pigmentos son cuantificados por métodos espectrofotométricos (Strack y col, 1993).

Cuadro 2. Azúcares y grupos acilos encontrados en los diferentes grupos de betacianinas. Glc es glucosa y GlcU es ácido glucurónico (Strack y col, 1993).

Betacianinas	Azúcar unido	Acido unido
Grupo Betanina	5-O-Glc	
Betanina	5-O-Glc	
Neobetanina	5-O-Glc	
Filocactina	5-O-Glc	Malónico (Glc-6-O)
Prebetanina	5-O-Glc	Sulfúrico (Glc-6-O)
Lamprantina I	5-O-Glc	p-cumárico (Glc-6-O)
Lamprantina II	5-O-Glc	Ferúlico (Glc-6-O)
Grupo Amarantina		
Amarantina	5-O-Glc-2-O-GlcU	
Celosianina I	5-O-Glc-2-O-GlcU	p-cumárico(GlcU-2-O)
Celosianina II	5-O-Glc-2-O-GlcU	Ferúlico (GlcU-2-O)
Grupo Bouganvilleina		
Bouganvilleina	5-O-Glc-2-O-Glc	
Grupo Gomfrenina		
Gomfrenina I	6-O-Glc	
Gomfrenina II	6-O-Glc	p-cumárico (Glc-6-O)
Gomfrenina III	6-O-Glc	Ferúlico (Glc-6-O)

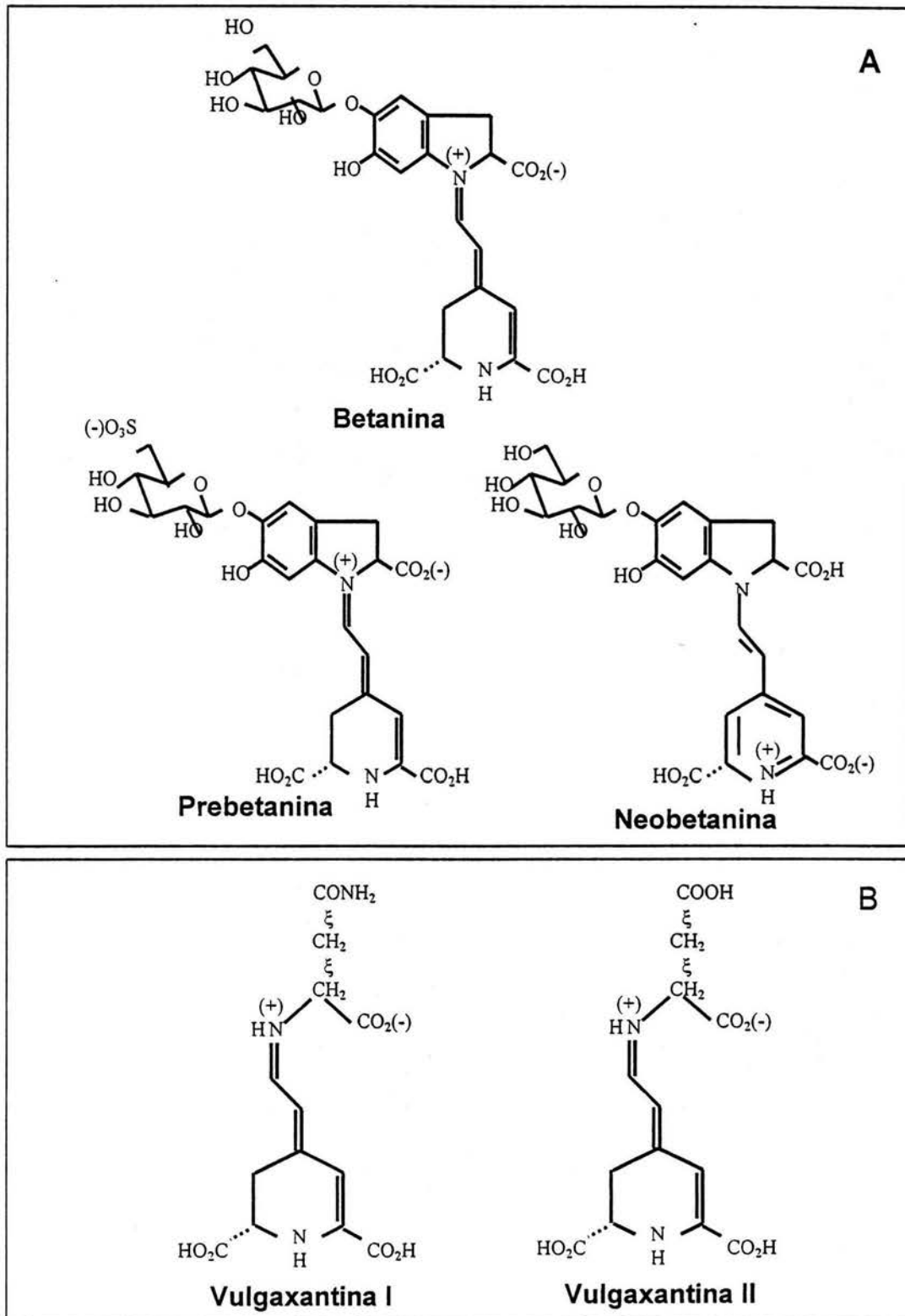


Figura 4. Estructura de las betacianinas (A) y las betaxantinas (B) de la raíz de almacenamiento de betabel.

Biosíntesis.

La vía propuesta de la biosíntesis de betacianinas es mostrada en la figura 5. Las reacciones iniciales de esta ruta se dedujeron de experimentos de alimentación con tirosina y con dopa marcadas isotópicamente, los que sugirieron que la dopa es la molécula precursora del ácido betalámico y de ciclo-dopa, que forman la estructura básica de las betacianinas (Steglich y Strack, 1990). Las tirosinasas son enzimas del tipo de las polifenoloxidasas que catalizan la hidroxilación de fenoles a *o*-difenoles (EC 1.14.18.1; monofenol: monooxigenasa) y su oxidación posterior a *o*-quinonas (EC 1.10.3.1; *o*-difenol: oxígeno oxidoreductasa). Al respecto, una tirosinasa involucrada en la biosíntesis de betacianinas de plantas se caracterizó de cultivos de callos de *Portulaca grandiflora*. La enzima tanto hidroxila (1) a la tirosina para formar dopa, como también oxida (2) a la dopa para dar lugar a la dopaquinona, la cual, es ciclizada en una reacción espontánea (3) dando lugar a la formación de ciclo-dopa (Steiner y col, 1999). Se identificó también a una tirosinasa del pileo del hongo *Amanita muscaria* que cataliza las primeras reacciones de la síntesis de las betacianinas del hongo. Sin embargo, mientras la tirosinasa purificada de *P. grandiflora* es específica para la hidroxilación de tirosina, la enzima purificada del hongo no lo es y puede aceptar otros sustratos (Muller y col, 1996; Steiner y col, 1999).

Por su parte, las reacciones enzimáticas que conducen al rompimiento del anillo extradiol de la dopa para la síntesis del ácido betalámico son catalizadas por dioxigenasas (4). Los productos de estas enzimas: 4,5- y 2,3-seco-dopa son reciclizados en una reacción espontánea (5) para dar lugar a la formación del ácido betalámico. En plantas, recientemente se aisló un gen que codifica para una 4,5-

dioxigenasa involucrada en la síntesis de los pigmentos de flores de *P. grandiflora* (Laurent y col, 2004), mientras que en hongos, la enzima se purificó de *A. muscaria* y el gen fue clonado y expresado en *E. coli*. La proteína recombinante cataliza la formación de los dos productos esperados a partir de dopa: 4,5- y 2,3-seco dopa (Hinz y col, 1997; Mueller y col, 1997).

La siguiente reacción de la vía que involucra la condensación del ácido betalámico con la ciclo-dopa (6) para dar la formación de betanidina, es una reacción que ocurre en forma espontánea (Schliemann y col, 1999).

Para la unión de la glucosa en la etapa final de la síntesis de betanina, se sugieren dos mecanismos. Uno de ellos considera que la glucosilación de ciclo-dopa (7) ocurre como una reacción previa a su condensación (8) con el ácido betalámico, mientras que el otro mecanismo sugiere que la glucosilación (9) es a nivel de la betanidina. La reacción de la formación de betanina a partir de la glucosilación de ciclo-dopa previa a su unión al ácido betalámico fue una propuesta que surgió por experimentos de alimentación con glucósido de ciclo-dopa marcado radioactivamente y por el hecho de que se detectó glucósido de ciclo-dopa en plántulas de betabel (Wyler y col, 1984). Así mismo, recientemente Sasaki y col (2004) en *Mirabilis jalapa* L. y en otras especies de plantas que acumulan betacianinas, detectaron la actividad de UDP-glucosa:ciclo-dopa 5-O-glucosiltransferasa.

En relación con el segundo mecanismo que se propone y que involucra la glucosilación de la betanidina (9), en cultivos de células en suspensión de *Dorotheanthus bellidiformis* se purificó una glucosiltransferasa (5-GT) que cataliza la transferencia de glucosa desde la UDP-glucosa al grupo 5-hidróxilo de la betanidina. No obstante, la enzima además de catalizar la transferencia de glucosa a la

betanidina, también transfiere el azúcar al grupo C-4 hidróxilo de los flavonoides: quercetina o luteolina. Por lo cual, se especula que esta enzima muestra una regioespecificidad para glucosilar sustratos que contengan grupos dihidróxilos vecinales como los que se presentan en el anillo de la ciclo-dopa de la betanidina o en los anillos beta de los flavonoides: quercetina y luteolina (Heuer y col, 1996). Un ADNc que codifica para ésta 5-GT fue obtenido de una biblioteca de ADNc de cultivos en suspensión de *D. bellidiformis*. La proteína recombinante mostró una especificidad por sustratos similar a la que previamente se encontró con la enzima purificada del mismo sistema. Sin embargo, esta glucosilación a nivel de betanidina solamente fue demostrada para *D. bellidiformis* y no para otras plantas (Vogt y col, 1999a).

El cultivo de células vegetales como un modelo de estudio de la síntesis de betacianinas.

Debido a que las betacianinas son metabolitos secundarios encontrados en un grupo específico de plantas y de que hay interés de producirlas para ser usadas como colorantes naturales, se propone usar la técnica de cultivo de células vegetales (CCV) como una alternativa biotecnológica de su producción. Esta técnica muestra ventajas con respecto a los métodos tradicionales de la producción de metabolitos secundarios producidos a partir de plantas cultivadas en el campo, entre las que se pueden mencionar, el mayor control de las condiciones climáticas adversas y de los problemas de plagas (Alferman y Paterson, 1995). Por estas cualidades, se reportan en la literatura estudios para la producción de betalaínas por CCV de diferentes especies (Böhm y Rink, 1986).

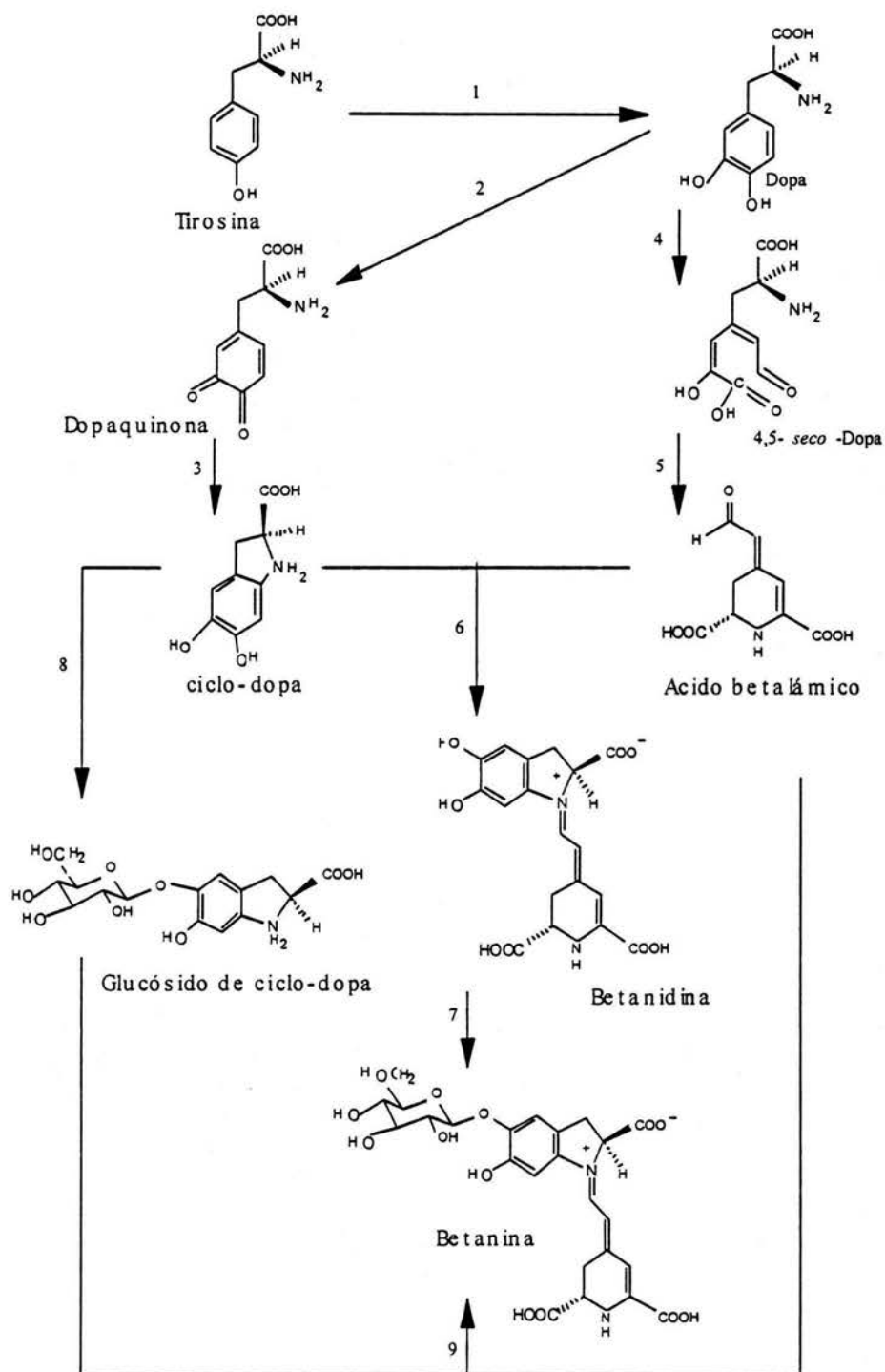


Figura 5. Vía probable de la biosíntesis de betacianinas en plantas. Las reacciones 1,2 son catalizadas por tirosinasas, la 4 por una dopa dioxigenasa y la 7 por una betanidina-5 glucosiltransferasa. Las reacciones 3,5 y 6 suceden en forma espontánea. La glucosiltransferasa de ciclo dopa (8) no esta caracterizada (Adaptado de Strack y col, 2003).

Para el caso particular del CCV de *B. vulgaris* se aislaron y caracterizaron callos con diferentes contenidos de betalaínas. Para esto, las semillas de betabel se germinaron bajo condiciones asépticas y los hipocótilos se usaron para inducir un callo multicolorido. Los fragmentos de diferente color del callo fueron aislados manualmente y resembrados en un medio de cultivo definido. La selección manual y las resiembras consecutivas de los grupos de células de diferente color condujeron al establecimiento de líneas celulares de callos de betabel de color rojo, naranja, amarillo y verde. En particular, los callos rojos produjeron principalmente betacianinas, los naranja acumularon tanto betacianinas como betaxantinas, los amarillos sintetizaron principalmente betaxantinas y los callos verdes no acumularon betalaínas. La expresión diferencial tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo entre los callos de diferente coloración sugiere que este material biológico puede ser usado como un sistema modelo para conocer los mecanismos que podrían alterar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de betacianinas (Figura 6; Ontiveros, 1994).

Así mismo, una variedad extensa de factores físicos y químicos inducen cambios la síntesis de betacianinas de los callos rojos de *B. vulgaris*. En general, se encontró que la luz y la auxina 2,4 ácido diclorofenoxiacético estimulan la acumulación de los pigmentos, que el ácido abscísico, el ácido giberélico y las citocininas pueden inhibir la síntesis, el nitrógeno podría estimularla y dependiendo de la fuente de carbono se puede estimular o inhibir su síntesis. Otros componentes como el cobre y la fuente de fosfatos también estimulan la acumulación de las betacianinas (Leathers y col, 1992; Rodríguez y col, 1994; Trejo-Tapia y col, 1999; Akita y col, 2000).

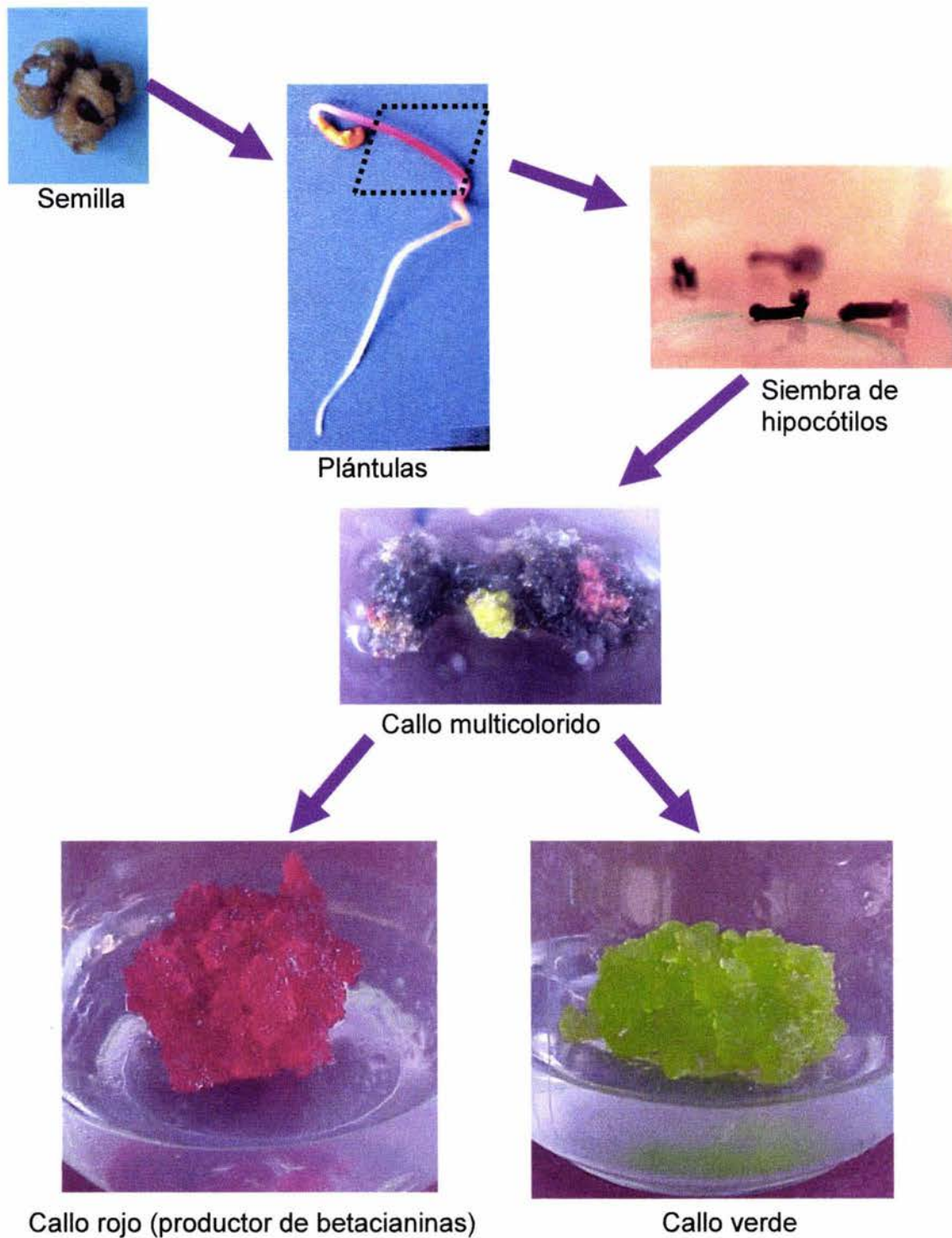


Figura 6. Obtención de callos de betabel (*Beta vulgaris*) productores de betacianinas por la técnica de cultivo de células vegetales (Ontiveros, 1994).

Función biológica.

Las betacianinas son pigmentos que se acumulan en las flores, en los frutos y en las semillas de las plantas (Steglich y Strack, 1990). Por analogía a otros metabolitos secundarios tales como las antocianinas y los carotenoides, es probable que la presencia de las betacianinas en estos tejidos reproductivos esté relacionada con eventos de polinización y de dispersión. En tallos, hojas y pecíolos también se acumulan betacianinas, sin embargo, no se conoce cual es la función biológica de éstos pigmentos en dichos tejidos vegetativos (Stafford, 1994). Se propone que las betacianinas podrían tener importancia en la resistencia a hongos. Al respecto, se encontró que plantas de betabel con betanina tienen una mayor resistencia al ataque por el hongo *Pythium debaryanum* (que causa la enfermedad conocida como "damping off") que las plantas no pigmentadas. Así mismo, un 50% del crecimiento del hongo se redujo en la presencia de 50 ppm de betanina (Mabry, 1980). Las betacianinas tal vez funcionen como filtros protectores de la luz UV, en forma similar a las antocianinas (Stafford, 1994; Chalker-Scott, 1999). En *Mesembryanthemum crystallinum* L (Aizoaceae) conocida como la planta del hielo, el tratamiento con intensidades altas de luz blanca induce la acumulación de betacianinas y flavonoides en la epidermis de las hojas (Vogt y col, 1999b).

Actividad antioxidante

La oxidación de moléculas biológicas por oxígeno activo o por radicales libres es de los eventos primarios que ocurren durante el desarrollo de diversas enfermedades de importancia para el hombre, tales como el cáncer. En este contexto, la actividad antioxidante de las betacianinas fue demostrada en ensayos *in*

vitro y utilizando sistemas de origen animal. La capacidad antirradical de las betacianinas de *B. vulgaris* fue evaluada por primera vez por Escribano y col (1998) quienes sugieren que dicha actividad puede ser explicada por la facilidad relativa con que un electrón desapareado de un oxígeno puede ser estabilizado a través del anillo aromático. Así mismo, la mayor capacidad antirradical fue observada a valores de pH neutro y básicos que a valores ácidos de pH.

Los extractos acuosos de raíz de betabel son capaces de reducir la viabilidad de células de hematomas e inducir la actividad de la enzima quinona reductasa, la cual, está involucrada en la conversión a compuestos inactivos de carcinógenos electrofílicos que son inducidos en la etapa inicial del cáncer (Wettasinghe y col, 2002). La betanina y la betanidina de *B. vulgaris* inhiben la oxidación de lípidos causada por la actividad de lipoxigenasas y de mioglobina, la oxidación de microsomas de músculo de pavo y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de células sanguíneas de humano (Kanner y col, 2001). Así mismo, los extractos metanólicos de betalaínas de *Opuntia ficus-indica* inhibieron la oxidación de lípidos de las membranas de glóbulos rojos y de las LDL del plasma humano (Butera y col., 2002).

En general, la actividad antioxidante de las betacianinas es mayor a la de otros compuestos antioxidantes conocidos, tales como el ácido ascórbico, la catequina, la rutina y el α -tocoferol (Kanner y col, 2001; Cai y col, 2003). No obstante, en plantas no se conoce cual es la función y el mecanismo químico por el cual las betacianinas actúan como antioxidantes. Como las betacianinas interactúan con el cobre, se propone que su efecto protector está dado por una oxidación de las LDL mediada por cobre (Butera y col., 2002). Otra posibilidad involucra la actividad de

peroxidasas ya que se ha demostrado que tanto betanina como betanidina son sustratos de estas enzimas extraídas de raíces de almacenamiento de *B. vulgaris*. El producto de la oxidación de la betanidina es una quinona de betanidina mientras que, los de la oxidación de betanina son el ácido betalámico y polímeros oxidados de glucósidos de ciclo dopa (Martínez-Parra y Muñoz, 2001).

La actividad de las betacianinas para remover los radicales libres, depende de su estructura química. Su actividad aumenta con el número de grupos hidróxilo y se reduce con una mayor glucosilación de la aglicona. La posición de la glucosilación también es importante, betacianinas, tales como la betanina cuya glucosilación es el grupo OH del C-5 tuvieron mejor actividad antioxidante que las betacianinas glucosiladas en el OH del C-6 de la aglicona (Cai y col, 2003).

5. OBJETIVOS

General

Analizar la participación de las betacianinas en la respuesta de defensa de betabel (*Beta vulgaris* L).

Particulares

1. Determinar si la herida o la infiltración con bacterias son condiciones que inducen la síntesis de betacianinas en hojas de betabel (*Beta vulgaris* L).
2. Aislar un gen de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de betacianinas, usando dos estrategias de estudio: a) obteniendo los patrones diferenciales de expresión de los ADNc de los ARNm entre los callos rojos y verdes de betabel y b) a través de PCR y oligonucleótidos específicos para glucosiltransferasas.
3. Evaluar la acumulación de betacianinas y la expresión del gen de la vía de su síntesis bajo condiciones de herida ó de infiltración con bacterias.
4. Conocer el papel que tiene la generación de las especies reactivas de oxígeno y el ácido jasmónico en la inducción de la síntesis de betacianinas.

5. RESULTADOS

Los resultados de este estudio son presentados en **cuatro apartados**. En el **apartado 6.1**, en el artículo en prensa de la revista *Physiological and Molecular Plant Pathology*, se incorporan los resultados del efecto de la herida, de la infiltración con bacterias ó de un sistema que genera H_2O_2 en la inducción de la síntesis de betacianinas. También se analiza la posible participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en la inducción de la síntesis de los pigmentos y se presenta la propuesta que como parte de los mecanismos de defensa de las plantas de betabel, las betacianinas funcionan removiendo el exceso de las ERO. Como un complemento a éstos resultados, en el **anexo 2** se muestran las figuras y los resultados de las evaluaciones del crecimiento de las bacterias *in planta* y en medios líquidos con y sin betanina, que aunque son descritas y discutidas en el artículo, no son mostrados dentro del mismo.

En el **apartado 6.2**, se incluyen en un segundo artículo (aceptado en la revista *Journal of Experimental Botany*) , los resultados que se obtuvieron del aislamiento de un fragmento de un gen de una UDP-glucosiltransferasa de *B. vulgaris* (*BvGT*) y de su expresión bajo las mismas condiciones que inducen la síntesis de betacianinas y que se describieron en el artículo del apartado 6.1: la herida, la infiltración con bacterias ó con un sistema que genera H_2O_2 . También se presenta, la evaluación del efecto de una construcción en antisentido del gen *BvGT* y de un inhibidor de NADPH oxidasas en la acumulación de los transcritos del gen de hojas infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens*. Como un complemento a la metodología presentada en

este artículo, en el **anexo 3** se presenta el método que se uso para purificar y obtener la curva patrón de betanina referida en el artículo.

Por otra parte, siguiendo con el objetivo de conocer los eventos involucrados en la inducción de la síntesis de betacianinas, en el **apartado 6.3** se presenta la metodología y los resultados de las evaluaciones del efecto del metil jasmonato en la inducción de la síntesis de betacianinas, en cultivos de células verdes de betabel (*B. vulgaris*) en suspensión.

Finalmente en el **apartado 6.4**, se muestra la metodología y los resultados del análisis de la expresión diferencial de los ADNc que se obtuvieron de los callos rojos y verdes, los cuales condujeron al aislamiento de una secuencia que codifica para una proteína rica en glicina de *B. vulgaris*.

6.1 Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst.

Gabriela Sepúlveda-Jiménez, Patricia Rueda-Benítez, Helena Porta, and Mario Rocha-Sosa. Artículo en prensa en la revista *Physiological and Molecular Plant Pathology*



ELSEVIER

Physiological and Molecular Plant Pathology xx (xxxx) 1–10

PMPP

www.elsevier.com/locate/pmpp

Original articles

Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst

Gabriela Sepúlveda-Jiménez^{a,b}, Patricia Rueda-Benítez^a, Helena Porta^a, Mario Rocha-Sosa^{a,*}

^aInstituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62250 Morelos, Mexico

^bCentro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN, P.O. Box No. 24, Yautepec 62731 Morelos, Mexico

Accepted 11 August 2004

Abstract

Red beet (*Beta vulgaris*) accumulates betacyanins, mainly betanin, in the store root. We report here that in leaves, the synthesis of betacyanins is induced by wounding or infiltration with an avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* or *Agrobacterium tumefaciens*. A red-violet pigmentation characteristic of betacyanin bordered the damaged tissue in wounded leaves. *P. syringae* infiltration induced a hypersensitive response (HR) and betacyanins accumulated in the epidermis of the region surrounding the dry tissue. In contrast, *A. tumefaciens* infiltration did not induce the HR. The tissue maintained a turgid appearance and betacyanins accumulated in the epidermis were uniformly distributed in the infiltrated area. It was also found that infiltration with *A. tumefaciens* elicited extracellular production of reactive oxygen species (ROS) prior to the accumulation of betacyanins. Infiltration with an H₂O₂-generating system (glucose/glucose oxidase) also induced betacyanin synthesis, whereas, the infiltration with diphenylene iodonium chloride (DPI), an NADPH oxidase inhibitor, reduced the *A. tumefaciens*-induced betacyanin accumulation. We suggest that ROS are signals inducing the betacyanin synthesis, and that betacyanins may act as ROS scavengers, limiting damage caused by wounding and bacterial infiltration.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Betacyanin; *Beta vulgaris*; Wounding; ROS; *Agrobacterium tumefaciens*; *Pseudomonas syringae*

1. Introduction

Betacyanins (red-violet pigments), together with betaxanthins (yellow pigments), are a group of chromoalkaloids known as betalains. These pigments are synthesized from tyrosine and constitute a class of secondary metabolites found in species of the order Caryophyllales, with the exception of the families Caryophyllaceae and Molluginaceae, whose members accumulate anthocyanins. Example of a betacyanin-producing plant is the red beet (*Beta vulgaris*), in which the main betacyanin, betanin (Fig. 1), is found in high concentration in the store root (0.5 g betanin kg⁻¹) [39].

Although anthocyanins and betacyanins are not found together in the same plant, their distribution patterns are

similar, suggesting a functional analogy between both groups of pigments. Both are found, for example, in flowers and fruits where they could function as pollinator attractants [38]. As shown for anthocyanins, betacyanins may also function as protective UV-filters [5,38]. The treatment of the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* with high intensity UV-A light resulted in a rapid accumulation of betanin within bladder cells of the leaf epidermis [40]. It has also been proposed that betacyanins play a role in fungal resistance. Betanin-containing beet seedlings have a higher degree of resistance to the plant pathogenic fungus *Pythium debaryum* than non-pigmented seedlings [26]. At 50 ppm, betanin reduced the growth of this causal agent of damping off by 50% [26]; however, studies are required to shed light on the mechanism of betacyanin induction as a defense response in plants.

When a plant detects an abiotic or a biotic stress, a set of inducible defense responses is deployed. Reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂),

* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 1652; fax: +52 777 317 2388.

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

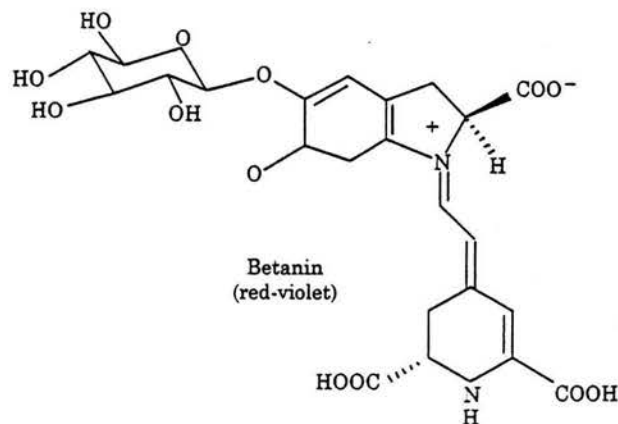


Fig. 1. Chemical structure of betanin, the main betacyanin of *B. vulgaris*.

superoxide (O_2^-), hydroxyl radicals (OH^\cdot), and singlet oxygen (1O_2) act as early messengers in signaling cascades activated by diverse external stimulus, such as pathogen attack, heat shock, mechanical stress or UV radiation [9]. Under normal growth conditions, the production of ROS in cells is low (e.g. $240 \text{ mM s}^{-1} O_2^-$), but in stress conditions, the production of ROS increases (e.g. to $720 \text{ mM s}^{-1} O_2^-$) [33].

In plant–pathogen interactions, ROS may exacerbate tissue damage or signal the activation of defense responses [9]. ROS can result in cell wall strengthening and direct microbial growth inhibition [12,18] or induce expression of genes encoding pathogenesis-related proteins (PR) or ROS-detoxifying enzymes [9,41]. Among the ROS-scavenging pathways, the production of antioxidants such as ascorbic acid and glutathione are essential to maintain physiological levels of ROS [29]. Secondary metabolites such as terpenoids and phenolic compounds, whose antioxidant properties have been evaluated in vitro, may also participate in the modulation of ROS levels [14,29]. ROS are generated early during the hypersensitive response (HR), following the establishment of an incompatible or a non-host plant–pathogen interaction. HR is a form of programmed cell death at the infection site that restricts pathogen growth and spread in the plant [18].

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* is an avirulent pathogen of non-host plants including *Arabidopsis* and bean, where it induces the HR [20,25]. However, this pathovar has not been reported as a virulent or avirulent pathogen of red beet. On the other hand, the infiltration with *Agrobacterium* does not elicit HR in dicotyledons, but in several species difficult to transform, including monocotyledons, this bacterium induces cell necrosis typical of HR as well as a high production of H_2O_2 [17,30]. Red beet has been successfully transformed using *Agrobacterium tumefaciens* [37], but nothing has been described about the biochemical or genetic responses of this plant to the inoculation with the bacteria. Recently, studies in *Ageratum conyzoides* cell cultures with high levels of transformation

showed that *Agrobacterium* alters the expression of plant defense-related genes commonly triggered by abiotic stress factors and by non-pathogenic bacteria. These genes encode a PR protein, a glucosyltransferase involved in biosynthesis of phenylpropanoids, and peroxidases [10].

UV-B also stimulates PR protein accumulation through the production of ROS [15]. It has been proposed that ROS not only function as destructive radicals but also as signaling molecules during UV-B responses [41]. Transcripts for plant defensive genes [8,15], as well as a number of enzymes and compounds implicated in the antioxidant responses including anthocyanins, are increased by UV-B treatment [4]. Purified anthocyanin extracts show strong antioxidant properties in vitro, and they can also scavenge reactive oxygen in living cells [4]. Therefore, the mechanism by which anthocyanins confer UV protection may involve UV absorption or scavenging of ROS, or both [4]. According to the proposed functional similarities for anthocyanins and betalains [38], it is tempting to speculate that betalains could have the same role as anthocyanins in response to external stimuli. In this context, the antioxidant activity of betacyanins, which was evaluated in animal systems in vitro, might be of relevance. For example, Kanner et al. [22] found that betanin and betanidin from *B. vulgaris* inhibited the lipid peroxidation caused by the metmyoglobin or lipoxygenase activity, the peroxidation of microsomes from turkey muscle tissue, and the oxidation of low-density lipoproteins (LDL) from human blood. Furthermore, methanolic extracts of betalains from *Opuntia ficus-indica* inhibited the red blood cell membrane lipid oxidation, as well as the oxidation of LDL from human plasma [3]. Nevertheless, the antioxidant activity of betacyanins has not been demonstrated in vivo.

We found in this study that mechanical wounding, infiltration with *P. syringae* or *A. tumefaciens*, or exposures to an H_2O_2 -generating system (glucose/glucose oxidase) are conditions that induce betacyanin synthesis in red beet leaves. Additionally, infiltration of *A. tumefaciens* induced the accumulation of ROS prior to the accumulation of betacyanin. The inhibition of the ROS-generating enzyme, NADPH oxidase, reduced the *A. tumefaciens*-induced betacyanin accumulation. These results suggest that the ROS production is an event that precedes and activates betacyanin synthesis. Moreover, we suggest that betacyanins function as ROS scavengers as part of the plant's defense response in red beet leaves.

2. Materials and methods

2.1. Plant samples and bacterial cultures

Seeds of red beet (*B. vulgaris* var. 'Crosby Egyptian') were germinated between wet paper sheets at 25°C in the dark and transferred to pots with sterile substrate. The seedlings were grown in a greenhouse at 25°C under natural

daylight conditions and the first two true leaves of 6-week-old plants were used for the experiments described.

Bacterial cultures were grown for approximately 18 h at 28 °C in an orbital shaker at 300 rpm. *P. syringae* pv. *tabaci* (provided by Dr Luis Herrera-Estrella, CINVESTAV, Mexico) was cultivated in King's B liquid medium [23], and *A. tumefaciens* strain C58C1Rif/pGV2260 [19] was grown in Luria B liquid medium supplemented with 50 µg ml⁻¹ rifampicin. Cultures were centrifuged, the bacterial pellet was resuspended in 10 mM MgSO₄ solution, and the inocula were adjusted to 1.0 × 10⁷ cfu ml⁻¹. Approximately 100 µl of each bacterial suspension was applied in each infiltration site.

2.2. Wounding treatment or leaf infiltration with bacteria

Treatments of wounding or infiltration with bacteria were done on the adaxial side of attached leaves. Mechanical wounding was done with sand paper. For the infiltration with bacteria, a 1.0 ml syringe without needle was used. Wounded and infiltrated areas were identified immediately after treatment, delineating the limits of wounding or liquid spread with a felt-tip marker. At 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h after treatment, 0.5 cm-discs were cut from delineated areas and used for the betacyanin quantification. As a control, leaves were infiltrated with 10 mM MgSO₄ solution. In the *A. tumefaciens* infiltration area, discs were also cut and utilized for ROS determination.

2.3. Infiltration with glucose/glucose oxidase or DPI

The H₂O₂-generating system, glucose/glucose oxidase (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO) was prepared fresh and used immediately in accordance with Pellinen et al. [31]. Three glucose oxidase concentrations (20, 50, and 100 U ml⁻¹) were added to 10 mM glucose dissolved in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5). Additionally, glucose alone dissolved in the same phosphate buffer was infiltrated as a control. Five or 10 µM of the NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium chloride, DPI (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO) was co-infiltrated with the *A. tumefaciens* suspension as described by Grant et al. [13]. Controls were carried out infiltrating DPI alone. *A. tumefaciens* growth was not affected by DPI in liquid cultures (data not shown). Each solution was infiltrated with a syringe on the adaxial side of the attached leaf and the limit of liquid spread was delineated. After 48 h of treatment, leaf discs were cut and used for the determination of betacyanins.

2.4. Quantification of betacyanins

Five discs of wounded or infiltrated leaves were frozen in liquid nitrogen, homogenized with a ground-glass tube and pestle, and with 1.0 ml 80% aqueous methanol as extracting solution. After centrifugation at 15,000g for 10 min at

25 °C, supernatants were collected and their absorbance was measured at 536 nm. The concentration was estimated using the molar extinction coefficient for betanin of 65 × 10⁶ cm² mol⁻¹ [36].

2.5. Measurement of ROS

Determination of extracellular levels of released ROS was performed as described by Chong et al. [7] and Schopfer et al. [35], using the reduced, dihydro derivative of 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). The procedure consists of deacetylating DCFH-DA with esterase before adding it to the plant material to be analyzed. The ROS dependent oxidation of deacetylated DCFH to dichlorofluorescein (DCF), a fluorescent compound, reveals the ROS extracellular level. In the reaction of DCFH oxidation, O₂⁻, H₂O₂, and OH[•] can be involved [35]. After 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h of infiltration with *A. tumefaciens* or with MgSO₄ solution as a control, 20 discs of leaves were cut and incubated in 12 ml of 100 µM deacetylated DCFH in potassium phosphate buffer at 25 °C on a shaker plate in the dark. Every 5 min, 2-ml aliquots of the incubation solution were removed and the increase in fluorescence (excitation: 488 nm, emission: 525 nm) was measured using a luminescence spectrophotometer (LS-50, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). The points in the linear phase of the reaction were used to obtain slopes of curves, and the results were expressed as change in DCF fluorescence per minute. Blanks without leaf discs were run in parallel and utilized to subtract values of spontaneous changes in fluorescence. Calibration curves and controls with H₂O₂ and horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO) were performed as described by Schopfer et al. [35]

2.6. Microscopic analysis

Tissue pieces of 5.0 mm² were excised from non-treated leaves and infiltrated leaves with MgSO₄ solution or with *A. tumefaciens* or *P. syringae*. Tissue samples were fixed for freezing and sectioned immediately using a cryostat (OTF, Bright Instrument Company Ltd, Huntingdon, Cambridge, England). Sections of 20 µm were examined using a light microscope.

3. Results

3.1. Wounding or infiltration with *P. syringae* pv. *tabaci* or *A. tumefaciens* induces betacyanin synthesis in red beet leaves

To analyze the effect of wounding and bacterial infiltration on betacyanin synthesis, the adaxial side of red beet leaves from 6-week-old plants was mechanically wounded or infiltrated with bacteria. A red-violet

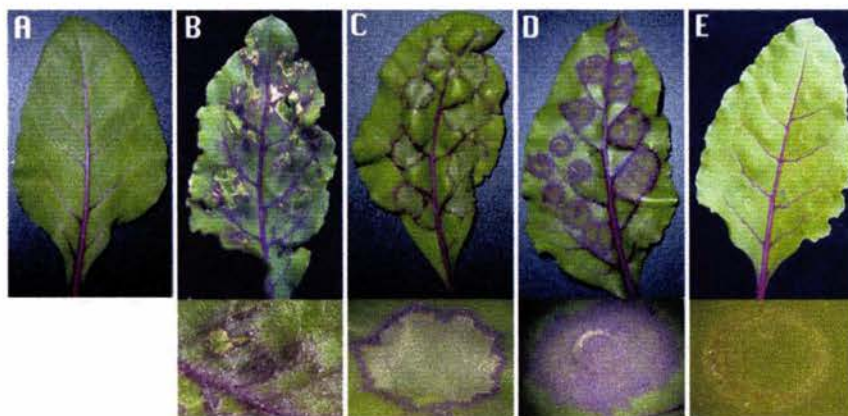


Fig. 2. The development of lesions and the accumulation of betacyanins in red beet leaves 48 h after treatment. (A) The red beet leaf without treatment shows pigmentation only in vascular tissue. (B) A wounded leaf shows development of red-violet pigmentation in the edge of wounded sites. (C) The *P. syringae*-infiltrated leaf shows red-violet pigmentation surrounding dry and brown tissue. (D) An *A. tumefaciens*-infiltrated leaf is characterized by a turgid aspect and red-violet pigmentation uniformly distributed in the infiltrated zone. (E) $MgSO_4$ -infiltrated leaf does not show visible betacyanin accumulation. Images at the bottom of figures are stereoscopic views of wounded or infiltrated zones.

pigmentation localized at the edge of wounded sites was observed 48 h after treatment, and this pigmentation was not detected in non-wounded areas (Fig. 2B). In contrast, healthy leaves without treatment showed red-violet pigmentation only in vascular tissue (Fig. 2A). Infiltration of red beet leaves with *P. syringae* induced a lesion 48 h later characterized by a red-violet ring surrounding the infiltrated area with a central region of dead and brown tissue (Fig. 2C). Infiltration of *A. tumefaciens* also induced the formation of the red-violet pigmentation, but in contrast to that induced by *P. syringae* the infiltrated area remained

with a turgid appearance and the red-violet pigmentation was uniformly distributed (Fig. 2D). Infiltration of $MgSO_4$ solution, used as a control for any wounding effect caused by this treatment, did not induce any pigmentation detectable within 48 h following the treatment (Fig. 2E). A light red-violet band at the edge of the $MgSO_4$ -infiltrated zone, however, was observed 120 h post-infiltration (data not shown).

To identify the site of pigment accumulation, microscopic examination of transverse sections of healthy and bacterial- or $MgSO_4$ -infiltrated leaves was carried out.

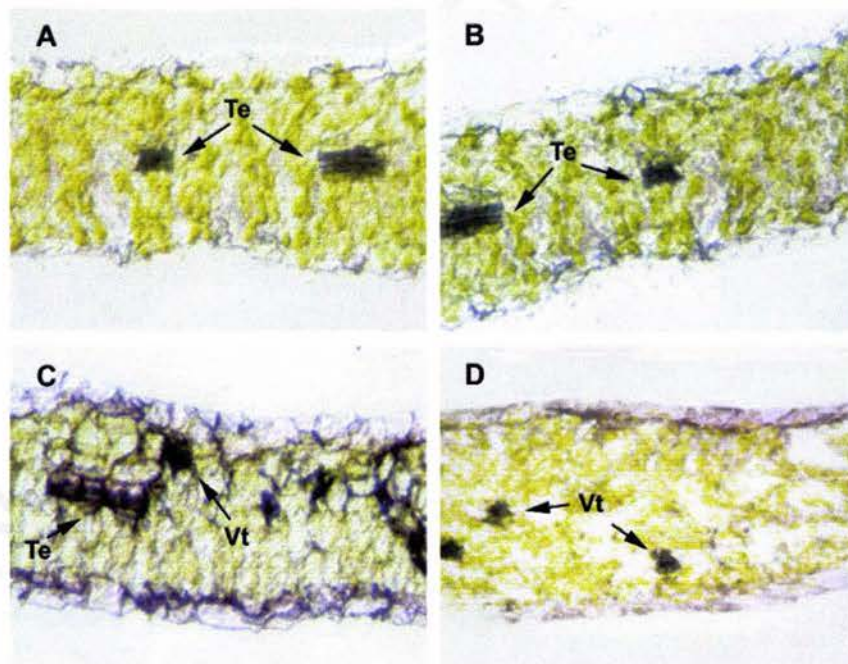


Fig. 3. Microscopic views of transverse sections of healthy or infiltrated leaves with bacteria for 48 h. Micrograph (30X) of healthy (A), and $MgSO_4$ -infiltrated (B) leaves do not show pigmented epidermis, whereas infiltrated leaves with *A. tumefaciens* (C) or *P. syringae* (D) show red-violet pigmentation in the epidermis. Vt is vascular tissue and Te is tracheal elements.

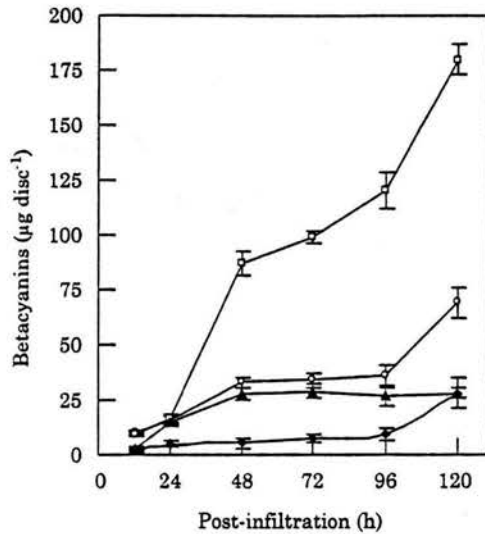


Fig. 4. Time course of betacyanin accumulation induced by wounding and bacterial infiltration. Discs of wounded (▲) or infiltrated leaves were collected at the indicated times. Treatment was done with 10 mM MgSO₄ solution (●), with *P. syringae* (○), or with *A. tumefaciens* (□). Each point represents the mean ±SD of six determinations for each infiltration time from three different experiments.

Because betacyanins are water-soluble compounds, the tissue fixation in aqueous solvents was not successful. Thus, samples were fixed by freezing and sectioned with a cryostat at -20 °C. Sections of healthy and MgSO₄-infiltrated leaves did not show any red-violet pigmentation up to 48 h after treatment (Fig. 3A and B). On the contrary, in *A. tumefaciens* or *P. syringae* infiltrated leaves, accumulated betacyanin was detected in the epidermis (Fig. 3C and D). However, the green pigmentation due to the presence of chlorophyll observed in mesophyll cells of healthy or MgSO₄-infiltrated leaves (Fig. 3A and B) was reduced in *A. tumefaciens*-infiltrated leaves (Fig. 3C) but not in *P. syringae*-infiltrated tissue (Fig. 3D). In *A. tumefaciens*-infiltrated leaves the red-violet pigmentation was also observed in tracheary elements and vascular tissue (Fig. 3C).

The red-violet pigmentation induced by wounding or by bacterial infiltration correlated with betacyanin accumulation (Fig. 4). In non-treated leaves, betacyanin content (Bc) was 4 µg Bc disc⁻¹. In wounded leaves, betacyanin levels increased to 28 µg Bc disc⁻¹ at 48 h and were stable between 72 and 120 h after treatment. In *P. syringae*-infiltrated leaves, betacyanin levels increased to 33 µg Bc disc⁻¹ after 48 h, remained stable between 72 and 96 h, and increased again to 69 µg Bc disc⁻¹ 120 h after treatment. Infiltration of leaves with *A. tumefaciens* also induced accumulation of betacyanins from 87.1 µg Bc disc⁻¹ at 48 h to 180 µg Bc disc⁻¹ at 120 h after infiltration. In contrast, MgSO₄ infiltration induced only a weak rise in the betacyanin level to 27.9 µg Bc disc⁻¹ 120 h after infiltration. Betacyanins were not detected in non-wounded

and non-infiltrated leaf areas. Hence, these results showed that wounding and infiltration of *B. vulgaris* leaves with *P. syringae* or *A. tumefaciens* induced betacyanin accumulation.

To explore a possible bactericidal effect of betacyanins, in planta bacterial growth was determined at 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h after the infiltration of leaves with *P. syringae* or *A. tumefaciens*. We found that after 24 h of infiltration, the bacterial counts of *P. syringae* or *A. tumefaciens* were reduced to 10 and 14%, respectively, and these values did not change between 48 and 120 h post-infiltration (data not shown). However, in assays in which purified betanin (0.01, 0.05, 0.1, 1.0, and 10 mM) was added to liquid cultures of *P. syringae* or *A. tumefaciens* no growth inhibition was detected, indicating that betanin does not have bactericidal activity (data not shown). Therefore, it is likely that the bacterial growth inhibition observed in planta was due to the induction and action of other secondary metabolites or proteins as part of defense mechanisms [24].

3.2. *A. tumefaciens* induces release of reactive oxygen species (ROS)

As part of the plant's defense response, ROS production are signals that induce the expression of genes encoding enzymes involved in the synthesis of secondary metabolites [24]. Therefore, we performed experiments to determine whether an oxidative burst is induced during the infiltration of red beet leaves with *A. tumefaciens* and whether there is a connection between the ROS production and the synthesis of betacyanins. To this end, kinetics of DCFH oxidation by ROS released from leaves infiltrated with MgSO₄ solution or with *A. tumefaciens* were obtained (Fig. 5). A basal level of ROS was detected in leaves infiltrated with MgSO₄ solution. In contrast, *A. tumefaciens*-infiltrated leaves

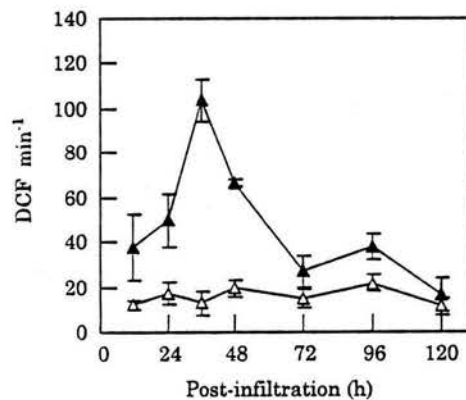


Fig. 5. Time course of ROS accumulation in *A. tumefaciens*-infiltrated plants. The increase in DCF fluorescence as a measure of released ROS was obtained from discs of MgSO₄-infiltrated (Δ) and agro-infiltrated leaves (▲) at the indicated times. Each point represents the mean ±SD of six determinations for each infiltration time from three different experiments.

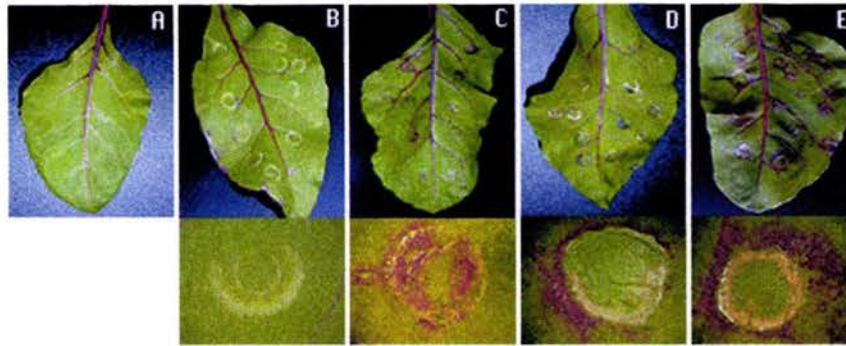


Fig. 6. Effect of the H₂O₂-generating system (glucose/glucose oxidase) on the induction of betacyanin synthesis. (A) Non-infiltrated leaves and (B) infiltrated leaves with glucose alone do not show visible pigment accumulation. (C–E) Infiltrated leaves with the glucose/glucose oxidase system (20, 50, and 100 U ml⁻¹, respectively) show a red-violet pigmentation surrounding the edge of the infiltrated sites.

showed an increase in ROS after 24 h, it peaked at 36 h and progressively declined 48 h post-infiltration. Interestingly, ROS release occurred mainly between 24 and 48 h post-infiltration whereas betacyanin accumulation was detected from 48 to 120 h after infiltration (compare Figs. 4 and 5). Hence, ROS production preceded betanin synthesis, which suggests that ROS accumulation is a signal required to induce the synthesis of the pigment.

3.3. The ROS production induces betacyanin synthesis

To evaluate the dependence of betacyanin synthesis on ROS accumulation, red beet leaves were infiltrated with an artificial H₂O₂-generating system (glucose/glucose oxidase) and betacyanin content was determined 48 h after infiltration. Three glucose/glucose oxidase concentrations (20, 50, and 100 U ml⁻¹) were assayed in the presence of 10 mM glucose and, as a control, glucose alone was infiltrated. Whereas those areas that were infiltrated with glucose/glucose oxidase showed red-violet pigmentation around their edges (Fig. 6C–E), no pigment was observed in glucose-only infiltrated leaves (Fig. 6B). In non-infiltrated leaves and leaves infiltrated only with glucose, the content of betacyanin was 4.2 and 4.8 µg Bc disc⁻¹, respectively, whereas the betacyanin content was 22.2, 38.7, and 55.2 µg Bc disc⁻¹ in samples infiltrated with 20, 50, and 100 U ml⁻¹ of glucose oxidase, respectively (Fig. 7). These results suggest that ROS are a signal inducing betacyanin synthesis. To test the role of ROS as second messenger in the pathogen-induced betacyanin synthesis, the production of ROS was inhibited in red beet leaf infiltrated with *A. tumefaciens*. The likely source of ROS produced after pathogen infection, wounding or other environmental stresses, is a plasma membrane NADPH oxidase [29]. Production of ROS after pathogen infection can be prevented by diphenylene iodonium chloride (DPI), an inhibitor of flavin-containing oxidases. Therefore, *A. tumefaciens* and DPI were co-infiltrated in red beet leaves and betacyanin content was

measured 48 h after co-infiltration. The infiltration of DPI alone did not cause visible pigmentation (Fig. 8A), whereas, the co-infiltration of *A. tumefaciens* and DPI (5 and 10 µM) lead to a reduction of the pigment as compared with the pigment produced in *A. tumefaciens* infiltrated leaves (Fig. 8B–D). In non-infiltrated leaves or leaves infiltrated only with MgSO₄ solution or 5 or 10 µM DPI, the betacyanin content ranged from 4.2 to 4.9 µg Bc disc⁻¹. Betacyanin accumulation induced by *A. tumefaciens* infiltration (72.7 µg Bc disc⁻¹) was reduced to 54.7 and 34.7 µg Bc disc⁻¹ when *A. tumefaciens* was co-infiltrated with 5 or 10 µM of DPI, respectively (Fig. 9). Thus, these results support the hypothesis that ROS production is a signal required for the synthesis of betacyanin in *B. vulgaris* leaves.

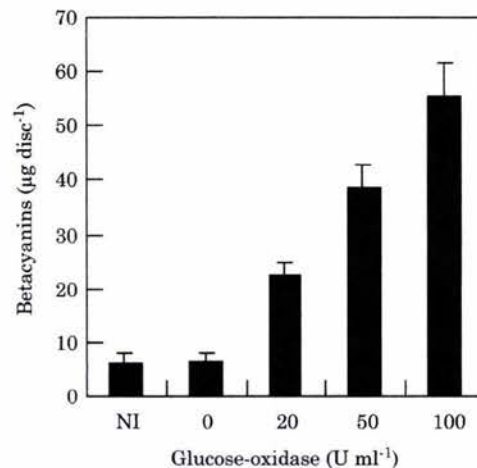


Fig. 7. Effect of the glucose/glucose oxidase on the accumulation of betacyanins. The betacyanin content of treated leaves with three glucose oxidase concentrations (20, 50, and 100 U ml⁻¹) show an increment that correlates with concentration of enzyme infiltrated. Non-infiltrated leaves (NI) and infiltrated leaves with glucose alone (0) were used as a control. Each point corresponds to the mean ± SD of four determinations.

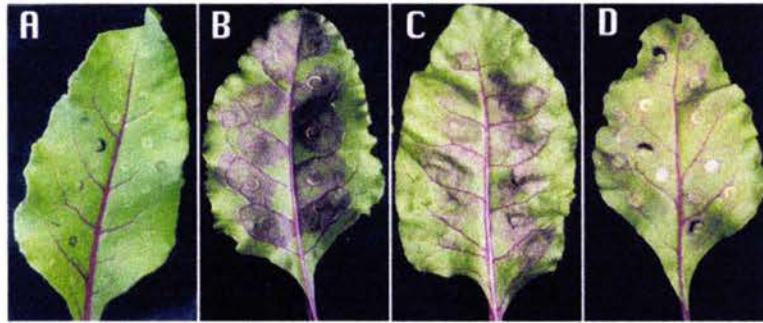


Fig. 8. The treatment of NADPH oxidase inhibitor (DPI) causes reduction of betacyanin accumulation induced by *A. tumefaciens*-infiltration for 48 h. (A) The 10 µM DPI-infiltrated leaves do not show visible betacyanin accumulation. The pigment accumulation observed by the *A. tumefaciens*-infiltration (B) is reduced in leaves co-infiltrated with *A. tumefaciens* and 5 µM DPI (C) or 10 µM DPI (D).

4. Discussion

During evolution, higher plants have developed self-defense mechanisms that protect them against environmental stress factors. Some of these mechanisms involve the synthesis of secondary metabolites, such as phenylpropanoids, terpenoids, and alkaloids [43]. The role of betacyanins in defense responses, which are classified as chromoalkaloids, has been thus far little studied. Our results showed that mechanical wounding and *P. syringae* or *A. tumefaciens* infiltration of red beet leaves induced betacyanin synthesis (Fig. 4). This suggests that these secondary metabolites may play a role in stress responses. The plant reaction was different depending on the infiltrated bacterium. The infiltration with *P. syringae* induces a typical HR and pigment accumulation around the dry and brown tissue. Similar to other interactions of *P. syringae* pv. *tabaci* with non-host plants [20,25], the formation of lesions with characteristics of a HR in red beet leaves by *P. syringae* pv. *tabaci* suggests that *B. vulgaris* establishes an interaction of non-host resistance with this bacterium. The induction of secondary metabolite biosynthesis is involved in HR [24] but, to our knowledge, this is the first report in which betacyanin synthesis induction has been associated with HR in red beet leaves. These observations suggest that betacyanins may contribute to the defense response by confining the disease to the infiltrated area. Similar observations have been obtained for other secondary metabolites such as phytoalexins and ROS scavengers (ascorbic acid, glutathione, α-tocopherol, carotenoids, and phenylpropanoids) that accumulate as part of a localized initial response of the plant defense [6,16]. Additionally, we observed that betacyanins were accumulated in the epidermis of the tissue surrounding the dead area in *P. syringae*-infiltrated leaves (Fig. 3). Likewise, mesophyll cells showed a green pigmentation similar to that found in cells of healthy or MgSO₄-infiltrated leaves. As in other defense responses [11,28], this pigment localization suggests that betacyanins are

synthesized by living cells adjacent to the lesion site and that the pigments contribute to the restriction of pathogen spread, thereby limiting the injury.

In contrast to that observed in *P. syringae*, the *A. tumefaciens* infiltration does not cause HR, the infiltrated zone shows a turgid appearance and betacyanins are accumulated in the infiltrated area (Fig. 2). Microscopic analysis also showed pigment accumulation in the epidermal cells, but a loss of green color in mesophyll cells probably caused by a reduction in chlorophyll content was observed (Fig. 3). It was shown that in *A. conyzoides* cell cultures, the exposure to *A. tumefaciens* induces the defense machinery, including the accumulation of mRNAs encoding a PR protein, enzymes involved in ROS metabolism and enzymes involved in the biosynthesis of secondary metabolites [10]. Therefore, in red beet leaves, *A. tumefaciens* seems to be triggering a defense response, at least regarding the synthesis of betanin.

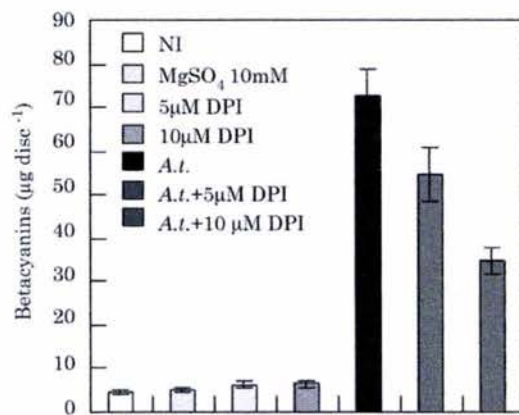


Fig. 9. Betacyanin accumulation in treated leaves with NADPH oxidase inhibitor (DPI). The betacyanin content induced by the *A. tumefaciens*-infiltration for 48 h (*A.t.*) is diminished with the co-infiltration of DPI and *A. tumefaciens*. Non-infiltrated leaves (NI) and infiltrated leaves with MgSO₄ solution or DPI alone (5 and 10 µM) were used as controls. Each point corresponds to the mean ± SD of three determinations.

785 In plant–pathogen interactions, ROS are produced, and
786 there are several proposed roles for ROS in the defense
787 response such as antimicrobial compounds, signaling
788 molecules, inducers of host cell death, and reinforcements
789 of the cell wall through oxidative cross-linking with cell
790 wall structural proteins [2,41]. In addition to the induction
791 of betacyanin biosynthesis in response to wounding and
792 bacterial infiltration, we show that ROS precede the
793 accumulation of betacyanins. The main ROS production
794 occurred between 24 and 48 h post-infiltration, prior to the
795 start of betacyanin accumulation (Fig. 5). Furthermore,
796 treatment with an artificial H₂O₂-generating system induced
797 betacyanin synthesis (Fig. 7). NADPH-oxidase is the
798 enzyme responsible for O₂⁻ synthesis and its activity is
799 induced in response to several stresses [28], the inhibition of
800 this enzyme with DPI reduced 50% the *A. tumefaciens*-
801 induced betacyanin production. We do not know whether,
802 NADPH oxidase inhibition was partial or there are other
803 sources of ROS in the plant, or another intermediate, in
804 addition to ROS, was able to induce betacyanin synthesis in
805 response to *A. tumefaciens* infection. Thus, our data suggest
806 that ROS accumulation is required to induce betacyanin
807 synthesis.

808 The fact that betacyanin accumulation was responsive to
809 bacterial (Fig. 4) and glucose/glucose oxidase infiltration
810 (Fig. 7) led us to hypothesize a role for these compounds as
811 phytoalexins and/or as ROS scavengers. To test the first
812 hypothesis, we assayed the activity of betanin as an inhibitor
813 of bacterial growth. With this purpose, betanin concentra-
814 tions up to 10 mM were added to liquid cultures of
815 *P. syringae* or *A. tumefaciens* and bacterial growth was
816 measured. Even though we did not know the concentration
817 of cellular betacyanin at bacterial infiltration sites, these
818 betanin concentrations were chosen according to the
819 concentrations that some phytoalexins reach in planta
820 [32]. However, no changes in bacterial growth were
821 observed in the cultures treated with betanin as compared
822 with non-treated cultures (data not shown). On the other
823 hand, when in planta bacterial growth was measured, a
824 dramatic drop in bacterial counts was observed after 24 h of
825 infiltration, and there was no further bacterial growth after
826 120 h of infiltration (data not shown). As betanin was unable
827 to reduce bacterial growth in liquid cultures, we believe that
828 other mechanisms are responsible for restricting bacterial
829 multiplication in red beet leaves. Most probably, in the case
830 of *P. syringae* infection, the development of the HR is the
831 primary cause of bacterial growth inhibition. In other
832 *Pseudomonas*–plant interactions the HR restricts bacteria to
833 the site of infection [1]. In the case of *A. tumefaciens*
834 infiltration, another mechanism must be contributing to halt
835 its growth. The synthesis of flavonoid phytoalexins in red
836 beet in response to a fungal infection has been reported [34].
837 Furthermore, in addition to phytoalexins, plants synthesize a
838 number of different molecules with antibacterial activity
839 [22] that may participate in stopping *Agrobacterium* growth
840 in red beet leaves.

We therefore favor the second hypothesis: betacyanins
have a role as ROS scavengers. Some secondary
metabolites display antioxidant properties in vitro, and it
has been proposed that in planta they act as scavengers of
ROS excess produced by the onset of defense responses
[14]. The potential of the antioxidant activity of betalains
in the prevention of human diseases is under study. In this
context, the antioxidant activity of betacyanins has been
evaluated using in vitro assays [3,26]. The production of
betacyanins in response to wounding or bacterial infiltra-
tion suggests that the pigment produced may function as a
ROS scavenger, limiting the damage caused by these
conditions of stress. Likewise, the treatment of cell
suspension cultures from tobacco with a fungal elicitor
resulted in the induction of a glucosyltransferase followed
by the release of phenolic compounds with antioxidant
properties and subsequent H₂O₂ scavenging [6]. Addition-
ally, microscopic examination of *B. vulgaris* leaves
infiltrated with *A. tumefaciens* or *P. syringae* showed
betacyanin accumulation mainly in epidermal cells.
Similarly, anthocyanin synthesis has been observed in
the leaf epidermis of cotton plants that were inoculated
with bacterial pathogens. Although anthocyanins are not
essential for resistance, it has been suggested that they
have a protective role in the healthy tissue surrounding
infection sites and that they play a role as ROS scavengers
preventing oxidative damage [21]. Furthermore, leaf
epidermis regions enriched with anthocyanins have an
elevated antioxidant capacity to scavenge the H₂O₂
produced in the mesophyll tissue after mechanical injury
[12]. Thus, betacyanins could be relevant as ROS
scavengers during the hyperoxidant condition induced by
bacterial infiltration and wounding.

ROS-scavenging mechanisms including catalases, super-
oxide dismutase, and peroxidases are activated during
oxidative stress [29]. Previous reports have shown that
betacyanins are used as substrates by peroxidases from
B. vulgaris roots [27]. A detoxification mechanism of H₂O₂
involving a flavonoid-peroxidase of leaf extract has also
been described previously [43]. Thus, the mechanism
implicated in ROS scavenging by betacyanins may involve
a peroxidase. Future studies are needed to analyze the
activation of genes encoding peroxidases in wounding or
bacteria-infiltrated red beet leaves.

In conclusion, ROS production appears to be a key event
that precedes and activates betacyanin accumulation.
Betacyanins could in turn be relevant as ROS scavengers
during the oxidative burst induced by bacterial infection and
wounding.

5. Uncited reference

[42].

Acknowledgements

We thank Dr Alejandra A. Covarrubias (IBT-UNAM) and Dr Mario Rodríguez Monroy (CeProBi-IPN) for critical reading of the manuscript. We are grateful to Biol. Lorena López Sánchez and Magali Zacarias Soto, and to Dr Edith Sánchez and Dr Enrique Reynaud for microscopy technical assistance. We thank Dr Luis Herrera-Estrella for supplying the *P. syringae* pv. *tabaci* used in this work. Gabriela Sepúlveda-Jiménez thanks COFAA-IPN for the fellowship awarded.

References

- [1] Alfano JR, Collmer A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* 1996;8:1683–98.
- [2] Borden S, Higgins V. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 2002;61:227–36.
- [3] Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi AM, et al. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem* 2002;50:6895–901.
- [4] Casati P, Walbot V. Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiol* 2003;132:1739–54.
- [5] Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* 1999;70:1–9.
- [6] Chong J, Baltz R, Fritig B, Saindrenan P. An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Lett* 1999;458:204–8.
- [7] Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glu:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* 2002;14:1093–107.
- [8] Conconi A, Smerdon MJ, Howe GA, Ryan CA. The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* 1996;383:826–9.
- [9] Dat J, Vandenebeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:779–95.
- [10] Ditt RF, Nester EW, Comai L. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10954–9.
- [11] Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol Plant Microbe Interact* 1997;10:646–55.
- [12] Gould KS, Mckelvie J, Markham KR. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury *Plant Cell Environ* 2002;25:1261–9.
- [13] Grant JJ, Yun B-W, Loake GJ. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J* 2000;24:569–82.
- [14] Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF. Plant's defense and its benefits for animal and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol Biochem* 2002;40:471–8.
- [15] Green R, Fluhr R. UV-B-Induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* 1995;7:203–12.
- [16] Hammond-Kosack KE, Jones JDG. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 1996;8:1773–91.
- [17] Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol Plant Microbe Interact* 2000;13:649–57.
- [18] Heath MC. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 2000;44:321–34.
- [19] Hellens R, Mullineaux P, Klee H. A guide *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 2000;5:446–51.
- [20] Jakobek JL, Smith-Becker JA, Lindgren PB. A bean cDNA expressed during a hypersensitive reaction encodes a putative calcium-binding protein. *Mol Plant Microbe Interact* 1999;12:712–9.
- [21] Kangatharalingam N, Pierce ML, Bayles MB, Essenberg M. Epidermal anthocyanin production as an indicator of bacterial blight resistance in cotton. *Physiol Mol Plant Pathol* 2002;61:189–95.
- [22] Kanner J, Harel S, Granit R. Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants. *J Agric Food Chem* 2001;49:51780–5185.
- [23] King E, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 1954;44:301–7.
- [24] Lamb C, Dixon R. The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997;48:251–75.
- [25] Lu M, Tang X, Zhou J-M. Arabidopsis-NH01 is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. *Plant Cell* 2001;13:437–47.
- [26] Mabry TJ. Betalains. In: Bell EA, Charwood BV, editors. *Encyclopedia of plant physiology. Secondary plant products*, vol. 8. Berlin: Springer; 1980. p. 513–33.
- [27] Martínez-Parra J, Muñoz R. Characterization of betacyanin oxidation catalyzed by a peroxidases from *Beta vulgaris* L. roots. *J Agric Food Chem* 2001;49:4064–8.
- [28] Meier BM, Shaw N, Slusarenko AJ. Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 1993;6:453–66.
- [29] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2002;7:405–10.
- [30] Parrott DL, Anderson AJ, Carman JG. *Agrobacterium* induces plant cell death in wheat (*Triticum aestivus* L.). *Physiol Mol Plant Pathol* 2002;60:59–69.
- [31] Pellinen RI, Korhonen M-S, Tauriainen AA, Palva ET, Kangasjärvi P. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiol* 2002;130:549–60.
- [32] Pierce ML, Cover EC, Richardson PE, Scholes VE, Essenberg M. Adequacy of cellular phytoalexin concentrations in hypersensitively responding cotton leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* 1996;48:305–24.
- [33] Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 2001;126:445–62.
- [34] Richardson PM. Phytoalexin induction in *Beta* and *Spinacia*. *Biochem Syst Ecol* 1981;9:105–7.
- [35] Schopfer P, Plachy C, Frahy G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidases in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* 2001;125:1591–602.
- [36] Schwartz SJ, von Elbe JH. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1980;28:540–3.
- [37] Snyder GW, Ingersoll JC, Smigocki AC, Owens LD. Introduction of pathogen defense genes and cytokinin biosynthesis gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment. *Planta* 1999;18:829–34.
- [38] Stafford HA. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci* 1994;101:91–8.

- 1009 [39] Strack D, Vogt T, Schliemann W. Recent advances in betalains
1010 research. *Phytochemistry* 2003;62:247–69. 1065
- 1011 [40] Vogt T, Ibdah M, Schmidt J, Wray V, Nimtz M, Strack D. Light-
1012 induced betacyanin and flavonols accumulation in bladder cells of
1013 *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry* 1999;52:583–92. 1066
- 1014 [41] Vranová E, Inzé D, Breusegem FV. Signal transduction during
1015 oxidative stress. *J Exp Bot* 2002;53:1227–36. 1067
- 1016 1071
- 1017 1072
- 1018 1073
- 1019 1074
- 1020 1075
- 1021 1076
- 1022 1077
- 1023 1078
- 1024 1079
- 1025 1080
- 1026 1081
- 1027 1082
- 1028 1083
- 1029 1084
- 1030 1085
- 1031 1086
- 1032 1087
- 1033 1088
- 1034 1089
- 1035 1090
- 1036 1091
- 1037 1092
- 1038 1093
- 1039 1094
- 1040 1095
- 1041 1096
- 1042 1097
- 1043 1098
- 1044 1099
- 1045 1100
- 1046 1101
- 1047 1102
- 1048 1103
- 1049 1104
- 1050 1105
- 1051 1106
- 1052 1107
- 1053 1108
- 1054 1109
- 1055 1110
- 1056 1111
- 1057 1112
- 1058 1113
- 1059 1114
- 1060 1115
- 1061 1116
- 1062 1117
- 1063 1118
- 1064 1119
- 1120
- [42] Wink M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of
secondary metabolites. In: Wink M, editor. *Biochemistry of plant
secondary metabolism*. England: Sheffield Academic Press; 1999. p.
1–16. 1068
- [43] Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N. Flavonoid-peroxidase reaction
as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant
Physiol* 1997;115:1405–12. 1069

6.2 A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress.

Gabriela Sepúlveda-Jiménez, Patricia Rueda-Benítez, Helena Porta, Mario Rocha-Sosa. Artículo aceptado en la revista *Journal of Experimental Botany*.

Dr. M Rocha-Sosa
Instituto de Biotecnología
UNAM
Apartado postal 510-3
Cuernavaca 62250 Morelos
MEXICO

Ref: 040732/eri036

Dear Dr Rocha-Sosa

Your paper entitled 'A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress' has now been accepted for publication in the Journal of Experimental Botany. It has been included in the Cell & Molecular Biology, Biochemistry & Molecular Physiology section, however, if you would prefer it to appear under a different heading please let me know as soon as possible.

Please Print and complete the attached licence to publish form and return it to:
Ms Hilary Lamb, Journals Production, OUP, Great Clarendon Street, Oxford, OX2 6DP, UK. Please use the paper reference printed above.

The JXB currently offers all authors a free online trial subscription.

To register go to <<http://www3.oup.co.uk/Online>> <http://www3.oup.co.uk/Online>

Enter the subscription number 90008345

Enter username JXBOTA04 and password transgenic and click on "enter"

Complete your name and address details and click on "continue"

Click on "finish"

You will be emailed confirmation of your free online subscription after which you will be able to gain full access to JXB online using the username and password.

Yours sincerely,

Raquel Gonzalez.
Assistant Editor

A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress.¹ Gabriela Sepúlveda-Jiménez ^{a,b}, Patricia Rueda-Benítez ^a, Helena Porta ^a, Mario Rocha-Sosa ^{a*}

^a Instituto de Biotecnología, UNAM. Apartado postal 510-3, Cuernavaca 62250 Morelos, México. ^b Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN, P.O Box No. 24, Yautepec 62731 Morelos, México

Abstract

Mechanical wounding, infiltration with *P. syringae* or *A. tumefaciens*, and exposure to an H₂O₂ generating system (Glc/Glc oxidase) induce betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves. These conditions also induced the expression of *BvGT*, a gene encoding a glucosyltransferase (GT) from *Beta vulgaris*. *BvGT* has a high similarity to *Dorotheanthus bellidiformis* betanidin-5 GT involved in the betacyanin synthesis. Furthermore, the transient expression of a *BvGT* antisense construct resulted in the reduction of *BvGT* transcript accumulation and betanin synthesis, suggesting a role for this gene product in betacyanin glucosylation. In addition, the NADPH oxidase inhibitor, diphenylene iodonium (DPI), inhibited the accumulation of *BvGT* transcript in response to the infiltration with *Agrobacterium tumefaciens*. Hence, this result suggests that ROS produced by a plasma membrane NADPH oxidase may act as a signal to induce *BvGT* expression, necessary for the betanin synthesis after wounding and bacterial infiltration.

Keywords: Bacterial infiltration; betacyanin; *Beta vulgaris*; glucosyltransferase; red beet; wounding;

Abbreviations: DPI, diphenylene iodonium; Glc, glucose; GlcO, glucose oxidase; GT, glucosyltransferase; ROS, reactive oxygen species.

Introduction

Wounding and pathogens induce transcription of genes encoding UDP-glucosyltransferases that glucosylate hormones and secondary metabolites (O'Donnell *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999). This glucosylation reaction is one of the mechanisms that allows plants to maintain metabolic homeostasis. Secondary metabolites are often converted to their glyco-conjugates and then accumulated and compartmentalized in vacuoles or specialized plastids. Furthermore, glucosylation of low-molecular-weight molecules, like harmful metabolites or environmental compounds, allows the solubilization of these compounds in water, for detoxification and modulation of their biological activity (Jones and Vogt, 2001). Oxidative stress and conditions that promote cell death induce the expression of glucosyltransferase genes and the production of transportable glucosides which function as reactive oxygen species (ROS) scavengers (Mazel and Levine, 2002). ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals (OH^{\cdot}), and singlet oxygen (1O_2) act as early messengers in signaling cascades activated by diverse external stimuli (Lamb and Dixon, 1997). In plant-pathogen interactions, ROS may exacerbate tissue damage or signal the activation of defense responses. In the first case, ROS can limit the spread of pathogen infection by strengthening the plant cell wall or killing pathogens directly. Regarding the activation of defense responses, ROS are known to induce expression of pathogenesis related (PR) protein genes, regulating accumulation of secondary metabolites, and genes encoding ROS detoxifying enzymes (Dat *et al.*, 2000; Grant and Loake, 2000).

Among the ROS-scavenging pathways, the production of antioxidants such as ascorbic acid and glutathione may be essential to keep ROS levels low (Mittler,

2002). Secondary metabolites such as terpenoids and phenolic compounds, whose antioxidant properties have been evaluated *in vitro*, may also participate in the modulation of ROS levels (Grassmann *et al.*, 2002; Mittler, 2002).

In red beet (*Beta vulgaris*), betacyanins (red-violet pigments) constitute a class of secondary metabolites, where the main betacyanin, betanin, is found in high concentration in the store root (0.5 g of betanin/kg) (Strack *et al.*, 2003). Betacyanin biosynthesis (Fig. 1) starts by the oxidation of tyrosine to dopa by a tyrosine hydroxylase (1) (Yamamoto *et al.*, 2001). Dopa is then converted to dopaquinone, in a reaction carried out by a tyrosinase or a polyphenol oxidase (2) (Steiner *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 2001). Recently, a gene for a 4,5-extradiol dioxygenase (4) involved in betalamic acid synthesis was described (Laurent *et al.*, 2004). Glucosylation is known to be a key reaction in the formation of the red-violet pigment betanin, but the precise mechanism involved, however, remains to be elucidated. Betanidin and *cyclo*-dopa have been proposed as possible targets for sugar attachment in the formation of betanin. *In vitro* glucosylation of betanidin by a betanidin 5-O-glucosyltransferase (betanidin 5-GT, 7), present in cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis*, takes place after the condensation of *cyclo*-dopa with betalamic acid (Heuer *et al.*, 1996). A cDNA, corresponding to the betanidin 5-GT, has been cloned (Vogt *et al.*, 1999). On the other hand, the glucosylation of *cyclo*-dopa (8) is also controversial. This possibility was first suggested by the detection of *cyclo*-dopa glucoside in young *B. vulgaris* plants (Wyler *et al.*, 1984). However, it was not possible to detect an enzyme or a recombinant gene product capable of catalyzing *cyclo*-dopa glucosylation and only traces of this compound, presumably generated by betanin hydrolysis were found in young red beet plants (Strack *et al.*, 2003). Recently, the

glucosylation of *cyclo*-dopa was observed in crude extract of *Mirabilis jalapa* L. and five other plants producing betacyanin (Sasaki *et al.*, 2004).

Previously, we found that betacyanins are induced by wounding, bacterial infiltration, and a H₂O₂ generating system (Glc/GlcO) and a role for betacyanins as ROS scavengers was suggested (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004).

In this report, we provide data that suggest the participation of a GT from *B. vulgaris* (*BvGT*), in betalain synthesis in response to wounding, infiltration with *P. syringae* or *A. tumefaciens*, and exposure to H₂O₂. Our data also suggest that ROS act as a signal to induce *BvGT* expression, necessary for the betanin synthesis during wounding or bacterial infiltration.

Materials and methods

Plant material and bacteria strains

Seeds of red beet (*B. vulgaris*, var. "Crosby Egyptian") were germinated in the dark between wet paper sheets at 25°C, and after eight days, seedlings were transferred to pots with sterile Metromix: Peatmoss substrate. Seedlings were grown in a greenhouse at 25°C under natural daylight conditions and the first two true leaves of six week-old plants were used in experiments described. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* was grown overnight at 28°C in King's B liquid medium (King *et al.*, 1954). *Agrobacterium tumefaciens* was grown for 18 h at 28°C in Luria B liquid medium supplemented with antibiotics (50 µg ml⁻¹ rifampicin and 100 µg ml⁻¹ kanamycin). For inoculations, the concentration of *P. syringae* and *A. tumefaciens* was adjusted to 1.0 X 10⁷ cfu cm⁻³ in 10 mM MgSO₄ solution.

Wounding treatment and leaf infiltration with bacteria or Glc/GlcO system

Mechanical wounding was done by rubbing once with sandpaper on the axial side of red beet leaves. Leaves were infiltrated with bacteria or MgSO_4 using a 1.0 ml syringe without a needle. Wounded or infiltrated areas (control or treatments) were identified immediately after treatment, delineating the limits of wounding or liquid spread with a felt-tip marker. At 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h after treatment 0.5 cm diameter leaf discs were collected from marked areas.

The H_2O_2 generating system, Glc/GlcO (Sigma, Aldrich Chemical St Louis), was prepared and used immediately for plant treatment. GlcO (20, 50, 100 U ml^{-1}) was added to 10 mM Glc in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) and infiltrated with a 1.0 ml syringe without a needle. For NADPH oxidase inhibition, 5 or 10 μM of diphenyl-iodonium (DPI) (Sigma, Aldrich Chemical St Louis) was co-infiltrated with bacterial suspension.

Determination of betanin

Plant material was extracted with 80% methanol, and pigments were analyzed by reverse phase, high-performance liquid chromatography (HPLC), using the solvent system described by Heuer *et al.*, (1996). A HPLC Waters modular system (Waters, Milford MA, USA) equipped with a 5 μm Nucleosil C_{18} column (250 X 4 mm, i.d, Macherey-Nagel, Düren Germany), a system controller 600E, an injector U6K, and a UV-visible variable wavelength detector 486 were used along with a chromatography data management system (Maxima 800). Betanin was detected to 536 nm and the concentration of betanin content was estimated using the molar extinction coefficient $65 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Betanin was purified from beet root and used as a standard (Schwartz and von Elbe, 1980; Pourrat *et al.*, 1988)

Amplification by PCR of BvGT

Genomic DNA was extracted from 3 g of red beet leaves as described by Saghai-Marooif *et al.*, (1984) and used to isolate a fragment of a glucosyltransferase by PCR with the forward primer: 5'-CCHGAYATGTTYTNCCHTGG-3' and the reverse primer 5'-RTAWGAWGAWCCWCCYTCYTC-3'. These primers were designed based on amino acid consensus sequence from a multiple alignment of glucosyltransferases of *Dorotheanthus bellidiformis* (accession number Y18871), *Nicotiana tabacum* (accession number U32643), and *Lycopersicum esculentum* (accession number X85138). The alignment was constructed with the PileUp program (Wisconsin Package Version 10.2 Genetics Computer Group, Madison WI). PCR reaction was carried out in 50 µL PCR reaction mixtures with 0.2 mM dNTPs, 0.2 U Taq polymerase (Gibco-BRL, Life Technologies, Rockville, MD), 0.2 µM of each primer, and 2 µg of genomic DNA. PCR conditions were as follow: 3 min initial heating at 94°C, followed by 35 three-step cycles of 1 min denaturation at 94°C, 30 s annealing at 61°C, and 20 s elongation at 68°C, followed by a final 7 min elongation step at 72°C in a GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer Life Sciences, Boston). The expected size DNA fragment of 1.1 kb was recovered from an agarose gel using the GFX PCR purification kit (Amersham, Biosciences AB, Uppsala), and cloned into the pMos blue vector (Amersham, Biosciences AB, Uppsala).

Sequencing and analysis of DNA

Sequencing of the genomic *BvGT* clone was carried out by thermo sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit, (Amersham Pharmacia Biotech,

USA), following the instructions of the manufacturer with fluorescence dideoxynucleotides, and using a 377-18 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA). The protein alignment was constructed with the ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) and MacBoxshade (Version 2.01) programs.

Transient expression assay of an antisense construct of the BvGT

A 1036 bp *BvGT* fragment digested with *Sall* and *KpnI* restriction enzymes was inserted between the same sites of pBin 3X35S-NOS vector in the antisense orientation. This construct (AsBvGT) or only the vector was introduced into *A. tumefaciens* and red beet leaves were infiltrated with the bacterium carrying the AsBvGT construct or the pBin3X35S-NOS vector.

Expression analysis by RT-PCR

Total RNA was extracted from infiltrated leaf fragments according to the method described by Logemann *et al.*, (1987). RNAs were treated with 0.5 U RNase-free DNase (Sigma, Aldrich Chemical St Louis), precipitated with ethanol, and resuspended in water. RNA yield was determined spectrophotometrically and its quality was determined by electrophoresis in an agarose/formaldehyde gel followed by ethidium bromide staining and UV light visualization. Two µg of RNA were used as a template for RT-PCR reactions using the Mo-MLV RT enzyme (Gibco-BRL, Life Technologies Rockville, MD) and 20 pmoles of *BvGT* specific primers (reverse primer 5'CTCAATGGAATGCACCGCTT3', and forward primer 5' GCTGAAGAAAAGGCACGAAAAG3'). For endogenous *BvGT* mRNA analysis, the first strand was synthesized using the reverse primer. For the antisense transcript amplification, the first strand cDNA was synthesized using the forward primer

instead of the reverse primer. PCR reactions were carried out in 50 μ L PCR reaction mixtures with 0.2 mM dNTPs, 0.2 U Taq polymerase (Gibco-BRL, Life Technologies, Rockville, MD), 0.2 μ M of each primer, and 2 μ L of cDNA. PCR conditions were as follows: 3 min initial heating at 94°C, followed by 35 three-step cycles of 1 min denaturation at 94°C, 30 s annealing at 63°C, and 20 s elongation at 68°C, followed by a final 7 min elongation step at 72°C as described above. Amplification of 18S rRNA as an internal standard was performed using the "Quantum RNA 18S" kit (Ambion, Inc). PCR products were analyzed on 1.2 % agarose gels stained with ethidium bromide.

Results

A BvGT encoding a GT from B. vulgaris

Based on amino acid sequence data, an alignment was done to find consensus sequences for plant UDP-Glucose:glucosyltransferases and used to design primers for amplification by PCR of a DNA encoding a GT from *B. vulgaris* (accession number T525033). The expected 1036-bp product was obtained and its identity as a GT was supported by sequencing. The deduced amino acid sequence showed a region between residues 226 and 269 (underlined in Fig.2) that corresponds to the UDP-binding domain and a highly conserved region among plant GTs known as a plant secondary product GT signature (PSPG box) (Bairoch, 1992). The BvGT encoded by the genomic fragment is 63.8% identical (71.8 % similar) to the betanidin-5 GT from *D. bellidiformis* and 57.3 % and 56.5 % identical (67.3 % and 67.4 % similar) with flavonoid GTs from *N. tabacum* and *L. esculentum*, respectively (Fig. 2).

Reduction of BvGT expression leads to a decrease in betanin content induced by infiltration with A. tumefaciens

To assess the possibility that the *BvGT* gene product may be implicated in betacyanin glucosylation, the expression of the *BvGT* was down-regulated by its antisense sequence using an *in planta Agrobacterium*-mediated transient expression assay and the betanin content was evaluated. Our previous studies showed that the betacyanin synthesis in red beet leaves was induced by *A. tumefaciens* infiltration after 48 h (Sepúlveda-Jiménez et al., 2004). Likewise, in this study the appearance of the red-violet pigmentation was observed in red beet leaves infiltrated with *A. tumefaciens* carrying only the vector after 48 h. However, the infiltrated leaves with *A. tumefaciens* carrying the As*BvGT* construct showed the absence of this visible red-violet pigmentation (Fig. 3A).

To determine the effect of the *A. tumefaciens*-infiltration with As*BvGT* on *BvGT* transcript abundance, RT-PCR assays were conducted to evaluate the accumulation of sense (endogenous) or antisense (transgene) transcripts. As an RNA loading control for the PCR assay, the attenuated product of 18S rRNA of 315 bp was obtained using specific primers, and related competitors. Control leaves were infiltrated with 10mM MgSO₄ solution, and only a weak *BvGT* transcript accumulation between 12 and 96 h post-infiltration was observed (Fig. 4A). In leaves infiltrated with *A. tumefaciens*, *BvGT* mRNA was accumulated between 12 and 96 h reaching the highest level between 48 and 72 h after treatment (Fig. 4B). The accumulation of endogenous *BvGT* mRNA, observed between 48 and 72 h post-infiltration, was absent in *A. tumefaciens* -infiltrated leaves with the As*BvGT* construct (compare Figs. 4B and C). In contrast, the

BvGT antisense transcript (t*BvGT*) progressively accumulated at 48 h and begun to decline 120 h after *A. tumefaciens* -infiltration (Fig. 4D).

To determine whether betanin content was affected by the transient expression of the As*BvGT* construct, HPLC profiles were obtained from *A. tumefaciens*-infiltrated leaves 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h post-infiltration. This allowed detection and quantification of betanin under the conditions tested. Treatment of plants with *A. tumefaciens* carrying the vector induced a rise in pigment content from 28.6 nmol betanin disc⁻¹ at 48 h to 56.2 nmol betanin disc⁻¹ at 120 h after treatment. In contrast, in *A. tumefaciens* -infiltrated plants with the As*BvGT* construct, the amount of pigment detected was 7.3 nmol betanin disc⁻¹ at 48 h and of 10.3 nmol betanin disc⁻¹ at 120 h post-infiltration. As a control, the time course of betanin accumulation, in leaves infiltrated with MgSO₄ solution, was also obtained. This treatment induced a weak increment of betanin content after 48 h (3.2 nmol betanin disc⁻¹) that rose up to 11.2 nmol betanin disc⁻¹ 120 h after infiltration (Fig. 3B).

Thus, the reduction of betanin accumulation caused by the transient expression of the As*BvGT* construct indicates that the *BvGT* participates in the betanin synthesis pathway in red beet leaves.

BvGT mRNA accumulates in response to *P. syringae* and ROS

In this study, the expression of *BvGT* in response to infiltration with the same bacteria that induced betacyanin accumulation was analyzed. Red beet leaves were infiltrated with *P. syringae* and samples were collected at 12-hour intervals up to 120 h after treatments, and total RNA was obtained for RT-PCR analysis. Results in the figure 4E show that *BvGT* mRNA accumulated between 12 and 96

h in leaves infiltrated with *P. syringae*, reaching the highest level 48 h after treatment. Together these results showed that infiltration with *P. syringae* or *A. tumefaciens*, conditions that lead to betacyanin accumulation, also induced *BvGT* transcript accumulation.

To determine whether the Glc/GlcO system was also able to induce *BvGT* mRNA accumulation, red beet leaves were infiltrated with 10 mM Glc and with three concentrations of GlcO (20, 50 and 100 U ml⁻¹). Figure 5A shows that the Glc/GlcO treatment induced *BvGT* transcript accumulation, reaching its highest level when 100 U ml⁻¹ of enzyme were used. Low levels of the *BvGT* transcript were detected in leaves infiltrated with Glc alone. Also, NADPH oxidase inhibitor diphenilen iodonium (DPI) at 10 μM, blocked the *BvGT* mRNA accumulation induced by the infiltration of *A. tumefaciens* for 48 h (Fig. 5B). These data suggest that NADPH oxidase is involved in ROS production that in turn may act as a signal to induce the expression of *BvGT*.

Discussion

Higher plants have developed self-defense mechanisms that protect them against environmental stress factors. Some of these mechanisms involve the synthesis of secondary metabolites, such as phenylpropanoids, terpenoids, and alkaloids with antimicrobial properties or antioxidant activities (Wink, 1999). However, due to their cellular toxicity, many of these compounds are converted to their glyco-conjugates and then accumulated in vacuoles or specialized plastids. Thus, the glucosylation reaction is one of the mechanisms that modulates the biological activity of secondary metabolites and allows maintaining the metabolic homeostasis of plants (Jones and Vogt, 2001). Previous work showed that

wounding and pathogens induced the transcription of genes that encode glucosyltransferases that can glucosylate secondary metabolites and hormones (O'Donnell *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999). In this work, we present some evidence that *BvGT* encodes a glucosyltransferase related to the betacyanin synthesis during defense responses. The accumulation of the *BvGT* mRNA was induced by wounding, bacterial infiltration, and ROS, the same conditions that induced the betacyanin accumulation (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004). Here, the betanin synthesis induced by infiltration with *A. tumefaciens* was reduced when the transient expression and accumulation of the *AsBvGT* construct was *A. tumefaciens*-infiltrated. Furthermore, the similarity observed between the *BvGT* and the betanidin 5-GT gene of *D. bellidiformis*, suggests that *BvGT* encodes an enzyme involved in betanin synthesis. To confirm this idea, however, it will be necessary to analyze the substrate specificity of the *BvGT* product. The biochemical studies of the *BvGT* enzyme will be facilitated by the use of recombinant protein produced in an *E. coli* expression system.

Agrobacterium alters the expression of plant defense-related genes commonly triggered by abiotic stress factors and by non-pathogenic bacteria in cell cultures of *Ageratum conyzoides*. These genes encode a pathogenesis related protein (PR), a glucosyltransferase involved in the biosynthesis of phenylpropanoids, and peroxidases (Ditt *et al.*, 2001). Similarly to the defense response of *A. conyzoides* cell culture, our results showed that in reed beet leaves *A. tumefaciens* induced the synthesis of betanin and the expression of a glucosyltransferase that may be involved in the defense response.

Recent studies indicate that ROS play an important role in plant cells as signaling molecules involved in the regulation of gene expression during stress or pathogen

infection (Dat *et al.*, 2000). Here we show that the treatment with an artificial H₂O₂ generating system, induced *BvGT* expression and treatments with DPI blocked its expression induced by the *A. tumefaciens* -infiltration. These data suggest that ROS accumulation is required to induce *BvGT* expression that in turn, is necessary for betacyanin synthesis. In this context, the production of betacyanins in response to wounding or bacterial infiltration has been evaluated previously, suggesting that the pigment produced, acts as a ROS scavenger, limiting the damage caused by these stress conditions (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004). Similarly, the treatment of tobacco cell suspension cultures with a fungal elicitor resulted in the induction of a glucosyltransferase for the production of transportable phenylpropanoid glucosides, followed by the release of free antioxidant phenolics into the extracellular medium and subsequent H₂O₂ scavenging by phenolic compounds (Chong *et al.*, 1999).

In plants, diverse mechanisms have been implicated in the oxidative burst including a plasma membrane located NADPH oxidase, a cell wall peroxidase, and apoplastic amine oxidase-type enzymes (Grant and Loake, 2000). Observations in our laboratory showed that the treatment with DPI reduced the betacyanin synthesis induced for the *A. tumefaciens* infiltration (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004). Additionally, the same NADPH oxidase inhibitor blocked the *BvGT* expression suggesting that an NADPH oxidase is implicated in the ROS production in red beet leaves infiltrated with bacteria. However, a number of important questions remain unanswered. The analysis of antisense red beet lines would help to assess the potential role of ROS in the production of betacyanins.

Acknowledgments

We thank Dra. Alejandra A. Covarrubias (IBT-UNAM) and Dr. Mario Rodríguez Monroy (CeProBi-IPN) for critical reading of the manuscript. We also thank M. C. Rene Hernández Vargas for automatic sequencing and Dr. Paul Gaytan Colín and M.C. Eugenio López Bustos for oligonucleotide synthesis. Gabriela Sepúlveda-Jiménez thanks COFAA-IPN for the fellowship awarded.

References

- Bairoch A. 1992. Prosite: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Research* **19**, 2241-2245.
- Chong J, Baltz R, Fritig B, Saindrenan P. 1999. An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Letters* **458**, 204-208.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779-795.
- Ditt RF, Nester EW, Comai L. 2001. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy Science USA* **98**, 10954-10959.
- Grant JJ, Loake GJ. 2002. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* **124**, 21-29.
- Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF. 2002. Plant's defense and its benefits for animal and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 471-478.

- Heuer S, Vogt T, Böhm H, Strack D. 1996. Partial purification and characterization of UDP-glucose:betanidin 5-O- and 6-O-glucosyltransferases from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N.E.Br. *Planta* 199, 244-250.
- Jones P, Vogt T. 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213, 164-174.
- King E, Ward MK, Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301-307.
- Lamb C, Dixon R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251-275.
- Laurent C, Burdet FX, Zaiko M, Hinz U, Zrýd JP. 2004. Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiology* 134, 265-274.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163, 16-20.
- Mazel A, Levine L. 2002. Induction of glucosyltransferase transcription and activity during superoxide-dependent cell death in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 133-140.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Calvert CM, Dorans A, Roberts MR, Bowles DJ. 1998. A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant Journal* 14, 137-142.

- Pourrat B, Lejeune A, Grand H, Pourrat L.** 1988. Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography. *Journal Food Science* **53**, 294-295.
- Roberts MR, Warner SAJ, Darby R, Lim E-K, Draper J, Bowles DJ.** 1999. Differential regulation of a glucosyltransferase gene homologue during defense responses in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **50**, 407-410.
- Saghai-Marooif MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW.** 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy Science USA* **81**, 8014-8018.
- Sasaki N, Adachi T, Koda T, Ozeki Y.** 2004. Detection of UDP-glucose:cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase activity in four o'clocks (*Mirabilis jalapa* L.). *FEBS Letters* **568**, 159-162.
- Schwartz SJ, Von Elbe JH.** 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high- performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**, 540-543.
- Sepúlveda-Jiménez G, Rueda-Benítez P, Porta H, Rocha-Sosa M.** 2004. Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. In press.
- Strack D, Vogt T, Schliemann W.** 2003. Recent advances in betalains research. *Phytochemistry* **62**, 247-269.
- Steiner U, Schliemann W, Böhm H, Strack D.** 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **208**, 114-124.

Vogt T, Grimm R, Strack D. 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferase from the Solanaceae. *Plant Journal* **19**, 509-519.

Wink M. 1999. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: Wink M, ed. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. England, Sheffield Academic Press Ltd, 1-16.

Wyler H, Meuer U, Bauer J, Stravs-Mombelli L. 1984. Cyclodopa glucoside (2S)-5-(β -D-glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). *Helvetica Chemical Acta* **67**, 1348-1355.

Yamamoto K, Kobayashi N, Yoshitama K, Teramoto S, Komamine A. 2001. Isolation and purification of tyrosine hydroxylase from callus cultures of *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell Physiology* **42**, 969-975.

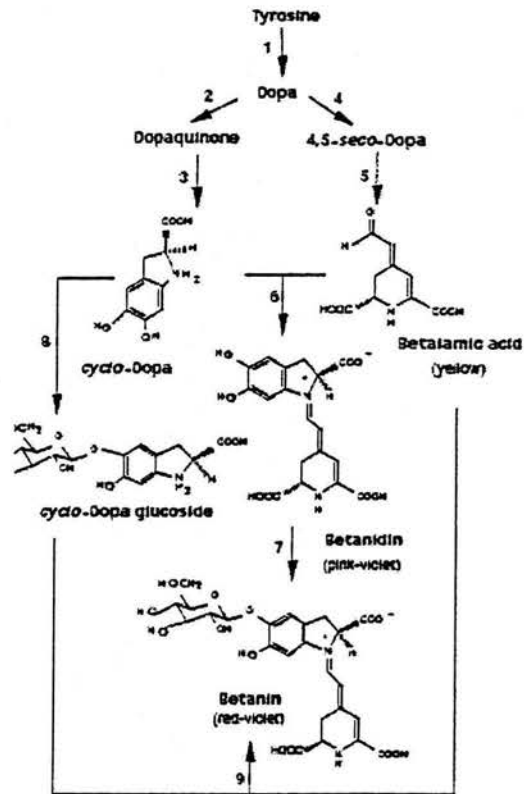


Figure 1. Proposed pathway for the synthesis of betacyanins in plants. (1), Tyrosinase hydroxylating activity. (2), Tyrosinase or polyphenol oxidase activity. (3) Non-enzymatic cyclization reaction. (4) dopa 4,5-dioxygenase. (5) Non-enzymatic cyclization reaction. (6) Non-enzymatic condensation reaction. (7) Betanidin 5-O-GT. (8) cyclo-DOPA 5-O-GT. (9) Non-enzymatic condensation reaction.


```

B. vulgaris .....
D. bellidiformis MGT HSTAPDLHVVF PFLAHGHM PSLDRAKEF AARGVKTTI I TTPLNASNFTKAI EKTRKNT
N. tabacum ..... MGQLHI FFFPVNAHGHI PTLDNAKLF ASRGVKATI I TTPLNEFVFSKAI CRN. KHL
L. esculentum ..... HFFFFPDDAQGHM PTLDNAANVACRGVKATI I TTPLNESVFSKAI ERN. KHL

B. vulgaris ..... DMFLPVAT
D. bellidiformis VFSFPSEEAGLPLGCENLEQAMAI GANNEFFNAANEDEKEQLENFVVKTRPNCLVADMFFTVAA
N. tabacum EI KFPAVENGLPEECERLDQI PSDEKLPNFF KAVAMNCEPLEQLHEECPDCLSDMFLPVTT
L. esculentum ELKFPKAKENDLPEDCERLDLVP SDDKLPNFLKAAAMV KDFEELHEGECRPDCLVSDMFLPVTT

B. vulgaris I P R E E I F H C I S F F A H C T K D M M M Y C F Y K H V S S I E D P I V M F Y F I N E I T L I E S C N P E D L M K H I Q S E
D. bellidiformis I P T E V F H G F S F F A C C A K E V N W R Y K P Y K A V S S D T E V F S L F L P H E V K M T R L C V P E S M R K G E T H
N. tabacum I P R A V F H G T S F F A L O V E N S V R L N K P E K M V S S D S E T F V V P D L P H E I K L I R T C V S P F E R S G E T A
L. esculentum I P R E V F H C T S Y F A L O V C D T I R R N K P E K M V S S D I E T F V V P D L P H E I R L I R T C V S P F E Q S C E T G

B. vulgaris H C E S E L Q C Y G M I V N S F Y E L E P D Y V D F E K K K L G R R A T H I G P V S C N K S E K D K A C R G G E A S M N E
D. bellidiformis H R E L E R K S Y G M I V N S F Y E L E P D Y A D F L R K E L G R R A T H I G P V S E C N R S I E D K A C R G R C T S I D E
N. tabacum V R E S D S K S Y G W F N S F Y E L E T D Y V E H Y T K V L G R R A T A I G P L S M G N R D I E D K A E R G K K S S I D K
L. esculentum V R E S D A K S Y G M I F N S F Y E L E S D Y V E H Y T K M V G R K N M A I G P L S E C N R D I E D K A E R G R K S S I D E

B. vulgaris N L R X P X S V I V I C F G S L A N F I V P G L C E F F K A L E A L E Y D F I W V E I D D R I T K N I E W F L G F R K I T
D. bellidiformis N S K K P D S V I V I C F G S T G H L I A P O L H E E A T A L E A S G Q D F I W A V R G D H G Q G N S E E W L P P C Y E H R L
N. tabacum D S K K P S S V V I I C F G S V A N F T A S C L H E L A N G V E A S G C E F I W V R T E L . . . D N E D W L P E C F E E R T
L. esculentum D S K K S S E V V C F G S T A D F T T A C N C E L A M G L E A S G Q D F I W V I R T G . . . N E D W L P E C F E E R T

B. vulgaris C G V P C V L I L E H E A T C A F V T H C G W N S T L E G I S A G V P M T W F V F A E C F Y N E K L V N H L K I G T P V
D. bellidiformis R G W A P C V L I L E H E A T C G F E T H C G W N S A L E G I S A G V P M T W F T F A E Q F H N E C L I T C I L K V G V A V
N. tabacum R G W A P C V L I L D H E S V C A F V T H C G W N S T L E G V S C G V P M T W F V F A E C F E N E K L V T E V L K T C A C V
L. esculentum R G W A P C S V I L D H E A I C A F V T H C G W N S T L E G I S A G V P M T W F V F A E C F E N E K L V T E V M R S G A C V

B. vulgaris V H S I E D V V E H N D I E K V I K D I V E G D I T C A M : N R A K N L K E M A R K A M E E G G S S . . . . .
D. bellidiformis K P S I E D V R K A E D I E K A V R E V V V G E E G E E R R R A K K L K E M A W R A I E E G G S S Y S D L S A L I E E I K G
N. tabacum S A S E G . V K R E A I A K A I K R V M V S E E A D C F R N R A K A Y K E M A R K A I E E G G S S Y T G L T T L I E D I S T
L. esculentum T A S E G . V K R E A I A K A I K R V M A S E E T E G F R S R A K E Y K E M A R E A I E E G G S S Y N G W A T L I C D E I T S

```

Figure 2. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of the *BvGT* and other plant glucosyltransferases. Black shading shows identical amino acids and gray shading indicates similar amino acids. The underlined sequence correspond to the region conserved among the plant secondary product glucosyltransferase (PSPG box) of *B. vulgaris* (accession number T525033), *D. bellidiformis* (accession number Y18871), *N. tabacum* (accession number U32643), and *L. esculentum* (accession number X85138).

Falta página

N° 65

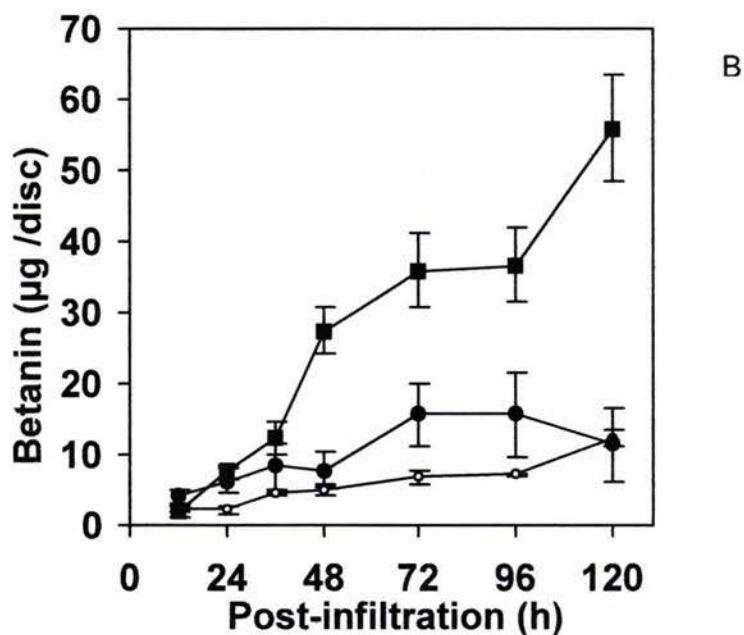
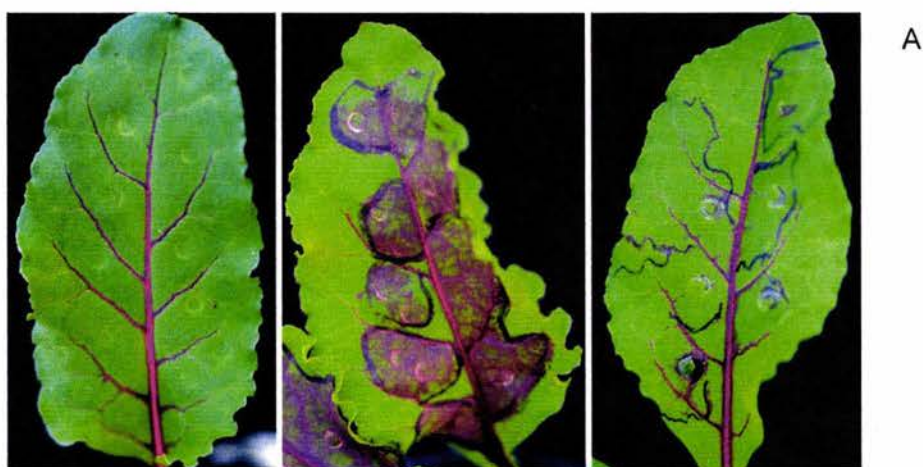


Figure 3. Transient expression of an antisense *BvGT* construct affects the accumulation of betanin induced for *A. tumefaciens*. A, MgSO₄-infiltrated leaf does not show visible betacyanin accumulation (left). In an infiltrated leaf with *A. tumefaciens* carrying only vector, there is a development of red-violet pigmentation in the infiltrated zone (center), whereas, in leaves with transient expression of *AsBvGT* construct do not show a red-violet pigmentation (right). B, Time-course of betanin accumulation in *A. tumefaciens*-infiltrated plants. Content of betanin was measured from MgSO₄-infiltrated (O), *A. tumefaciens*-infiltrated with empty vector (■) and *A. tumefaciens*-infiltrated leaves with the *AsBvGT* construct (●), at the indicated times. Each point corresponds to six determinations for each time from three different experiments.

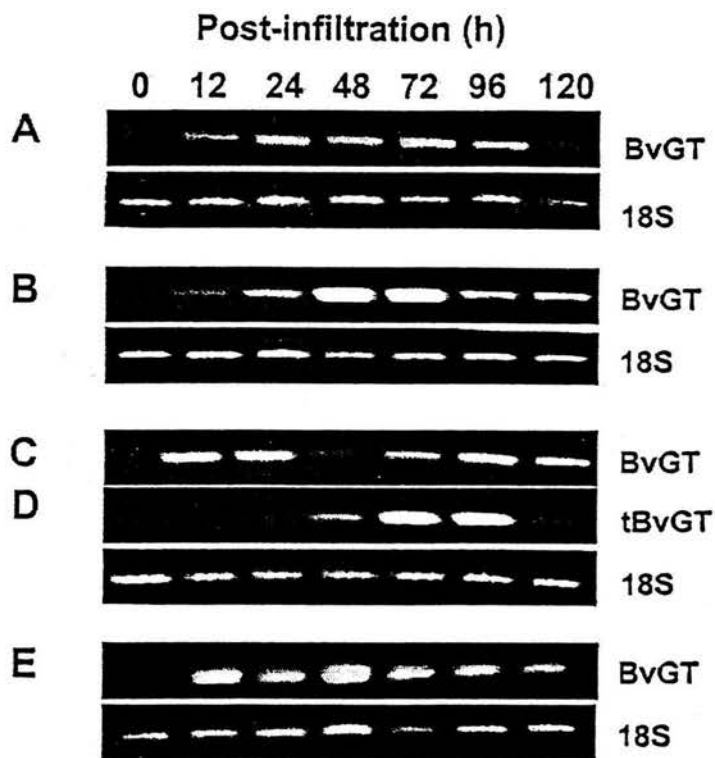


Figure 4. Analysis by RT-PCR of the accumulation of *BvGT* mRNA in leaves infiltrated with bacteria. Red beet leaves were infiltrated with 10 mM MgSO₄ solution (A), or with *A. tumefaciens* carrying vector (B). In *A. tumefaciens*, infiltrated samples with the *AsBvGT* construct (C and D), the analysis of the accumulation of the endogenous transcript (*BvGT*) was done synthesizing the cDNA first strand with the reverse primer (C). For the analysis of the accumulation of the mRNA of the antisense transgene (*tBvGT*), the synthesis of the cDNA first strand was done using the forward primer (D). The accumulation of *BvGT* mRNA in leaves infiltrated with *P. syringae* is also shown (E). The amplification of an attenuated product of the 18S rRNA was used as the RNA loading control.

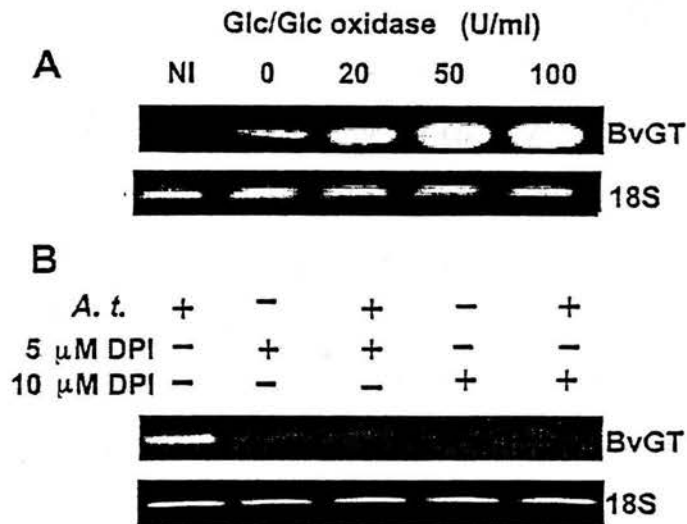


Figure 5. The expression *BvGT* mRNA in leaves infiltrated with the Glc/Glc oxidase system or co-infiltrated with *A. tumefaciens* and DPI for 48 h. A, the accumulation of the *BvGT* transcript in non-infiltrated leaves (NI), in infiltrated leaves with Glc alone (0) or in combination with one of three Glc oxidase concentrations (20, 50, and 100 U ml⁻¹). B, the *BvGT* mRNA accumulation with *A. tumefaciens* and DPI (5 or 10 μ M).

6.3 Efecto de metil jasmonato en cultivos verdes de betabel en suspensión.

Se conoce que una de las respuestas de las plantas a diversas condiciones de estrés (herida, ataque de patógenos, desecación, salinidad) o de desarrollo (senescencia), es la síntesis de jasmonatos que son inductores a su vez de la síntesis de metabolitos secundarios tales como las antocianinas, flavonoides y alcaloides (Wasternack y Parthier, 1997). Aunque no se sabe si tales jasmonatos inducen la síntesis de betalaínas, hay que recordar que estos metabolitos secundarios son clasificados como alcaloides (Roberts y Strack, 1999). Así mismo, que la herida y la infiltración con bacterias indujeron la síntesis de betacianinas en las hojas de betabel (apartado 6.1, figuras 2 y 3).

Por tanto, para probar si los jasmonatos pudieran estar participando en la inducción de la biosíntesis de betacianinas, se obtuvieron cultivos en suspensión de la línea celular verde, se les adicionó metil jasmonato (100 μM) y se tomaron muestras a las 6, 12, 24, 48 y 144 h (etapa final del crecimiento del cultivo), que fueron analizadas espectrofotométricamente.

Material biológico. Los cultivos de callos verdes en suspensión se obtuvieron sembrando 4g de peso fresco de callos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 30 mL de medio de cultivo Gamborg's B₅ (Gamborg y col, 1968), con sacarosa al 3%, 0.2 mg/L de cinétina, 0.02 mg/L de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético y un pH del medio de 5.5. Los cultivos fueron incubados a 24°C, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad e iluminación de 32 W/m².

Para obtener los cultivos disgregados, los agregados mayores a 25 μm se separaron por filtración y el inóculo se preparó creciendo las células disgregadas en matraces de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitación rotatoria a 100 rpm.

Tratamiento con metil jasmonato. Los cultivos verdes en suspensión fueron subcultivados en medio líquido fresco y al quinto día de crecimiento se les agregó una alícuota de un stock de metil jasmonato (Apex Organics, Leicester, UK) disuelto en N, N-dimetil-formamida para dar en los cultivos una concentración final de 100 μM del compuesto. A las 6, 12, 24, 48 y 144 h de iniciado el tratamiento se tomaron muestras de 3 mL para la determinación de betacianinas y de peso fresco. Los controles para cada uno de los tiempos fueron cultivos sin metil jasmonato y cultivos con solamente el solvente (N, N-dimetil-formamida).

Determinación de betacianinas. Un mL de cultivo en suspensión fue centrifugado a 3000 rpm X 10 min y el paquete celular fue resuspendido con 1.0 mL de agua y homogeneizado con un tubo con pistilo de vidrio. Los extractos fueron centrifugados a 10 000 g por 10 min y se midió la absorbancia a 536 nm del sobrenadante. La cuantificación de las betacianinas se realizó considerando un coeficiente de extinción molar de $65 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, reportado para la betanina (Schwartz y von Eibe, 1980).

Resultados. Los perfiles de absorción entre 350 y 700 nm de los extractos de los cultivos de células tratados con metil jasmonato, indicaron que a las 12 h comienza a aparecer un aumento en la absorbancia que abarca entre los 450 y 550 nm y que se hace más evidente a las 24, 48 y 144 h de tratamiento (Figura 1). Estos aumentos en la absorbancia abarcan las longitudes de onda a las que absorben las betacianinas, por lo que se evaluó el contenido de los pigmentos. El contenido de las betacianinas a las 24, 48 y 144 h de inducción fueron de 342.6, 784.5 y 1265.6 μg

de betacianinas/g de PF, respectivamente. Por lo cual, estos resultados sugieren que metil jasmonato podría inducir las síntesis de betacianinas en cultivos verdes.

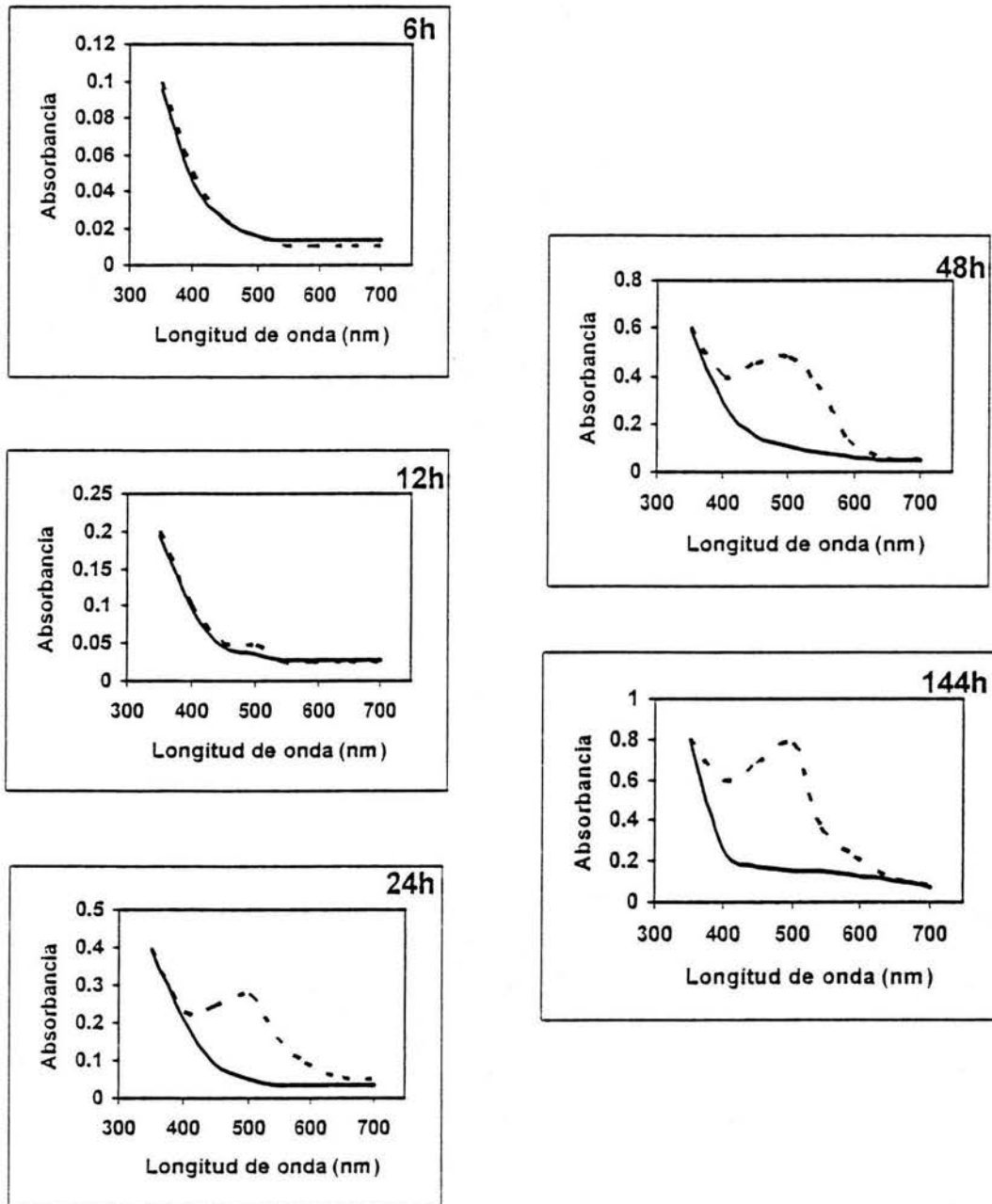


Figura 1. Espectros de absorción de cultivos verdes de betabel en suspensión sin (—) y con 100 μM de metil jasmonato (---).

6.4 Análisis de la expresión diferencial de los ADNc obtenidos de los callos verdes y rojos de betabel.

Con el objetivo de aislar genes que codifican para las enzimas de la ruta de síntesis de betacianinas y así estudiar los efectos de la herida ó la infiltración con bacterias, en este trabajo se planteó usar como modelo de estudio los callos verdes y rojos (productores de betacianinas) de *B. vulgaris*, para obtener a través de la técnica de "differential display" los ADNc de los ARNm que se expresan diferencialmente en los dos tejidos.

Material biológico. Los cultivos de callos rojos y verdes que se usaron, fueron los obtenidos por Ontiveros (1994). Este tejido fue mantenido por resiembras periódicas cada 20 días en el medio de cultivo de Gamborg's B₅ (Gamborg y col, 1968), con sacarosa al 3%, 0.2 mg/L de cinétina, 0.02 mg/L de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético, 1.2 g/L de fitagel y un pH del medio de 5.5. Los cultivos fueron incubados a 24°C, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad e iluminación de 32 W/m².

Extracción del ARN total. Un gramo de cultivo de callo rojo o verde fue pulverizado en un mortero con nitrógeno líquido y el ARN total fue extraído con el buffer de extracción conteniendo: isotiocianato de guanidina (5M), laurilsarcocianato de sodio (0.5%), citrato de sodio (50 mM, pH 7.0), 2-mercaptoetanol (72 mM) y de acuerdo al método descrito por Kai-Wun y col (1991). Su concentración se determinó por su absorbancia a 260 nm y los ARNs totales fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

"Differential display". El protocolo que se usó para desarrollar el "differential display" fue el descrito por Liang y Pardee (1995), el cual consiste de las siguientes etapas:

a) Tratamiento con DNasa I del ARN total.

Para digerir el ADN presente en las muestras de ARN total obtenido de callo rojo o verde, en un ensayo de reacción de 50 μ L se trataron 50 μ g de ARN con 10 U de DNasa I libre de RNasa (Sigma Chemical Company), 10 U de inhibidor de RNasa de placenta humana (Sigma Chemical Company), con el buffer y las condiciones recomendadas para la DNasa I. Después de incubar a 37°C por 30 min, la DNasa I se inactivó con fenol/cloroformo y el ARN se precipitó con acetato de sodio 3M, etanol y a -70°C. Se cuantificó el ARN por su absorbancia a 260 nm y se revisó su integridad por electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

b) Ensayo de transcriptasa reversa.

Los ADNc se sintetizaron a partir de 1.0 μ g de ARN tratado con DNasa I, con 200 U de transcriptasa reversa murina MoMuLV (Gibco-BRL), con dNTPs y el buffer a las concentraciones recomendadas para la enzima. Además se usó una mezcla de "primers oligo-dT" anclados degenerados: 5' T₁₂MN 3' (Operon Technologies Inc., Alameda CA) donde MN son los nucleótidos GC, AC y CC.

c) Amplificación de los ADNc por PCR.

Una mezcla de reacción para Taq DNA polimerasa (Boehringer Mannheim) fue preparada de acuerdo a las condiciones sugeridas para la enzima, conteniendo (α -³²P) dCTP (Amersham Pharmacia Biotech), la mezcla de los "primers" 5' T₁₂MN 3' en combinación con el decámero arbitrario OPM 3 (Operon Technologies Inc., Alameda CA) con la secuencia: GGGGGATGAG. El programa usado para la amplificación de los ADNc consistió de 40 ciclos a 94°C (30 seg), 40°C (2 min) y 72°C (30 seg) y de un ciclo a 72°C (5 min).

d) Separación por electroforesis en geles de poliacrilamida de los productos de PCR.

Alícuotas de 3.0 μ L de los productos del PCR mezcladas con buffer de carga fueron corridas en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6%, a 60W y por 4 h. Después de la electroforesis, el gel se transfirió a una hoja de papel Whatman 3 MM, se secó por calor y se expuso a una película fotográfica de rayos X (X-KOmat, Kodak) a -70°C.

e) Recuperación, reamplificación y clonación de los ADNc expresados diferencialmente.

Después de localizar las bandas de ADNc que se expresaron diferente entre las muestras de callo rojo y verde, se procedió a cortarlas del gel y reamplificar el ADNc en un nuevo ensayo de PCR bajo las mismas condiciones y con la combinación de mezcla de "primers oligo-dTs" y el decámero OPM 3 usada en la primera amplificación. Las bandas de ADNc que se reamplificaron fueron nuevamente separadas en un gel de agarosa, recuperadas del gel con el GFXTM PCR purification kit (Amersham, Pharmacia Biotech) y clonadas en *E. coli* usando el "pMOS blue blunt ended cloning Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) y que se secuenciaron con un secuenciador automático (modelo 377-18, PE Applied Biosystems, EUA).

"Northern blot". En un gel de agarosa al 1.2% con formaldehído se corrieron por carril 50 μ g de ARN total de callo rojo o verde. El gel se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech), se fijó en un secador de geles a 80°C por 2 h y con NaOH (0.05 M) por 5 min. La membrana de nylon se hibridó contra el ADNc de la clona 18 o de la 19, que se marcaron radiactivamente con el sistema de marcaje rediprimeTMII (Amersham Pharmacia Biotech). Las condiciones

de hibridación fueron: 65°C por 16 h en un buffer conteniendo fosfato de sodio (0.3 M, pH 7.2), SDS (7%) y EDTA (1 mM). Al término de ésta incubación, la membrana se lavó dos veces con SSC 3X y SDS (0.1%) a 65°C por 30 min en el primer lavado y por 10 min en el segundo lavado. Se secó y se dejó exponiendo contra una película de rayos X (X-KOmat, Kodak) a -70°C.

"*RACE*". Para conocer el extremo 5' de los ADNc de las clonas 18 y 19 se usó la técnica conocida como "*RACE*" propuesta por Frohman y col, (1988) con las siguientes modificaciones. Se purificó poli(A)⁺ARN de acuerdo al método descrito por Kingston (1994). El cual, se usó para obtener ADNc en una reacción con la enzima transcriptasa reversa MoMuLV (Gibco-BRL) y usando un "*primer*" específico ("*primers*": 18-1 o 19-1, Figura 10) del ADNc a amplificar en su extremo 5'. Al ADNc resultante se le añadió una secuencia de poliG usando dGTP y la enzima deoxinucleotidil-transferasa-terminal (Boehringer, Mannheim). El producto se amplificó en una reacción de PCR y utilizando como primer adaptador un oligodC y un segundo primer específico del gen ("*primers*: 18-2 o 19-2, Figura 10). Después de la amplificación, el producto fue clonado en *E. coli* usando el pMOS blue blunt ended cloning Kit (Amersham Pharmacia Biotech) y secuenciado con un secuenciador automático (modelo 377-18, PE Applied Biosystems, EUA).

Resultados.

En la figura 1, se muestra el patrón de bandas de los ADNc amplificados por "differential display" de los ARNm obtenidos de los callos verdes y rojos de betabel. Como se puede observar dos ADNc, llamados 18 y 19 fueron expresados preferentemente en los callos rojos que en los verdes, por lo cual estas bandas de ADNc fueron clonadas y su secuencia es mostrada en la figura 2. El análisis de las

secuencias de los ADNc de las clonas 18 y 19 sin embargo, indicó que no hay similitud con otras secuencias reportadas en el banco de genes.

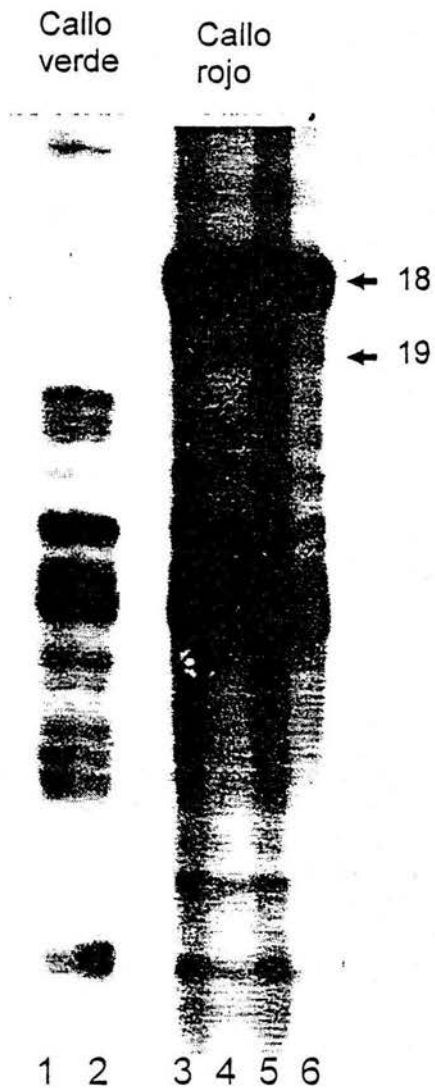


Figura 1. Patrón de bandas de los ADNc amplificados por "differential display" de los ARNm obtenidos de callos verdes (carriles 1 y 2) y callos rojos (carriles del 3 al 6) de betabel. Los ADNc 18 y 19 fueron expresados preferentemente en los callos rojos.

Clona 18 (281 pb)

```
GGGGGATGAG ACACGGGTGG CTATGGACAT GGTGGTTATG GACACGGCGG ATATGGAGGT 60
CACTACCCAC CAAAGGAAGA AATTAACAAC TAGTACATGT TAGTGAATGA AGCTATCTAG 120
Primer 18-2
TTTGCTTTCT GATAGGCGTG CATGCAAATA TGCAGGATGA CAAAAATGAA CTACTTTTAC 180
Primer 18-1
AAGTGAATAT GTATTTTAAT AAGCATGTCT AATGAAATGT ATCCCATCT TTATGCTTAT 240
GTAATGAAGT AATATAAAGT CTTTGTGCGC AAAAAAAAAA A
```

Clona 19 (278 pb)

```
GGGGGATGAG GTATTTAATG TAAACAAAAA TATGTAGTTG TGTATATTCA GCATGTTGTT 60
AGCAGCCCCC TCCCTGCCAC AACGAAAGGT AGATATTGAA AAGAACAGTT TACACTTAAG 120
Primer 19-2
AATTAGGATG GAGCATTTTG CAAAGAATTG TGAAAATTTT GATTTCAGAT TGCAATTATT 180
GAGGTTAAAA TAGGAAATGT ATAGATGAGT CAGAAAATGT TTCCTATTAT ATTGATTTTT 240
Primer 19-1
ATGTTTATAT GTTGACAGT TCTGCGTAAA AAAAAAAAA
```

Figura 2. Secuencia de nucleótidos de los ADNc de las clonas 18 y 19.

Por otra parte, para reevaluar la acumulación del ARNm del ADNc de las clonas 18 y 19 se realizó un análisis por "Northern blot". Como se muestra en la figura 3A, hay una mayor acumulación del ARNm del ADNc de las clona 18 en los callos rojos que en los callos verdes. En el caso del ADNc de la clona 19, no se obtuvo el "Northern blot" respectivo. Por lo cual, en base a la secuencia del ADNc de la clona 19, se diseñaron oligonucleótidos específicos y se obtuvo por RT-PCR el patrón de acumulación del ARNm. Como se muestra en la figura 3B, también para éste ADNc hay una mayor acumulación de ARNm en los callos rojos que en los callos verdes.

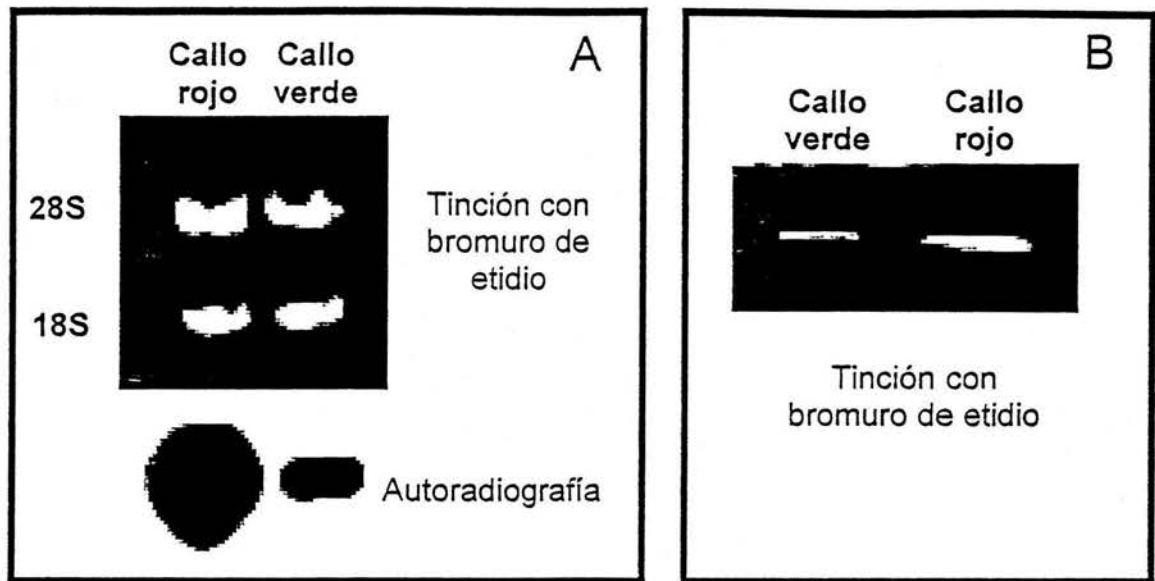


Figura 3. Acumulación del ARNm de las clonas 18 (A) y 19 (B) en callos rojos y verdes de betabel.

Con la amplificación del extremo 5' del ADNc de la clona 18 por la técnica de "RACE" se obtuvo un producto de aproximadamente 805 pb de peso molecular que fue clonado (clona 18-RACE) y secuenciado. Para el caso del ADNc de la clona 19 se realizaron los ensayos respectivos, pero bajo la serie de condiciones de PCR que fueron probadas no se obtuvo un producto definido. No obstante, se deberán probar otras condiciones tanto para la síntesis del ADNc así como de su amplificación por PCR.

La secuencia de nucleótidos de la clona 18-RACE fue ensamblada con la secuencia hacia el extremo 3' (clona 18) obtenida con el análisis de "differential display". El producto fue un ADNc de 1111 pb que se muestra en la figura 4. Al

analizar esta secuencia de nucleótidos, se encontró en el nucleótido 79 un sitio de inicio de la traducción, seguido de un sitio de terminación localizado en la base 235, de un segundo sitio de inicio de la traducción en el nucleótido 382 y de uno de terminación en la base 931 (Figura 5). La presencia de dos sitios de inicio de la traducción, dio la pauta para revisar si parte de este fragmento es producto de un artefacto creado durante el ensayo de PCR. Con este fin, se sintetizaron dos oligonucleótidos, uno hacia el extremo 5' (5'-62) abarcando el primer sitio de inicio de la traducción y otro complementario hacia el extremo 3' (3'-704) y cuyas secuencias son mostradas en la figura 5. Se realizó un ensayo de RT-PCR, utilizando ARN de callo rojo y el oligonucleótido 3'-704 para la reacción de RT, mientras que para la reacción de PCR se utilizaron ambos oligonucleótidos. También esta reacción de PCR se hizo con ADN de hoja de betabel, pero en ambos casos, no se encontraron los productos deseados. Como un control, con los dos oligonucleótidos se realizó una reacción de PCR utilizando al ADNc de la clona 18-*RACE*, con lo que se obtuvo efectivamente el producto de 805 pb. Así mismo, el análisis de la secuencia desde el nucleótido 79 al 382 mostró la ausencia de intrones. Descartando la posibilidad de que alguna de las secuencias de nucleótidos ubicadas entre los dos supuestos sitios de inicio de la traducción, corresponda a la secuencia de un intrón. Estos resultados mostraron que efectivamente parte del extremo 5' obtenido del "*RACE*" es producto de un artefacto probablemente producido durante la amplificación por PCR.

CCTTTGGTGG	GTAGTGACAA	AAGCATAACA	TTTAATTATG	AGTTAAAACA	TCCAATTTTC	60
CACATCCCAT	AAGCGTTCAT	GTGCGGATTA	TATCTTTTTT	CTTTTTCTTC	TGTTTTGAGA	120
CTTTTGAATC	ACAAGGATCA	CAAGATCTTG	GCTATCTTGC	CATTTTTTAC	CAATTGTCAA	180
CACTATTTCA	CCTACTGTCA	TCCATTCTAT	CTGCTTTATT	TTATTTATCT	TTATTGATCC	240
TATAGGCTAT	TAATATGCCT	ATTAATATGC	CTATATATAT	GGTCTTACC	TTGGCACACT	300
TCTCATCCAA	AGCAACTCAA	AGAAGACAAA	GCTCTTAAAA	AAAAAAAAAA	TCCACGAGTA	360
CTCACTTGTG	AGTTGATAAA	AATGGCCTAC	TCTAAGGCAT	TTCTCCTTCT	TGGCCTTCTA	420
TCTTTTGTGC	TCCTTGTTTC	GTCTCGTGAA	CTCGCCGAGT	CTACTTCTAC	TGAAACTCAG	480
GAGTCAAAGG	ACTTAGATGG	ATATGGTCAC	GGTGGTTATG	GTTATGGACA	TGGCGGTTAT	540
GGCCATGGCG	GCTATGGTCA	TGGTGGCTAT	GGACATGGTG	GTGGATACGG	TGGCCACTAT	600
CCACCAGAAG	AAGAAGAGAA	GGATGTGATG	GAAAATGTTG	AGCCACAGGG	TTATGGATAT	660
GGTGGTTACG	GTCATGGTGG	CTATGGACAT	GGTGGCTATG	GACATGGTGG	TGGATATGGT	720
CATGGTGGTC	ATGGTCATGG	TGGGTACGGC	CAAGGTGGCA	ATGGTCATGG	TGGATATGGA	780
CATGGTGGCT	ATGGACATGG	TGGTTATGGA	CACGGCGGAT	ATGGAGGTCA	CTACCCACCA	840
<u>AAGGAGGTGG</u>	<u>CTATGGACAT</u>	<u>GGTGGTTATG</u>	<u>GACACGGCGG</u>	<u>ATATGGAGGT</u>	<u>CACTACCCAC</u>	900
<u>CAAAGGAAGA</u>	<u>AATTAACAAC</u>	<u>TAGTACATGT</u>	<u>TAGTGAATGA</u>	<u>AGCTATCTAG</u>	<u>TTTGCTTTCT</u>	960
<u>GATAGGCGTG</u>	<u>CATGCAAATA</u>	<u>TGCAGGATGA</u>	<u>CAAAAATGAA</u>	<u>CTACTTTTAC</u>	<u>AAGTGAATAT</u>	1020
<u>GTATTTAAT</u>	<u>AAGCATGTCT</u>	<u>AATGAAATGT</u>	<u>ATCCCATCT</u>	<u>TTATGCTTAT</u>	<u>GTAATGAAGT</u>	1080
<u>AATATAAAGT</u>	<u>CTTTGTGCGC</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>A</u>			1111

Figura 4. Secuencia de nucleótidos del producto obtenido por RACE (azul) y su ensamble con la secuencia de la clona 18 (rojo) aislada por "differential display". La secuencia subrayada es la común entre los dos ADNc.

Tomando en cuenta el nucleótido 382 como el sitio de inicio de la traducción, se tiene un marco de lectura abierta de 549 nucleótidos que codificarían para un

polipéptido de 183 aminoácidos. La secuencia deducida de aminoácidos (Figura 5) indica que es una proteína rica en glicina (25.2%), tirosina (9.57%) e histidina (8.70%) arreglados en mayor frecuencia como motivos GGYGH (cuadro 1).

Por su parte, el análisis de homología de la secuencia deducida de aminoácidos (Figura 6) indicó que el polipéptido tiene similitud con proteínas ricas en glicina (PRG). Estas proteínas incluyen a una de *Cicer arietinum* inducida por herida y ácido salicílico, las de alfalfa (*Medicago sativa*) inducidas por ABA, frío, sequía, salinidad y herida, así como una PRG de *Hordeum vulgare* con similitud a citoqueratinas de humanos (cuadro 2).

Para conocer si el ARNm del ADNc de la clona 18 se acumula en otros tejidos se realizó un "Northern blot" usando como sonda el ADNc de la clona 18 y ARN de raíz de almacenamiento, raíces secundarias, callo rojo, callo verde y hojas de betabel. Se encontró una fuerte acumulación del ARNm en el callo rojo, seguida de una menor acumulación en el callo verde, en raíces y en hojas (Figura 7).

P	L	V	G	S	D	K	S	I	T	F	N	Y	E	L	K	H	17		
CCT	TTG	GTG	GGT	AGT	GAC	AAA	AGC	ATA	ACA	TTT	AAT	TAT	GAG	TTA	AAA	CAT	51		
P	I	F	H	I	P	.	A	F	M	S	G	L	Y	L	F	S	F	S	36
CCA	ATT	TTC	<u>CAC</u>	<u>ATC</u>	<u>CCA</u>	<u>TAA</u>	<u>GCG</u>	<u>TTC</u>	<u>ATG</u>	TCC	GGA	TTA	TAT	CTT	TTT	TCT	TTT	TCT	108
5'-62																			
S	V	L	G	L	L	N	P	K	D	H	K	I	L	A	I	L	P	F	55
TCT	GTT	TTG	GGA	CTT	TTG	AAT	CCC	AAG	GAT	CAC	AAG	ATC	TTG	GCT	ATC	TTG	CCA	TTT	165
F	T	N	C	Q	H	Y	F	T	Y	C	H	P	F	Y	L	L	Y	F	74
TTC	ACC	AAT	TGT	CAA	CAC	TAT	TTC	ACC	TAC	TGT	CAT	CCA	TTC	TAT	CTG	CTT	TAT	TTT	222
I	Y	L	Y	.	S	Y	R	L	L	I	C	L	L	I	C	L	Y	I	93
ATT	TAT	CTT	TAT	<u>TGA</u>	TCC	TAT	AGG	CTA	TTA	ATA	TGC	CTA	TTA	ATA	TGC	CTA	TAT	ATA	289
W	F	F	P	W	H	T	S	H	P	K	Q	L	K	E	D	K	A	L	112
TGG	TTC	TTC	CCT	TGG	CAC	ACT	TCT	CAT	CCA	AAG	CAA	CTC	AAA	GAA	GAC	AAA	GCT	CTT	336
K	K	K	K	N	P	R	V	L	T	C	E	L	I	K	M	A	Y	S	131
AAA	AAA	AAA	AAA	AAT	CCA	CGA	GTA	CTC	ACT	TGT	GAG	TTG	ATA	AAA	<u>ATG</u>	GCC	TAC	TCT	393
K	A	F	L	L	L	G	L	L	S	F	V	L	L	V	S	S	R	E	150
AAG	GCA	TTT	CTC	CTT	CTT	GGC	CTT	CTA	TCT	TTT	GTG	CTC	CTT	GTT	TCG	TCT	CGT	GAA	450
L	A	E	S	T	S	T	E	T	Q	E	S	K	D	L	D	G	Y	G	169
CTC	GCC	GAG	TCT	ACT	TCT	ACT	GAA	ACT	CAG	GAG	TCA	AAG	GAC	TTA	GAT	GGA	TAT	GGT	507
H	G	G	Y	G	Y	G	H	G	G	Y	G	H	G	G	Y	G	H	G	188
CAC	GGT	GGT	TAT	GGT	TAT	GGA	CAT	GGC	GGT	TAT	GGC	CAT	GGC	GGC	TAT	GGT	CAT	GGT	564
G	Y	G	H	G	G	G	Y	G	G	H	Y	P	P	E	E	E	E	K	207
GGC	TAT	GGA	CAT	GGT	GGT	GGA	TAC	GGT	GGC	CAC	TAT	CCA	CCA	GAA	GAA	GAA	GAG	AAG	621
D	V	M	E	N	V	E	P	Q	G	Y	G	Y	G	G	Y	G	H	G	226
GAT	GTG	ATG	GAA	AAT	GTT	GAG	CCA	CAG	GGT	TAT	GGA	TAT	GGT	GGT	TAC	GGT	CAT	GGT	678
G	Y	G	H	G	G	Y	G	H	G	G	Y	G	H	G	G	H	G	245	
GGC	TAT	GGA	CAT	GGT	GGC	TAT	GGA	<u>CAT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGA</u>	<u>TAT</u>	<u>GGT</u>	<u>CAT</u>	GGT	GGT	CAT	GGT	735
3'-704																			
H	G	G	Y	G	Q	G	G	N	G	H	G	G	Y	G	H	G	G	Y	264
CAT	GGT	GGG	TAC	GGC	CAA	GGT	GGC	AAT	GGT	CAT	GGT	GGA	TAT	GGA	CAT	GGT	GGC	TAT	792
G	H	G	G	Y	G	H	G	G	Y	G	G	H	Y	P	P	K	E	V	283
GGA	CAT	GGT	GGT	TAT	GGA	CAC	GGC	GGA	TAT	GGA	GGT	CAC	TAC	CCA	CCA	AAG	GAG	GTG	849
A	M	D	M	V	V	M	D	T	A	D	M	E	V	T	T	H	Q	R	302
GCT	ATG	GAC	ATG	GTG	GTT	ATG	GAC	ACG	GCG	GAT	ATG	GAG	GTC	ACT	ACC	CAC	CAA	AGG	906
K	K	L	T	T	S	T	C	.	.										963
AAG	AAA	TTA	ACA	ACT	AGT	ACA	TGT	<u>TAG</u>	<u>TGA</u>	ATG	AAG	CTA	TCT	AGT	TTG	CTT	TCT	GAT	963
AGG	CGT	GCA	TGC	AAA	TAT	GCA	GGA	TGA	CAA	AAA	TGA	ACT	ACT	TTT	ACA	AGT	GAA	TAT	1020
GTA	TTT	TAA	TAA	GCA	TGT	CTA	ATG	AAA	TGT	ATC	CCC	ATC	TTT	ATG	CTT	ATG	TAA	TGA	1077
AGT	AAT	ATA	AAG	TCT	TTG	TGC	GCA	AAA	AAA	AAA	A								1111

Figura 5. Secuencia de nucleótidos y la deducida de aminoácidos del ensamblaje de los ADNc aislados por "differential display" y por "RACE". Los sitios de inicio y final de la traducción son indicados en rojo y en azul, respectivamente. Las secuencias subrayadas corresponden a los oligonucleótidos 5'-62 y 3'-704.

Cuadro 1. Composición de la secuencia deducida del péptido de 183 aminoácidos.

Composición deducida de aminoácidos (%)		
Gly 25.22	Ala 2.61	Ser 3.91
Thr 4.78	Val 3.91	Leu 8.26
Ile 1.74	Pro 3.48	Cys 1.74
Met 3.04	His 8.70	Tyr 9.57
Asp 3.04	Glu 6.09	Lys 6.09
Arg 1.30	Asn 1.30	Gln 2.17
Phe 1.74	Trp 0.87	TER: 0.43

Cuadro 2. Homología de la secuencia deducida de aminoácidos de la PRGBv con otras proteínas ricas en glicina.

Número de acceso en el banco de genes	Proteína rica en glicina	Identidad (%)	Similitud (%)
L03708	<i>Medicago sativa</i>	55.6	59.8
S40947	<i>Medicago sativa</i>	55.6	59.8
AJ012829	<i>Cicer arietinum</i>	54.6	57.5
M74189	<i>Medicago sativa</i>	50.6	57.3
X52580	<i>Hordeum vulgare</i>	49.7	54.5

```

PRGMs2 ~~~~~HGGH: 4
PRGMs3 ~~~~~HGGH: 4
PRGMs1 MDSKKA I L M L S L L A M A L I S S V M S A R D L T E T S T D A K K E V V E K T N E V N D A K Y G G G Y N H G G G Y : 60
PRGCa ~~~~~EVSARDLTEISSNTEKDVAEKKNEVTDANY.DGFNGGGNY: 39
PRGHv ~~~~~MASKSKGLVVLALLLAAAILVASADEHPQAKKEENEAGVENF: 42
PRGBv ~~~~~:

PRGMs2 G.GGGY.NGGGGHGGHGGGGYNGGGGGHGGHGGGAESVAVQTEEKTNEVNDAKYG...GGG: 58
PRGMs3 G.GGGY.NGGGGHGGHGGGGYNGGGGGHGGHGGGAESVAVQTEEKTNEVNDAKYG...GGG: 58
PRGMs1 N.GGGY.NHGGGY.NHGGGGYHNGGGGYNHG.....G...GGY: 92
PRGCa GNGGGYPSNNGGGNYGHGGGNYGNNGGGNYGHGGNGGGNYGNNGGGNYGHGGGNYGHGSGNGGG: 99
PRGHv FHGGG.GHHGHRGGHGGGGYGGGGGYGGGGG.....YPGGGGGYG.GGGGGY: 89
PRGBv ~~~~~MAYSKAFLLLGLLSFVLLVSSRELAEESTSTET: 32

PRGMs2 NYNDGRGGYNHGGGGH.GHGGGGHGGGGYNGGGGGHGGHGGGAESVAVQTEEKTNEVND:117
PRGMs3 NYNDGRGGYNHGGGGH.GHGGGGHGGGGYNGGGGGHGGHGGGAESVAVQTEEKTNEVND:117
PRGMs1 NNGGGGGHGG..HGGGGYN.GGGGGHGGGGYNGGGGGHGGHGGGAESVAVQTEEKTNEVND:149
PRGCa NYGNNGGGNYGHGGGNY....GHGGNGGGNYGNNGGGSYNGG.....G:137
PRGHv PGHGGEGGGGYGGGG...GYPGHGGEGGGGYGGGGGYHGGGGE.....GGG:132
PRGBv QESKDL DGYGHGGYGYGHGGYGHGGYGHGGYGHGGYGGHYEPEE...EEKDV MENVEPQ: 89

PRGMs2 KYG.GGSNY...NDGRGGYNHGGG.GY.NHGGG...GHGGHG...GHGGH.GGHGGHGAD:164
PRGMs3 KYG.GGSNY...NDGRGGYNHGGG.GY.NHGGG...GHGGHG...GHGGH.GGHGGHGAD:164
PRGMs1 KYG.GGSNY...NDGRGGYNHGGG.GY.NHGGG...GHGGHG...GHGGH.GGHGGHGAV:196
PRGCa NYGHGGGNY...GNNGGGNYGHGGG.NY.GHGGGYPNGGGHGGGYPNGGGHGGGGHGGGGG:192
PRGHv GYGGGGYHGHGGEGGGGGYGGGGG.GYPGHGGG.GGHGG.GRCKWCCGHGFLHHCRC:189
PRGBv GYGYGG...YGHGGYGHGGYGHGGYGHGGHGGYGGYGGNGHGGYGHGGYGHGGYGHGGY:147

PRGMs2 QTEDNTQNDIIMHHAHFLSNICHE~~~~~:191
PRGMs3 QTEDNTQNDIIMHHAHFLSNICHE~~~~~:191
PRGMs1 QTEDNTQN~~~~~:204
PRGCa YVGEATDVQREDKTIN~~~~~:208
PRGHv ARADEVPEVRN~~~~~:200
PRGBv GGHYPPEVAMDMVMDTADMEVTTTHQRKLTSTC:183

```

Figura 6. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de la clona 18-RACE (PRGBv) con otras secuencias de proteínas ricas en glicina (PRG). Las abreviaturas son Ms para *Medicago sativa*, Ca para *Cicer arietinum*, Hv para *Hordeum vulgare* y Bv para *Beta vulgaris*. Los aminoácidos idénticos son los sombreados en gris y los aminoácidos similares son los sombreados en negro.

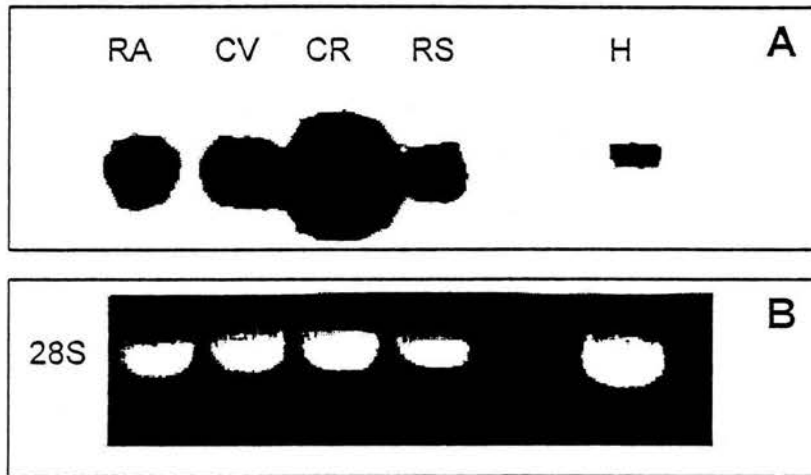


Figura 7. Acumulación del ARNm del ADNc de la clona 18 en diferentes tejidos de betel. La autorradiografía de la hibridación tipo "northern blot" (A) de la sonda 18 contra el ARN extraído de raíz de almacenamiento (RA), de callo verde (CV), de callo rojo (CR), de raíces secundarias (RS) y de hojas (H). Con la tinción con bromuro de etidio se muestra el ARN 28S ribosomal como un control de carga del ARN en el gel (B).

7. DISCUSION GENERAL

7.1 Las betacianinas ¿Cuál es su participación en la defensa de las plantas de betabel sometidas a herida ó a la infiltración con bacterias?

Diversos metabolitos secundarios tales como fenilpropanoides, terpenoides y alcaloides, forman parte de la respuesta de defensa de las plantas sometidas a un estrés abiótico o biótico. Sin embargo, el papel de las betacianinas en la defensa de las plantas es limitado. En este estudio se encontró que la herida y la infiltración con las bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* y *Agrobacterium tumefaciens* fueron condiciones que indujeron la acumulación de betacianinas en las hojas de betabel. Por lo cual, se analizó si los pigmentos tenían un efecto en el crecimiento de las bacterias y/o de remover el exceso de las ERO. Para probar la primera posibilidad, se midió el crecimiento bacterial *in planta*. La disminución del número de bacterias de *P. syringae* o de *A. tumefaciens* en las hojas infiltradas con una u otra bacteria, desde las 24 h de efectuada la infiltración hasta el final de la cinética (120 h) y que correlacionó con el aumento en los niveles de betacianinas, sugirió que los pigmentos podrían afectar el crecimiento de las bacterias (anexo 2, figura 1). Sin embargo, cuando se evaluó el crecimiento de las bacterias en medios de cultivos líquidos con y sin betanina se encontró que las cinéticas de crecimiento de las bacterias sin y con betanina fueron similares (anexo 2, figura 2), lo cual sugiere que la betanina no afectó el crecimiento de las bacterias. Se conoce que como parte de la respuesta a un estrés, se inducen diversos mecanismos de defensa (Lamb y Dixon, 1997). Por lo cual, además de la síntesis de betacianinas se induce la producción de

proteínas o de otros metabolitos secundarios con características antimicrobianas. Al respecto, los isoflavonoides tales como betavulgarina y betagarina que pueden actuar como fitoalexinas son inducidos durante la infección por hongos de las hojas de la remolacha (Martin, 1977; Elliger y Halloin, 1994). Sin embargo, no conocemos si estos u otros compuestos son los causantes de la reducción del crecimiento bacterial que se observó en las hojas.

Con respecto a la posibilidad de que las betacianinas pudieran remover el exceso de las ERO, las siguientes evidencias apoyan que estos pigmentos tienen un efecto antioxidante en las hojas heridas o infiltradas con bacterias. En las hojas infiltradas con *A. tumefaciens*, el pigmento se acumuló principalmente en la epidermis (apartado 6.1, figura 3). De igual manera, las antocianinas son pigmentos que se acumulan en este tejido cuando las hojas son infectadas por virus o son expuestas a luz UV. En este contexto, también se sugiere que las antocianinas más que afectar la resistencia contra el virus, tienen un efecto antioxidante (Kangatharalingam y col, 2002). En las hojas infiltradas con *A. tumefaciens*, se encontró una estrecha relación del inicio de la reducción de la producción de las ERO (que ocurrió a las 48 h de tratamiento) con el comienzo de la síntesis de betacianinas y de su acumulación en las hojas infiltradas, lo cual sucedió entre las 24 y las 48 h de infiltración (apartado 6.1, figuras 4 y 5). Por último, la actividad antirradical y antioxidante de las betacianinas se ha demostrado en ensayos *in vitro* usando sistemas de origen animal (Kanner y col, 2001; Butera y col, 2002). Por otra parte, se ha propuesto que las ERO son producidas en las células del mesófilo y removido por flavonoides acumulados en las células epidérmicas (Yamasaki y col, 1997; Gould y col, 2002). En este estudio, no conocemos el sitio de producción de las ERO pero se

considera que estudios comparativos de localización de las ERO y de betacianinas en las hojas infiltradas con bacterias podrían apoyar las evidencias de que las betacianinas participan en los mecanismos para remover el exceso de las ERO.

7.2 ¿Las especies reactivas de oxígeno y el metil jasmonato son parte del mecanismo para inducir la síntesis de betacianinas?

En las interacciones planta-patógeno, las ERO pueden actuar como inductores de genes de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), de genes de enzimas requeridas en el mecanismo de detoxificación de las ERO y de genes de enzimas de la síntesis de metabolitos secundarios que a su vez pueden actuar también para remover el exceso de las ERO. Los resultados que se obtuvieron en este estudio sugirieron que las ERO actúan como una señal para la inducción de la expresión del gen *BvGT* y de la acumulación de betacianinas: a) la liberación de las ERO en hojas infiltradas con *A. tumefaciens* fue un evento previo al inicio de la acumulación de las betacianinas y del ARNm del gen *BvGT* (apartado 6.1 figuras 4 y 5; apartado 6.2, figura 4), b) un sistema que genera H₂O₂ (glucosa/glucosa oxidasa) indujo tanto la expresión del gen *BvGT* como la síntesis de betacianinas (apartado 6.2, figura 5A; apartado 6.1, figuras 6 y 7) y c) el tratamiento con DPI, un inhibidor de NADPH oxidasas, enzimas implicadas en la producción de las ERO, llevó a un bloqueo de la acumulación del transcrito del gen *BvGT* y de la síntesis de betacianinas inducidas por la infiltración con *A. tumefaciens* (apartado 6.2, figura 5B; apartado 6.1, figuras 8 y 9). Este es el primer estudio que muestra la participación de las ERO en la

inducción de la síntesis de betacianinas en hojas de betabel y que una NADPH oxidasa esta involucrada en la generación de las ERO.

Los jasmonatos pueden ser considerados como señales globales de la expresión de los genes de defensa y como parte de esta respuesta, está la inducción de la producción de metabolitos secundarios del tipo de los alcaloides, terpenoides y flavonoides que pueden tener actividad antimicrobiana o de protección de un estrés oxidativo (Wasternack y Parthier, 1997). La estimulación de la acumulación de betacianinas por metil jasmonato en cultivo de células de *Portulaca grandiflora* productoras de betacianinas fue evaluada recientemente por Nazmul y col (2003). A diferencia de éste trabajo, en nuestro estudio el efecto con metil jasmonato fue evaluado con los cultivos verdes de betabel en suspensión y que no producen betacianinas. Los resultados del tratamiento con metil jasmonato (100 μM) mostraron que hay la formación de compuestos que tienen un espectro con una absorbancia que abarca el rango de las longitudes de luz visible reportados para las betacianinas (apartado 6.3, figura 1). Sin embargo, dadas las características de color de los extractos (rojo-naranja) no se puede inferir a que betacianinas corresponden. Es posible que bajo condiciones *in vitro*, otras betacianinas diferentes sean sintetizadas a las que se encuentran en las plantas. Es conocido que cultivos de raíces peludas de una variedad amarilla de *B. vulgaris* contienen 2-descarboxi-betanidina (con una λ_{max} a 533 nm). Así mismo, la administración de dopamina a tales cultivos y a plántulas de la variedad amarilla de *B. vulgaris* lleva respectivamente a la formación de las betacianinas, melanina y de la 2-descarboxi-betanina, ésta última con una λ_{max} a 507 nm (Kobayshi y col, 2001). Por lo cual, para determinar cuales betacianinas son inducidas por el tratamiento con metil jasmonato, sería conveniente

realizar un análisis de los compuestos por técnicas analíticas como es la cromatografía de líquidos acoplada a espectrofotometría de masas. Así mismo, sería recomendable realizar inducciones con metil jasmonato en las plántulas de betabel de la variedad utilizada en este estudio.

7.3 El fragmento de un gen de una glucosiltransferasa codifica para una enzima probablemente involucrada en la síntesis de betacianinas.

En este estudio se mostraron evidencias de que el fragmento del gen de la glucosiltransferasa obtenido de *B. vulgaris* (*BvGT*) por la técnica de PCR podría codificar para una enzima involucrada en la síntesis de betanina de hojas de betabel: a) el análisis de homología indicó una identidad (63.8%) y una similitud (71.8%) alta del gen *BvGT* (apartado 6.2, figura 2) con el gen de la glucosiltransferasa de cultivos en suspensión de *D. bellidiformis*, que codifica para una enzima que glucosila betanidina dando la formación de betanina (betanidina-5GT; Vogt y col, 1999), b) la expresión transitoria de una construcción en antisentido del gen *BvGT* (*AsBvGT*) produjo una disminución de la acumulación del transcrito del gen *BvGT* y de la betanina inducida por la infiltración con *A. tumefaciens* (apartado 6.2, figuras 3A y B), c) la expresión del gen *BvGT* y la síntesis de betacianinas fueron inducidas por tratamientos similares, como es la herida, la infiltración con bacterias ó por el sistema de glucosa/glucosa oxidasa que se usó para generar H_2O_2 (apartado 6.1, figuras 4 y 7; apartado 6.2, figuras 4 y 5A) y d) la acumulación del ARNm del gen *BvGT* y de betacianinas fue bloqueada por la aplicación de DPI (apartado 6.1, figuras 8 y 9; apartado 6.2, figura 5B). Para la síntesis de betanina, se han propuesto dos

mecanismos para la incorporación de la glucosa a la estructura de la betanina. Uno de ellos sugiere que la glucosilación ocurre a nivel de la ciclo dopa antes de su condensación con el ácido betalámico y el otro mecanismo propuesto indica que la betanidina es la molécula glucosilada (Roberts y Strack, 1999). Nuestro análisis de homología de la secuencia deducida de aminoácidos de la BvGT mostró una similitud e identidad alta con la betanidina-5GT de *D. bellidiformis*, lo cual sugiere que la enzima BvGT podría también usar como sustrato a la betanidina. Sin embargo, para comprobar esta hipótesis es importante por una parte, expresar el gene *BvGT* en *E. coli* y obtener la proteína recombinante y por otra parte, purificar parcialmente la enzima nativa de las hojas de betabel acumulando el pigmento y en los dos casos realizar estudios de actividad enzimática y caracterización bioquímica. Estos estudios a su vez son interesantes, porque permitirían proponer un mecanismo más generalizado de la incorporación de la glucosa durante la síntesis de betanina en plantas.

7.4 El ADNc de la clona 18 que se expresa diferencialmente en callos rojos y verdes de betabel codifica para una proteína rica en glicina.

En este estudio se planteó como una estrategia utilizar los callos rojos y verdes obtenidos por la técnica de cultivo de células vegetales para aislar algunos de los genes de las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de betacianinas. Estudios previos mostraron que esta diferencia de color estaba dada fundamentalmente por el contenido de betacianinas, mientras que el callo rojo se caracterizaba por su producción del pigmento, en los callos verdes el colorante

estaba ausente. Estas características marcaron la pauta para un estudio a nivel bioquímico y molecular, ya que muy probablemente los cultivos de callo rojo y los verdes mostrarían una expresión diferencial de los genes de las enzimas de la ruta de síntesis de betacianinas, de los genes de las proteínas implicadas en la regulación de la ruta de síntesis y/o de las relacionadas con su transporte a vacuolas (Ontiveros, 1994). Por lo cual, en este estudio a través de la técnica conocida como "*differential display*", se aislaron y se clonaron dos ADNc (nombrados como 18 y 19) que principalmente se expresaban en el callo rojo (apartado 6.4, figuras 1 y 3). Sin embargo, el análisis de su secuencia de nucleótidos (apartado 6.4, figura 2) y/o aminoácidos no mostró identidad con otras secuencias y por tanto no permitió predecir a la proteína que pudiera ser codificada por los ADNc de las clonas 18 y 19. Esto es explicable, debido a que en esta técnica para sintetizar los ADNc que se expresan diferencialmente, se usan mezclas de "*primers oligo-dT*" anclados degenerados (5' T₁₂MN 3') que por su secuencia, se unen normalmente a la cola de poliA de los ARNm y por lo tanto se amplifica de preferencia la región 3' no traducida de los ARNm y que es caracterizada como una región variable. En tal sentido, se procedió a completar la secuencia hacia el extremo 5' de los ADNc de las clonas 18 y 19 a través de la técnica conocida como "*RACE-end 5'*". No obstante, solamente fue posible aislar y clonar un producto amplificado del ADNc de la clona 18 (18-*RACE*) y cuyo análisis de la secuencia deducida de aminoácidos sugiere que este producto codificaría para una proteína rica en glicina (apartado 6.4, figura 5). Sin embargo, aunque los patrones de acumulación del ARNm del ADNc de la clona 18 mostraron que este ARNm se encuentra principalmente en raíces y en el callo rojo que son tejidos que acumulan betacianinas, también este transcrito se encuentra en callo

verde y hojas (apartado 6.4, figura 7). Hasta la fecha, se conoce que diversas proteínas ricas en glicina que se encuentran en membranas plasmáticas, pared celular o en el citoplasma aumentan la expresión de sus ARNm por diversas condiciones de estrés, de desarrollo y de diferenciación (Cassab, G. 1998), pero no se ha reportado su relación con la síntesis de metabolitos secundarios, como son las betacianinas. Así mismo, el análisis de homología de la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de la clona 18 (apartado 6.4, cuadro 2) muestra similitud con proteínas ricas en glicina de alfalfa (*Medicago sativa*) inducidas por frío y desecación, de *Cicer arietinum* que se acumulan en respuesta a infección por hongos ó herida. Sin embargo, no se conoce si éstas u otras condiciones de estrés están relacionadas con la acumulación del ARNm del ADNc de la clona 18.

La acumulación abundante del ARNm de la clona 18 en los callos rojos podría relacionarse con un proceso de diferenciación que quizás se origina durante el establecimiento del propio cultivo. Las proteínas ricas en glicina presentan un patrón de expresión amplio, son encontradas en diversos tejidos especializados y a una etapa de desarrollo definida, por lo que pueden ser usadas como marcadores moleculares de procesos de diferenciación (Sachetto-Martins y col, 2000).

8. CONCLUSIONES

La herida, la infiltración con *P. syringae* o con *A. tumefaciens*, o con un sistema que genera H_2O_2 , son condiciones que inducen la acumulación de betacianinas en hojas de betabel (*Beta vulgaris*) y la expresión de un gen que codifica para una glucosiltransferasa (BvGT), involucrada probablemente con la síntesis de los pigmentos.

Las especies reactivas de oxígeno, producidas por la actividad de una NADPH oxidasa, actúan como una señal para inducir la acumulación de las betacianinas y del ARNm del gen de la BvGT.

Las betacianinas no parecen afectar el crecimiento de las bacterias, pero por su actividad antioxidante y como parte de los mecanismos de defensa ante la herida y la infiltración con bacterias, podrían actuar removiendo el exceso de las especies reactivas de oxígeno producido bajo éstas condiciones de estrés.

El metil jasmonato participa en la inducción de la síntesis de betacianinas en cultivos verdes de *Beta vulgaris* en suspensión.

El ADNc que se obtuvo de los callos de betabel codifica para una proteína rica en glicina (BvPRG), cuyo ARNm se acumula preferentemente en los callos rojos.

9. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS

En este trabajo se mostró que las betacianinas en hojas de betabel (*Beta vulgaris*) fueron inducidas por herida ó la infiltración con bacterias. Dada su capacidad antioxidante, se propuso que las betacianinas al reaccionar con las ERO participan en la reducción del estado oxidativo desencadenado con la herida y la infiltración con bacterias. Sin embargo, para proponer un modelo de interacción en los tejidos de las betacianinas con las ERO, sería interesante conocer los sitios donde se producen las ERO y analizar su correlación con la acumulación de los pigmentos. Así mismo, para sugerir cual de las especies reactivas de oxígeno reacciona con las betacianinas, se recomienda obtener las cinéticas de acumulación para cada una de las diferentes especies reactivas de oxígeno, en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de inducción de betacianinas.

El tratamiento con DPI indica que hay NADPH oxidasas implicadas en la producción de ERO. Sin embargo, dado que la inhibición de la acumulación del pigmento es del 50% con 10 μ M de DPI, sería conveniente realizar tratamientos con inhibidores de otras enzimas (peroxidasas), que quizás también participen en este evento.

Con la finalidad de realizar un análisis de la participación del metil jasmonato como parte del mecanismo para inducir la síntesis de betacianinas, se recomienda

realizar estudios de la acumulación de los pigmentos y del ARNm del gen de la BvGT en plantas tratadas con metil jasmonato.

Las evidencias de este trabajo mostraron que el fragmento del gen de la glucosiltransferasa (BvGT) codifica para una enzima que podría estar implicada en la síntesis de betacianinas. Para comprobar su participación, es importante completar la secuencia del gen, expresarlo en *E. coli*, purificar la proteína y medir la actividad de la enzima usando como sustratos a la ciclo-dopa y a la betanidina.

10. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

- Akita T, Hina Y, Nishi T. 2000. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Biosc Biotech Biochem* 64: 1807-1812
- Alferman A, Paterson M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 43: 199-205
- Böhm H, Rink E. 1986. Betalains. En: *Phytochemical in Plant Cell Cultures*. Vasil I, Constabel F (Eds). Academic Press, London, pp: 449-463
- Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi AM, Kohen R, Livrea MA. 2002. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem* 50: 6895-6901
- Cai Y, Sun M, Corke H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J Agric Food Chem* 51: 2288-2294
- Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. *Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 281-309
- Chalker-Scott L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* 70: 1-9
- Creelman RA, Mullet JE. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci* 99: 4114-4119
- Creelman RA, Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 355-381

- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795
- Elliger CA, Halloin JM.** 1994. Phenolics induced in *Beta vulgaris* by *Rhizoctonia solani* infection. *Phytochemistry* 37: 691-693
- Escribano J, Pedreno MA, García-Carmona F, Muñoz R.** 1998. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochem Anal* 9: 124-127
- Francis J.** 1994. Food color. The world ingredients. *J Pract Food Technol.* Octubre: 7-11
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR.** 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotides primer. *Proc Natl Acad Sci* 85: 8998-9002
- Gamborg O, Miller R, Ojima K.** 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- García-Ponce B, Rocha-Sosa M.** 2000. The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multi-functional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 157: 181-190
- Gould KS, Mckelvie J, Markham KR.** 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell Environment* 25: 1261-1269
- Grant JJ, Loake GJ.** 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* 124: 21-29

- Hammond-Kosack KE, Jones JDG.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG.** 2000. Responses to plant pathogens. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds). American Society of Plant Physiol USA, 21: 1102-1156
- Heuer S, Vogt T, Böhm H, Strack D.** 1996. Partial purification and characterization of UDP-glucose: betanidin 5-O- and 6-O-glucosyltransferases from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N.E.Br. *Planta* 199: 244-250
- Hinz UG, Fivaz J, Girod P-A, Zryd J-P.** 1997. The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Amanita muscaria* and its regulation. *Mol Gen Genet* 256: 1-6
- Kai-Wun Y, Rong-Huay J, Jong-Ching S.** 1991. A rapid and efficient method for RNA isolation from plants with high carbohydrate content. *Focus* 13: 102-103
- Kangatharalingam N, Pierce ML, Bayles MB, Essenberg M.** 2002. Epidermal anthocyanin production as an indicator of bacterial blight resistance in cotton. *Physiol Mol Plant Pathol* 61: 189-195
- Kanner J, Harel S, Granit R.** 2001. Betalains-a new class of dietary cationized antioxidants. *J Agric Food Chem* 49: 5178-5185
- Kingston RE.** 1994. Preparation of poly (A)⁺RNA. En: *Preparation and analysis of RNA. Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (Eds). John Wiley and Sons. Vol. 1: Unit 4.5.

- Lamb C, Dixon R.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251-275
- Laurent C, Frédéric X, Hinz U, Zrýrd J.** 2004. Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiol* 134: 265-274
- Leathers R, Davin C, Zrýrd J.** 1992. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. *bikores monogerm* (red beet). *In vitro Cell Dev Biol* 28P: 39-45
- Liang P y Pardee AB.** 1995. Differential display of mRNA by PCR. En: *Polymerase chain reaction. Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (Eds). John Wiley and Sons. Vol. 2:Unit 15.8.
- Mabry TJ.** 1980. Betalains. En: *Encyclopedia of Plant Physiology* EA Bell y BV Charwood, (Eds) Vol 8: Secondary Plant Products. Springer-Verlag, Berlin, pp 513-533
- Maher E, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon R, Lamb C.** 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc Natl Acad Sci* 91: 7802-7806.
- Martin SS.** 1977. Accumulation of the flavonoids betagarin and betavulgarin in *Beta vulgaris* infected by the fungus *Cercospora beticola*. *Physiol Plant Pathol* 11: 297-303
- Martínez-Parra J, Muñoz R.** 2001. Characterization of betacyanin oxidation catalyzes by a peroxidase from *Beta vulgaris* L. roots. *J Agric Food Chem* 49: 4064-4068

- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Muller LA, Hinz U, Zryd J-P. 1997. The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant DOPA-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry* 44: 567-569
- Nazmul M, Bhuiyan H, Adachi T. 2003. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *J Plant Physiol.* 160: 1117-1124
- Ontiveros Jiménez MA. 1994. Aislamiento de líneas celulares de *Beta vulgaris* productoras de betalaínas. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Peña-Cortés H, Willmitzer L. 1995. The role of hormones in gene activation in response to wounding. En: *Plant hormones*. Davis PJ (Ed). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 395-414
- Pourrat A, Lejeune B, Grand A, Pourrat H. 1988. Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography. *J Food Sci* 53: 294-295
- Reinbothe S, Mollenhauer B, Reinbothe C. 1994. JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 6: 1197-1209
- Reymond P, Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 1:404-411
- Rodríguez M, Jiménez A, Dávila G, Sepúlveda G. 1994. Effect of carbon source in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnol Lett* 16: 853-858
- Sachetto-Martins G, Franco LO, Oliveira DE. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?. *Bioch Biophys Acta* 1492: 1-14

- Sasaki N, Adachi T, Koda T, Ozeki Y.** 2004. Detection of UDP-glucose :ciclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase activity in four o'clocks (*Mirabilis jalapa* L.). *FEBS Letters* 568: 159-162
- Schliemann W, Kobayashi N, Strack D.** 1999. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol* 119: 1217-1232
- Schwartz SJ, von Elbe JH.** 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 28: 540-543
- Stafford HA.** 1994. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci* 101: 91-98
- Steglich W, Strack D.** 1990. Betalains. En: *The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology*. Brossi A (Ed). Academic Press, London, pp: 1-62
- Steiner U, Schliemann W, Böhm H, Strack D.** 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* 208: 114-124
- Strack D, Steglich W, Wray V.** 1993. Betalains. En: *Methods in Plant Biochemistry*. Dey PM y Harborne JB (Eds) Academic Press Limited, London 8: 421-450
- Strack D, Vogt T, Schliemann W.** 2003. Recent advances in betalains research. *Phytochemistry* 62: 247-269
- Trejo-Tapia G, Jiménez AA, Rodríguez M, Sepúlveda G, De Jesús A.** 1999. Influence of medium constituents on growth and betalain production in cell suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Asian Pac J Mol Biol Biotechnol* 7: 167-172
- Vogt T, Zimmermann E, Grimm R, Meyer M, Strack D.** 1997. Are the characteristics of betanidin glucosyltransferases from cell-suspension cultures of

- Dorotheanthus bellidiformis* indicative of their phylogenetic relationship with flavonoid glucosyltransferases?. *Planta* 203: 349-361
- Vogt T, Grimm R, Strack D.** 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferase from the Solanaceae. *Plant J* 19: 509-519
- Vogt T, Ibdah M, Schmidt J, Wray V, Nimtz M, Strack D.** 1999. Light-induced betacyanin and flavonols accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry* 52: 583-592
- Wasternack C, Parthier B.** 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci* 2: 302-307
- Wettasinghe M, Bolling B, Plhak L, Xiao H, Parkin K.** 2002. Phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of beetroot (*Beta vulgaris* L.) Extracts from phenotypes of different pigmentation. *J Agric Food Chem* 50: 6704-6709
- Wylter H, Meuer U, Bauer J, Stravs-Mombelli L.** 1984. Cyclodopa glucoside (= (2S)-5-(β-D-glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). *Helv Chim Acta* 67: 1348-1355
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N.** 1997. Flavonoid-Peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol* 115: 1405-1412

ANEXOS

La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas

Gabriela Sepúlveda-Jiménez, Depto. de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Apdo. Postal 24, Yautepec, Morelos, México CP 62731; Helena Porta-Ducoing y Mario Rocha-Sosa, Depto. de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, México CP 62250. Correspondencia: rocha@ibt.unam.mx

(Recibido: Septiembre 24, 2003 Aceptado: Enero 27, 2004)

Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., y Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:355-363.

Resumen. Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez y reducir su digestibilidad por insectos y vertebrados herbívoros. Así mismo, algunos alcaloides son neurotóxicos a insectos y vertebrados herbívoros. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por las plagas

Palabras clave adicionales: Alcaloides, fenilpropanoides, terpenoides.

Abstract. The synthesis and the accumulation of low molecular weight compounds known as secondary metabolites are induced as part of the chemical defense response to wounding and/or pathogen attack. During the hypersensitive response, some compounds such as alkaloids, terpenoids, and phenylpropanoids participate killing the pathogen and restricting its invasion to the plant; while other secondary metabolites contribute scavenging reactive oxygen species that are toxic to the plant cell and that are synthesized early as a part of the defense response.

Conjugated phenylpropanoids with amines are incorporated into the plant cell wall increasing its rigidity and reducing its digestibility for herbivores (insects and vertebrates). Furthermore, some alkaloids are neurotoxic to herbivores. Thus, some secondary metabolites are an important part of the defense response of plants subjected to wounding or pest attack.

Additional keywords: Alkaloid, phenylpropanoid, terpenoid.

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Estas respuestas de defensa a su vez, se combinan con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000). Los MS son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Fig. 1).

Características generales de los MS. En la actualidad, se

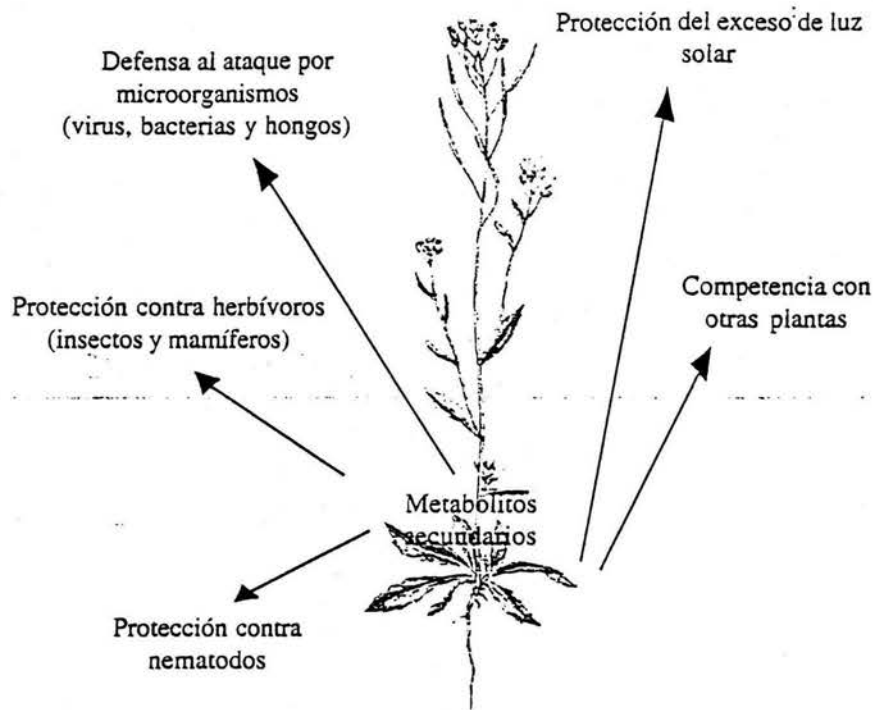


Fig. 1. Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas.

conocen aproximadamente 20,000 estructuras de MS que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Fig. 2). La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999). Esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas. Se sabe que a un microorganismo patógeno o a insectos y vertebrados herbívoros, les resulta más difícil infectar o alimentarse de una población de plantas que individualmente contienen mezclas diferentes de MS, que de una población con una mezcla homogénea de MS (Castellanos y Espinoza-García, 1997). Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de MS puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también MS que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y

Gatehouse, 1999). La síntesis de MS depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles de MS, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. En este sentido, también es relevante hacer notar que la biosíntesis y el almacenamiento de MS o de sus precursores, ocurren en diferentes lugares de la célula vegetal. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides, sesquiterpenos y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

Función de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. La herida que se produce tanto por la depredación por insectos como por el daño mecánico inducido por factores físicos, son condiciones que se traducen en una respuesta de defensa de la planta, la cual involucra la activación transcripcional de diversos genes de proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y la prevención de la invasión de microorganismos patógenos. Estos genes codifican para proteínas involucradas en: a) en la fortificación de la pared celular, como son la formación de calosa, lignina y las

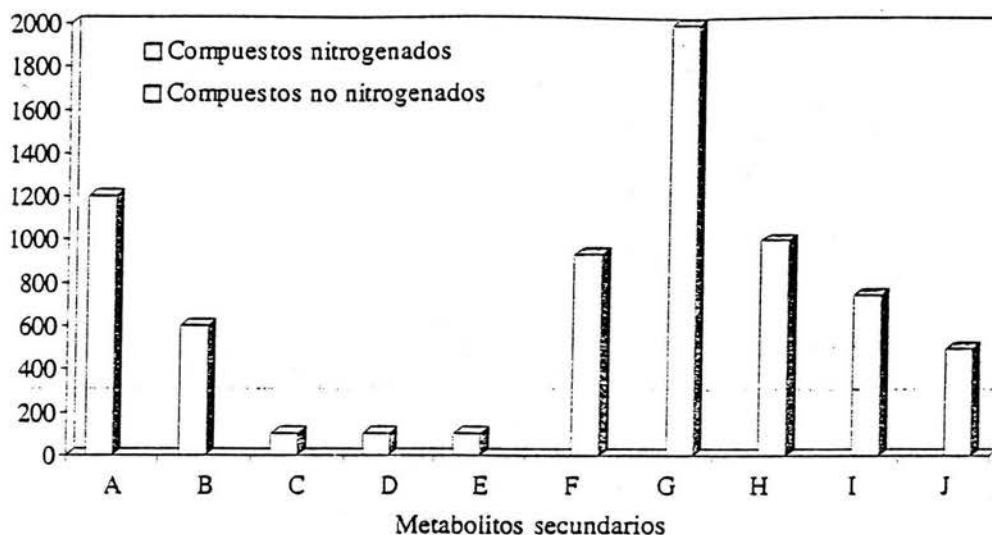


Fig. 2. Clasificación y número de estructuras que se conocen de los metabolitos secundarios de plantas. Compuestos nitrogenados, A, alcaloides; B, aminoácidos no protéicos; C, aminas; D, glucósidos cianogénicos; E, glucosinolatos. Compuestos no nitrogenados, G, terpenos; H, flavonoides; I, poliacetilenos; J, policétidos; K, fenilpropanoides.

proteínas ricas en hidroxiprolina, b) la producción de inhibidores de proteasas y de enzimas líticas tales como las quitinasas y glucanasas, y c) la síntesis de MS con actividad antimicrobiana y/o antioxidante (Peña-Cortés y Willmitzer, 1995). La respuesta de defensa contra el ataque de microorganismos patógenos, está coordinada tanto espacial como temporalmente para una contención rápida del microorganismo patógeno, por lo que puede ser local o en sitios lejanos al daño, conocida como la respuesta sistémica. La respuesta local está asociada a una repuesta hipersensible (RH) caracterizada por una muerte rápida de las primeras células infectadas y la restricción de la expansión del microorganismo patógeno, aislándolo del resto de la planta (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Entre los eventos tempranos que se desencadenan en la RH están: a) la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el superóxido (O_2^-), el radical hidróxilo (OH^\cdot) y el peróxido (H_2O_2), b) la apertura de canales iónicos, y c) los eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas. Posteriormente, se da un aumento de los niveles del ácido jasmónico, el ácido salicílico y el etileno, la acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (RP), un aumento de la producción de MS con actividad antimicrobiana o antioxidante y el fortalecimiento de la pared celular. Estos eventos conducen al establecimiento de la respuesta local, mientras que en la respuesta sistémica se induce la producción de proteínas RP similares a las de la respuesta local y de otras proteínas RP (Fig. 3). En general, la expresión de los genes de defensa se regula por moléculas tales como el ácido salicílico, el etileno, el ácido jasmónico y las ERO. En particular, el ácido jasmónico modula la síntesis de las proteínas de la pared celular, como son las proteínas ricas en

prolina y activa la expresión de los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios, tales como la acetil CoA carboxilasa, la chalcona sintasa, la fenilalanina amonio liasa, la hidroximetil-glutaril-CoA reductasa y las polifenol oxidasas, entre otras (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000; Wasternack y Parthier, 1997). Por su parte, las ERO pueden tener dos funciones, en la primera debido a su toxicidad, pueden aumentar el daño producido por el estrés, mientras que en la segunda, pueden actuar como una señal para la activación de las respuestas de defensa (Dat *et al.*, 2000). En la RH, las ERO pueden limitar la expansión del microorganismo patógeno causando la muerte de la célula vegetal huésped y/o matando directamente al microorganismo patógeno. Esta muerte celular puede resultar de procesos de oxidación tales como la peroxidación de lípidos de membranas, la oxidación de proteínas, la inhibición de enzimas y daños al DNA y al RNA. El entrecruzamiento oxidativo con componentes de la pared celular vegetal como las proteínas ricas en prolina y los polisacáridos, es un mecanismo que puede reducir el ingreso del microorganismo patógeno y/o atraparlo en la célula huésped destinada a morir (Lamb y Dixon, 1997). En su función como molécula señal, las ERO pueden inducir la expresión de genes de enzimas antioxidantes que intervienen regulando sus niveles excesivos y tóxicos tales como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa, así como la de genes de enzimas para la síntesis de MS con capacidad antioxidante, como son el ácido ascórbico, α -tocoferol, los carotenoides, las antocianinas y las betacianinas (Grant y Loake, 2000; Mittler, 2002). De tal forma que los MS son importantes en la respuesta de defensa de las plantas, restringiendo la invasión y/o matando directamente al microorganismo patógeno, o bien,

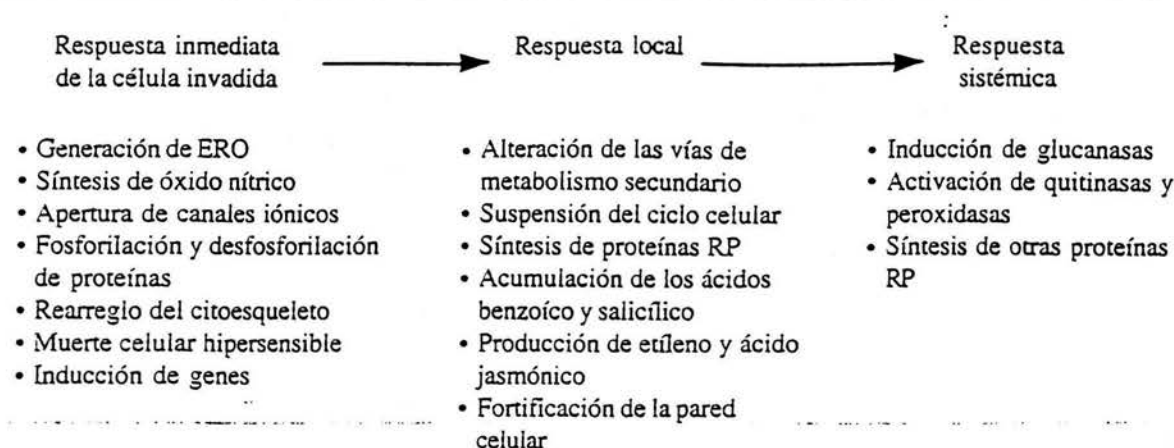


Fig. 3. Representación esquemática de las respuestas de defensa tanto locales como sistémicas que ocurren desde el inicio de la invasión de un microorganismo patógeno. RP es relacionada a la patogénesis.

por su capacidad antioxidante contribuyen al mantenimiento del estado de óxido-reducción de la célula vegetal. Esta revisión presenta a manera de ejemplos, algunos de los mecanismos de acción de los MS que participan en la defensa bioquímica de las plantas. En vista de que la lista de MS puede ser muy amplia, se enfocó a tres de los grupos de MS más extensamente estudiados: los terpenoides, los alcaloides y los fenilpropanoides.

Los terpenoides. Los terpenoides o isoprenoides, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (C5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva al cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta DXP, la cual es independiente de la del mevalonato y que se realiza en los plástidos. Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Eisenreich *et al.*, 2001). Los monoterpenos tales como el mentol, que es un antimicrobiano, el citronelal, que es un repelente de insectos y las piretrinas que funcionan como venenos del sistema nervioso de los insectos, son componentes químicos con actividad biológica potencial durante la respuesta de defensa de las plantas que los producen. Los sesquiterpenos tales como la risitina y lubimina de la papa (*Solanum tuberosum* L.), el capsidiol del chile (*Capsicum annuum* L.) y el 2,7-dihidroxicadaleno del algodón (*Gossypium hirsutum* L.) son compuestos con actividad antimicrobiana; mientras que el poligodial de *Polygonum hidropiper* L. inhibe fuertemente la alimentación de diversos insectos herbívoros, el diterpeno atractilósido inhibe la fosforilación oxidativa en mitocondrias, y el casbeno del ricino (*Ricinus* spp.) es un agente antifúngico. El triterpenoide cucurbitacina de las raíces de pepino (*Cucumis sativus* L.) es un compuesto con acción nematocida (Fig. 4). Por su parte,

los terpenos en combinación con otros compuestos como las oxilipinas y los indoles, forman mezclas de volátiles que funcionan como señales químicas para atraer a los enemigos naturales de insectos herbívoros. Estudios sobre la respuesta de la planta a esta interacción, en hojas de maíz (*Zea mays* L.) y de algodón tratadas con secreciones orales de insectos, demuestran que hay inductores (elicitores) en la saliva de los insectos herbívoros, que inducen la síntesis de tales terpenos volátiles (Paiva, 2000; Pare y Tumlinson, 1998; Shen *et al.*, 2000). Como parte del mecanismo de defensa a la herida, a la depredación por insectos y vertebrados herbívoros y al ataque por microorganismos patógenos, las coníferas sintetizan una mezcla compleja de terpenoides llamadas oleoresinas que se secretan y movilizan hasta los sitios de herida o de infección; están formadas por la turpentina y la resina; mientras que la turpentina está compuesta de monoterpenos y sesquiterpenos, la resina está constituida por diterpenos. Además de su efecto tóxico contra insectos y microorganismos, la turpentina funciona como solvente para transportar a la resina al sitio del daño. Cuando los terpenoides volátiles de la turpentina se exponen al aire, se evaporan y forman una masa semicristalina que polimeriza por oxidación para dar lugar a una barrera dura que sella la herida y con frecuencia atrapa insectos y microorganismo patógenos invasores (Phillips y Croteau, 1999). Por otra parte, por su capacidad antioxidante, los terpenoides son de vital importancia para las plantas (Grassman *et al.*, 2002). Los carotenoides no sólo son componentes estructurales esenciales de los sistemas fotosintéticos, sino que también son protectores del daño causado por la foto-oxidación (Bartley y Scolnik, 1995). Así mismo, el isopreno podría ser un protector del daño causado por el ozono y quizá por su interacción con las membranas de los tilacoides, es un protector del daño causado por las altas temperaturas (Fig. 4) (Logan *et al.*, 2000).

Los alcaloides. Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y

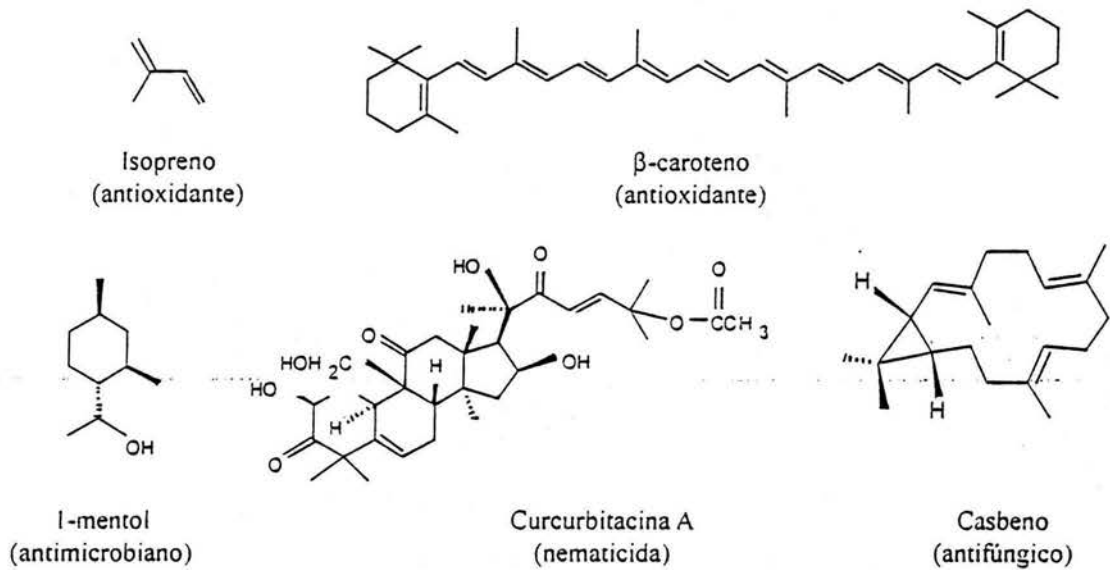


Fig. 4. Estructuras de terpenoides con actividad biológica. Se muestran como ejemplos al hemiterpeno isopreno, el monoterpeno l-mentol, el triterpenoide cucurbitacina A, el diterpeno casbeno y al carotenoide b-caroteno.

ornitina, solos o combinados con terpenoides. También se pueden derivar de purinas y del acetato de los policétidos. Los alcaloides se pueden dividir en los siguientes grupos: alcaloides isoquinolólicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos (Facchini, 2001). Por su similitud química a moléculas que participan en la transmisión de las señales del sistema nervioso, el efecto tóxico de los alcaloides radica en su capacidad de bloquear neuroreceptores, intermediarios de la transducción de la señal neuronal y canales iónicos de vertebrados e insectos. Mientras que sus efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Wink y Schimmer, 1999). En general, la síntesis constitutiva de alcaloides se incrementa en respuesta a la herida producida por los insectos depredadores; sin embargo, otros alcaloides como los N-acil derivados de la nicotina de *Nicotiana sylvestris* Speg. y Comes son sintetizados *de novo* y sólo cuando las plantas son heridas. La cantidad de derivados de nicotina que se acumulan en las hojas heridas basta para reducir el consumo y el crecimiento de las larvas de *Manduca sexta* L. (Baldwin y Ohnmeiss, 1993). La berberina, palmatina y la sanginarina son alcaloides isoquinolólicos tóxicos a insectos y vertebrados, pero también inhiben el crecimiento de bacterias, hongos y virus (Fig. 5). Estos alcaloides reaccionan con grupos aniónicos y grupos nucleofílicos de aminoácidos o de otras moléculas como receptores y enzimas, inhibiendo su función. Los receptores adrenérgicos, nicotinérgicos, muscarinérgicos y de la serotonina son blancos de unión de estos compuestos. Así mismo, inhiben a las enzimas necesarias para la síntesis y el rompimiento del

neurotransmisor acetilcolina, impidiendo la transducción de la señal neuronal de insectos y vertebrados. La interacción de estos alcaloides con el DNA, las proteínas y enzimas de la transcripción, contribuye a los efectos aleloquímicos y tóxicos contra bacterias, hongos, virus, insectos, vertebrados y otras plantas (Schmeller *et al.*, 1997). Los alcaloides quinolizidínicos tales como la esparteína, la lupanina y la 13-tigloiloxilupanina quizás funcionan inhibiendo la síntesis de proteínas y los receptores de acetilcolina; mientras que la N-metilcitisina, la anagirina y la citisina presentan actividad nematicida, y otros como la matrina y la esparteína reducen la movilidad de helmintos. La multiplicación de virus, el crecimiento de hongos y de bacterias también pueden inhibirse con la esparteína de lupinos (*Lupinus* spp.) (Wink, 1992; Wink y Schimmer, 1999). De igual forma, otros alcaloides de lupinos, tales como la lupanina, angustifolina, 13-hidroxilupanina y la gramina, también tienen un efecto bactericida (De la Vega *et al.*, 1996). Como se mencionó anteriormente, algunos alcaloides se sintetizan como parte de una respuesta general de defensa de las plantas; sin embargo, se conocen insectos parásitos que evitan esta respuesta de defensa asimilando, transportando y almacenando estos compuestos para su propio beneficio. Estos insectos se especializan en utilizar los alcaloides de la planta en la síntesis de sus ferohormonas o de compuestos que tienen actividad en contra de sus propios depredadores. Por ejemplo, las larvas de *Uteheisa ornatrix* L. secuestran a los alcaloides pirrolizidínicos de *Crotalaria* (*Crotalaria* spp.) y los retiene durante su metamorfosis hasta la etapa adulta. Durante el apareamiento, los alcaloides son utilizados para la síntesis de ferohormonas usadas como señales por el macho para atraer a la hembra. En la copulación, la hembra recibe alcaloides del macho que junto con sus alcaloides almacenados son transmitidos hasta el huevo, sirviendo de

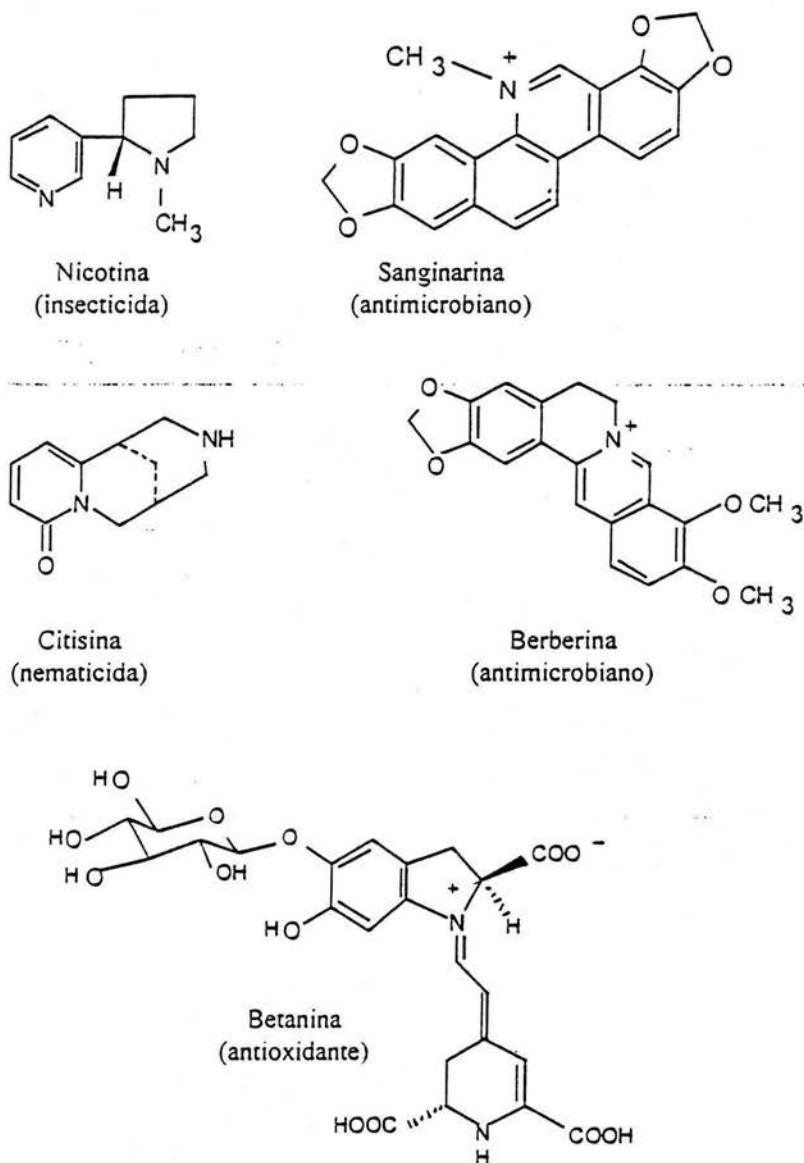


Fig. 5. Ejemplos de estructuras de alcaloides con actividad biológica durante la respuesta de defensa de *Nicotiana tabacum* (nicotina), de miembros de la familia *Papaveraceae* (sanginarina), de la familia *Berberidaceae* (berberina), de plantas del género *Cytisus* (citisina) y de *Beta vulgaris* (betanina).

protección contra insectos depredadores. Debido a los alcaloides, tanto el huevo, como las larvas y los adultos muestran sabores desagradables para sus depredadores (Hartmann, 1999). Las betacianinas son cromoalcaloides que dan una pigmentación rojo-violeta a plantas del orden Caryophyllales. Estos compuestos presentan una actividad antioxidante en ensayos *in vitro* usando sistemas de origen animal. En general, la actividad antioxidante de las betacianinas es mayor a la de otros compuestos antioxidantes conocidos, tales como el ácido ascórbico, la catequina, la rutina y el α -tocoferol (Kanner *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003). Recientemente se mostró que cuando las hojas

de betabel (*Beta vulgaris* L.) son heridas o infiltradas con bacterias, o bien con un sistema que genera H_2O_2 , se induce la síntesis de betacianinas. Por su capacidad antioxidante, los autores proponen que las betacianinas quizás atrapen el exceso de ERO producido bajo estas condiciones de estrés y así contribuyan a mantener el estado de óxido-reducción, que es tóxico para la misma célula.

Fenilpropanoides. Estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilos y se sintetizan a partir de un precursor común, el ácido cinámico, derivado de la fenilalanina por la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa. Debido a

su fitotoxicidad, por lo común son almacenados en su forma glucosilada en las vacuolas o bien pueden conjugarse con otros componentes de la pared celular (Edwards y Gatehouse, 1999). En la RH los fenilpropanoides simples pueden contribuir a limitar el desarrollo de la infección. Por ejemplo, cuando plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con niveles de expresión reducidos de la enzima fenilalanina amonio liasa y en consecuencia de su contenido de ácido clorogénico, se infectan con el hongo virulento *Cercospora nicotianae* Ellis y Everh., las lesiones se desarrollan más rápidamente y se extienden en una superficie mayor que la lesiones que presentan las plantas silvestres, en las que se induce un nivel elevado de ácido clorogénico (Maher *et al.*, 1994). Algunas formas insolubles de fenilpropanoides aunados a otros compuestos como la cutina, suberina, lignina y polisacáridos, refuerzan la pared celular como respuesta de las plantas a la herida y al ataque de microorganismo patógenos. Estos compuestos reducen la digestibilidad de la pared celular por las enzimas digestivas del microorganismo patógeno (Petersen *et al.*, 1999). Por su parte, dimerizaciones del ácido caféico, el ferúlico y el clorogénico dan origen a la formación de lignanos, tales como el magnolol con actividad antifúngica (Fig. 6). Así mismo, los flavonoides tales como la naringenina y el kaempferol del arroz (*Oryza sativa* L.) inhiben el crecimiento de *Xanthomonas oryzae* ex Ishiyama y la germinación de las esporas de *Pyricularia oryzae* Cavara, que son importantes microorganismos patógenos de este cereal (Padmavati *et al.*, 1997). La síntesis de conjugados de fenilpropanoides con aminas, como son la feruloiltiramina y la p-cumaroltiramina,

es inducida como respuesta a la herida en las hojas del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). La incorporación de estos compuestos a la pared celular, aumenta su rigidez y reduce su digestibilidad (Pearce *et al.*, 1998). Así mismo, durante la infección de *Solanum tuberosum* L. por el hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, se induce la actividad y la expresión de los genes de las enzimas fenilalanina amonio liasa, tirosina decarboxilasa y la de la enzima HCA-CoA: tiramina HCA transferasa que participan en la síntesis de la feruloiltiramina y de la p-cumaroltiramina (Matern *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1998). Como otros compuestos secundarios, los flavonoides pueden limitar la invasión del microorganismo patógeno, por ejemplo, las plantas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] en respuesta a la infección del hongo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson, producen la apigenidina y la luteolina que se acumulan en forma de inclusiones en las primeras células epidérmicas que fueron atacadas por el microorganismo patógeno. Estas inclusiones pueden viajar hasta el sitio en donde ocurrió la penetración del tejido micelar, liberar su contenido, matar tanto al hongo, así como a las células infectadas que sintetizaron estos flavonoides para finalmente detener la infección (Snyder y Nicholson, 1990). Por otra parte, los fenilpropanoides simples y los flavonoides tienen una actividad antioxidante amplia dependiendo del sustituyente del hidróxilo de su anillo fenólico. Estos compuestos pueden actuar como agentes quelantes de los iones de hierro y de cobre, como cosechadores de radicales como es el radical hidróxilo, o reaccionar con moléculas como el ácido hipocloroso o nitroso y producir compuestos con

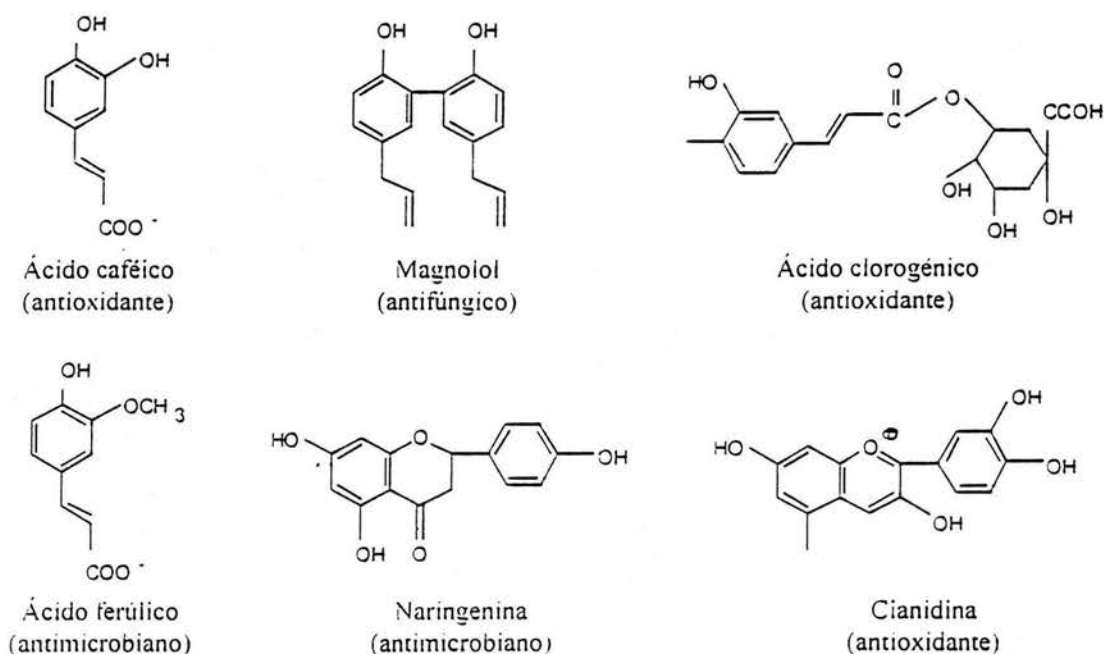


Fig. 6. Estructuras de fenilpropanoides (ácidos caféico, clorogénico y ferúlico) del lignano magnolol y de flavonoides (naringenina y cianidina) con actividad biológica.

una menor capacidad oxidativa. Por ejemplo, los fenilpropanoides simples como el ácido cafeico, el ferúlico y el clorogénico, y el flavonoide cianidina (antocianina) de diversas frutas y vegetales, son poderosos antioxidantes capaces de consumir el H_2O_2 y contribuir con el ajuste del estado de óxido-reducción celular desencadenado durante el estrés (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Agradecimientos. Este trabajo forma parte de la tesis de Doctorado de Gabriela Sepúlveda-Jiménez, quien agradece a la COFAA-IPN por la beca recibida durante la realización de sus estudios, así como a la Dra. Ana Ramos-Valdivia, por la lectura del manuscrito y sus sugerencias.

LITERATURA CITADA

- Baldwin, I.T., and Ohnmeiss, T.E. 1993. Alkaloid response to damage in *Nicotiana* native to North America. *Journal of Chemical Ecology* 19:1143-1153.
- Bartley, G.E., and Scolnik, P.A. 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7:1027-1038.
- Cai, Y., Sun, M., and Corke, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2288-2294.
- Castellanos, I., and Espinosa-García, F.J. 1997. Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology* 25:591-602.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Gruissem., and R. Jones R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367 p.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell and Molecular Life Sciences* 57:779-795.
- De la Vega, R., Gutiérrez, M., Sanz, P.C., Calvo, R., Robredo, L., De la Cuadra, C., and Muzquiz, M. 1996. Bactericide like effect of *Lupinus* alkaloids. *Industrial Crops and Products* 5:141-148.
- Edwards, R., and Gatehouse, J.A. 1999. Secondary metabolism. pp. 193-218. In: P.J. Lea., and R.C. Leegood (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. 384 p.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., and Bacher, A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 6:78-84.
- Facchini, P.J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:29-66.
- García-Ponce, B., and Rocha-Sosa, M. 2000. The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multi-functional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 157:181-190.
- Grant, J.J., and Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124:21-29.
- Grassmann, J., Hippeli, S., and Elstner, E.F. 2002. Plant's defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:471-478.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
- Hartmann, T. 1999. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207:483-495.
- Kanner, J., Harel, S., and Granit, R. 2001. Betalains-a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:5178-5185.
- Lamb, C., and Dixon, R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-275.
- Logan, B.A., Monson, R.K., and Potosnak, M.J. 2000. Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends in Plant Science* 5: 477-481.
- Maher, E., Bate, N.J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R., and Lamb, C. 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:7802-7806.
- Matern, U., Grimmig, B., and Kneusel, R.A. 1995. Plant cell wall reinforcement in the disease resistance response: molecular composition and regulation. *Canadian Journal of Botany* 73:511-517.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K.V., and Reddy, A.R. 1997. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry* 46:499-502.
- Paiva, N.L. 2000. An introduction to the biosynthesis of chemical used in plant-microbe communication. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:131-143.
- Paré, P.W., and Tumlinson, J.H. 1998. Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry* 47:521-526.
- Pearce, G., Marchand, P.A., Griswold, J., Lewis, N.G., and Ryan, C.A. 1998. Accumulation of feruloyltyramine and p-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* 47:659-664.
- Peña-Cortés, H., and Willmitzer, L. 1995. The role of hormones in gene activation in response to wounding. pp. 395-414. In: P.J Davis (ed.). *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 833 p.
- Petersen, M., Strack, D., and Matern, U. 1999. Biosynthesis

- of phenylpropanoid and related compounds. pp. 151-221. In: M. Wink (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Vol. 4. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 p.
- Phillips, M.A., and Croteau, R.B. 1999. Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* 4:184-190.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J., and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.
- Schmeller, T., Latz-Brüning, B., and Wink, M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44:257-266.
- Schmidt, A., Scheel, D., and Strack, D. 1998. Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxy-cinnamoyl-tyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* 205:51-55.
- Shen, B., Zheng, Z., and Dooner, H.K. 2000. A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:14807-14812.
- Snyder, B.A., and Nicholson, R.L. 1990. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science* 248:1637-1639.
- Wasternack, C., and Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2:302-307.
- Wink, M. 1992. Role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. pp. 133-169. In: E.A. Bernays (ed.). *Insect-plant interactions*. Vol. IV. CRC-Press. Boca Raton, Florida, USA. 367 p.
- Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M. Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 p.
- Wink, M., and Schimmer, O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. pp. 17-134. In: M. Wink M. (ed.). *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic Press. Sheffield, England. 304 p.

2. Crecimiento bacterial “*in planta*” y en cultivos líquidos con y sin betanina.

Con el objeto de conocer si hay un efecto de las betacianinas en el crecimiento de las bacterias: *P. syringae* ó *A. tumefaciens*, se midió el número de colonias de bacterias en las plantas infiltradas por una u otra bacteria después de 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h de infiltración. Para esto, las hojas de betabel fueron infiltradas por medio de una jeringa de 1.0 mL sin aguja, un inóculo de *P. syringae* o de *A. tumefaciens* (1.0×10^7 cfu/cm³). La zona infiltrada fue delimitada con un marcador indeleble y después de 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h de tratamiento, se colectaron cinco discos de 0.5 cm de diámetro de las áreas infiltradas. Los discos de hoja infiltrada fueron macerados con 1.0 mL de MgSO₄ (10 mM) y el extracto fue utilizado para preparar una serie de diluciones desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-5} . De estas diluciones, se tomaron alícuotas de 50 µL que se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo específico para cada una de las bacterias. Después de incubar las cajas Petri por 48 h a 25°C, se obtuvo visualmente el número de colonias desarrolladas en cada caja.

En la figura 1A, se muestra que en las hojas infiltradas con *P. syringae*, el número de colonias evaluado a 12 h de infiltración (1032 colonias/disco), disminuyó después de las 24 h del tratamiento hasta un valor de 145 colonias/disco, el cual se mantuvo constante hasta las 120 h de realizada la infiltración. Para el caso de las hojas infiltradas con *A. tumefaciens*, el número de colonias que se encontró a las 12h de infiltración (246 colonias/disco), se redujó después de las 24 h de infiltración hasta un valor de 42 colonias/disco, se mantuyó entre las 48 y 72 h de tratamiento, para nuevamente disminuir después de 96 y 120 h de la infiltración (Figura 1B).

En las hojas infiltradas con *P. syringae* o con *A. tumefaciens*, la acumulación de betacianinas comenzó a las 24 h y continuó aumentando entre las 48 y las 120 h de efectuada la infiltración (ver Figura 4, apartado 6.1), resultados que sugirieron que la acumulación de las betacianinas podrían tener relación con la disminución del crecimiento bacterial observado *in planta*. Para comprobar esta hipótesis, se midió el crecimiento de una u otra bacteria, incubadas en medio de cultivo líquido sin (control) y con betanina. Para esto, cada una de las bacterias fue crecida en 10 mL de medio de cultivo que contenía: K_2HPO_4 (10 g/L), KH_2PO_4 (4.5 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (1.0 g/L), citrato de sodio $\cdot 2H_2O$ (0.5 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.02 g/L) y glucosa (0.2 g/L). Después de 16 h de incubación a 25°C, el cultivo fue centrifugado y la pastilla resuspendida en $MgSO_4$ (10 mM) y una alícuota para dar una absorbancia a 600 nm de 0.1/mL de medio, se inoculó en 25 mL de medio de cultivo fresco. Los cultivos se incubaron sin y con betanina purificada de raíz de almacenamiento de betabel. El pigmento se añadió al inicio del crecimiento del cultivo quedando a una concentración final de betanina de 0.02, 0.050, 0.1, 1 y 10 mM. Cada 2 h se tomaron muestras de 1.0 mL de cada uno de los cultivos y el crecimiento bacterial fue medido por el cambio de absorbancia a 600 nm. Las cinéticas de crecimiento de *P. syringae* y de *A. tumefaciens* fueron similares entre el cultivo control y entre los cultivos creciendo en presencia de las concentraciones de betanina que se probaron (Figuras 2A y B), sugiriendo que betanina quizás no afecta el crecimiento de las bacterias.

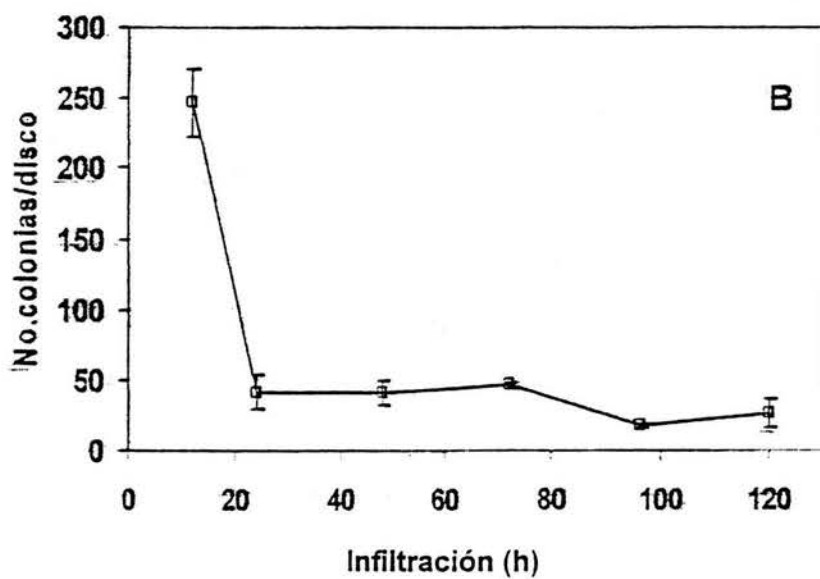
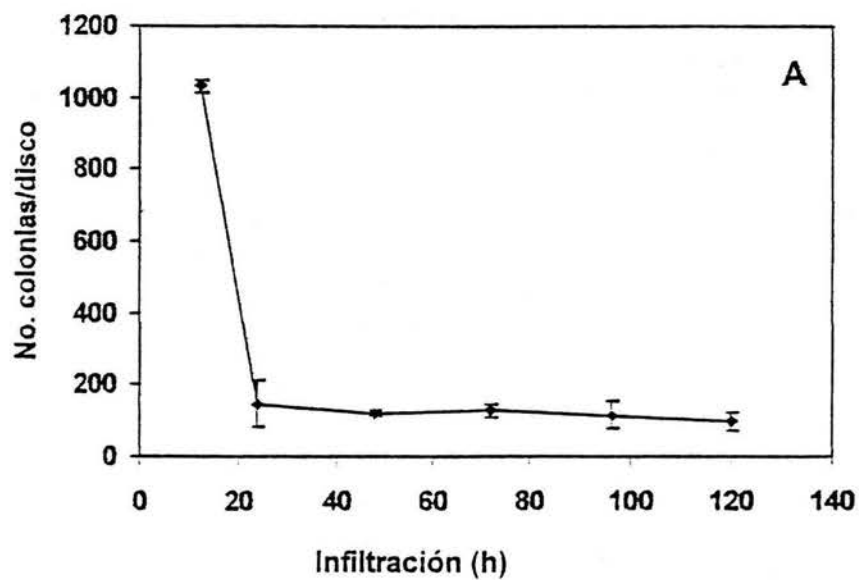


Figura 1. Crecimiento en la planta de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (A) y de *Agrobacterium tumefaciens* (B).

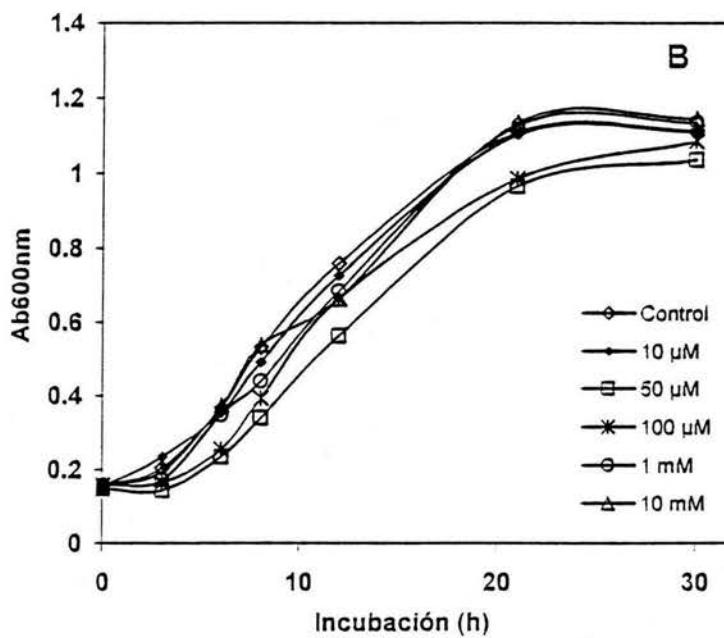
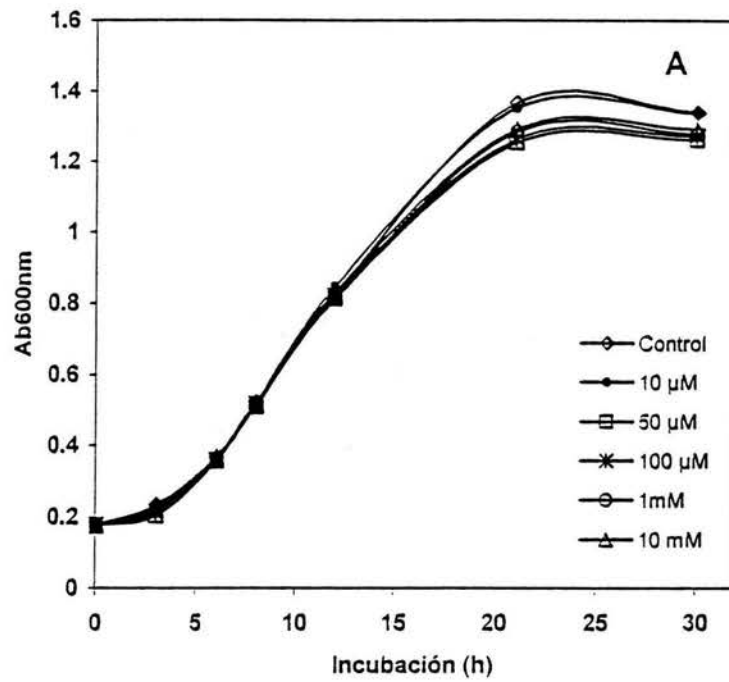


Figura 2. Crecimiento en cultivos líquidos de *Pseudomonas syringae* pt. *tabaci* (A) o de *Agrobacterium tumefaciens* (B) sin y con betanina.

3. Purificación y obtención de la curva patrón de betanina por HPLC.

La betanina se purificó a partir de raíz de almacenamiento de betabel. Para esto, por cada gramo de tejido congelado en nitrógeno líquido, homogeneizado con un molino para café y extraído por 16 h a 4°C, se le añadió 10 mL de metanol al 80% conteniendo ascorbato de sodio 50 mM. El extracto se centrifugó a 15 000 g por 30 min, el sobrenadante se filtró con papel filtro (Whatman # 1) y el precipitado se re-extrajó con 10 mL de metanol al 50%. Después de centrifugar en las condiciones anteriores, el sobrenadante también se filtró y se juntó con el primer sobrenadante obtenido con metanol al 80%. Ambos sobrenadantes se concentraron a presión reducida, a 30°C. El polvo se resuspendió en HCl al 0.1%, se aplicó a una columna de cromatografía empacada con Dowex 50W X 100 (45 X 2.5 cm de d.i) y las fracciones de carbohidratos y de pigmentos fueron obtenidas de acuerdo a las condiciones reportadas por Pourrat y col, (1998). La fracción rojo-violeta fue concentrada a presión reducida, purificada por Sephadex G-25 y por HPLC de acuerdo a las condiciones y al sistema de solventes descritos por Heuer y col (1996). La betanina purificada mostró un espectro de absorción con una λ_{max} a 536 nm y un tiempo de retención por HPLC de 3.1 min (Figs. 1A y B).

Un equipo de HPLC (Waters, Milford MA, EUA) fue equipado con una columna de Nucleosil C₁₈ (de 5 μ m y de 250 X 4 mm; Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y la elución de betacianinas se realizó con el sistema de solventes reportado por Heuer y col (1996). Para obtener la curva patrón de betanina, concentraciones conocidas del pigmento purificado de la raíz de almacenamiento de betabel fueron inyectadas a la

columna de HPLC y se obtuvo el área de respuesta de cada uno de los picos de betanina (Figura 1C).

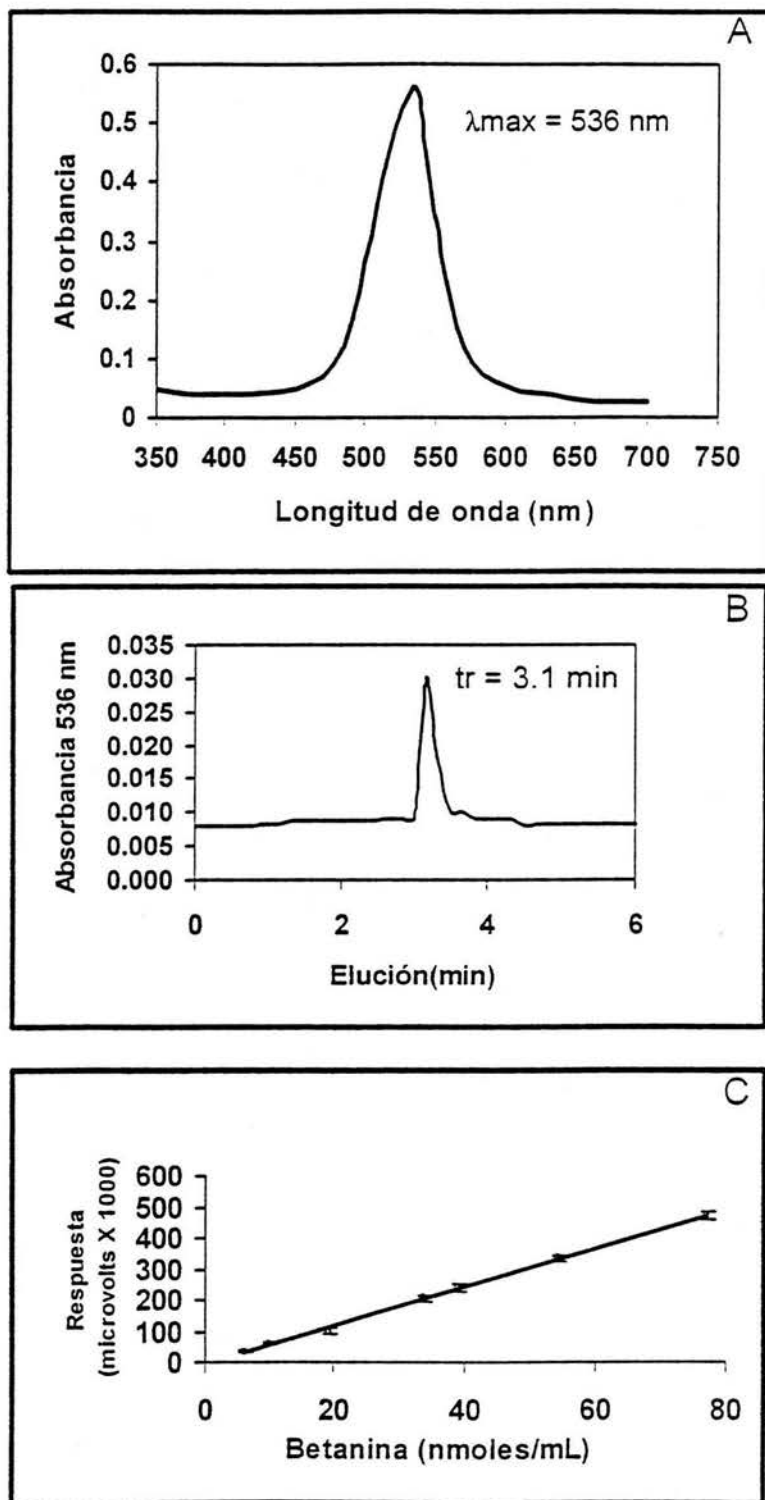


Figura 1. Espectro de absorción (A), perfil de HPLC (B) y curva patrón (B) de betanina purificada de raíz de almacenamiento de betabel.