



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CUANTIFICACIÓN Y EFECTO EN LA ULTRAESTRUCTURA
DEL CLOROPLASTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
INDUCIDAS POR UN AUMENTO DE BASES ESFINGOIDEAS
EN PLANTAS**

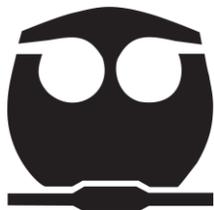
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
CINTHYA ROCÍO TAPIA DE AQUINO**

MÉXICO, D.F.

2012





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Marina Gavilanes Ruiz**

VOCAL: **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**

SECRETARIO: **Profesor: Gloria Gutiérrez Venegas**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**

2° SUPLENTE: **Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB. 101, CONJUNTO E, DEPTO. DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz _____

SUSTENTANTE:

Cinthya Rocío Tapia De Aquino _____

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruiz, en el laboratorio 101 del Depto. de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.



Cintha Rocío Tapia De Aquino realizó esta tesis gracias a una beca de CONACYT (101521), dentro del proyecto “Mecanismos de acción de los esfingolípidos en la actividad de proteínas membranales y en la muerte celular de plantas” (proyecto 101521).



El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de CONACYT al proyecto 101521 y de DGAPA (UNAM), a los proyectos PAPIIT IN211409 e IN210812.



Se agradece al Dr. Néstor Carrillo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina, por haber proporcionado las semillas de la línea mutante de *Arabidopsis thaliana pflD 18-18*.



En este momento tan importante en mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes me han acompañado y apoyado a lo largo de este camino.

A mi mamá Constantina De Aquino por sus enseñanzas, por su paciencia y lo más importante por todo el amor y apoyo que siempre me ha brindado.

A mi papá Jaime Tapia por todo su amor, su apoyo y por todas las risas que hemos compartido.

A mi hermano Sebastián (que siempre me salva la vida) por su corazón tan noble, porque siempre me cuida y me ofrece su ayuda incondicional y a mi hermanito Mauricio por su paciencia y comprensión.

A mi hermanita Ana Margarita por muchos de los recuerdos más bellos de mi infancia.

A mis amigos de la honorable e inolvidable Facultad de Química, Anaid, Arturo, Atzin, Carmen, Claudia, Cristina, Daniela, Dora, Francisco, Heidi, Rubén, Yoana, por su amistad (que significa mucho para mi) y por todos los momentos que hemos compartido a lo largo de nuestra formación profesional.

A mis amigos y compañeros del laboratorio (L-101) Ariadna, Diana, Doris, Fernanda, José, Lupita y Paulina (L-114) que hacen muy gratas las horas de trabajo en el laboratorio.

A la Q. F. B. Consuelo Enríquez Arredondo, por su ayuda, amabilidad y paciencia.

Finalmente quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por ser una excelente profesora, por todas sus atenciones, por ser tan comprensiva con nosotros los alumnos y sobre todo por el tiempo y esmero que dedicó a la realización de este trabajo de tesis.

A todos, de corazón, muchas gracias.

“Lo importante de todo
es nunca dejar de hacerse preguntas.
La curiosidad tiene su propia razón de existir”

Albert Einstein

*A mi mamá y a mi papá,
que les debo todo
Gracias, los amo.*

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
1. Sistemas constitutivos de defensa contra patógenos.....	2
2. Sistemas inducibles de defensa contra patógenos.....	2
2.1 La Respuesta de Hipersensibilidad (HR).....	3
2.1.1 Reconocimiento del patógeno por la planta hospedera.....	4
2.1.2 Inmunidad gen por gen.....	4
2.1.3 Inmunidad no hospedero.....	4
2.1.4 Características morfológicas de la MCP en la HR.....	5
2.1.5 Transducción de señales que llevan a la HR.....	5
2.1.6 Estructura de las bases esfingoideass y su función en la MCP-HR.....	6
2.2 Especies reactivas de oxígeno	8
2.2.1 Especies reactivas de oxígeno en la defensa contra patógenos de las plantas.....	10
2.2.2 Especies reactivas de oxígeno como moléculas señalizadoras en la defensa contra patógenos de las plantas.....	11
2.2.3 Sitios generadores de ERO en las plantas	11
2.2.4 Los cloroplastos y la actividad fotosintética como sitios generadores de ERO	12
2.2.5 Formación de oxígeno singulete mediado por el triplete de clorofila	13
2.2.6 Disipación de energía térmica.....	15
2.2.7 Generación de oxígeno singulete en el Fotosistema II	16
2.2.8 Generación de anión superóxido en el Fotosistema I	17
2.2.9 Foto reducción de O ₂ (el ciclo agua-agua).....	18
III. ANTECEDENTES INMEDIATOS	20
IV. JUSTIFICACIÓN	22
V. HIPÓTESIS.....	23
VI. OBJETIVOS	23
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1. Reactivos especiales	24
2. Material biológico	24
3. Germinación de semillas de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
4. Germinación y cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) variedad Canario 60.....	26
5. Cultivo de la cepa de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>P. syringae avr</i>).....	27

6. Preparación del inóculo bacteriano.....	27
7. Exposición de los tejidos vegetales a los tratamientos que producen aumento en los niveles endógenos de bases esfingoideas (fumonisina B1 y el patógeno <i>P. syringae avr</i>)	28
8. Toma de muestra de los tejidos vegetales expuestos a los tratamientos.	29
9. Determinación de H ₂ O ₂ por el método de naranja de xilenol	32
10. Visualización de la ultraestructura celular de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> wt y <i>pflD 18-18</i> expuestas a FB1 por microscopía electrónica de transmisión	33
11. Registro fotográfico	33
12. Análisis estadístico.....	33
VIII. RESULTADOS	34
1. Determinación de H ₂ O ₂ por el método de naranja de xilenol	34
2. Detección de H ₂ O ₂ en hojas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) variedad Canario 60. Control utilizando H ₂ O ₂ adicionado en diferentes etapas de la toma de muestra y de cuantificación por el método de naranja de xilenol	38
3. Infiltración de suspensiones de patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>P. syringae avr</i>) y FB1 en diferentes concentraciones y su efecto en el fenotipo de hojas de plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) var. Canario 60.	39
4. Inducción de la HR y cuantificación de H ₂ O ₂ en plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) var. Canario 60.	43
4.1. Efecto de la FB1 en la producción de H ₂ O ₂ en plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) var. Canario 60.....	43
4.2. Efecto de la infiltración del patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (<i>P. syringae avr</i>) en la producción de H ₂ O ₂ en plantas de frijol var. Canario 60 (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	45
5. Inducción de la HR y la producción de H ₂ O ₂ en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> genotipo silvestre (wt) y mutante <i>pflD 18-18</i>	52
5.1. Efecto de la FB1 20 µM en la producción de H ₂ O ₂ en plántulas de <i>A. thaliana</i> genotipo silvestre (wt) y mutante <i>pflD 18-18</i>	52
5.2. Efecto de la FB1 50 µM en la producción de H ₂ O ₂ en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
5.2.1. Curso temporal de producción de H ₂ O ₂ en un periodo de 0 a 390 min posteriores a la exposición con FB1 50 µM de plántulas de	

<i>A. thaliana</i> genotipo silvestre.....	56
5.2.2. Efecto de la FB1 50 µM en la producción de H ₂ O ₂ en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> genotipo silvestre (wt) y mutante <i>pflD 18-18</i>	57
5.3. Efecto de la exposición de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> genotipo silvestre (wt) y mutante <i>pflD 18-18</i> a la FB1 en la ultraestructura del cloroplasto.....	61
IX. DISCUSIÓN.....	66
1. La técnica de naranja de xilenol como forma de cuantificar las ERO formadas en la MCP- HR inducida por aumento de bases esfingoidea endógenas	66
2. Análisis de los fenotipos y la producción de ERO de las hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol) var. Canario 60.....	68
2.1. Análisis del efecto de la infiltración de FB1 y <i>Pst avr</i> en el fenotipo y la producción de ERO de las hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol) var. Canario 60	68
3. Análisis del efecto de la FB1 20 µM en el fenotipo y la producción de ERO en plántulas de la línea silvestre y mutante <i>pflD 18-18</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
4. Análisis del efecto de la FB1 50 µM en el fenotipo y la producción de ERO de <i>Arabidopsis thaliana</i> a tiempos tempranos de la inducción de la HR de las líneas silvestre y mutante <i>pflD 18-18</i>	70
5. Análisis del efecto de la FB1 50 µM en el fenotipo y la producción de ERO a tiempos largos de <i>Arabidopsis thaliana</i> de las líneas silvestre y mutante <i>pflD 18-18</i>	71
6. Análisis de la ultraestructura celular de plántulas de las líneas silvestre y mutante <i>pflD 18-18</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> tras la inducción de la HR con FB1 50 µM.....	72
X. RESUMEN DE RESULTADOS.....	75
XI. CONCLUSIÓN.....	75
XII. PERSPECTIVAS.....	76
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	77
XIV. APÉNDICE.....	85

AGPasa	ADP- glucosa pirofosforilasa
APX	Ascorbato peroxidasa
AS	Ácido salicílico
Asc	Ascorbato
ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato
avr.	Avirulenta
Avr	Gen de avirulencia
BCL	Base de cadena larga
C	Cloroplasto
CuZn-SOD	Superoxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
d18:0	Esfinganina
d18:0-P	Esfinganina fosfato
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAF	2', 7' dihidroclorofluoresceína
DHA	Dehidroascorbato
dpi	Días post-inducción
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FB1	Fumonisina B1
Fdx	Ferredoxina
Fe-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de hierro
Fld	Flavodoxina
FMN	Mononucleótido de flavina
FNR	Ferredoxin NADP+ reductasa
FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
FTR	Ferredoxina-tiorredoxina reductasa
g	Gramo
GA	gránulo de almidón
GSH	Glutati3n reducido
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
hpi	Horas post-inducción
HR	Respuesta de hipersensibilidad

M	Molar
MCP	Muerte celular programada
MDA	Monodehidroascorbato
MP	Membrana plasmática
MET	Microscopia electrónica de transmisión
mg	Miligramo
min	Minuto
Mit	Mitocondria
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPK6	Cinasa activada por mitógeno 6 (MAP cinasa 6)
NADH	Nicotinamida-adenin dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida-adenin dinucleótido oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato reducido
nmol	nanomol
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PC	Pared celular
<i>Pst avr.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRPM1</i>
pv.	Patovar
<i>R</i>	Gen de resistencia
RER	Retículo endoplásmico rugoso
s	Segundo
SOD	Superóxido dismutasa
SPT	Serina palmitoil transferasa
T	Tilacoides
t18:0	Hidroxiesfinganina
Ton	Tonoplasto
Trx	Tiorredoxina
UDO	Unidades de densidad óptica
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultra violeta
VC	Vacuola central
wt	Wild type (silvestre)
μL	Microlitros
μM	Micromolar

I. RESUMEN

La respuesta de hipersensibilidad (HR) es un mecanismo de defensa contra el ataque de un patógeno biótrofo que se caracteriza por la muerte de las células hospederas en el sitio de infección mediante un proceso programado de muerte. La vía de transducción de señales que desencadena la HR involucra eventos como la acumulación de bases esfingoideas o bases de cadena larga (BCL), la activación de cascadas de fosforilación, así como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO producidas durante la HR producen efectos que desembocan en una respuesta global de defensa, como el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular y los eventos de señalización que conducen a activación de genes y a otras respuestas moleculares relacionadas con la protección contra patógenos. En las plantas, las ERO pueden producirse en diversos organelos y reacciones del metabolismo. Evidencias obtenidas por nuestro grupo de trabajo sugieren que el cloroplasto es un organelo con una participación significativa en la generación de ERO inducida por la acumulación de bases esfingoideas en la HR. Con el objetivo de determinar la temporalidad de producción de ERO cuantitativamente, así como la contribución del cloroplasto en la formación de estas especies reactivas durante la HR, se cuantificaron por el método de naranja de xilenol las ERO producidas en hojas de plantas *Phaseolus vulgaris* y en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de genotipos silvestre y mutante *pflD 18-18* expuestas a dos tratamientos. Estos últimos inducen la HR mediante la acumulación de las bases esfingoideas: la micotoxina fumonisina B1 (FB1), o el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1*. La temporalidad de formación de H₂O₂ en las plantas de *Phaseolus vulgaris* mostró un máximo a las 8 horas post-inducción (hpi) tanto con FB1 como con el patógeno *P. syringae* *avr*. Por otro lado, la mutante de *A. thaliana pflD 18-18* que expresa a la proteína flavodoxina y que previene la formación de ERO en el cloroplasto, produjo aproximadamente un 36.7 % menos H₂O₂ a las 72 hpi con FB1 50 µM. Finalmente, el análisis ultraestructural de ambas líneas de plántulas inducidas bajo estas condiciones mostró la preservación de la integridad de la membrana tilacoidal y la acumulación de almidón en los cloroplastos de las plántulas de la línea mutante, en contraste con los cloroplastos de las plántulas de la línea silvestre, que mostraron daño significativo en su ultraestructura.

Los resultados obtenidos sugieren que el cloroplasto sí contribuye de manera importante y significativa a la producción de ERO en las fases avanzadas del establecimiento de la MCP inducida por el aumento de bases esfingoideas en la HR; éstas ERO probablemente cumplan un papel importante en la contención de los patógenos y otras respuestas de defensa, sin embargo, lo anterior conlleva a la destrucción del cloroplasto, suceso que posiblemente cumpla la función de hacer irreversible el proceso de muerte celular que caracteriza a la HR.

II. INTRODUCCIÓN

El estado de enfermedad en las plantas ocurre con mucha menor frecuencia de la que se esperaría dada la gran diversidad de especies de plantas y de patógenos potenciales que las pueden atacar. Lo anterior indica que las plantas poseen mecanismos de defensa que son muy efectivos ante las posibilidades de infección. Lo anterior se refleja en que, en términos generales, cada especie de planta puede ser afectada por aproximadamente 100 diferentes tipos de hongos, bacterias, virus y nemátodos. Frecuentemente, una sola planta es atacada por cientos o miles de ellos. En general, las plantas se defienden de los patógenos mediante una combinación de sistemas constitutivos o preformados e inducibles que resultan ser muy efectivos (Agrios 1997; Gray 2004).

1. Sistemas constitutivos de defensa contra patógenos

Pueden ser características estructurales que actúan como barreras físicas que impiden la extensión del patógeno a través de la planta, como la cutícula, la cantidad y la calidad de cera que recubre las células epiteliales, así como el grosor de su pared celular, el tamaño, localización y forma de los estomas. Sin embargo, los factores constitutivos de defensa también pueden derivarse de reacciones bioquímicas (diferentes en cada sistema planta-patógeno) que toman lugar en las células y tejidos de plantas y que producen sustancias que son tóxicas para el patógeno o que crean condiciones que inhiben su crecimiento en la planta tales como la producción de exudados fungitóxicos en el tomate y caña de azúcar, o compuesto fenólicos y taninos presentes en frutos jóvenes y hojas, así como saponinas que tienen actividad membranolítica, entre otros. (Agrios 1997).

2. Sistemas inducibles de defensa contra patógenos

Debido a que las plantas están en constante competencia entre ellas mismas, así como con otros organismos, por las limitadas fuentes de luz, agua y nutrientes, no pueden asignar una parte sustancial de su metabolismo a la producción continua de metabolitos de defensa sólo en espera de su requerimiento. Por ello, una estrategia muy económica es la de desplegar una percepción muy eficiente del patógeno cuando este se presenta y la expresión rápida y eficaz de un sistema de transducción de la señal (de ingreso del patógeno) a los varios compartimentos celulares involucrados en las reacciones de defensa. Esta estrategia permite a las plantas expresar continuamente (constitutivamente) sólo una pequeña cantidad de proteínas de defensa, pero además también aumentarla de acuerdo a la demanda. Cada célula de la planta puede

reprogramar su síntesis de proteínas para modificar la composición de proteínas necesarias para adaptarse a los cambios. Mientras algunas defensas inmediatas contra el ataque de patógenos se basan en el reforzamiento de barreras estructurales (tales como la lignificación y la formación de papilas) a través de la activación de enzimas existentes (Thordal-Cristensen *et al.* 1997), una gran parte de las defensas inducidas depende de la inducción transcripcional de genes de defensa (Mizoguchi *et al.* 1996; Chen *et al.* 2002).

Un importante mecanismo inducible de defensa contra patógenos es la Respuesta de Hipersensibilidad (HR).

2.1 La respuesta de hipersensibilidad (HR)

La respuesta de hipersensibilidad es un mecanismo de defensa contra el ataque de un patógeno biótrofo, que se caracteriza por la rápida muerte de las células hospedadas, mediante un proceso de muerte celular programada (MCP) en el sitio de infección del patógeno (Goodman & Novacky 1994; Dorey *et al.* 1997).

La HR es la culminación de la respuesta de defensa contra patógenos y comienza con el reconocimiento del patógeno, lo cual activa una cascada de reacciones bioquímicas en las células atacadas y en sus vecinas, conduciéndolas a nuevas o alteradas funciones celulares para contender con el ataque del patógeno (Agrios 1997).

La MCP por HR evita la generación de nutrientes extraíbles por los patógenos biótrofos, crea un ambiente desfavorable para los mismos y priva de la humedad esencial para el crecimiento de los patógenos. Por otro lado, la subsecuente explosión oxidativa producida al inicio de la MCP contribuye a crear barreras físicas y químicas tales como la lignificación y la deposición de callosa y fenoles que obstaculizan la diseminación del patógeno (Lamb & Dixon 1997), propiciando que los patógenos sean atrapados en las lesiones necróticas y que generalmente sean eliminados rápidamente (Agrios 1997), ya que las células en proceso de muerte en la HR producen excesivas cantidades de enzimas antimicrobianas y otros compuestos tóxicos que va más allá de los niveles que pueden ser tolerados por las células vivas (Devlin & Gustine 1992; Rusterucci *et al.* 1996; Koch *et al.* 1998).

La HR también tiene un papel central en la preparación de las plantas atacadas para el desarrollo de la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), la cual protege a la planta contra subsecuentes infecciones por el mismo o por otros patógenos no relacionados (Ryals *et al.* 1996).

2.1.1 Reconocimiento del patógeno por la planta hospedera

El reconocimiento del patógeno por la planta es un evento determinante, es decir, la rapidez con que la planta reconozca la presencia del patógeno y la prontitud con la que pueda enviar sus señales de alarma y movilizar sus defensas, determina que tan severos serán los síntomas o que la infección no tome lugar, como en la HR.

La planta puede reconocer moléculas habituales de los patógenos como la flagelina, la quitina, los lipopolisacaridos, entre otros, que activan un sistema de inmunidad denominado no hospedero, o puede reconocer a las moléculas denominadas efectores, que pueden ser específicos del patógeno para activar un sistema de inmunidad del tipo gen por gen. En ambas interacciones, el patógeno y el hospedero son incompatibles, es decir son antagónicos, ya que pueden converger en una HR en la planta y expresar mecanismos de defensa ocasionando que la enfermedad *per se* no suceda (Figura 1)

2.1.2 Inmunidad gen por gen

El sistema de inmunidad del tipo gen por gen involucra una cierta especificidad en el reconocimiento del patógeno, ya que durante la interacción planta patógeno, sucede el reconocimiento de un efector liberado por un patógeno en específico, ya que es codificado por un gen, denominado gen de avirulencia (gen *Avr*), denominado así porque lleva al desarrollo de la resistencia en el hospedero, lo que lo hace avirulento; este efector puede ser reconocido por la planta a través del producto de un gen de resistencia, denominado gen *R* (Flor 1942; Agrios 1997).

2.1.3 Inmunidad no hospedero

La inmunidad mostrada por una especie completa de plantas a un patógeno específico es denominada inmunidad no-hospedero y es la forma más común de inmunidad en la naturaleza. La inmunidad no hospedero está presente en cada planta y le provee de protección contra la mayoría de los organismos potencialmente patogénicos (Gray 2004)

La planta comienza a recibir las señales moleculares (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPS) que indican la presencia del patógeno tan pronto como el patógeno establece contacto físico con la planta mediante receptores localizados en la superficie de la célula. Varios patógenos, especialmente hongos y bacterias liberan en su ambiente inmediato una variedad de sustancias como glicoproteínas, carbohidratos, ácidos grasos y péptidos, que en varias combinaciones patógeno-hospedero, actúan como evocadores patogénicos del reconocimiento por la planta. En muchos casos, las enzimas de la planta hospedera rompen los polisacáridos de la superficie de un

patógeno (o viceversa) y liberan monómeros, los cuales actúan como evocadores del reconocimiento del patógeno (Agrios 1997). De los PAMPs que se conocen y pueden ser reconocidos por las células vegetales se encuentran el péptido flg22 de la flagelina del flagelo bacteriano, que es reconocido por el receptor membranal FLS2 (Zipfel *et al.* 2007), el factor de elongación bacteriano Tu, los lipopolisacaridos de la pared de bacterias Gram negativas, la quitina y ergosterol de la pared celular de hongos (Wit 2007).

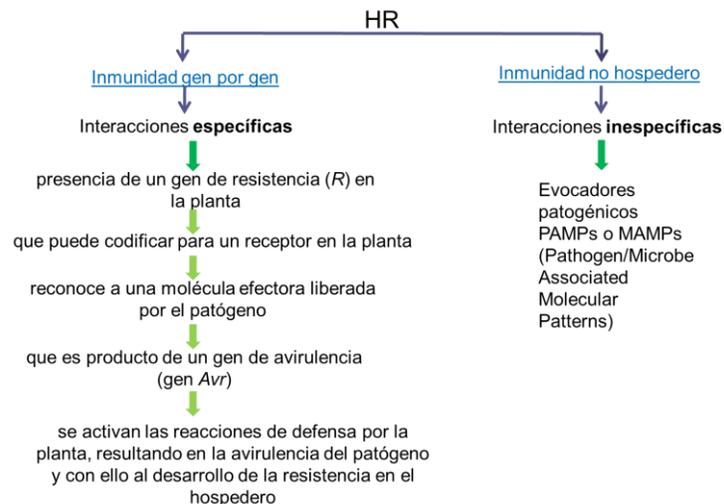


Figura 1. Sistemas de inmunidad en los que se presenta la respuesta de hipersensibilidad (HR). Se muestran los dos mecanismos más importantes de defensa, la inmunidad gen por gen y la inmunidad no hospedero.

2.1.4 Características morfológicas de la MCP en la HR

Morfológicamente la MCP tipo HR es un tipo único y específico de muerte celular (Mur *et al.* 2008). La MCP por HR usualmente exhibe todas las características de la necrosis celular de plantas como: aumento de tamaño de las mitocondrias (hinchamiento), pronta ruptura de la membrana plasmática, encogimiento del protoplasto, presencia de remanentes celulares no procesados, aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, caída en el nivel de ATP, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Van Doorn *et al.* 2011). Esta MCP se acompaña al mismo tiempo por un crecimiento de vacuolas líticas (Hofius *et al.* 2009) y ruptura del tonoplasto, lo cual, en algunos casos puede requerir enzimas de procesamiento vacuolar (VPE) de la vacuola (Hatsugai *et al.* 2004; Rojo *et al.* 2004). Además se presentan alteraciones morfológicas en el cloroplasto (Mur *et al.* 2008), como se ha observado recientemente en la HR inducida por FB1 en *Arabidopsis thaliana*, mostrando una marcada desintegración de los tilacoides (Saucedo-García *et al.* 2011b).

2.1.5 Transducción de señales que llevan a la HR

El proceso de transducción de señales que llevan a la HR aún es objeto de mucha investigación, sin embargo, se sabe que la HR es más que simple muerte celular, la HR constituye una coordinada respuesta de la planta al ataque del patógeno, que requiere de un metabolismo activo porque involucra una serie de complejas respuestas a diferentes niveles y que por lo tanto requiere de una sofisticada cadena de transducción para coordinar las reacciones individuales de las vías de señalización (Gray 2004).

Algunos de los pasos de la señalización involucrados en la HR y que son eventos tempranos subsecuentes al reconocimiento del patógeno como:

- La alteración de flujos de iones, en particular, una entrada de H^+ (lo cual produce una alcalinización extracelular) y de Ca^{2+} a las células (Glazener *et al.* 1996; Xiong *et al.* 2008; Lachaud *et al.* 2010).
- La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Yang *et al.* 1997; Richberg *et al.* 1998).
- La producción de óxido nítrico (NO) (Delledonne *et al.* 1998; Klessig *et al.* 2000).
- La producción de ácido salicílico para el establecimiento de la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) (Agrios 1997)
- La activación de cascadas de fosforilación (proteínas cinasas muy diversas como la MPK3 y la MPK6) (Liu *et al.* 2007; Saucedo-García *et al.* 2011a, b) y la activación de proteasas (caspasas y enzimas de procesamiento vacuolar, VPE) (Hatsugai *et al.* 2004; Rojo *et al.* 2004; Coll *et al.* 2010; Coll *et al.* 2011)
- La acumulación de bases esfingoideas intracelulares, de las cuales destaca la esfinganina (d18:0) (Abbas *et al.* 1994; Shi *et al.* 2007; Saucedo-García *et al.* 2011a, b).

2.1.6 Estructura de las bases esfingoideas y su función en la MCP-HR

Las bases esfingoideas o de cadena larga (BCL) son moléculas precursoras de los esfingolípidos complejos (Figura 2), que son componentes esenciales de las membranas celulares, ya que constituyen aproximadamente el 40% de los lípidos de éstas (Verhoek *et al.* 1983; Yoshida & Uemura 1986; Haschke *et al.* 1990; Sperling *et al.* 2005; Laloi *et al.* 2007). Los esfingolípidos complejos se componen de una base de cadena larga (esfingosina) que se une a un ácido graso

mediante un enlace amida y a un alcohol fosforilado (esfingomielinas) o uno o varios carbohidratos (glicosfingolípidos) mediante un enlace éster.

Las bases esfingoideas se constituyen de una cadena alifática de 14 a 22 átomos de carbono, que tienen una región polar que consta de dos grupos -OH en las posiciones C1 y C3 y un grupo $^+NH_3$ en la posición C2. (Figura 2), la cadena alifática puede presentar insaturaciones en las posiciones C4 y C8, así como grupos -OH en la posición C4. Dada la variedad en número y posición de las insaturaciones e hidroxilaciones, puede existir una gran diversidad de bases esfingoideas y esfingolípidos complejos.

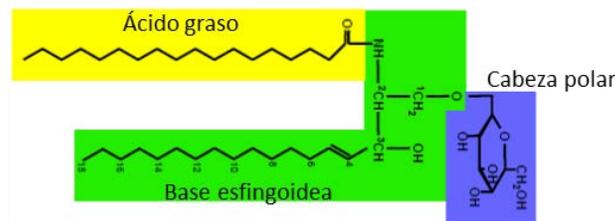


Figura 2. Estructura general de los esfingolípidos complejos.

La síntesis de bases esfingoideas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico. La síntesis comienza con la formación de 3-cetoesfinganina a partir de palmitoil CoA y serina mediante la actividad de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT), posteriormente la 3-cetoesfinganina se convierte en esfinganina (d18:0) mediante la 3-cetoesfinganina reductasa. La esfinganina origina a otras bases modificadas como la esfinganina -1-fosfato (d18:0-P) por la acción de la esfingosina cinasa o a la OH-esfinganina por acción de la base esfingoidea C4-hidroxilasa, o bien transformarse en ceramida mediante la ceramida sintasa, la cual une un ácido graso a la esfinganina. La ceramida es el precursor inmediato de los esfingolípidos complejos en los que la ceramida recibe un alcohol fosforilado o uno o más carbohidratos (Sperling *et al.* 2005) (Figura 3).

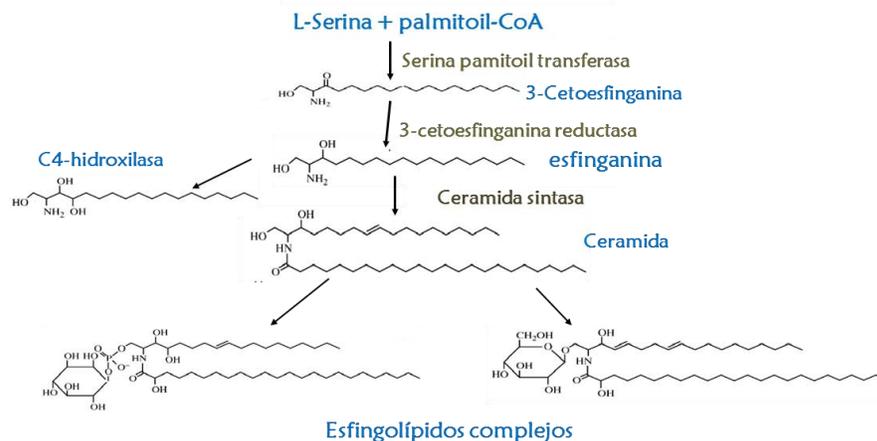


Figura 3. Biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos.

Las bases esfingoideas producidas inicialmente en plantas son la esfinganina (o dihidroesfingosina), la cual está completamente saturada y contiene dos grupos hidroxilo. Esta LCB puede ser modificada posteriormente por la adición de un grupo hidroxilo en C-4 y por la introducción de dobles ligaduras entre los átomos de carbono C-4 y C-5 (Chen *et al.* 2009).

Las bases esfingoideas más abundantes en los esfingolípidos de las plantas son la esfinganina (d18:0) y la 4-hidroxiesfinganina (o dihidroesfingosina, t18:0) (Markham *et al.* 2007).

Las bases esfingoideas además de tener una función estructural al formar parte de los esfingolípidos complejos, también poseen una función señalizadora, ya que participan en la vía de transducción de señales que llevan a la MCP durante la HR, como se ha observado en la MCP inducida por la toxina fumonisina B1 (FB1) en *Arabidopsis thaliana* (Abbas *et al.* 1994; Shi *et al.* 2007; Saucedo-García *et al.* 2011a, b). La toxina induce la HR mediante la inhibición de la enzima ceramida sintasa de la biosíntesis de esfingolípidos, ocasionando la acumulación del sustrato de esta enzima, la esfinganina, así como de sus formas derivadas, la 4-hidroxiesfinganina y sus formas fosforiladas, esfinganina 1-fosfato y 4-hidroxiesfinganina 1-fosfato. La FB1 es una toxina producida en condiciones normales por hongos de la especie *Fusarium moniliforme*, patógeno de plantas de maíz y trigo.

Además de la acumulación de bases esfingoideas, otro intermediario importante durante el desarrollo de la HR y la MCP es la producción de ERO.

2.2 Especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son especies moleculares de oxígeno que han sufrido la adición de uno o más electrones, por lo que son energéticamente más reactivas que el oxígeno molecular. Las ERO incluyen los radicales libres como el anión superóxido O_2^- , que tiene una vida media de 2 a 4 μs y su forma protonada, el radical perhidroxilo HO_2 , cuya formación toma lugar en medio ácido y el radical hidroxilo OH^\bullet , además del peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , una molécula relativamente estable y sin carga que tiene una vida media de 1 ms y el oxígeno singulete (O^1_2) que se forma por el cambio de spin de uno de los electrones desapareados del oxígeno molecular (Figura 4).

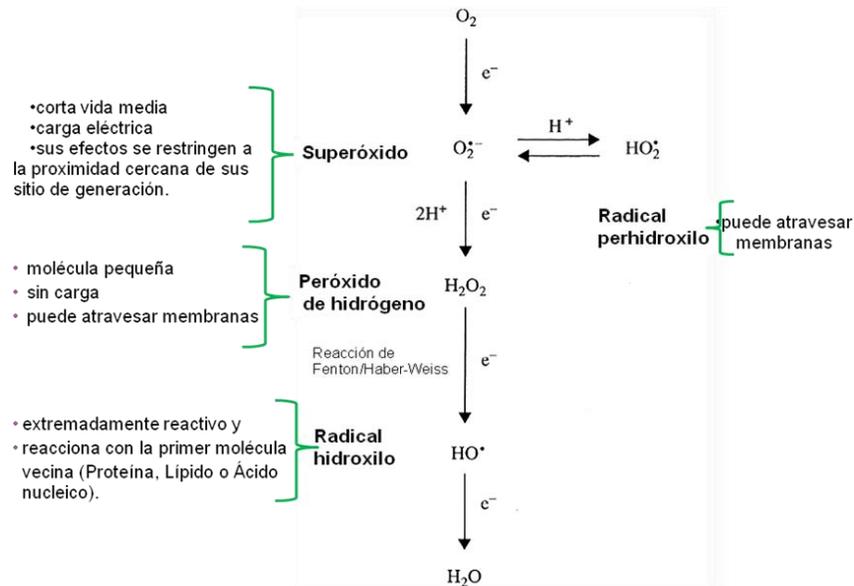


Figura 4. Formación de especies reactivas de oxígeno y sus principales características. Modificado de Smirnoff (2005).

Las ERO son moléculas que poseen un poder oxidante que las hace potencialmente peligrosas para el ambiente celular que las rodea, ya que dentro de sus efectos directos se encuentran la inactivación de enzimas mediante la modificación de grupos Fe-S por el radical $O_2^{\bullet -}$ (Van Breusegem *et al.* 2001; Halliwell 2006) o de grupos tiol por el H_2O_2 (Halliwell 2006), la oxidación de lípidos mediante la extracción de protones de los ácidos grasos poliinsaturados por el radical HO_2^{\bullet} , que puede atravesar membranas biológicas. Por otra parte, el radical OH^{\bullet} puede reaccionar con cualquier molécula con la que entre en contacto (Halliwell 2006), ocasionando la oxidación de lípidos y proteínas y el entrecruzamiento del DNA. Además el $O_2^{\bullet -}$ es una ERO altamente inestable que daña macromoléculas, principalmente mediante reacciones de adición que producen hidroperóxidos (Halliwell & Gutteridge 1999).

Una propiedad adicional de las ERO es que poseen la capacidad de interconvertirse en otras especies o llevar a la formación de otros radicales por reacción entre ellos, por ejemplo, el $O_2^{\bullet -}$ puede ser rápidamente convertido a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD), también puede reaccionar con el radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) para formar peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), que se protona para formar ácido peroxinitroso ($ONOOH$) y que es un poderoso agente oxidante. Por otro lado, los radicales $O_2^{\bullet -}$ y el H_2O_2 reaccionan con iones metálicos como Fe (II) y Cu (II), que dan lugar a la formación de los radicales OH^{\bullet} altamente reactivos en la denominada reacción de Fenton. (Gechev *et al.* 2006; Halliwell 2006) Debido a los efectos dañinos de las ERO, las plantas

poseen diversos mecanismos que regulan su presencia en las células y mantiene los niveles de ERO bajo control.

Sin embargo, a pesar de los efectos dañinos de las ERO, sus mecanismos de regulación y producción les permite una participación útil en el desarrollo de procesos naturales en la planta como la senescencia, la adaptación al estrés causado por factores abióticos y la muerte celular programada en la HR (Gechev *et al.* 2006).

2.2.1 Especies reactivas de oxígeno en la defensa contra patógenos de las plantas

Las ERO se producen durante la HR en la defensa contra patógenos ocasionando tanto efectos directos en la defensa, como efectos indirectos mediante eventos de señalización que conducen a la activación de genes relacionados con la defensa y con la MCP.

Dos de los principales efectos directos de las ERO son la muerte directa de los patógenos y el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular de la propia planta. Existen glicoproteínas preformadas en la pared celular que contribuyen a su fortificación, como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), que se entrecruzan rápidamente en la matriz de la pared vía una tirosina que reacciona con H_2O_2 . Por otro lado, la subsecuente síntesis *de novo* de las HRGPs inicia adicionalmente la polimerización de lignina, un polímero fenólico hidrofóbico y altamente complejo a base de coniferil alcohol, siringil alcohol y *p*-cumaril alcohol cuya polimerización involucra H_2O_2 y peroxidasa, ambos procesos actúan reforzando la pared celular haciéndola más resistente contra la penetración microbiana (Buchanan 2000; Smirnov 2005).

De los principales efectos indirectos de las ERO destacan la liberación de moléculas señalizadoras como los fitoprostano, que son productos de la oxidación de lípidos que llevan a la activación de proteínas cinasas, la expresión de genes relacionados con la defensa y la acumulación de fitoalexinas (Thoma *et al.* 2003), así como la inducción de la síntesis de ácido salicílico a través de la inducción de la enzima ácido benzoico 2 hidroxilasa (BA 2-H) mediada por H_2O_2 , la cual es necesaria para la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Buchanan, *et al.* 2000).

La expresión de genes mediada por las ERO puede suceder a través de dos mecanismos, como resultado de la modificación directa de la actividad de factores de transcripción (TF) o indirectamente a través de una cascada de transducción de señales, mediante la activación de proteínas cinasas (PKs) como las MAPKs que finalmente fosforilan TFs que llevan a la expresión de genes.

Además de la expresión de genes, las ERO pueden conducir a la MCP a través de una vía de transducción de señales que incluyen la acumulación de bases esfingoides, en particular esfinganina (d18:0) y dihidroesfingosina (t18:0) (Saucedo-García *et al.* 2011a, b). Aunque el mecanismo mediante el cual las ERO transducen la señal no se ha establecido, se ha reportado la activación de PKs via ERO tal como la serina/treonina cinasa OXI1 (oxidative signal-inducible 1) necesaria para la activación de 2 MAPKs: la AtMPK3 y la AtMPK6 (Rentel *et al.* 2004; Gechev 2005), o la OMTK1 (oxidative stress-activated MAP triple-kinase1) que puede específicamente activar a la MAPK MMK3 que resulta en la muerte celular (Nakagami *et al.* 2004).

2.2.2 Especies reactivas de oxígeno como moléculas señalizadoras en la defensa contra patógenos de las plantas.

No se ha establecido con claridad en que consiste la función señalizadora de las ERO dentro de la HR. Se ha propuesto que las ERO como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden actuar como moléculas señalizadoras dentro de una vía de señalización mediante la oxidación de los grupos tiol (-SH) de los residuos de cisteína de proteínas blanco específicas. El grupo tiol puede formar un puente disulfuro (-S-S-) o un grupo sulfenilamida, (que se forma por la oxidación del grupo tiol a ácido sulfénico y la subsecuente ciclización del aminoácido dentro de la proteína) (Figura 3). Finalmente, estos cambios llevan a cambios conformacionales en tales proteínas, provocando su reconocimiento por otra proteína señalizadora, o su activación catalítica (Smirnov 2005). De esta manera, el papel de las ERO es amplificar el eslabón anterior de señalización. Una vez que el mensaje es transmitido, la proteína regresa a su conformación original mediante la reducción de dichos grupos oxidados, cuyas reacciones están mediadas por el glutatión reducido (GSH), tioredoxina (TRX) o sulfiredoxina (Srx) (Figura 5).

Aunque se ha descrito la formación de ácido sulfínico (-SO₂H), y ácido sulfónico (-SO₃H) por la subsecuente oxidación del ácido sulfénico es improbable que éstas moléculas tengan una función señalizadora (Smirnov 2005).

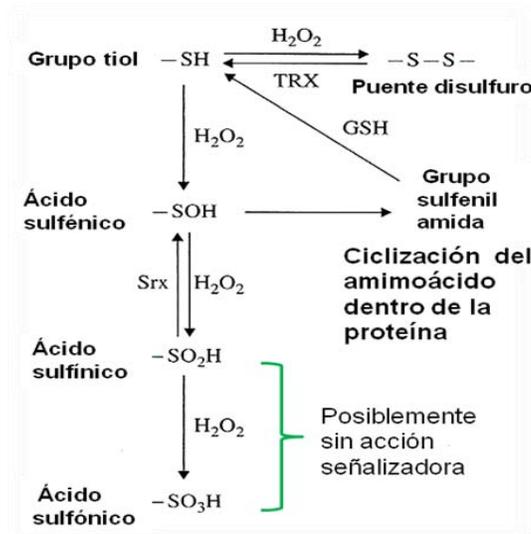


Figura 5. Efectos directos de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas. Las ERO pueden actuar como moléculas señalizadoras mediante la oxidación de los grupos tiol (-SH) de proteínas, conduciéndolas a cambios conformacionales y eventos de señalización. GSH: glutatión reducido, TRX: tioredoxina, Srx: sulfiredoxina. Modificado de Smirnov (2005).

2.2.3 Sitios generadores de ERO en las plantas

Las ERO se generan en las plantas de muchas formas y en muchos compartimentos celulares (Mittler 2002; Desikan *et al.* 2004), pueden formarse como productos de reacciones catalizadas por varias enzimas como la NADPH oxidasa de la membrana plasmática, la glicolato oxidasa respiratoria, la amino oxidasa y la oxalato oxidasa en el apoplasto y las xantina oxidasa y enzimas de la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas (Smirnov 2005), o a través de mecanismos de transferencia de electrones al oxígeno molecular O_2 durante la fotosíntesis en los cloroplastos y en la respiración en las mitocondrias.

2.2.4 Los cloroplastos y la actividad fotosintética como sitios generadores de ERO

La vía fotosintética oxigénica permite a las plantas utilizar la luz para obtener la energía (ATP) y el poder reductor (NADPH) para llevar a cabo las reacciones termodinámicamente desfavorables para la síntesis de carbohidratos.

La fotosíntesis requiere de la coordinación de dos fases, cada una de las cuales incluye varias reacciones: la fase luminosa, que involucra la absorción de luz, la conversión de energía y la transferencia de electrones del agua para la síntesis de NADPH y ATP y la fase oscura, que

comprende las reacciones del ciclo de Calvin, en las que se utiliza el CO_2 y los productos de la fase luminosa (NADPH y ATP) para la síntesis de carbohidratos. En los organismos eucariotas fotosintéticos, todas estas reacciones toman lugar en el cloroplasto.

El cloroplasto es un organelo especializado que se rodea de un sistema de doble membrana: las envolturas externa e interna, que contienen en su interior un sistema membranoso denominado membrana tilacoidal que comprende dos regiones de distinta composición: las membranas tilacoidales expuestas a un fluido conocido como estroma y las membranas tilacoidales apiladas en grana, que se encuentran todas interconectadas y encerradas en un espacio interno denominado lumen. Las dos fases de la fotosíntesis ocurren en diferentes regiones del cloroplasto. Las membranas tilacoidales contienen los complejos proteínicos fotosintéticos, el Fotosistema I (FSI) (presente en las membranas tilacoidales expuestas al estroma) y el Fotosistema II (FSII) (presente en las grana), que contienen los centros de reacción responsables de transformar la energía luminosa en energía química (contenida en los enlaces del ATP), además de un complejo transmembranal, el citocromo b_6f , una proteína de cobre soluble en agua, la plastocianina, una quinona soluble en lípidos, la plastoquinona y la ATP sintetasa. En contraste, las reacciones oscuras o del ciclo de Calvin, suceden en el estroma del cloroplasto (Buchanan *et al.* 2000).

La oxidación del agua en las reacciones de la fase luminosa origina al oxígeno molecular (O_2) como producto, el cual es en su mayoría difundido pasivamente hacia afuera de la hoja a través de los estomas, sin embargo durante la iluminación, las células fotosintéticas poseen altas concentraciones de O_2 (Smirnoff 2005). La proximidad de las altas concentraciones de O_2 , los eventos de transporte de electrones de los pigmentos fotosintéticos, así como el transporte de electrones en los fotosistemas hace que los cloroplastos sean fuentes de formación de ERO y que por lo tanto sean blancos susceptibles de daño oxidativo.

2.2.5 Formación de oxígeno singulete mediado por el triplete de clorofila.

Las clorofilas a y b son pigmentos presentes en las membranas tilacoidales de los cloroplastos que están asociados a complejos proteínicos captadores de luz o complejos antena y que absorben luz de longitudes de onda que están en la región espectral del azul y del rojo. La absorción de la energía de la luz ocasiona que uno de los electrones de las clorofilas cambie de un orbital de menor energía (Figura 6), que está cercano al núcleo atómico de la molécula del pigmento, a cualquiera de dos orbitales más distantes y de mayor energía, ocasionando que la molécula pueda

tener dos tipos de estados de excitación: el estado singulete, que tiene un tiempo de vida relativamente corto y que tiene dos electrones con spin antiparalelo y el estado triplete cuyo tiempo de vida es mucho mayor que la del singulete, sus electrones se encuentran alineados (en paralelo) y tiene un nivel energético menor que el singulete.

Una vez que la molécula se encuentra en un estado excitado, un electrón puede regresar al estado basal, liberando energía en forma de calor (relajación), emitiendo un fotón (fluorescencia), transfiriendo la energía a otra molécula que esté próxima a la molécula excitada (transferencia de energía) o por la transferencia de un electrón a una molécula aceptora a través de un evento de separación de carga (fotoquímica) (Buchanan *et al.* 2000).

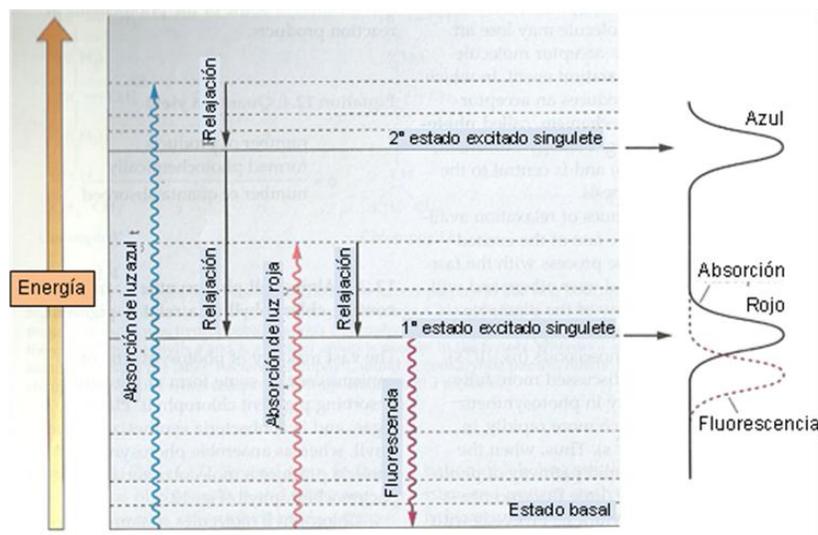


Figura 6. Niveles de energía de excitación de la molécula de clorofila.

Estas propiedades de pigmentos como la clorofila permiten la absorción y conversión de la energía de la luz en productos químicos. Sin embargo, cuando la luz absorbida excede a la luz fotosintética utilizada y la energía de excitación no es consumida por las siguientes reacciones de la fotosíntesis, el tiempo de vida del estado excitado de singulete de la clorofila se incrementa, lo cual aumenta la probabilidad de que el spin del electrón excitado se voltee en la clorofila, formando un triplete de clorofila (Foote 1976). Debido a la propiedad del oxígeno molecular de ser un triplete en estado basal, el oxígeno puede aceptar energía del triplete de clorofila formando así el muy reactivo radical oxígeno singulete (Asada 1996; Niyogi 1999). No obstante, las plantas poseen mecanismos como la disipación de energía térmica, que minimizan la producción de oxígeno singulete y neutralizan el radical formado en el cloroplasto (Smirnov 2005)

2.2.6 Disipación de energía térmica

La disipación de energía térmica protege a las plantas del peligro del exceso de absorción de luz, convirtiendo la energía de excitación de la clorofila singulete en calor antes de que pueda producirse el oxígeno singulete.

Aunque sigue siendo desconocido el mecanismo exacto mediante el cual la energía térmica se disipa, se sabe que se requieren las siguientes condiciones en el cloroplasto como: la presencia de carotenos de-epoxidados, la zeaxantina (Z) o la anteraxantina (A) del ciclo de la xantofila (Figura 7A), un pH bajo en el lumen tilacoidal, y un complejo proteínico menor de absorción de luz, el complejo PsbS (Gilmore & Yamamoto 1993 a, b; Li *et al.* 2000).

Los carotenos de-epoxidados Z y A se forman a partir de la violaxantina (V), un caroteno di-epoxidado del ciclo de la xantofila, mediante la actividad de de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE), una enzima presente en el lumen tilacoidal, que requiere ácido ascórbico como reductor (el cual a su vez impone un pH bajo óptimo para su actividad) (Bratt *et al.* 1995). Dicha interconversión de V a Z se correlaciona con el crecimiento de la intensidad de la luz ambiental (Adams *et al.* 1992), lo que indica que las plantas ajustan su capacidad de disipación de energía térmica en respuesta al ambiente, alterando las concentraciones activas de dichos carotenos a través de su interconversión química (Figura 7B) (Smirnov 2005).

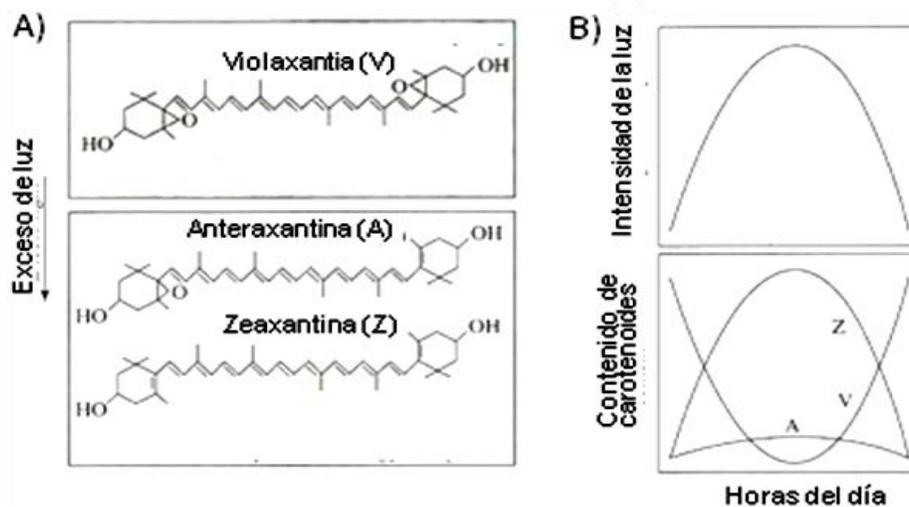


Figura 7. Carotenoides de-epoxidados del ciclo de las xantofilas, necesarios para la disipación de energía térmica. La Zeaxantina (Z) y la Anteraxantina (A) son producto de la interconversión de la Violaxantina (V) catalizada por la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) como respuesta al exceso de absorción de luz (Tomado de Smirnov 2005)

No se conoce el mecanismo por el cual Z y A potencian la disipación de calor, sin embargo es posible que Z y A sean aceptores de la energía de la clorofila excitada singulete, ya que Z (y posiblemente A) poseen un estado excitado S1 que se encuentra debajo del de la clorofila (Frank *et al.* 1994; Owens 1997; Ma *et al.* 2003), siendo termodinámicamente posible la transferencia de energía. Una vez que Z acepta la energía de la clorofila, esta experimenta (como todos los carotenos) de-excitación térmica o relajación (Smirnov 2005).

El complejo PsbS es un miembro de la superfamilia de Complejos Proteínicos Captadores de Luz (Li *et al.* 2000), que contiene cuatro hélices transmembranales que forman 2 asas en el lumen, y que a su vez contienen residuos de glutamato que son críticos para la disipación de energía (Li *et al.* 2004).

2.2.7 Generación de oxígeno singulete en el Fotosistema II

Además de la formación de oxígeno singulete mediante el triplete de clorofilas antena, los centros de reacción mismos del FSII también pueden ser fuentes generadoras de ERO.

La estructura molecular detallada del FSII no se conoce, sin embargo, el siguiente modelo (por su similitud con la secuencia de aminoácidos de las proteínas del centro de reacción del complejo bacteriano de *Rhodospseudomonas viridis*) (Figura 8), se compone de dos proteínas, D1 y D2, moléculas de clorofila a asociadas con proteínas (fracción P680), dos moléculas de feofitina (Pheo), un átomo de hierro (Fe), las proteínas CP43 y CP47 que unen los pigmentos antena y dos moléculas de plastoquinona (Q_A y Q_B) que actúan como aceptores de electrones terminales, entre otras (Buchanan *et al.* 2000).

En condiciones de luz, el FSII actúa como una agua-plastoquinona oxidoreductasa, transfiriendo electrones del agua a la plastoquinona. El transporte de electrones sucede tras una primera separación de carga en el FSII que deja a la clorofila del centro de reacción oxidada ($P680^+$), esto provee un poder oxidante que permite remover un electrón del agua, que se transfiere a través de un residuo de tirosina (Z) en la proteína D1 a la clorofila a de $P680^+$, dejándola reducida (P680), la subsecuente absorción de un fotón deja a la molécula de P680 excitada ($P680^*$) para la posterior transferencia del electrón a la Pheo y luego a Q_A para producir plastosemiquinona (Q_A^-), este electrón es transferido a Q_B , obteniéndose la semiquinona (Q_B^-), a continuación un segundo electrón es transferido a Q_B^- por el mismo mecanismo produciendo una plastoquinona completamente reducida (Q_B^{2-}) que toma dos protones del estroma para formar plastoquinol (Q_BH_2); ésta se disociará del centro de reacción del FSII y se difundirá dentro de la bicapa de fosfolípidos de la membrana para actuar como un acarreador de electrones móvil (Buchanan *et al.* 2000).

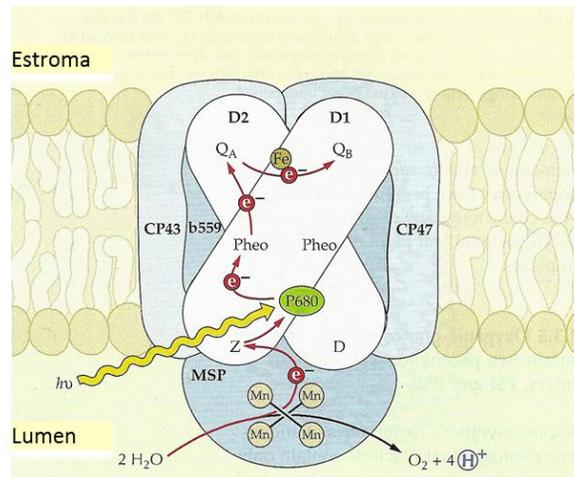


Figura 8. Modelo del Fotosistema II (basado en analogías con el centro de reacción del complejo bacteriano). La oxidación de dos moléculas de agua y el transporte de electrones, produce plastoquinol (Q_BH_2) que actúa como un acarreador de electrones móvil (Buchanan *et al.* 2000).

Cuando las condiciones de estrés limitan la utilización de los equivalentes reductores, el oxígeno singlete se forma en el centro de reacción del FSII, mediante una sobre reducción de las moléculas de Q_A (Huner *et al.* 1998; Melis 1999), ya que al suceder la transferencia del electrón seguida de absorción de luz mientras Q_A está reducida, la feofitina reducida ($Pheo^-$) puede experimentar una recombinación de carga con $P680^+$, que resulta en la formación de un triplete de clorofila P680 (Andersson & Barber 1996; Asada 1996; Melis 1999), que es capaz de causar daño directamente, sin embargo, también puede reaccionar con oxígeno molecular O_2 para formar oxígeno singlete (Smirnoff 2005). Además del FSII, el FSI también es un sitio en donde se producen ERO debido a los eventos de transporte de electrones.

2.2.8 Generación de anión superóxido en el Fotosistema I

El Fotosistema I (FSI) (Figura 9) es un complejo proteínico que contiene alrededor de 90 moléculas de clorofila *a* en su centro de reacción asociadas con proteínas (fracción P700), un aceptor de electrones (filoquinona), varios centros Fe-S (F_x , F_A y F_B) y la proteína soluble de Fe-S, ferredoxina (Fdx). El FSI transfiere los electrones de la plastocianina (PC), provenientes de la transferencia de electrones del FSII (a través del plastoquinol (PQH_2) y el citocromo b_6f a la Fdx (aceptor final de electrones del FSI), que se disocia del FSI para transportar los electrones a la ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR) que reduce al NADP⁺ a NADPH.

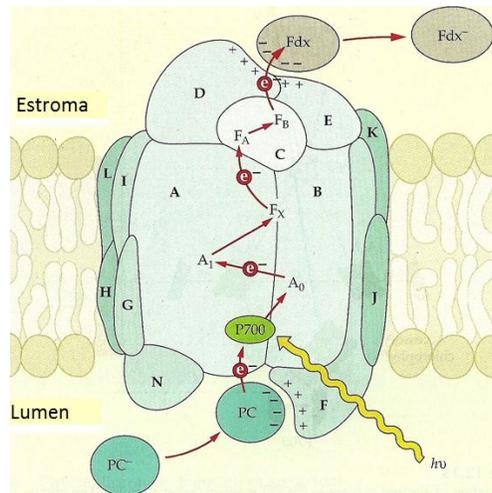


Figura 9. Modelo del Fotosistema I. Los electrones se transfieren desde la plastocianina (PC) hasta la Ferredoxina (Fdx), el aceptor final de electrones del FSI, que se disocia del FSI para transportar los electrones a la ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR) (Buchanan *et al.* 2000).

Sin embargo, en el FSI, el O₂ es capaz de competir con NADP⁺ para recibir el electrón de la Fdx resultando en la formación de O₂⁻ en el estroma del cloroplasto mediante esta reacción, conocida como Reacción de Mehler (Mehler 1951), que es la mayor fuente de O₂⁻ en la células de las plantas (Polle 1996).

La presencia del radical O₂⁻ en el cloroplasto es crítica, ya que puede conducir a la formación de otras ERO al ser transformado a H₂O₂ mediante las isoformas de la superóxido dismutasa (SOD) del cloroplasto, la CuZn-SOD y Fe-SOD, de los tilacoides y el estroma respectivamente (Kurepa *et al.* 1997; Asada 1999). Además el H₂O₂ producido puede desactivar las tiol-bisfosfatasa activadas del ciclo de Calvin (Charles & Halliwell 1981) o descomponerse en radicales hidroxilo en presencia de Fe (II) o Cu (II) por medio de la reacción de Fenton (Halliwell & Gutteridge 1999) y causar daño oxidativo en el cloroplasto. No obstante, la formación de ERO a través de la formación del radical O₂⁻ en el FSI puede ser abatida mediante su reducción a una molécula de agua a través del ciclo agua-agua (Asada 1999).

2.2.9 Foto-reducción de O₂ (el ciclo agua-agua)

El ciclo agua-agua es un mecanismo que permite remover los radicales superóxido producidos en el FSI, reduciéndolos a moléculas de agua. El ciclo agua-agua, debe su nombre al hecho de que el agua es la fuente de electrones (mediante la oxidación del agua en el FSII), así como el producto final de esta vía (Figura 10).

En esta vía, los radicales O_2^- , producidos por la reducción de O_2 , son transformados a H_2O_2 mediante las isoformas de la superóxido dismutasa (SOD), posteriormente el H_2O_2 es transformado a agua por la actividad de la ascorbato peroxidasa (APX), que requiere de ascorbato (Asc) como donador de electrones y que al ser oxidado produce monodehidroascorbato (MDA), que puede ser reducido nuevamente a ascorbato mediante varios mecanismos.

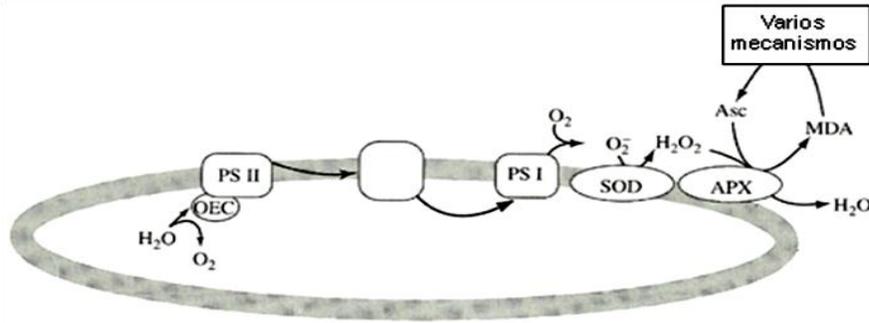


Figura 10. Ciclo del agua-agua. Mecanismo de detoxificación de radicales O_2^- formados en el FSI mediante su reducción a moléculas de agua. Tomado de Smirnov (2005).

Los mecanismos que permiten la reducción de MDA a Asc (Figura 11) son la foto-reducción directa de MDA en el citocromo *b₆f* o en el FSI (Miyake & Asada 1992; Grace *et al.* 1995), la reducción mediante la enzima MDA reductasa, que requiere NADPH como reductor (Hossain *et al.* 1984), o través de la desproporción para formar Asc reducido y dehidroascorbato (DHA). EL DHA a su vez puede ser reducido a Asc por la DHA reductasa, que utiliza glutatión reducido (GSH) como reductor, finalmente el glutatión oxidado puede ser reducido por la glutatión reductasa, que requiere de NADPH como reductor.

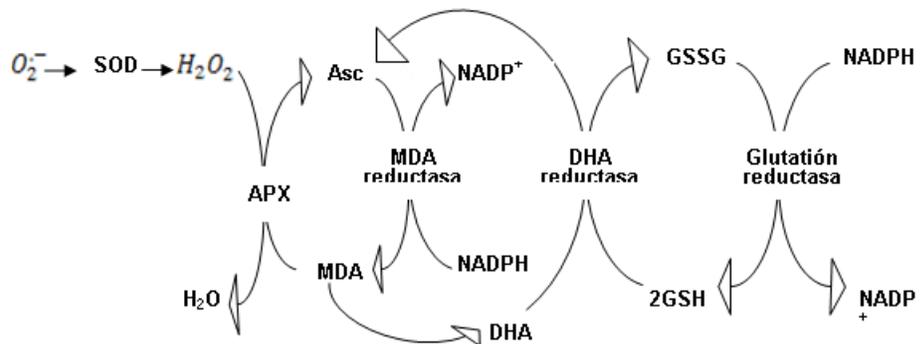


Figura 11. Mecanismos de de-toxificación de ERO presentes en el cloroplasto de las células de plantas. Tomado de Mittler *et al.* (2004).

III. ANTECEDENTES INMEDIATOS

La HR es un mecanismo de defensa contra patógenos cuya vía o vías de transducción de señales son parcialmente conocidas. Sin embargo, se han relacionado eventos como la alteración de flujos de iones, la producción de AS y la producción de ERO al desarrollo de dicha respuesta de defensa.

Las investigaciones de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la MCP-HR es producida tras la acumulación de bases esfingoideas, principalmente esfinganina (d18:0) y fitoesfingosina (t18:0) a partir de las 4 h de inducción de plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana* con 10 μ M FB1, siendo la acumulación de éstas BCL considerablemente mayor a las 12 y 72 h (González-Solis 2009).

Experimentos en *A. thaliana* de la línea mutante *Atlcb2b-hp/Atlcb2a* (que posee silenciado el gen *LCB2B* que codifica para la correspondiente subunidad de la serina palmitoil transferasa) fue incapaz de producir H_2O_2 *in situ* en el sitio de infiltración después de las 4 y 12 h con el patógeno *Pseudomonas syringae* cepa avirulenta (*Pseudomonas syringae* patovar tomato DC3000 *avrRPM1*). Lo anterior confirma la acumulación de bases esfingoideas como un suceso necesario para la formación de H_2O_2 , colocando a las bases esfingoideas como una señal probablemente corriente arriba de las ERO en la vía de transducción de señales que conducen a la MCP por HR (González-Solis 2009).

Por otro lado, los resultados de conteos bacterianos realizados en plántulas de *A. thaliana*, genotipos silvestre y de la mutante *pflD 18-18* (que expresa la proteína flavodoxina en el cloroplasto y que evita la acumulación de ERO en las células), mostraron un crecimiento más lento de los patógenos en la mutante, sugiriendo que el desarrollo de los mecanismos de defensa en esta ocurre a tiempos más largos con respecto a la línea silvestre (Coronel-Román 2011).

Adicionalmente se ha observado la presencia de ERO en el cloroplasto en hojas de *A. thaliana* teñidas con 3,3'-diaminobencidina (DAB), tras 18 hpi de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato avrRPM1* 1×10^8 UFC/mL (González-Solis 2009). Estos resultados se complementan con las alteraciones estructurales observadas en imágenes (tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión) de cloroplastos de hojas de *A. thaliana* expuestas a 10 μ M FB1 por 10 días (Saucedo-García 2011b).

En otro modelo experimental de MCP-HR, se estableció que subsecuente a la acumulación de BCL a tiempos cortos (1 h), se presentó la formación de H_2O_2 *in situ* en hojas de *Phaseolus vulgaris* (frijol, variedad Canario 60) teñidas con DAB. Adicionalmente, una segunda etapa de formación de H_2O_2 se observó entre las 24 y 48 hpi, lo que puede asociarse a la elevación masiva de BCL (Palacios-Bahena 2008; González-Solis 2009).

Por otro lado, otras investigaciones relacionadas con el tema han sido publicadas recientemente, en las que se observó la inhibición de la fijación de CO₂, que podría llevar a la formación de ERO en el cloroplasto bajo iluminación en una mutante de *Nicotiana tabacum*, a la que induciblemente se le activa una cascada de MAPKs que se sabe se activa durante la HR (Liu *et al.* 2007), además un análisis de microarreglos mostró la represión de los genes relacionados con la fotosíntesis tras la inducción de la HR con la toxina AAL en *Arabidopsis thaliana* (Gechev *et al.* 2004), así como la inhibición de la fotosíntesis en *A. thaliana* a las 3 hpi de la HR tras la inoculación con *Pseudomonas syringae* cepa avirulenta y 48 hpi con la cepa virulenta (Bonfig *et al.* 2006).

En conjunto, estas evidencias experimentales sugieren que el cloroplasto es un organelo con una participación significativa en la generación de ERO durante la HR, que sabemos es de gran importancia para la defensa contra patógenos y está mediada por la acumulación de bases esfingoideas.

IV. JUSTIFICACIÓN

La MCP es un mecanismo muy importante en las plantas, ya que se presenta dentro de procesos fisiológicos durante el desarrollo de las plantas, como en la senescencia, la formación de gametos, y la defensa contra patógenos (HR). La MCP en la HR le confiere inmunidad a las plantas al evitar que ésta sea colonizada por un patógeno, por lo que el conocimiento de los sucesos moleculares que desencadenan esta respuesta en la planta es muy importante.

El conocimiento de las vías que conducen a la MCP tanto en la HR como en los procesos naturales de desarrollo y senescencia tendría importantes aplicaciones en la agricultura, tales como la obtención de plantas que logran reconocer y desarrollar una HR contra patógenos cuya interacción previa no desencadenaba una respuesta de defensa, confiriéndoles inmunidad. Otra posibilidad es manipular negativamente la MCP desencadenada por patógenos necrótrofos o la MCP de los tejidos de almacenamiento energético como tubérculos y semillas. También otra posibilidad es la de desarrollar nuevos herbicidas cuyo blanco de acción sea alguna vía que conduzca a la MCP en plantas específicas (Gray 2004).

Las evidencias en la literatura, así como las obtenidas por nuestro grupo de trabajo relacionan la acumulación de bases esfingoides y la producción de ERO con la MCP y sugieren que el cloroplasto es un organelo con una contribución significativa en la producción de ERO, por lo que este estudio contribuirá al entendimiento de la participación de las ERO formadas en el cloroplasto con la MCP desarrollada en la HR en la defensa contra patógenos de las plantas.

V. HIPÓTESIS

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas en el cloroplasto de plantas expuestas a condiciones que inducen la acumulación de bases esfingoideas endógenas contribuyen significativamente a la producción total de ERO a tiempos largos de la HR que se presenta en la defensa contra patógenos.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar de manera cuantitativa el H₂O₂ como especie reactiva de oxígeno y además determinar su efecto en la ultraestructura del cloroplasto.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones de medición de H₂O₂ por una técnica cuantitativa (procedimiento de naranja de xilenol).
- Determinar las condiciones de formación de H₂O₂ en hojas de *Phaseolus vulgaris* y de plántulas de *Arabidopsis thaliana* aplicando agentes que inducen la acumulación de bases esfingoideas: fumonisina B1 y el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1*.
- Establecer la contribución del cloroplasto en la formación de ERO inducidas por la acumulación de bases esfingoideas, utilizando a la mutante de *Arabidopsis thaliana pflD 18-18* que produce menos ERO en el cloroplasto.
- Determinar el efecto del aumento de ERO en la ultraestructura del cloroplasto en la mutante de *Arabidopsis thaliana pflD 18-18* que produce menos ERO en esta organela.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos especiales

a. Fumonisina B1

Fumonisina B1, Sigma Chemical Co. St Louis, MO. Se prepararon diluciones a partir de una solución stock de FB1 1 mM (disuelta en agua) para obtener las concentraciones finales de 20 μ M y 50 μ M.

b. Naranja de xilenol

Naranja de xilenol (sal tetrasódica) Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, MO. La solución se preparó a una concentración de 125 μ M y sorbitol 100 mM utilizando agua como disolvente.

2. Material biológico

a. *Arabidopsis thaliana*

De la especie *Arabidopsis thaliana*, se utilizaron dos líneas: la línea silvestre (ecotipo Col-0) y la línea mutante *pflD 18-18*.

Las plantas de la línea mutante de *A. thaliana pflD 18-18* expresan una proteína en el cloroplasto denominada flavodoxina (Fld). La Fld es una pequeña proteína (16-20 kDa) soluble y móvil que contiene mononucleótido de flavina (FMN) como grupo prostético y cumple la misma función que la ferredoxina (Fdx), transporta electrones entre diferentes donadores y aceptores en el metabolismo redox en algunas cianobacterias y algas oceánicas. En muchos de estos microorganismos en los cuales ambas proteínas están presentes, la Fld es inducida como un recurso adaptativo en condiciones ambientales o nutricionales que comprometan la expresión de Fdx o su actividad, como la limitación de Fe, asumiendo la Fld las funciones de la Fdx y permitiendo así la supervivencia y la reproducción del organismo en dichas condiciones.

La expresión de la Fld en el cloroplasto de plantas de tabaco transgénicas resulta en una remarcable tolerancia al estrés oxidativo, ambiental (sequía, altas intensidades de luz, calor, bajas temperaturas, radiación UV) y deficiencia de Fe. La acumulación de ERO, la cual es prominente en las plantas silvestres estresadas, es también totalmente evadida en las transformantes. Dicho fenotipo tolerante observado se debe a la sustitución de la actividad homóloga de la Fdx autóctona en dichas plantas, como sucede en los microorganismos (cianobacterias y algas) (Tognetti *et al.* 2006; Zurbriggen *et al.* 2007).

La Fld es capaz de restaurar la homeostasis redox, evitando la formación de ERO de las células de las plantas interactuando productivamente con rutas dependientes de Fdx como la transferencia de electrones directa a la ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR) para la fotoreducción de NADP⁺, así como de la activación reductiva de enzimas mediante la tioredoxina (Trx) vía Fdx–Trx reductasa (FTR) (Tognetti *et al.* 2006). Dichas actividades son cruciales para rutas del metabolismo central como el ciclo de Calvin y el metabolismo de antioxidantes, ya que éstas requieren de NADPH.

Para fines experimentales se utilizaron plántulas de *A. thaliana* de ambas líneas (silvestre y mutante *pfld 18-18*) de 3 a 5 semanas de edad.

Las semillas de la línea mutante *pfld 18-18* fueron generosamente proporcionadas por el Dr. Néstor Carrillo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

b. Phaseolus vulgaris

Se utilizaron las hojas de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad Canario 60 con genotipo silvestre, de 4 a 5 semanas de edad.

3. Germinación de semillas de líneas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* de ambas líneas (silvestre y mutante *pfld 18-18*) se germinaron de acuerdo al siguiente procedimiento.

- 1) Colocar las semillas en un tubo ependorff y agregar 1 mL de NaHClO₄ al 20 % (estéril), 1 µL de Tween 20 al 0.1 % y 3 µL de microdyn comercial (solución de plata ionizada al 0.35 %). Agitar vigorosamente por 20 min.
- 2) Centrifugar y quitar el sobrenadante con una micropipeta y puntas estériles. Posteriormente, lavar las semillas agregando 1 mL de NaHClO₄ al 20 % (estéril) y manteniendo en agitación por 10 min
- 3) Centrifugar nuevamente por 10 s y eliminar el sobrenadante.
- 4) Enjuagar las semillas al menos 5 veces, agregando 1 mL de agua estéril, agitando durante 30 s, centrifugando 10 s y eliminando el sobrenadante con una micropipeta para cada vez, hasta eliminar completamente el NaHClO₄ y el Tween 20.
- 5) Sembrar las semillas desinfectadas en cajas petri con 20 mL de medio de Gamborg's B-5/agar 1 %/ sacarosa 1 % estéril preparado como se indica en el Apéndice.

- 6) Mantener las cajas con las semillas en oscuridad y a 4 °C por 48 h para romper la latencia de las semillas.
- 7) Trasladar las cajas a una cámara de incubación a 22 °C con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad y crecerlas en posición vertical u horizontal por 3-5 semanas.

4. Germinación y cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad Canario 60.

Las semillas de frijol variedad Canario 60 se germinaron y cultivaron de acuerdo al siguiente procedimiento.

- 1) Desinfectar las semillas de frijol con una solución de etanol al 70 % y agitando por 1 min. Posteriormente enjuagar con agua des ionizada varias veces.
- 2) Adicionar a las semillas una solución de NaHClO₄ al 1 %, agitar y dejar reposar por 10 min. Desechar la solución de NaHClO₄ y enjuagar con agua des ionizada varias veces.
- 3) Añadir agua des ionizada y dejar reposar por 2 h.
- 4) Colocar las semillas en una charola de plástico con agrolita húmeda, colocando el hilio de la semilla hacia abajo y dejándolas ligeramente enterradas en la agrolita.
- 5) Tapar la charola con aluminio y dejar incubar a 23-29 °C hasta que las semillas germinen (aproximadamente 5 días, esto depende de la temperatura). Regar con agua des ionizada.
- 6) Trasplantar las plántulas una vez que las semillas exhiben un crecimiento de la parte aérea de 15 a 20 cm colocándolas en un vaso de plástico de 300 mL lleno de agrolita humedecida.
- 7) Mantener las plantas en invernadero con luz natural en el día y con luz artificial por la noche. La cámara tienen una temperatura que fluctúa entre los 12 y los 30 °C durante las 24 h dependiendo del clima.
- 8) Regar diariamente las plántulas alternando H₂O y medio de Hoagland-Arnon (ver Apéndice) hasta alcanzar las plántulas una edad de 4 a 5 semanas.
- 9) Cuando las plantas alcancen un altura que hace que se pueda doblar el tallo principal, atar cada tallo a un poste delgado de madera insertado en la agrolita por medio de un alambre recubierto de plástico.
- 10) Para los experimentos, usar las hojas de trifolios maduros o jóvenes, pero no usar las hojas embrionarias.

5. Cultivo de la cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*P. syringae* *avr*)

El cultivo de la cepa bacteriana se realizó de la siguiente manera.

- 1) En área aséptica, esterilizar en la flama un asa bacteriológica y tomar una asada de la cepa congelada a -70 °C (conservada en glicerol).
- 2) Estriar la cepa por agotamiento en una caja de petri con medio B de King más rifampicina (50 mg/mL) y tetraciclina (20 mg/mL) (ver Apéndice). Cubrir la caja con papel aluminio e incubar a 29 °C por 24 a 48 h.
- 3) Realizar una resiembra a partir de una colonia aislada del cultivo anterior en una caja de petri con medio B de King más rifampicina y tetraciclina, estriando completamente toda la superficie de la caja para obtener un cultivo abundante. Cubrir la caja con papel aluminio e incubar a 29 °C por 36 a 48 h.

6. Preparación del inóculo bacteriano

Con el cultivo en placa de *P. syringae avr* se prepararon suspensiones bacterianas a diferentes concentraciones para ser inoculadas por infiltración en las hojas de frijol var. Canario 60. Las suspensiones se prepararon de acuerdo al siguiente procedimiento.

- 1) Agregar a un matraz Erlenmeyer con tapón de rosca 25 mL de una solución estéril de MgCl₂ 10 mM en agua des ionizada.
- 2) Tomar varias asadas del cultivo resembrado y suspender dicho inóculo agitando ligeramente en la solución de MgCl₂.
- 3) Tomar una muestra de dicha suspensión y medir en el espectrofotómetro a $\lambda=600$ nm, hasta alcanzar una Absorbancia de 0.1 UDO, correspondiente a una concentración de 1×10^8 UFC/mL. Agregar más solución de MgCl₂ o suspender más bacterias si es necesario para ajustar la concentración de la suspensión.
- 4) Realizar una dilución 1:10 para obtener la suspensión de la concentración 1×10^7 UFC/mL.
- 5) Mantener la suspensión a resguardo de la luz solar directa y utilizarla lo más pronto posible.

7. Exposición de los tejidos vegetales a los tratamientos que producen aumento en los niveles endógenos de BCL (FB1 y el patógeno *P. syringae avr*)

Para evaluar el efecto en la generación de ERO por la acumulación de BCL se expusieron plántulas de *A. thaliana* de ambas líneas (silvestre y mutante *pflD 18-18*) y las hojas de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. Canario 60 a la toxina FB1 y/o al patógeno avirulento *P. syringae avr* como se describe a continuación.

a. Exposición de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre y mutante *pflD 18-18* a FB1.

A las cajas petri con las plántulas de *A. thaliana* de 3 a 5 semanas de edad crecidas en medio Gamborg B-5/agar 1 % y sacarosa 1 % se les aplicaron soluciones de FB1 a diversas concentraciones por aspersión como se describe en seguida.

- 1) Preparar una disolución de FB1 a partir de una solución de FB1 1 mM disuelta en agua desionizada a la concentración final requerida (20 μ M o 50 μ M) en agua desionizada estéril.
- 2) Agregar la solución de FB1 a un frasco atomizador (con capacidad de 10 mL) estéril.
- 3) En área aséptica, asperjar las plántulas en la caja de petri a una distancia de 10-15 cm de la caja, la cantidad de 10 disparos (que corresponde a 1 mL de solución) por cada caja de plántulas.
- 4) Tapar la caja y exponerla a un fotoperiodo con luz continua a 22 °C durante el tiempo requerido.

b. Infiltración de hojas de frijol

A las hojas de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. Canario 60 con 4 a 5 semanas de edad y con 3 a 4 trifolios totalmente extendidos de un color verde homogéneo, apariencia sana y de tamaño similar, se les infiltró la solución de FB1 o la suspensión del patógeno avirulento (*P. syringae avr*) o una solución en agua desionizada de MgCl₂ 10 mM estéril (como control) de la siguiente forma.

- 1) Seleccionar las plantas de frijol de tamaño similar y marcarlas de acuerdo al tratamiento que se va a infiltrar en cada una.
- 2) Seleccionar un trifolio de cada planta de aspecto y tamaño similar e identificarlo. Marcar los trifolios colgando un anillo de color en la unión del pecíolo con el tallo.

- 3) Con una jeringa de plástico graduada de 1 mL sin aguja, infiltrar las 3 hojas del trifolio con solo uno de los tratamientos (en cuatro puntos por cada hoja), colocando la jeringa en cada punto por la parte central del envés de la hoja (evitando tocar la nervadura central y las nervaduras principales), aplicando presión con la jeringa y bajando el émbolo lentamente para que la solución penetre el tejido. Con este método, aproximadamente 20 μ L de la solución se deposita en los intersticios de la hoja.
- 4) Marcar los sitios de infiltración con un marcador indeleble poniendo un pequeño punto en el borde externo de la hoja en un sitio paralelo al de la infiltración.
- 5) Una planta puede tener solo un tipo de tratamiento. Las plantas de frijol están bajo luz continua todo el tiempo en el invernadero, desde que se transplantan a los vasos de agrolita. Dejar actuar el tratamiento el tiempo necesario.

8. Toma de muestra de los tejidos vegetales expuestos a los tratamientos.

Una vez realizada la aspersion de las plántulas de *A. thaliana* o la infiltración de las hojas de frijol con los tratamientos a evaluar y transcurrido el tiempo de inducción de la acumulación de bases esfingoideas, se toma una muestra de los tejidos para cuantificar en ella ERO por el método de naranja de xilenol. Las muestras se recolectaron como se describe a continuación.

a. *Arabidopsis thaliana*

- 1) Cortar 2 porciones de plántulas de una caja petri previamente asperjada con FB1 de aproximadamente el mismo tamaño con unas tijeras pequeñas y unas pinzas, tratando de cortar sólo la parte verde que incluye tallos y hojas.
- 2) Pesar cada una de las porciones de plántulas en charolas de plástico pre-pesadas.
- 3) Usar las porciones de tejido para determinación de H_2O_2 .

b. *Phaseolus vulgaris* var. *Canario 60*

- 1) Transcurrido el tiempo de inducción, cortar los trifolios completos infiltrados con cada uno de los tratamientos y colocar cada uno en una caja petri de vidrio identificada con el tratamiento aplicado. Hacer esto en el invernadero.
- 2) Colocar las cajas petri en un recipiente con hielo.

- 3) Ya en el laboratorio, cortar las 4 zonas de infiltración de cada una de las hojas de un trifolío del mismo tratamiento con un horador circular de aproximadamente 5 mm de diámetro.
- 4) Pesar el material vegetal obtenido, colocando los discos de las hojas en una charola de plástico pre-pesada.

9. Determinación de H_2O_2 por el método de naranja de xilenol

a. Curva estándar

Para determinar la cantidad de H_2O_2 contenida en las muestras vegetales recolectadas se realizaron curvas estándar con una solución de H_2O_2 y el reactivo de naranja de xilenol. Se realizó una curva estándar para cada muestra de cada tiempo de tratamiento, siguiendo el siguiente procedimiento.

Reactivos

Estándar de H_2O_2 30 % (p/p) Sigma-Aldrich 026K3770

Solución de naranja de xilenol 125 μ M y sorbitol 100 mM en agua des ionizada.

Solución de $FeSO_4$ 62.5 mM (recién preparada cada vez que se va a usar)

Solución de $(NH_4)_2SO_4$ 250 mM

Solución de H_2SO_4 5 M

Procedimiento

Los siguientes pasos se llevan a cabo en el momento de hacer la determinación de H_2O_2 de las muestras.

- 1) En un tubo de ensaye agregar 0.5 mL de la solución de H_2SO_4 , 0.1 mL de la solución de $(NH_4)_2SO_4$ y 0.4 mL de la solución de $FeSO_4$ y mezclar.
- 2) Preparar el reactivo de naranja de xilenol, agregando 100 μ L de la mezcla de $H_2SO_4/(NH_4)_2SO_4/ FeSO_4$ a cada 10 mL de solución de naranja de xilenol 125 μ M/sorbitol 100 mM.
- 3) Preparar una disolución de H_2O_2 10 mM a partir de la solución estándar de H_2O_2 30 % (p/p) (8.82 M), agregando 11.3 μ L de la solución estándar de H_2O_2 a un matraz volumétrico de 10 mL y aforando con agua desionizada.

- 4) Preparar una disolución de H₂O₂ 100 µM a partir de la disolución de H₂O₂ 10 mM, mediante una dilución 1:100.
- 5) Agregar a cada tubo de ensaye de 13 x 100 el volumen de solución de H₂O₂ 100 µM y agua des ionizada descritos en la siguiente tabla.

Tubo	H ₂ O (µL)	H ₂ O ₂ 100µM (µL)	nanomol H ₂ O ₂
1	100	-----	0
2	95	5	5
3	90	10	1
4	80	20	2
5	60	40	4
6	40	60	6

- 6) Agregar a cada tubo 1 mL del reactivo de naranja de xilenol recién preparado.
- 7) Transcurridos 30 min, tomar lecturas de absorbancia de cada tubo a 560 nm en un espectrofotómetro.

b. Determinación de H₂O₂ en las muestras vegetales recolectadas

Una vez recolectadas las muestras, ya sean las porciones de plántulas o los discos cortados de las hojas de frijol con un tratamiento específico, se realizó la cuantificación de H₂O₂ en cada una de de las muestras como se describe a continuación.

- 1) Preparar en el momento el volumen de reactivo de naranja de xilenol necesario para 3 réplicas por cada porción de plántulas de *A. thaliana* y 3 blancos de reactivo en un matraz Erlenmeyer pequeño. Considerando que se requiere 1 ml de reactivo para cada réplica.
- 2) Agregar 1 mL de reactivo de naranja de xilenol a los tubos de ensaye de 13 x 100 para las muestras y los blancos de reactivo.
- 3) Antes de la cuantificación de H₂O₂ en la muestra vegetal, agregar las cantidades de H₂O₂ 100 µM y agua des ionizada en los tubos de ensaye para la curva estándar, sin agregar el reactivo de naranja de xilenol.
- 4) Colocar cada una de las 2 porciones de plántulas de *A. thaliana* pre pesadas en un mortero pequeño.

- 5) Agregar N₂ líquido a uno de los morteros y con el pistilo moler rápidamente las plántulas congeladas hasta obtener un polvo fino.
- 6) Rápidamente, agregar 1 mL de Tris-HCl 25 mM pH 7.5 al mortero y resuspender el contenido del mortero.
- 7) Con una micropipeta colocar la suspensión contenida en el mortero en un tubo ependorff y centrifugar por 40 s a temperatura ambiente.
- 8) Agregar 100 µL de sobrenadante a cada uno de los tubos de ensaye conteniendo 1 mL de reactivo de naranja de xilenol y agitar en un vortex. Mantener a temperatura ambiente. (Del sobrenadante total se toman dos o tres muestras de 100 µL como réplicas)
- 9) Realizar el mismo procedimiento para la segunda porción de plántulas de *A. thaliana*.
- 10) Tras haber mezclado el sobrenadante de la segunda muestra con el reactivo de naranja de xilenol, agregar 1 mL de reactivo a cada uno de los tubos con las cantidades de agua y H₂O₂ 100 µM para la curva estándar previamente preparados y agitar en un vortex. (Del sobrenadante total de la muestra duplicado también se toman dos o tres muestras de 100 µL como réplicas). De esta manera, se tienen entre 4 y 6 determinaciones por tiempo/tratamiento).
- 11) Preparar 3 blancos de reactivo, agregando 100 µL de Tris-HCl 25 mM pH 7.5 a los tubos de ensaye conteniendo 1 mL de reactivo de naranja de xilenol y agitando en un vortex. Estos tubos se preparan junto con los demás para ser leídos dentro de una misma serie.
- 12) Transcurridos 30 min, tomar lecturas de absorbancia de cada tubo a 560 nm en un espectrofotómetro.
- 13) Para la toma de muestras de cada tiempo y/o tratamiento se hizo una curva estándar independiente y simultánea a la toma de muestras.

En el caso de discos de frijol se siguió el mismo procedimiento, pero realizando 5 réplicas para los discos de frijol de un tratamiento.

10. Visualización de la ultraestructura celular de las plántulas de *Arabidopsis thaliana wt* y *pfl18-18* expuestas a FB1 por microscopía electrónica de transmisión.

Tras la inducción del aumento en los niveles endógenos de bases esfingoideas por previo tratamiento de las plántulas de *A. thaliana* con FB1 por 72 h según el procedimiento descrito

anteriormente, se tomaron 5 hojas en total de diferentes plántulas wt y de la línea *pfl1 18-18*. Se tomaron también muestras de los controles (plántulas no expuestas a FB1).

A las muestras obtenidas, se les realizó una fijación con glutaraldehído al 3% en buffer de fosfatos 100 mM pH 7. Posteriormente, las muestras se lavaron, deshidrataron, infiltraron e incluyeron en Epon fresco al 100 % y se hicieron microcortes de 80 nm que se contrastaron con una solución de acetato de uranilo y citrato de plomo.

Los cortes se observaron en un microscopio electrónico JEOL 1200 EXII operado a 60 Kv

11. Registro fotográfico

Los fenotipos de las plántulas de *Arabidopsis* y de las hojas de frijol tratados con la FB1 o con *P. syringae avr* se registraron fotográficamente con una cámara Samsung L730 VLUU.

12. Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado fue ANOVA de una vía y comparación de medias por el método Bonferroni.

VIII. RESULTADOS

1. Determinación de H_2O_2 por el método de naranja de xilenol

Para poder aplicar el método de naranja de xilenol (Gray *et al.* 1999) en la detección de H_2O_2 en nuestras muestras vegetales, fue necesario establecer las condiciones apropiadas del método en cuanto a linealidad, estabilidad y sensibilidad a los niveles de H_2O_2 que nuestras muestras podían producir. Para ello, inicialmente se estandarizó la preparación de soluciones a las concentraciones adecuadas, la estabilidad de varias de ellas y a continuación se realizaron curvas estándar de H_2O_2 .

En las curvas estándar de H_2O_2 realizadas se presentan las absorbancias determinadas a 560 nm con respecto a las cantidades de H_2O_2 agregadas (Figura 10). La curva estándar en el intervalo de 0 a 300 nmol de H_2O_2 se realizó como una primera aproximación para determinar los límites de detección del método (Figura 12). Como se observa en la figura, al aumentar la concentración de H_2O_2 , la absorbancia aumenta hasta llegar a un máximo de 2.0 UDO, lo cual corresponde a 20 nmol de H_2O_2 . Una vez que llega a este valor, la absorbancia permanece constante aún a la cantidad de 300 nmol de H_2O_2 . Además, podemos observar que el intervalo lineal, es decir, el intervalo en el que la absorbancia es proporcional a la concentración, se encuentra aparentemente entre 0 y menos de 25 nmol de H_2O_2 .

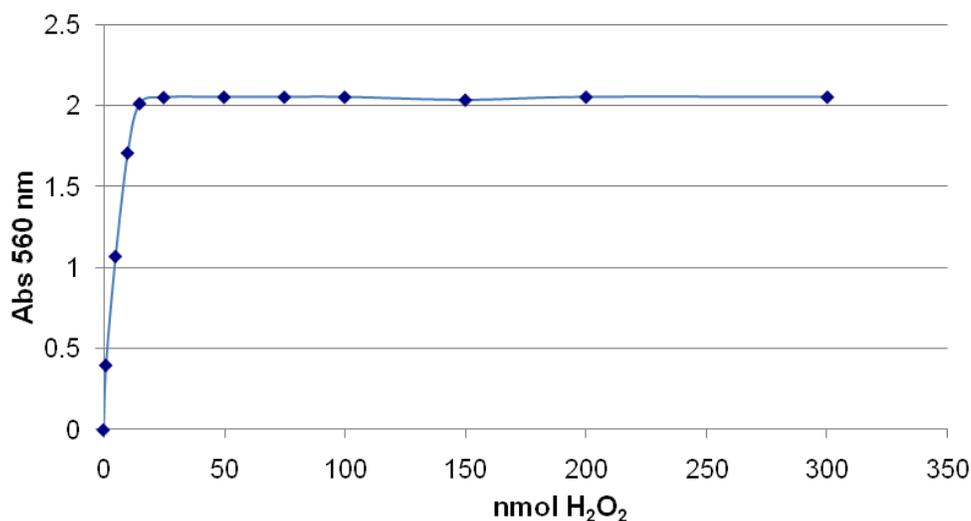


Figura 12. Curva estándar para la determinación de H_2O_2 por la técnica de naranja de xilenol. Se incluyó el intervalo de 0 a 300 nmol de H_2O_2

Para explorar la fase lineal de detección con mejor resolución, se realizó una curva estándar con 0 a 30 nmol de H_2O_2 (Figura 13). En esta gráfica, con un rango ampliado de bajas concentraciones

de H_2O_2 , se puede observar claramente que el intervalo lineal se encuentra entre los 0 y 10 nmol de H_2O_2 .

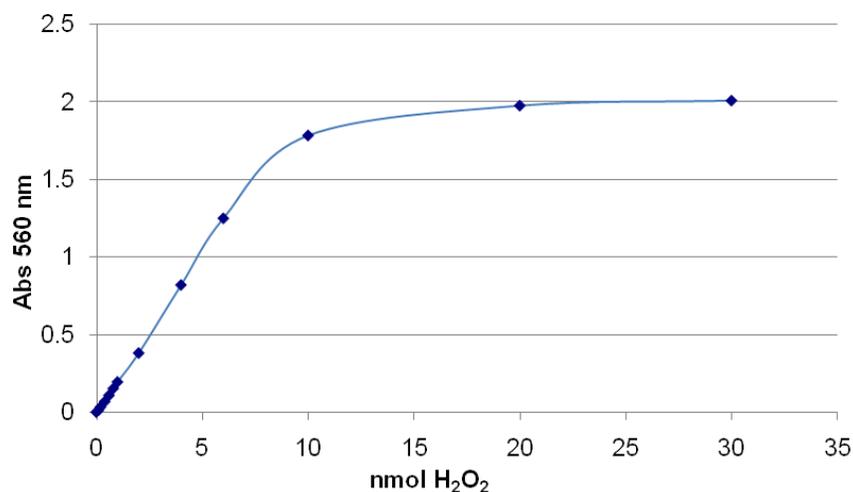


Figura 13. Curva estándar para la determinación de H_2O_2 por la técnica de naranja de xilenol. Se incluyó el intervalo de 0 a 30 nmol de H_2O_2

Posteriormente se realizó una curva estándar de 0 a 10 nmol de H_2O_2 (Figura 14) para determinar los límites de detección del método con mayor precisión; en esta grafica se observa que las absorbancias obtenidas son proporcionales a la cantidad de H_2O_2 agregado, la gráfica representa una línea recta, que al realizar la regresión lineal presenta una pendiente y una R^2 de 0.1857 y de 0.9957, respectivamente. Es importante mencionar que aún 1.0 nmol de H_2O_2 registra una alta absorbancia.

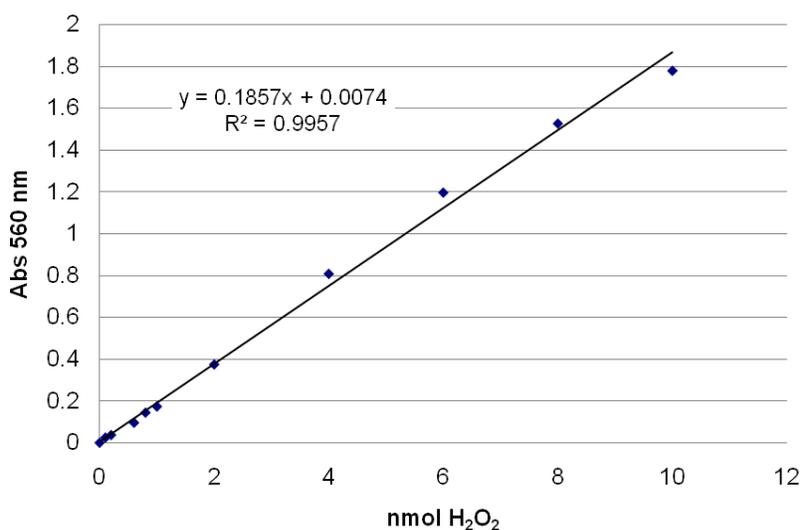


Figura 14. Curva estándar para la determinación de H_2O_2 por la técnica de naranja de xilenol. Se incluyó el intervalo de 0 a 10 nmol de H_2O_2

A continuación se realizó una curva estándar con 0 a 6 nmol de H_2O_2 (Figura 15) para verificar la linealidad en éste intervalo. Como se observa, la gráfica representa una línea recta, que tras realizar la regresión lineal presenta una pendiente de 0.2125 y una R^2 de 0.9986.

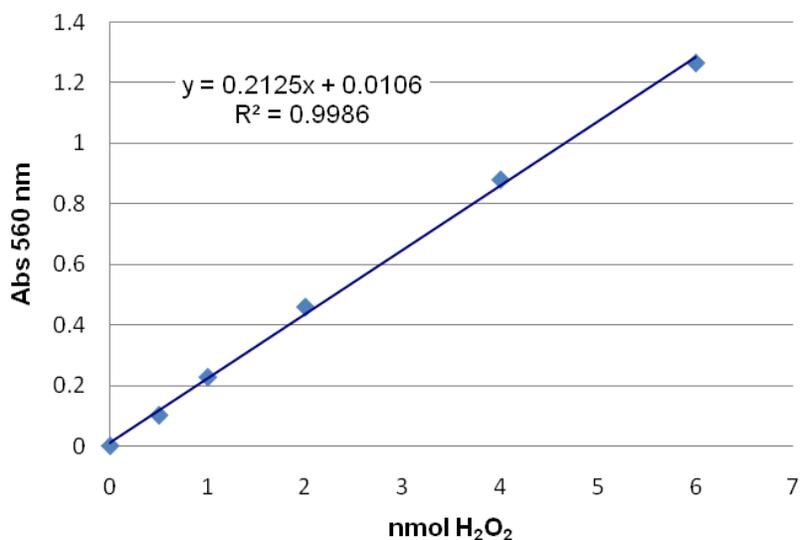


Figura 15. Curva estándar para la determinación de H_2O_2 por la técnica de naranja de xilenol. Se muestra el intervalo de 0 a 6 nmol de H_2O_2

Finalmente, se realizó una curva estándar de 0 a 10 nmol de H_2O_2 con el propósito de determinar la estabilidad del compuesto formado por el naranja de xilenol una vez que se terminaba el procedimiento, para lo cual se tomaron lecturas de absorbancia de una misma curva transcurrido el tiempo de espera para tomar las lecturas (30 min) y transcurridos 60 y 90 min adicionales (Tabla I). Como se puede observar, al graficar los valores de absorbancia con respecto a las nmol de H_2O_2 (Figura 16) para los tres tiempos de lectura, se obtuvieron tres líneas rectas que se superponen hasta los puntos correspondientes a las 6 nmol, lo cual indica que los valores de absorbancia prácticamente no disminuyen ni aumentan aún transcurridos 90 min de haberse terminado la reacción. Tras realizar la regresión lineal de los datos experimentales (Tabla I), se obtuvo una pendiente de 0.2133, 0.2057 y 0.2069 para los valores de absorbancia de la curva estándar a los 30, 60 y 90 min, respectivamente y una R^2 que se mantuvo en 0.99 aún transcurridos 90 min.

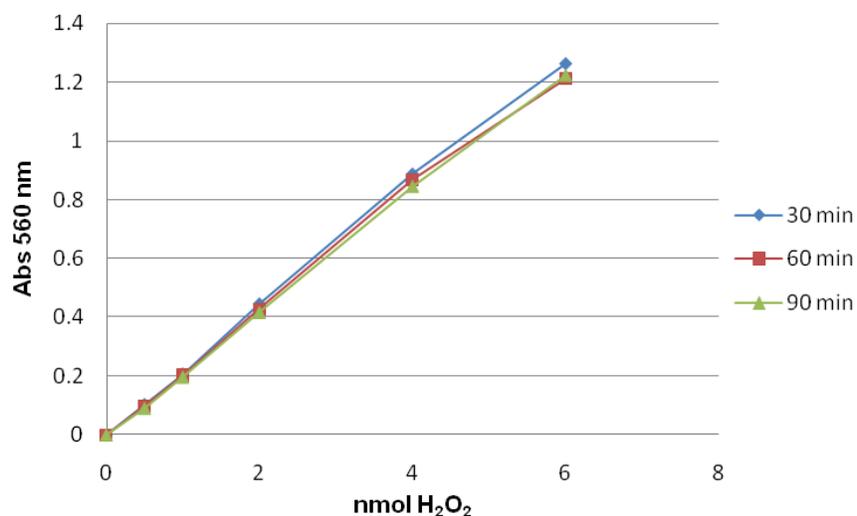


Figura 16. Estabilidad de la curva estándar para la determinación de H₂O₂ por la técnica de naranja de xileno. La curva se hizo de 0 a 10 nmol de H₂O₂ y la absorbancia se leyó a los 30, 60 y 90 min después de haberse terminado la reacción.

Tabla 1. Lecturas de absorbancia de la curva estándar con 0 a 10 nmol de H₂O₂, transcurridos 30, 60 y 90 min de haber sido agregados los reactivos de color. Los valores de pendiente, ordenada al origen y R² se obtuvieron mediante regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

nmol H ₂ O ₂	Abs 560 nm		
	30 min	60 min	90 min
0	0	0	0
0.5	0.104	0.098	0.091
1	0.208	0.203	0.197
2	0.446	0.428	0.417
4	0.887	0.868	0.846
6	1.262	1.211	1.224
pendiente	0.2133	0.2057	0.2069
ordenada	0.0047	0.0052	-0.0031
R²	0.9986	0.9976	0.9993

2. Detección de H_2O_2 en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad Canario 60. Control utilizando H_2O_2 adicionado en diferentes etapas de la toma de muestra y de cuantificación por el método de naranja de xilenol.

Debido a que las ERO como el H_2O_2 , son inestables, era necesario tener una estimación de la factibilidad de que pudieran ser detectadas desde que son generadas en la planta naturalmente en respuesta a nuestros tratamientos hasta que son extraídas y detectadas por nuestra técnica. Por tanto, fue necesario determinar la cantidad de H_2O_2 que puede ser recuperada de las hojas en las que se induce la producción de ERO en diferentes etapas del proceso de la obtención de las muestras. Para tal objetivo se adicionó H_2O_2 100 μ M en hojas de frijol en diferentes pasos del método de toma de muestra y se cuantificó el H_2O_2 subsecuentemente, comparando la cantidad de H_2O_2 recuperada con la aplicada. Este experimento se realizó infiltrando las 3 hojas de un trifolío de frijol con H_2O_2 100 μ M, así como las 3 hojas de un trifolío de otra planta con H_2O , mientras las plantas permanecieron en invernadero por 1 h. Transcurrido ese tiempo, se cortaron las hojas infiltradas y 2 trifolios más sin tratamiento; posteriormente y de la forma más rápida posible, se trataron las muestras individualmente cortando los discos de hoja de las zonas infiltradas con H_2O_2 y H_2O y se colocaron en morteros, y lo mismo se hizo con los 24 discos provenientes de los 2 trifolios sin tratamiento. Estos se dividieron en 2 morteros, a uno de ellos se le adicionó H_2O_2 100 μ M al material vegetal antes de ser homogenizado y al segundo se le agregó H_2O_2 100 μ M al material vegetal inmediatamente después de ser homogenizado y resuspendido según lo descrito en la parte de materiales y métodos. Una vez obtenidas las cuatro muestras con H_2O_2 100 μ M en las 3 etapas diferentes del procedimiento, se cuantificó H_2O_2 a cada una de estas muestras y al control mediante el método de naranja de xilenol.

En la Figura 17, se presenta la cantidad de H_2O_2 en nmol por gramo de material vegetal fresco cuantificado en las 4 diferentes muestras. Como se observa en esta gráfica, la primera columna corresponde a la cantidad de H_2O_2 cuantificada cuando se infiltra H_2O como control, que resulta menor a las 1000 nmol/g de H_2O_2 ; lo cual corresponde a los niveles basales o blanco del ensayo y que pueden ser el producto del efecto del procedimiento de infiltración. La segunda, tercera y cuarta columnas, respectivamente, representan la cantidad de H_2O_2 que se logra recuperar cuando se aplica H_2O_2 en diferentes etapas del método de su cuantificación. Estas adiciones fueron: infiltrando en las hojas, aplicando a los discos de hoja en el momento previo a que se homogenizaran y por último, añadiendo el H_2O_2 a la suspensión proveniente del material vegetal triturado y reconstituido con el buffer de respectivo. Como se puede observar en la gráfica, la mayor cantidad de H_2O_2 recuperada se obtuvo en la muestra en la cual se le agregó H_2O_2

inmediatamente después de resuspender el material vegetal, lográndose recuperar cerca de 1800 nmol de H_2O_2 por gramo de peso fresco.

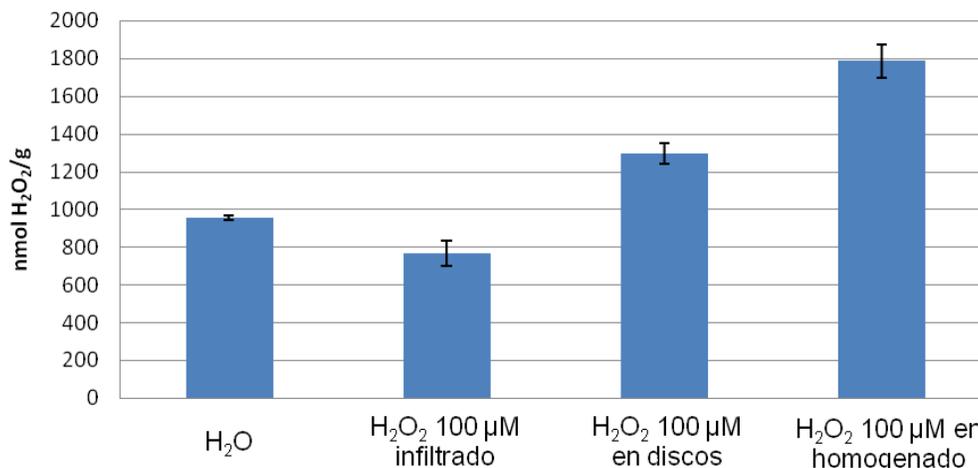


Figura 17. Cuantificación de H_2O_2 en hojas de frijol a las que se aplicó H_2O_2 100 μM en varios pasos: infiltrada directamente, añadida a los discos justo antes de su homogenado o bien adicionada al material vegetal recién homogenado.

3. Infiltración de suspensiones de patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*P. syringae* *avr*) y FB1 en diferentes concentraciones y su efecto en el fenotipo de hojas de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. *Canario 60*.

Se indujo la HR mediante la inducción de la acumulación de bases esfingoideas endógenas a través de la infiltración de las hojas de las plantas de frijol con soluciones de FB1 o con suspensiones de diferentes concentraciones de bacterias *P. syringae* *avr* en $MgCl_2$ 10 mM, realizándose el registro fotográfico de las hojas infiltradas a tiempos de inducción largos, con la finalidad de observar el fenotipo desarrollado en las hojas.

Se infiltraron las hojas de un trifolium con $MgCl_2$ 10 mM (control) en el lado derecho de la hoja y las soluciones de FB1 de concentraciones 5, 10, 20 y 50 μM paralelamente en el lado izquierdo de la hoja; de esta forma se infiltró un trifolium por tiempo de inducción y se realizó el registro fotográfico a las 24, 48, 72 h post-inducción (hpi) de la aplicación de FB1 (que produce una elevación de bases esfingoideas endógenas) y a los 4 y 7 d post-inducción (dpi) del aumento de bases esfingoideas. Adicionalmente, se infiltraron las hojas de un trifolium con $MgCl_2$ 10 mM (control) en el lado derecho de la hoja y suspensiones de *P. syringae* *avr* de concentraciones 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 y 1×10^8 UFC/mL paralelamente en el lado izquierdo de la hoja y se realizó el registro fotográfico a las 24, 48, 72 hpi y a los 4 y 7 dpi.

En la Figura 18 se presentan los fenotipos de las hojas de frijol infiltradas con las diferentes soluciones de FB1 y suspensiones de *Pst avr*. Los fenotipos observados fueron consistentes con los observados en las 2 hojas restantes del trifolio de cada tiempo de inducción. Como se observa en la figura, en el lado derecho de la hoja, donde fue infiltrado el $MgCl_2$, no se presentó ninguna señal visible de muerte celular.

La infiltración de FB1 5 μM produjo una lesión que se observa como una zona verde más pálida que en el lado en el que se infiltró $MgCl_2$ desde las 24 hpi, posteriormente, la lesión se observó más aguda a las 48 hpi y a los 72 hpi, sin embargo, la lesión más severa observada al infiltrar ésta solución se observó a los 4 dpi, observándose el tejido de color café oscuro en la zona de infiltración.

La infiltración de FB1 10 μM produjo la muerte celular del tejido de manera visible y muy aguda desde las 48 hpi, observándose como un tejido café muy oscuro, que progresó al transcurrir 7 dpi, ya que transcurrido este tiempo la lesión se tornó más oscura.

La infiltración de FB1 20 μM presentó un fenotipo de muerte celular muy severo desde las 48 hpi, que fue extendiéndose al transcurrir el tiempo, observándose a las 7 dpi una gran zona lesionada en la hoja, que se superpuso con la lesión ocasionada por la infiltración de FB1 50 μM .

La infiltración de FB1 50 μM provocó la muerte celular que fue visible macroscópicamente en el tejido desde las 24 hpi, la lesión se extendió y se agudizó a las 48 hpi, posteriormente a las 72 hpi y a 4 dpi la lesión se observó más extendida, hasta finalmente fusionarse con la lesión inducida por la infiltración de FB1 20 μM a los 7 dpi.

Por otro lado, la infiltración de *Pst avr* 1×10^5 UFC/mL ocasionó la muerte celular de manera visible hasta los 4 dpi, la lesión se presentó como una zona circular de color verde pálido, que progresó, observándose a los 7 dpi una lesión color verde más pálida.

La lesión inducida por la infiltración de *Pst avr* 1×10^6 UFC/mL se observó desde las 24 hpi como un tejido color verde pálido en la zona de infiltración, mientras que a las 48 hpi, el tejido se observa de color verde más pálido, indicando una lesión más severa que la mostrada a las 24 hpi, sin embargo a las 72 hpi y 4 dpi, la lesión se observó menos severa que la observada a las 48 hpi, finalmente a los 7 dpi, se observa una lesión color café en el centro y amarilla en la periferia.

La infiltración de *Pst avr* 1×10^7 UFC/mL ocasionó la muerte celular del tejido infiltrado desde las 24 hpi, la lesión se observó de color verde pálido, la cual progresó al transcurrir 48 hpi, observándose en el tejido infiltrado una lesión color café pálido, sin embargo a las 72 hpi y 4 dpi, la lesión en el

tejido se observa menos severa, que la observada a las 48 hpi; finalmente a los 7 dpi se produjo en el tejido una lesión más severa que la observada a las 72 hpi y 4 dpi, pero menos severa que la observada a las 48 hpi, el tejido en la zona de infiltración a los 7 dpi se observó de color café pálido y amarillo en la periferia.

Finalmente, la infiltración de *Pst avr* 1×10^8 UFC/mL indujo la muerte celular del tejido desde las 24 hpi, observándose una lesión de color café oscuro; posteriormente a las 48 y 72 hpi la lesión producida en el tejido fue menos severa que la observada a las 24 hpi, ésta lesión se observó como un tejido color café pálido, posteriormente a los 4 dpi, la lesión fue más extensa, que la observada a las 24 hpi, observándose como una zona de tejido color café pálido en el centro y más oscuro en las orillas, por último, a los 7 dpi, la lesión se observó más extensa y severa que la observada a los 4 dpi, en ésta, el tejido se observó de color café pálido amarillento en el centro y café oscuro en la periferia.

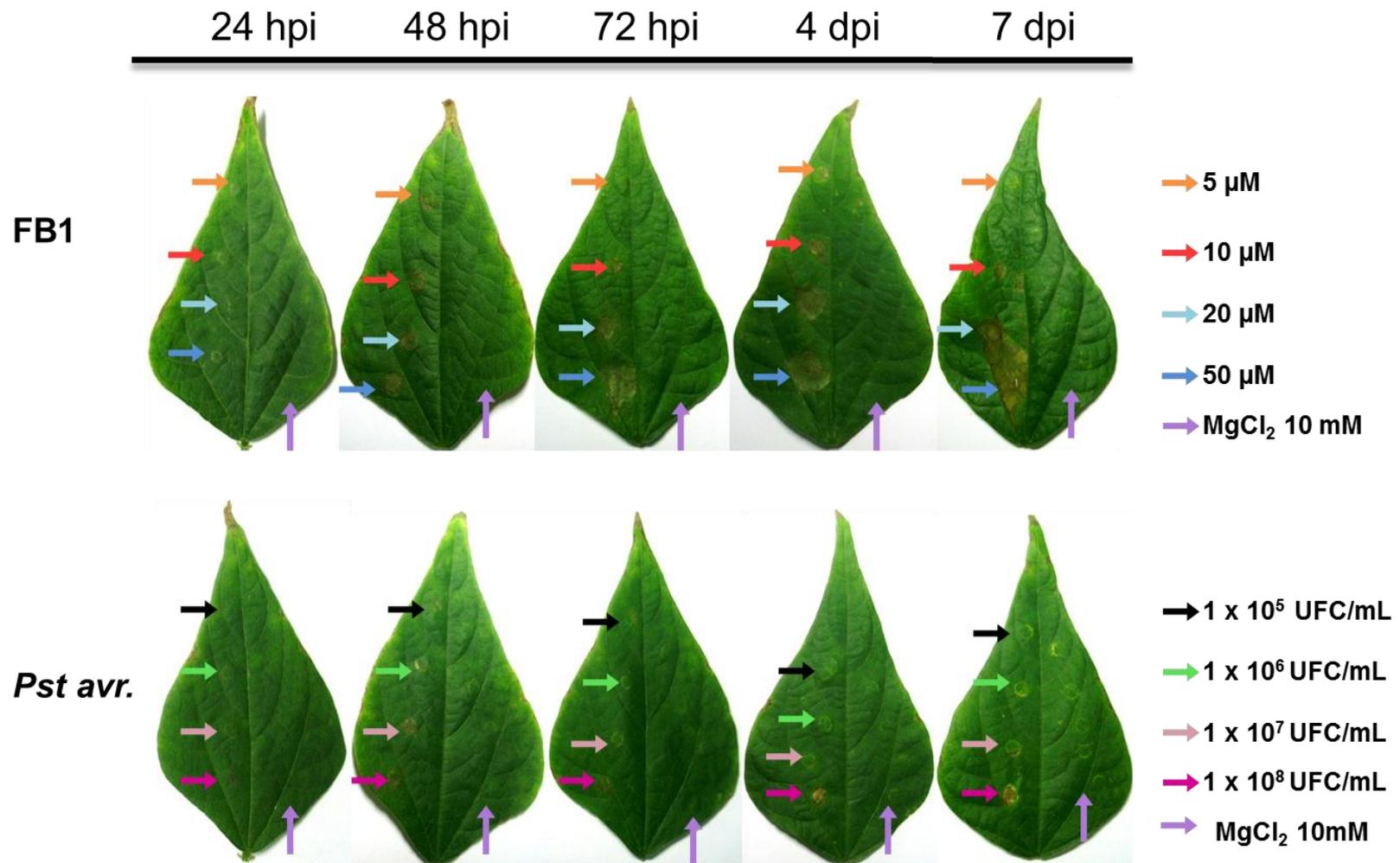


Figura 18. Fenotipos de las hojas de frijol tras la infiltración de FB1 5, 10, 20 y 50 μM y suspensiones de *P. syringae avr* 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 UFC/mL en MgCl_2 10 mM o solamente MgCl_2 10 mM (control) a los tiempos indicados. Se infiltró un trifolío para cada tiempo. Las flechas señalan las lesiones producidas en los sitios de infiltración de los diferentes tratamientos. En el caso del MgCl_2 , los sitios de infiltración son paralelos a los del lado izquierdo con el tratamiento respectivo.

4. Inducción de la HR y cuantificación de H₂O₂ en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. Canario 60.

4.1. Efecto de la FB1 en la producción de H₂O₂ en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. Canario 60

Se indujo la HR y la producción de ERO mediante la inducción de la acumulación de bases esfingoideas endógenas al infiltrar las hojas de las plantas de frijol con la toxina FB1 con una concentración de 50 µM y se realizó un registro fotográfico de las hojas infiltradas a las 4, 8, 18 y 24 hpi con la finalidad de observar el fenotipo desarrollado en las hojas y correlacionarlo con la producción H₂O₂ en los tejidos.

Se realizaron 2 ó 3 experimentos independientes, en cada uno se infiltraron las 3 hojas de un trifolio de una planta con MgCl₂ 10 mM (control) y las 3 hojas de un trifolio de una segunda planta con FB1 50 µM. En la Figura 19 se presentan las fotografías de las hojas de frijol infiltradas con cada tratamiento, los fenotipos observados en este experimento representativo fueron consistentes con los observados en las repeticiones.

De acuerdo a las fotografías de la Figura 17, las hojas infiltradas con MgCl₂ 10 mM no presentaron lesión alguna (observada como una zona color verde pálido o café que indica la muerte del tejido). A las 4 hpi con FB1, la hoja no presentó ninguna lesión comparada con la hoja control, sin embargo a las 8, 18 y 24 hpi se observa una pequeña lesión en el tejido infiltrado con FB1, que se observa como una zona circular de color verde más pálido (señalada con las flechas rojas), siendo ésta lesión más evidente a las 24 hpi.

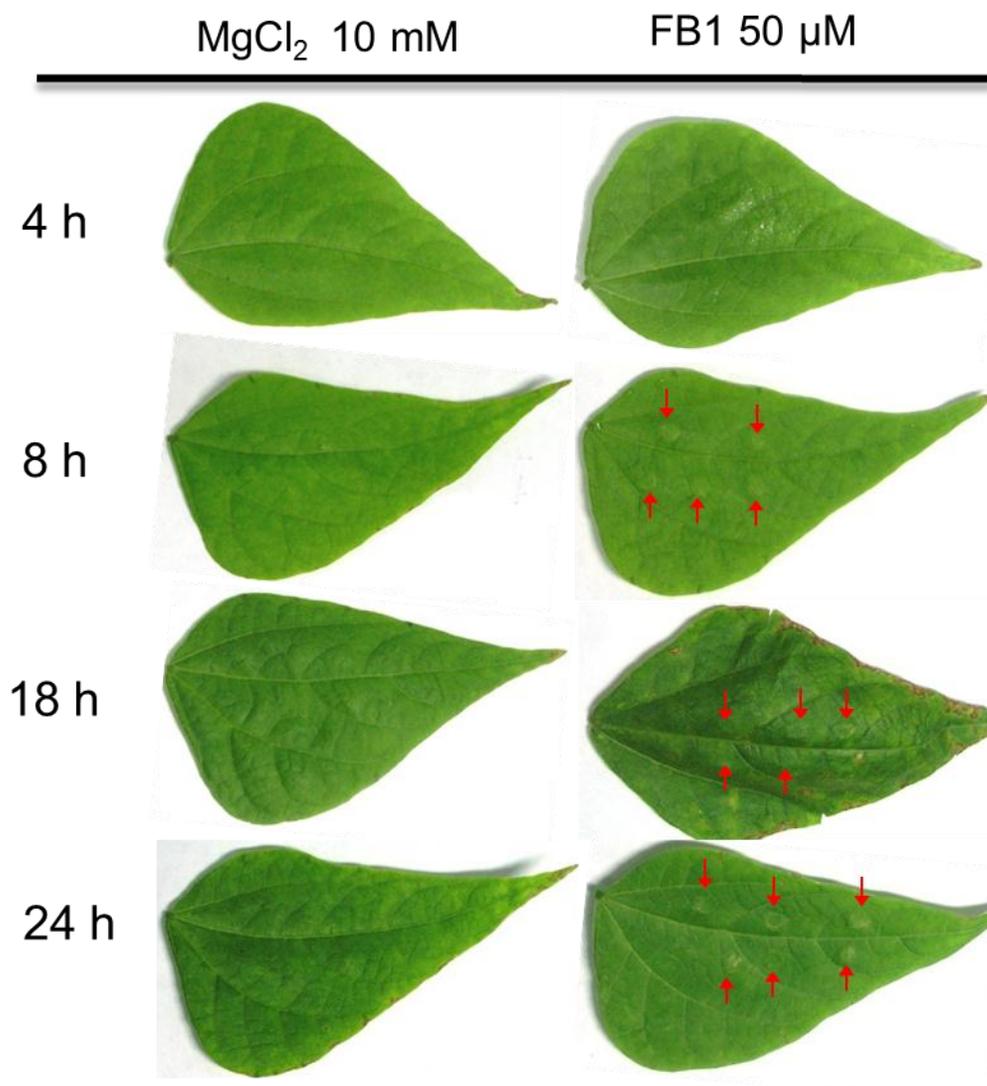


Figura 19. Fenotipos de las hojas de frijol infiltradas con FB1 50 μ M o MgCl_2 10 mM a los tiempos indicados. Se infiltraron 2 trifolios de 2 plantas diferentes para cada tiempo y para cada tratamiento. Las flechas indican las lesiones formadas en los sitios de infiltración.

Además del registro fotográfico, se cuantificó la cantidad de H_2O_2 producido por los tejidos de las hojas de frijol infiltradas con FB1 50 μ M y MgCl_2 (control) para cada tiempo.

Se realizaron 2 a 3 experimentos independientes. En cada experimento se infiltraron las 3 hojas de un trifolio con el tratamiento control (MgCl_2 10 mM) y las 3 hojas de un trifolio de una segunda planta (de la misma edad y de tamaño similar) con la solución de FB1 50 μ M, posteriormente se cortaron 4 discos de hoja en las zonas que fueron infiltradas y se cuantificó el H_2O_2 producido en los 12 discos con un tratamiento para cada tiempo, realizando 5 réplicas y una curva estándar.

En la Figura 20 se expresan los resultados como el porcentaje de H₂O₂ detectado en las hojas infiltradas con FB1 50 µM con respecto a la cantidad total de H₂O₂ cuantificada en las hojas de frijol infiltradas con MgCl₂, representando éstas el 100% de H₂O₂. Los resultados fueron 91.00, 136.9, 90.98 y 77.29 % de H₂O₂ con respecto al control para los tiempos 4, 8, 18 y 24 hpi, respectivamente, de acuerdo a estos resultados y lo observado en la gráfica, la mayor cantidad de H₂O₂ producido sucedió a las 8 hpi, mientras que en los otros tiempos de inducción, la cantidad de H₂O₂ producida por las hojas de frijol prácticamente no varía.

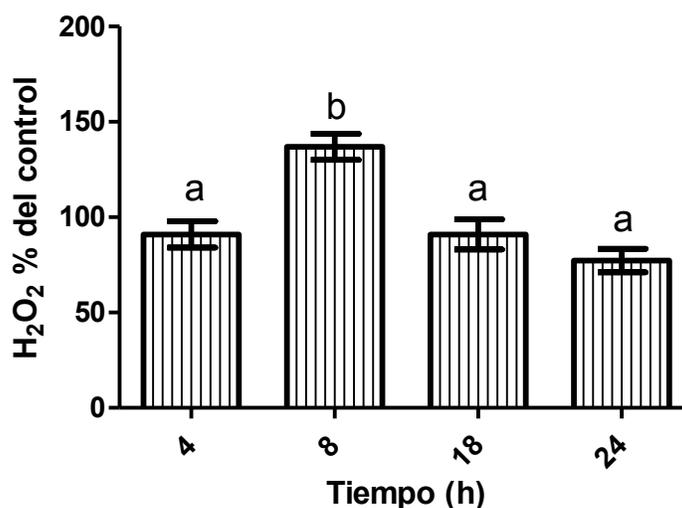


Figura 20. Cuantificación de H₂O₂ en hojas de frijol, los resultados se expresan en por ciento con respecto al producido por las hojas infiltradas con MgCl₂ 10 mM que representa el 100%, transcurridas 4, 8, 18 y 24 hpi con FB1 50 µM. Las barras representan el error estándar de la media del por ciento del control de 2 experimentos independientes.

4.2. Efecto de la infiltración del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* (*P. syringae* *avr*) en la producción de H₂O₂ en plantas de frijol var. Canario 60 (*Phaseolus vulgaris*).

Se indujo la HR mediante la infiltración de las hojas de las plantas de frijol con suspensiones de bacterias *P. syringae* *avr* en MgCl₂ 10 mM en diferentes concentraciones y se realizó el registro fotográfico de las hojas infiltradas a las 4, 8, 18 y 24 hpi con la finalidad de observar el fenotipo desarrollado en las hojas y correlacionarlo con la producción H₂O₂ en los tejidos.

Se realizaron 2 experimentos independientes, en cada experimento se infiltraron las 3 hojas de un trifolio de una planta con MgCl₂ 10 mM (control), así como las hojas de un trifolio de 3 plantas

diferentes para cada una de las suspensiones de *P. syringae avr* de concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC/mL.

En la Figura 21 se presentan las fotografías de las hojas de frijol infiltradas con las suspensiones bacterianas. Los fenotipos observados fueron consistentes con los observados en la repetición del experimento. Como se observa en la figura, ninguna de las hojas infiltradas con $MgCl_2$ presenta alguna señal de muerte celular visible. Además, se puede observar que la infiltración de la suspensión de *Pst avr* a la concentración de 1×10^7 UFC/mL no indujo una lesión visible del tejido vegetal aún transcurridas 24 hpi, sin embargo las suspensiones de *Pst avr* a las concentraciones de 1×10^8 y 1×10^9 UFC/mL sí lograron producir la muerte celular a nivel macroscópico de los tejidos infiltrados.

En las hojas infiltradas con *Pst avr* a la concentración de 1×10^8 UFC/mL, las lesiones se presentaron como zonas circulares de color café grisáceo a las 18 y 24 hpi (indicadas con flechas amarillas), mientras que las hojas infiltradas con *Pst avr* a 1×10^9 UFC/mL presentaron lesiones desde las 8 hpi (flechas rojas), observándose a este tiempo zonas circulares color verde más pálido comparado con el resto de la hoja y con la hoja control. Adicionalmente, las lesiones observadas con *Pst avr* 1×10^9 UFC/mL fueron más agudas a los tiempos 18 y 24 hpi que las presentadas en las hojas con *Pst avr* 1×10^8 UFC/mL a los mismos tiempos de inducción; observándose los tejidos infiltrados como zonas de color café oscuro.

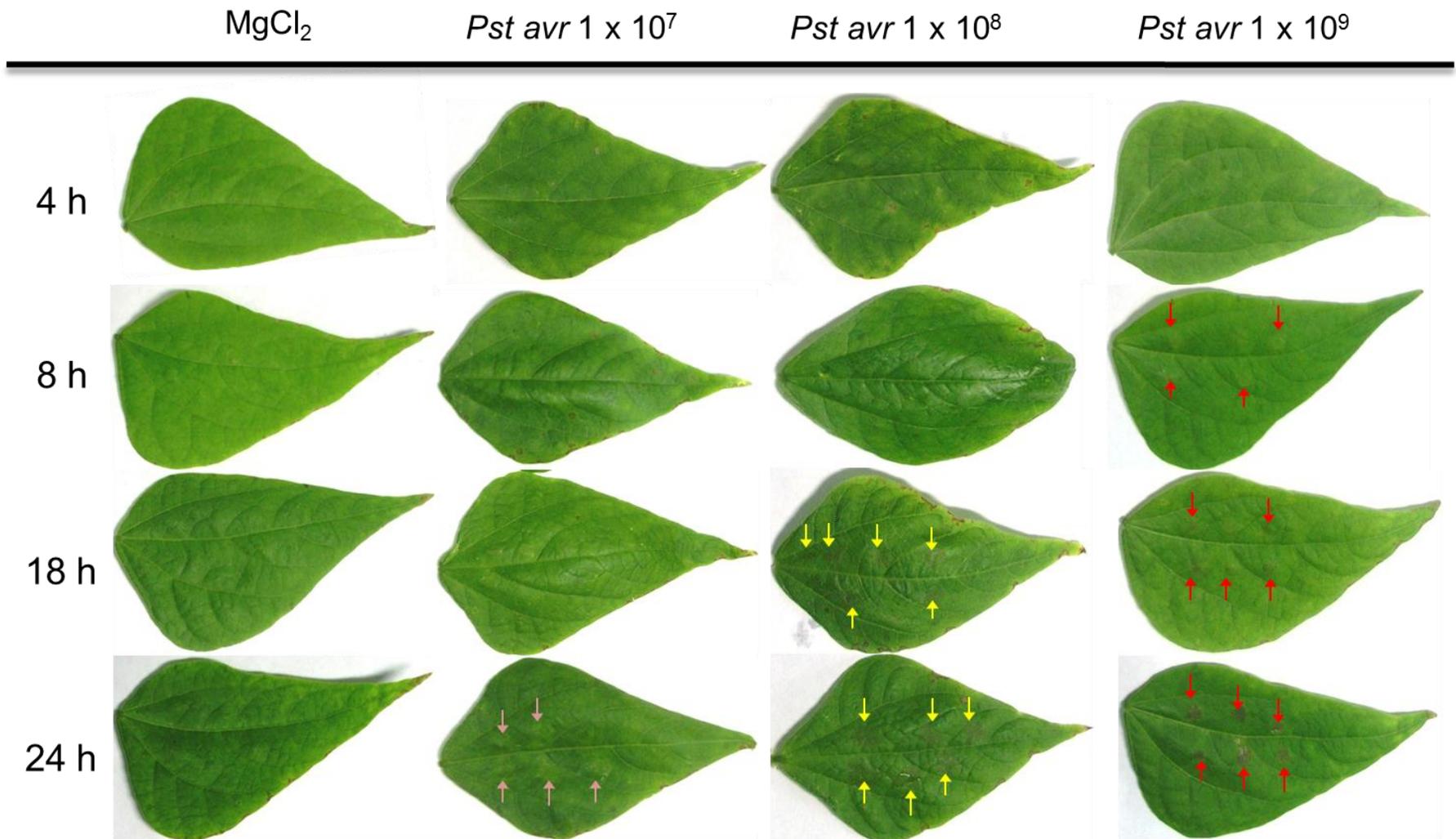


Figura 21. Fenotipos de las hojas de frijol tras la infiltración de suspensiones de *P. syringae avr* 1x 10⁷, 1x10⁸ y 1x10⁹ UFC/mL en MgCl₂ 10 mM o con solamente MgCl₂ 10 mM (control) a los tiempos indicados. Se infiltraron 2 trifolios de 2 plantas diferentes para cada tiempo y para cada tratamiento. Las flechas amarillas y rojas indican las lesiones presentadas en los tejidos infiltrados con *P. syringae avr* 1x10⁸ y 1x10⁹ UFC/mL respectivamente.

Una vez realizado el registro fotográfico, se cuantificó la cantidad de H_2O_2 producido por los tejidos de las hojas de frijol infiltradas con las suspensiones de *P. syringae avr* a las concentraciones de 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC/mL o con $MgCl_2$ (control) para cada tiempo, con el objetivo de relacionar la producción de H_2O_2 con los fenotipos observados en dichas condiciones.

Se realizaron 2 experimentos independientes. En cada experimento se infiltraron las 3 hojas de un trifolío con $MgCl_2$ 10 mM y las 3 hojas de un trifolío de 2 plantas diferentes con las suspensiones de *P. syringae avr* a las concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 UFC/mL. Los tejidos infiltrados con las suspensiones bacterianas fueron cortados de las hojas una vez transcurridos sus respectivos tiempos de inducción. Se cortaron 4 series de 12 discos de hoja, cada serie con una suspensión de *P. syringae avr* de diferente concentración o con $MgCl_2$ 10 mM como control para un tiempo de inducción determinado. A cada serie de 12 discos se le cuantificó H_2O_2 realizando 5 réplicas y una curva estándar.

En la Figura 22 se expresan los resultados como porcentaje de H_2O_2 detectada en las hojas infiltradas con *Pst avr* 1×10^7 UFC/mL, con respecto a la cantidad total de H_2O_2 cuantificada en las hojas de frijol infiltradas con $MgCl_2$, representando éstas el 100% de H_2O_2 . Los resultados fueron 56.57, 131.90, 86.77 y 95.29 % de H_2O_2 con respecto al control para los tiempos 4, 8, 18 y 24 hpi respectivamente. De acuerdo a estos resultados y lo observado en la gráfica, la mayor cantidad de H_2O_2 producido sucedió a las 8 hpi y fue significativamente mayor que el producido a los tiempos 4, 18 y 24 hpi.

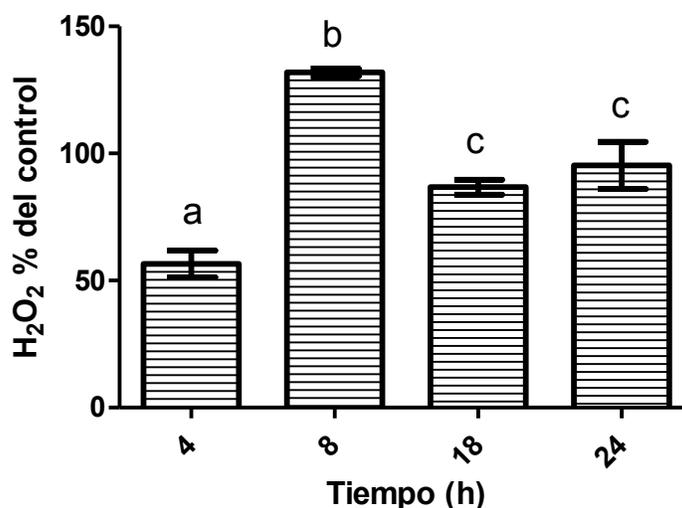


Figura 22. Cuantificación de H_2O_2 en hojas de frijol infiltradas con *Pst avr* 1×10^7 UFC/mL. Los resultados se expresan en por ciento con respecto al producido por las hojas infiltradas con $MgCl_2$ 10 mM que representa el 100%. Las barras representan el error estándar de la media del por ciento del control de 2 experimentos independientes.

Los resultados de la cuantificación de H_2O_2 en las hojas infiltradas con *Pst avr* 1×10^8 UFC/mL se presentan en % del control en la Figura 23. Los valores del por ciento de H_2O_2 producido fueron 110.9, 122.2, 83.66 y 91.14 % a las 4, 8, 18 y 24 hpi respectivamente.

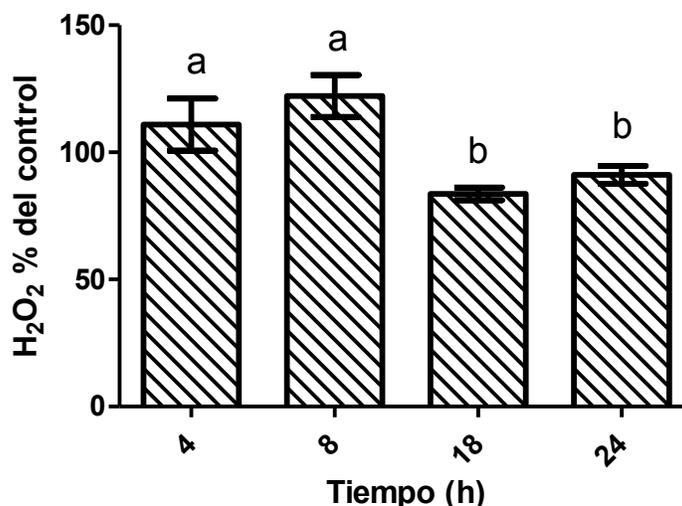


Figura 23. Cuantificación de H_2O_2 en hojas de frijol infiltradas con *Pst avr* 1×10^8 UFC/mL. Los resultados se expresan en por ciento con respecto al producido por las hojas infiltradas con $MgCl_2$ 10 mM que representa el 100%. Las barras representan el error estándar de la media del por ciento del control de 2 experimentos independientes.

Finalmente, la producción de H_2O_2 producido por las hojas de frijol cuando se infiltró una suspensión de *P. syringae avr* a la concentración de 1×10^9 UFC/mL, se cuantificó de 12 discos de hoja que fueron cortados de las 3 hojas de un trifolium infiltrado con dicha suspensión. Para cada tiempo de inducción se realizaron 5 réplicas y una curva estándar de H_2O_2 . En la Figura 24, la cantidad de H_2O_2 producida se expresó en porcentaje de H_2O_2 con respecto al producido por el control. Los valores determinados fueron 68.04, 110.5, 79.16 y 99.98 % transcurridas 4, 8, 18 y 24 hpi respectivamente.

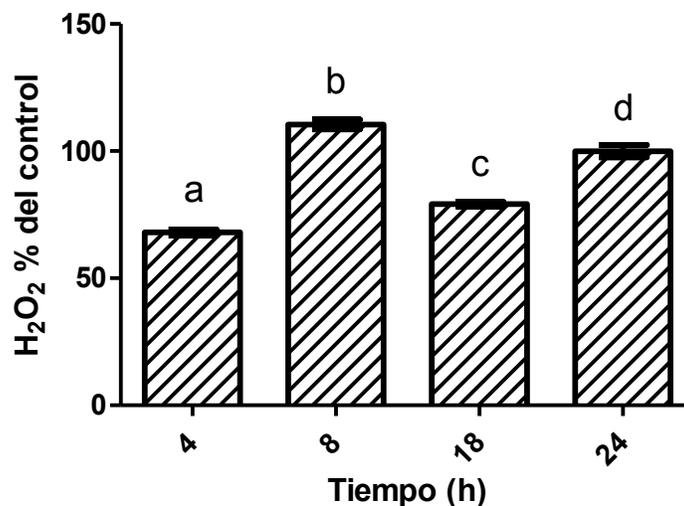


Figura 24. Cuantificación de H₂O₂ en hojas de frijol infiltradas con *Pst avr* 1×10^9 UFC/mL. Los resultados se expresan en por ciento con respecto al producido por las hojas infiltradas con MgCl₂ 10mM que representa el 100%.

Con el objeto de comparar los resultados de la generación de H₂O₂ mostrados en las Figuras 20, 22, 23 y 24, a continuación se graficaron los resultados de la cuantificación de H₂O₂ en las hojas de frijol infiltradas con los diferentes tratamientos que inducen la HR (FB1 50 μ M y *Pst avr* a las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC/mL) y por lo tanto la producción de H₂O₂ (Figuras 25 y 26). Las columnas representan las cantidades de H₂O₂ cuantificadas en por ciento del control. Como se puede observar en las Figuras 25 y 26, las hojas infiltradas con FB1 50 μ M o *Pst avr* a (cualquier de las concentraciones infiltradas), mostraron que a las 4 hpi la cantidad de H₂O₂ cuantificada fue la menor para cada tratamiento, posteriormente, a las 8 hpi se presentó consistentemente un máximo en la producción de H₂O₂ en los 4 tratamientos, para finalmente descender a las 18 hpi y mantenerse a las 24 hpi. Como se puede observar, este fue un patrón común de los niveles de H₂O₂ en los cuatro tratamientos (Figura 26).

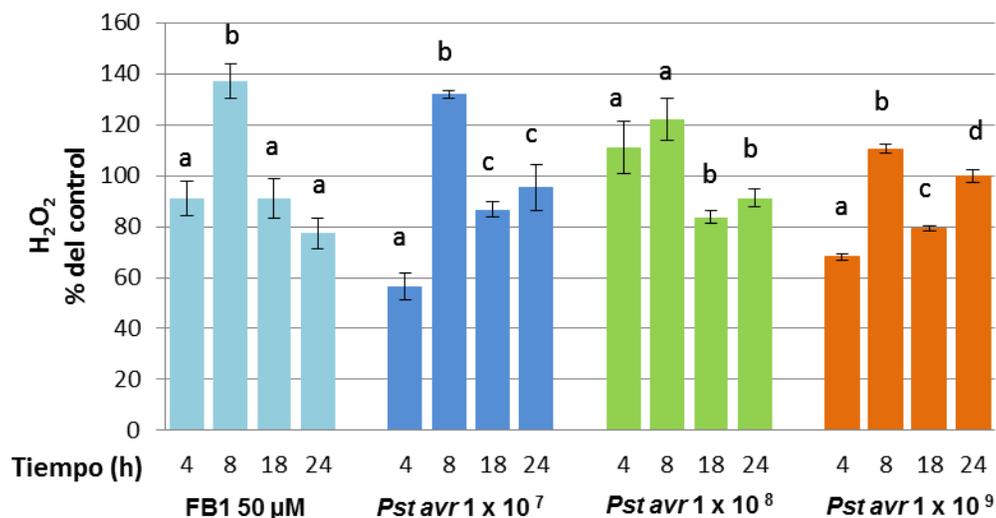


Figura 25. Cuantificación de H₂O₂ en hojas de frijol infiltradas con FB1 50 µM y suspensiones de *Pst avr* a las concentraciones 1x 10⁷, 1x10⁸ y 1x10⁹ UFC/mL. Los resultados se expresan en por ciento con respecto al producido por las hojas infiltradas con MgCl₂ 10 mM. Las barras representan el error estándar del promedio del por ciento del control de 1 ó 2 experimentos independientes.

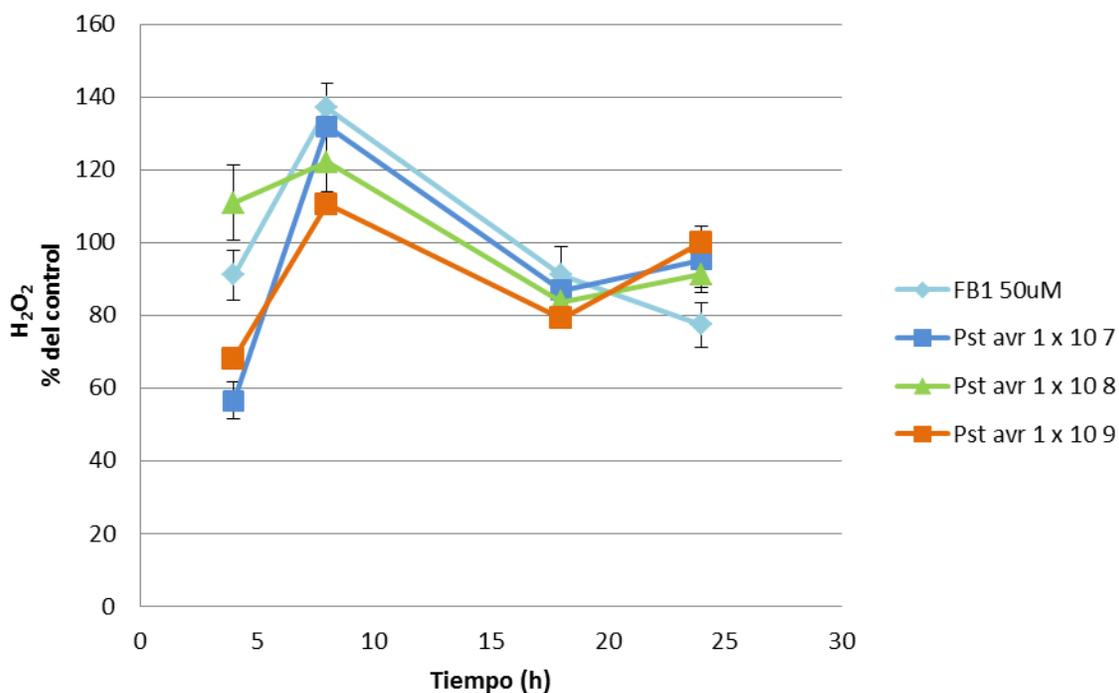


Figura 26. Cuantificación de H₂O₂ en hojas de frijol infiltradas con FB1 50 µM y suspensiones de *Pst avr* a las concentraciones 1x 10⁷, 1x10⁸ y 1x10⁹ UFC/mL. Los resultados se expresan en por ciento con respecto al producido por las hojas infiltradas con MgCl₂ 10 mM. Los valores graficados son los mismos de la Figura 14, pero se expresan aquí de forma diferente para apreciar mejor la cinética de la formación de H₂O₂ en los tratamientos probados. Las barras representan el error estándar del promedio del por ciento del control de 1 ó 2 experimentos independientes.

5. Inducción de la HR y la producción de H₂O₂ en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre (wt) y mutante *pflD 18-18*

Con el objetivo de determinar la contribución del cloroplasto en la producción de ERO en la HR, se indujo la producción de ERO en plántulas de *A. thaliana* de genotipos silvestre (control) y mutante *pflD 18-18* (que produce menos ERO en el cloroplasto). Esto se llevó a cabo mediante la aplicación de la toxina FB1, que induce una lesión tipo HR mediante un aumento en los niveles de bases esfingoideas endógenas, para así comparar las cantidades de ERO producidas en ambas líneas de plántulas y su asociación con los aumentos de bases esfingoideas.

5.1 Efecto de la FB1 20 µM en la producción de H₂O₂ en plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre (wt) y mutante *pflD 18-18*.

Se realizaron 3 experimentos independientes. Para cada experimento se utilizaron 4 cajas de Petri con plántulas de *A. thaliana* de cada línea, una para cada tiempo de inducción. Las cajas con plántulas de *A. thaliana* de ambas líneas se asperjaron con una solución de FB1 20 µM para inducir la HR, posteriormente se realizó el registro fotográfico a las 0 h (plántulas sin asperjar), 6, 18 y 24 hpi con la finalidad de observar el fenotipo desarrollado en las hojas y correlacionarlo con la producción H₂O₂ en las mismas.

En la Figura 27 se presentan las fotografías de las plántulas tratadas con FB1 20 µM. Los fenotipos observados fueron consistentes con los observados en las repeticiones del experimento. El fenotipo característico de la muerte celular en las líneas de *A. thaliana* se presenta como la aparición de clorosis en las hojas, que se puede observar como una disminución de la coloración foliar. Como se observa en la figura, ninguna de las hojas de las plántulas a las 0 hpi (sin tratamiento) de ambas líneas presenta alguna señal de muerte celular visible. Por otro lado, en las plántulas de la línea silvestre se observa débilmente la aparición de clorosis desde las 18 hpi, mientras que en la línea mutante no se observó tal fenotipo.

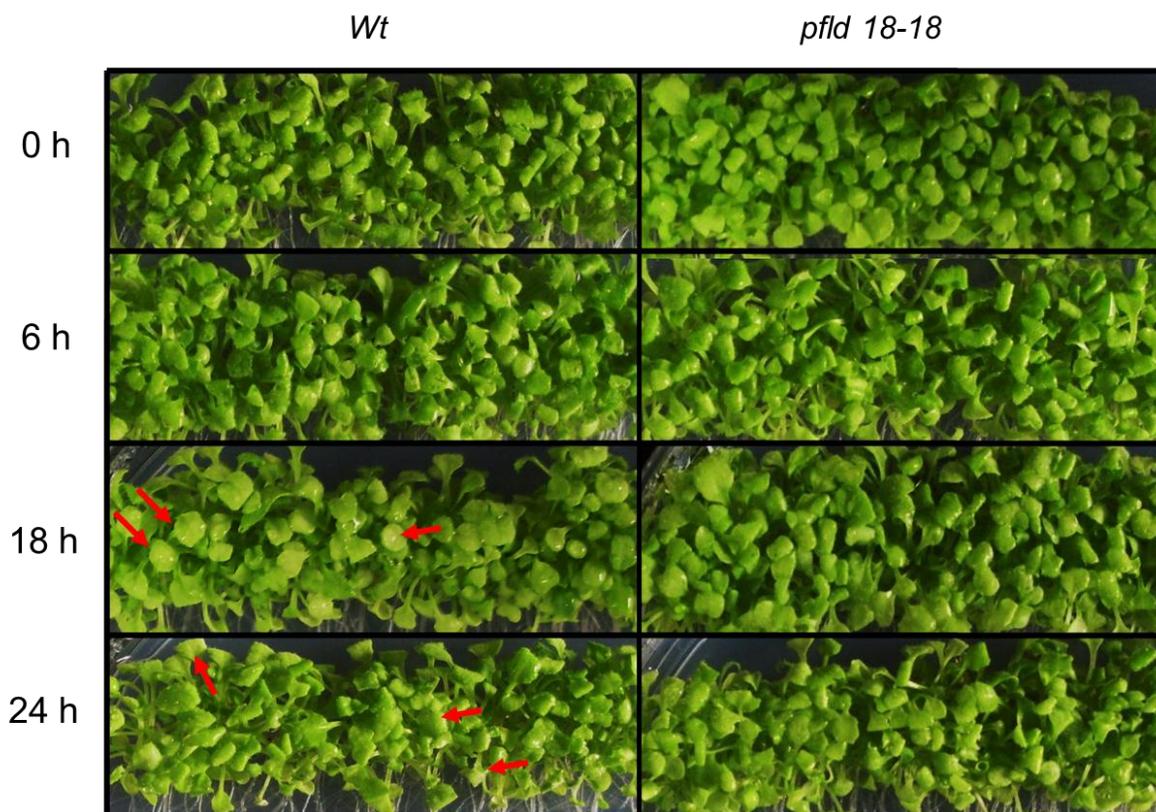


Figura 27. Fenotipos de las plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre (*wt*) y mutante *pflid 18-18* sin asperjar ($t=0$ h) y asperjadas con FB1 20 μ M a los tiempos indicados.

A las plántulas de los 3 experimentos independientes realizados, se cuantificó la cantidad de H_2O_2 producida por las plántulas de *A. thaliana* de ambas líneas a las 0, 6, 18 y 24 hpi. Para cada experimento se utilizaron 4 cajas de Petri con plántulas de *A. thaliana* de cada línea, una para cada tiempo de inducción y se cuantificó la cantidad de H_2O_2 en 2 porciones de plántulas de cada caja de manera independiente y realizando 3 réplicas para cada porción, así como una curva estándar para cada línea y tiempo de inducción. Es decir, en total se realizaron 6 réplicas por tiempo por línea de plántulas con su respectiva curva estándar.

En la Figura 28 se presenta la gráfica del H_2O_2 cuantificado como promedio de las 6 réplicas en nmol de H_2O_2 por gramo de peso fresco, una vez transcurrida la exposición de 0, 6, 18 y 24 hpi con FB1 20 μ M de los tres experimentos independientes. En el experimento 1, el H_2O_2 cuantificado en las plántulas *wt* (control) fue de 34.2 nmol/g, mientras que en la línea mutante *pflid 18-18* fue de 28.9 nmol/g en el tiempo 0 hpi, posteriormente el H_2O_2 cuantificado a las 6 hpi disminuyó en ambas líneas, siendo 26.6 nmol/g en el control y 17.7 nmol/g en la línea mutante. A las 18 hpi aumentó nuevamente a 30.0 nmol/g en el control y en la mutante a 34.8 nmol/g y finalmente a las 24 hpi, el H_2O_2 fue de 43.5 nmol/g en el control y 27.9 nmol/g en las plántulas de la línea mutante *pflid 18-18*.

Como se observa en la gráfica, en los experimentos 2 y 3 se presentó una tendencia similar, cuantificándose la menor cantidad de H_2O_2 producida por las plántulas de ambas líneas a las 6 hpi en cada experimento.

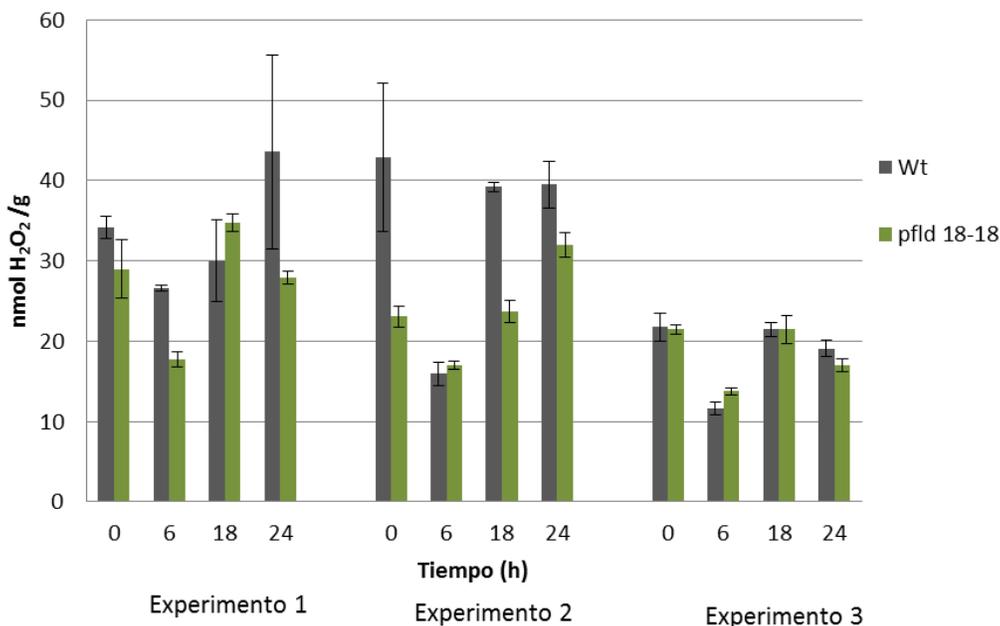


Figura 28. Cuantificación de H_2O_2 en plántulas de la línea silvestre (wt) y mutante *pflid 18-18* inducidas con FB1 20 μ M a las 0, 6, 18 y 24 hpi en 3 experimentos con muestras biológicas independientes. Las barras representan el error estándar del promedio de 6 réplicas dentro del mismo experimento.

Para determinar la contribución del cloroplasto en la producción de ERO en la HR, se comparó el incremento de la cantidad de H_2O_2 producido por las plántulas de la línea mutante *pflid 18-18* con respecto al incremento de la cantidad de H_2O_2 producido por las plántulas de la línea silvestre (control) para cada tiempo de inducción. Se tomaron en cuenta, los valores en nmol de H_2O_2 de cada línea de cada experimento y se expresaron en por ciento con respecto a su control (t=0 hpi) para determinar el incremento en la producción de H_2O_2 con respecto al tiempo de cada línea de plántulas, posteriormente los incrementos en la producción de H_2O_2 para cada intervalo de tiempo de la línea mutante *pflid 18-18* fueron expresados como porcentaje con respecto a los valores en por ciento de H_2O_2 incrementado de la línea silvestre, que representan el 100% y se calculó la media para cada tiempo de inducción, éstos resultados se representan en la gráfica de la Figura 29 A, cuyos valores fueron analizados mediante un análisis ANOVA de una vía y comparación de medias por método de Bonferroni (Figura 29 B). Como se puede observar en la Figura 29 A, la producción de H_2O_2 en la línea mutante *pflid 18-18* parece disminuir a las 18 hpi, sin embargo de acuerdo al análisis estadístico ésta disminución no fué significativa.

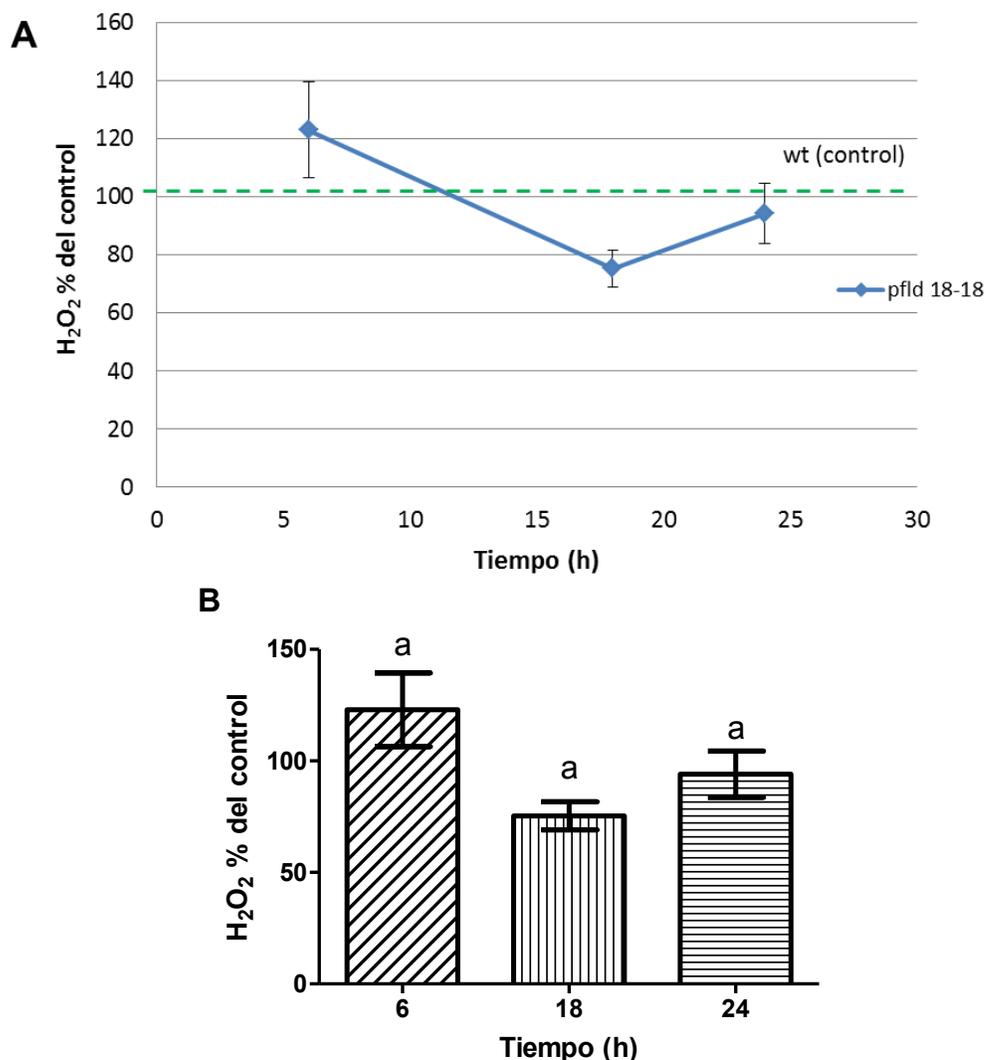


Figura 29. Cuantificación de H₂O₂ en plántulas de la línea mutante *pflD 18-18* en comparación con la línea silvestre. Los valores se expresan en por ciento con respecto al incremento de H₂O₂ producido por las plántulas de la línea silvestre que representa el 100%. Se muestran los valores obtenidos después de transcurridas 0, 6, 18 y 24 hpi con FB1 20 μ M. Las barras representan el error estándar del promedio del por ciento del control de los 3 experimentos independientes mostrados en la Figura 16.

5.2 Efecto de la FB1 50 μ M en la producción de H₂O₂ en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Con el fin de acentuar el efecto de la FB1 en la producción de ERO entre las plantas silvestres y las mutantes, se indujo la producción de ERO en plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre y mutante *pflD 18-18* exponiendo a las plántulas a una concentración de FB1 50 μ M.

5.2.1 Curso temporal de producción de H₂O₂ en un periodo de 0 a 390 min posteriores a la exposición con FB1 50 µM de plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre

Para determinar si la aplicación de una concentración elevada de FB1 permitía determinar cuantitativamente la producción de ERO a tiempos tempranos de desarrollo de la MCP inducida por el aumento de bases esfingoideas, se indujo la producción de ERO en plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre por exposición a la FB1 50 µM y se cuantificó el H₂O₂ producida a tiempos cortos (0, 30, 90, 150, 270 y 390 min) que los empleados anteriormente. Se asperjaron 4 cajas con plántulas de la línea silvestre cada una con 1 mL de FB1 50 µM, las plántulas de cada caja se dividieron en tres porciones (teniendo 12 en total en las 4 cajas), para cada tiempo de inducción de tomaron 2 de las 3 porciones por caja correspondientes y se cuantificó H₂O₂ en cada una de ellas, realizando 3 réplicas por porción, es decir se realizaron 6 réplicas para cada tiempo y en cada uno de ellos se construyó la respectiva curva estándar.

En la Figura 30 se graficaron las cantidades de H₂O₂ en nmol/g producidas a los 0, 30, 90, 150, 270 y 390 min post-inducción de aumento de las BCL en las plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre. Los valores de H₂O₂ fluctuaron entre los 25 y 30 nmol/g para los tiempos 0, 30 y 90 min post-inducción, siendo éstos: 29.4, 25.8, 28.6, nmol/g para cada uno de ellos respectivamente, posteriormente a los 150 min post inducción, el H₂O₂ disminuyó a 24.1 nmol/g, siendo éste el valor más bajo determinado en este experimento, en seguida volvió a aumentar a 25.0 y 29.1 a los 270 y 390 min post-inducción. Las únicas diferencias significativas se observaron a los 30 y 150 min, cuando se presentó una discreta disminución de H₂O₂ por exposición a la FB1.

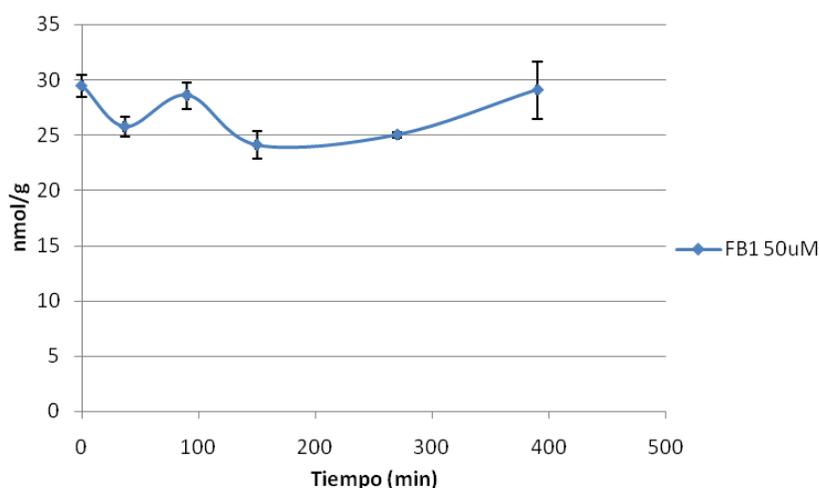


Figura 30. Cuantificación de H₂O₂ en plántulas de *A. thaliana* de la línea silvestre inducidas con FB1 50 µM transcurridos 0, 30, 90, 150, 270 y 390 min post inducción del aumento de BCL. Las barras representan el error estándar del promedio de 6 réplicas de cada tiempo.

5.2.2 Efecto de la FB1 50 μ M en la producción de H_2O_2 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre (wt) y mutante *pfl1 18-18*.

Para determinar la contribución del cloroplasto en la producción de ERO cuando se induce la MCP-HR y la producción de ERO aplicando una solución de FB1 50 μ M en plántulas de *A. thaliana*, se asperjaron plántulas de las líneas silvestre y mutante *pfl1 18-18* con ésta solución con el objetivo de comparar las cantidades de H_2O_2 que logran producir las plántulas en un periodo prolongado de tiempo.

Se realizaron 3 experimentos independientes, para cada experimento se utilizaron 4 cajas de Petri con plántulas de *A. thaliana* de cada línea, las cajas con plántulas de *A. thaliana* se asperjaron con una solución de FB1 50 μ M, posteriormente se realizó el registro fotográfico a las 0 h (plántulas sin asperjar), 4, 24 y 72 hpi con la finalidad de observar el fenotipo desarrollado en las hojas y correlacionarlo con la producción H_2O_2 en las mismas.

En la Figura 31 se muestran las fotografías de las plántulas tratadas con FB1 50 μ M. Los fenotipos observados fueron consistentes con los observados en las repeticiones del experimento. Las hojas de las plántulas a las 0 hpi (sin tratamiento) de ambas líneas no presentaron ninguna señal de muerte celular visible. En las plántulas de la línea silvestre se observó débilmente la aparición de clorosis a las 24 y 72 hpi, en esta fotografía se puede observar la presencia de varias hojas de plántulas con un color verde más pálido que en el resto de las plántulas. En la línea mutante no se logró observar la aparición de clorosis aún a las 72 hpi.

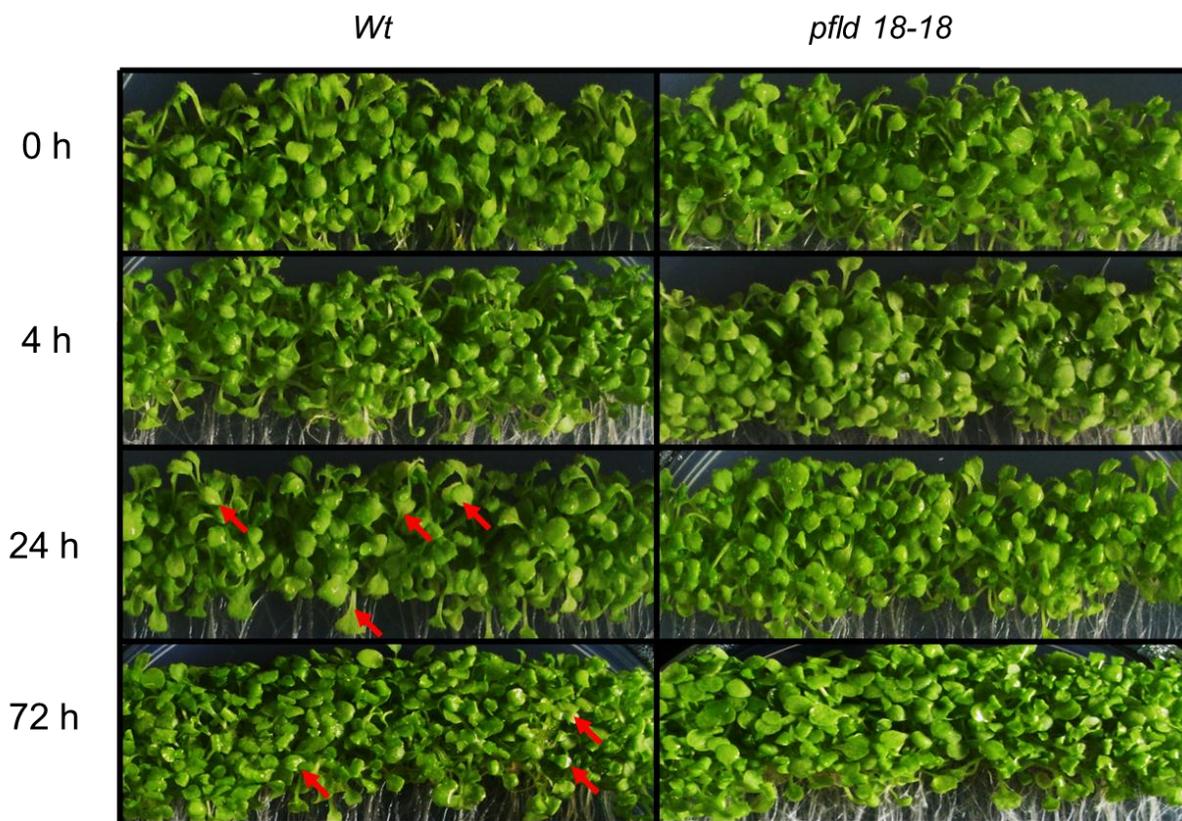


Figura 31. Fenotipos de las plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre (*wt*) y mutante *pflid 18-18* sin asperjar ($t=0h$) y asperjadas con FB1 50 μM a los tiempos indicados.

Posteriormente se realizó en cada uno de los 3 experimentos independientes la cuantificación de la cantidad de H_2O_2 producida por las plántulas de *A. thaliana* de ambas líneas a las 0, 4, 24 y 72 hpi con FB1 50 μM . Para cada experimento se utilizaron 4 cajas de Petri con plántulas de *A. thaliana* de cada línea, una para cada tiempo de inducción y se cuantificó la cantidad de H_2O_2 en 2 porciones de plántulas de cada caja de manera independiente y realizando 3 réplicas para cada porción, así como una curva estándar por tiempo de inducción y por línea de plántulas, es decir se realizaron 6 réplicas por tiempo de inducción por línea de plántulas con su respectiva curva estándar, ya que aunque las lecturas del método no cambian, era preferible tener determinaciones muy precisas entre tiempo y tiempo para poder compararlas.

En la Figura 32 se presentan en columnas grises, las cantidades de H_2O_2 en nmol/g producido por las plántulas de *A. thaliana* de la línea silvestre y en columnas color naranja las nmol/g de H_2O_2 producido por las plántulas de la línea mutante *pflid 18-18* a las 0, 4, 24 y 72 hpi de cada uno de los 3 experimentos realizados.

En el experimento 1 la línea de plántulas silvestre produjo 34.2, nmol/g a las 0 hpi, mientras que la línea *pflD 18-18* produjo 29.0 nmol/g. En los tiempos posteriores, la cantidad de H₂O₂ producida en ambas líneas disminuyó, resultando en 32.0, 24.1 y 17.5 nmol /g para la línea silvestre a las 4, 24 y 72 hpi respectivamente, así como 26.1, 15.0 y 10.8 nmol/g para los tiempos 4, 24 y 72 hpi, respectivamente. Para la línea mutante *pflD 18-18*, sin embargo, esta tendencia no se observó en los 2 experimentos subsecuentes.

En el experimento 2, las plántulas de la línea wt produjeron 62.0 nmol/g a las 0 hpi, mientras que las plántulas de la línea mutante *pflD 18-18* produjeron 73.7 nmol/g, siendo ésta la mayor cantidad de H₂O₂ cuantificada en éste experimento, luego a las 4 hpi, la cantidad de H₂O₂ producida por ambas líneas disminuyó, cuantificándose 16.9 y 14.3 nmol/g para la líneas silvestre y mutante, respectivamente. Finalmente la cantidad de H₂O₂ producida en la línea silvestre para los tiempos 24y 72 hpi aumenta nuevamente a 32.0 y 61.0 nmol/g respectivamente, mientras que en la línea mutante aumentó a sólo 23.6 y 24.1 nmol/g para los tiempos 24 y 72 hpi, respectivamente.

Por último, en el experimento 3, la tendencia fue diferente a la que se presentó en los experimentos 1 y 2, en términos de las cantidades absolutas del ERO, ya que en éste experimento la línea silvestre produjo 32.4, 31.9, 24.9 y 27.3 nmol/g para los tiempos 0, 4, 24 y 72 hpi respectivamente, mientras que la línea mutante produjo sólo 14.6, 18.2, 34.8 y 14.6 nmol/g para los tiempos 0, 4, 24 y 72 hpi respectivamente.

Cuando se consideran los perfiles de producción de H₂O₂ en los tres experimentos, se observaron diferencias entre ellos, sin embargo un rasgo importante y común a todos ellos, fue que en prácticamente todos los tiempos, los niveles de H₂O₂ determinados fueron menores en la línea mutante comparados con los producidos por las plantas silvestres (Figura 30).

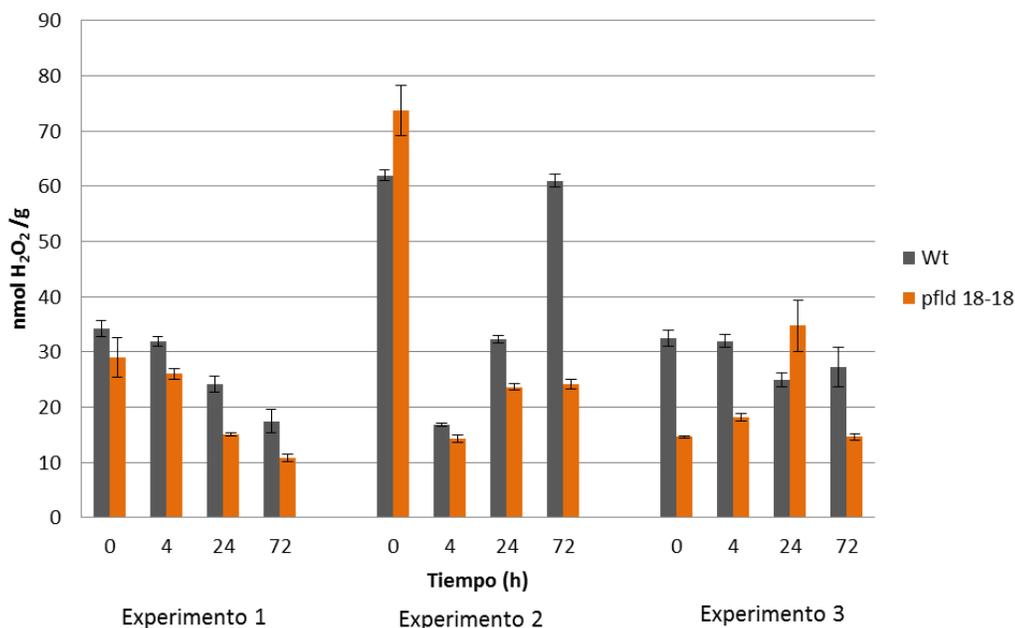


Figura 32. Curso temporal de la cuantificación de H₂O₂ en plántulas de *A. thaliana* de la línea silvestre y mutante *pflid 18-18* inducidas con FB1 50 µM transcurridos 0, 4, 24 y 72 hpi en tres experimentos con muestras biológicas independientes. Las barras representan el error estándar del promedio de 6 réplicas de cada tiempo de cada experimento.

Tomando los resultados en números absolutos de la Figura 32, se comparó la cantidad de H₂O₂ producido por las plántulas de la línea mutante *pflid 18-18* con respecto a la cantidad de H₂O₂ producido por las plántulas de la línea silvestre (control) pero ahora en términos relativos, es decir en porcentaje.

En la Figura 33, se presenta el promedio del por ciento del incremento de H₂O₂ producida por la mutante *pflid 18-18* en cada tiempo con respecto al incremento de H₂O₂ producido por la línea wt (control), que representa el 100%; en ésta figura se observa que con FB1 50 µM las plántulas de la línea *pflid 18-18* produjeron un 36.7 % de H₂O₂ menos que las plántulas de la línea silvestre transcurridas 72 hpi. El análisis estadístico realizado, determinó que la producción de H₂O₂ fue significativamente menor ($P > 0.05$) en la línea mutante *pflid 18-18* con respecto a la línea silvestre.

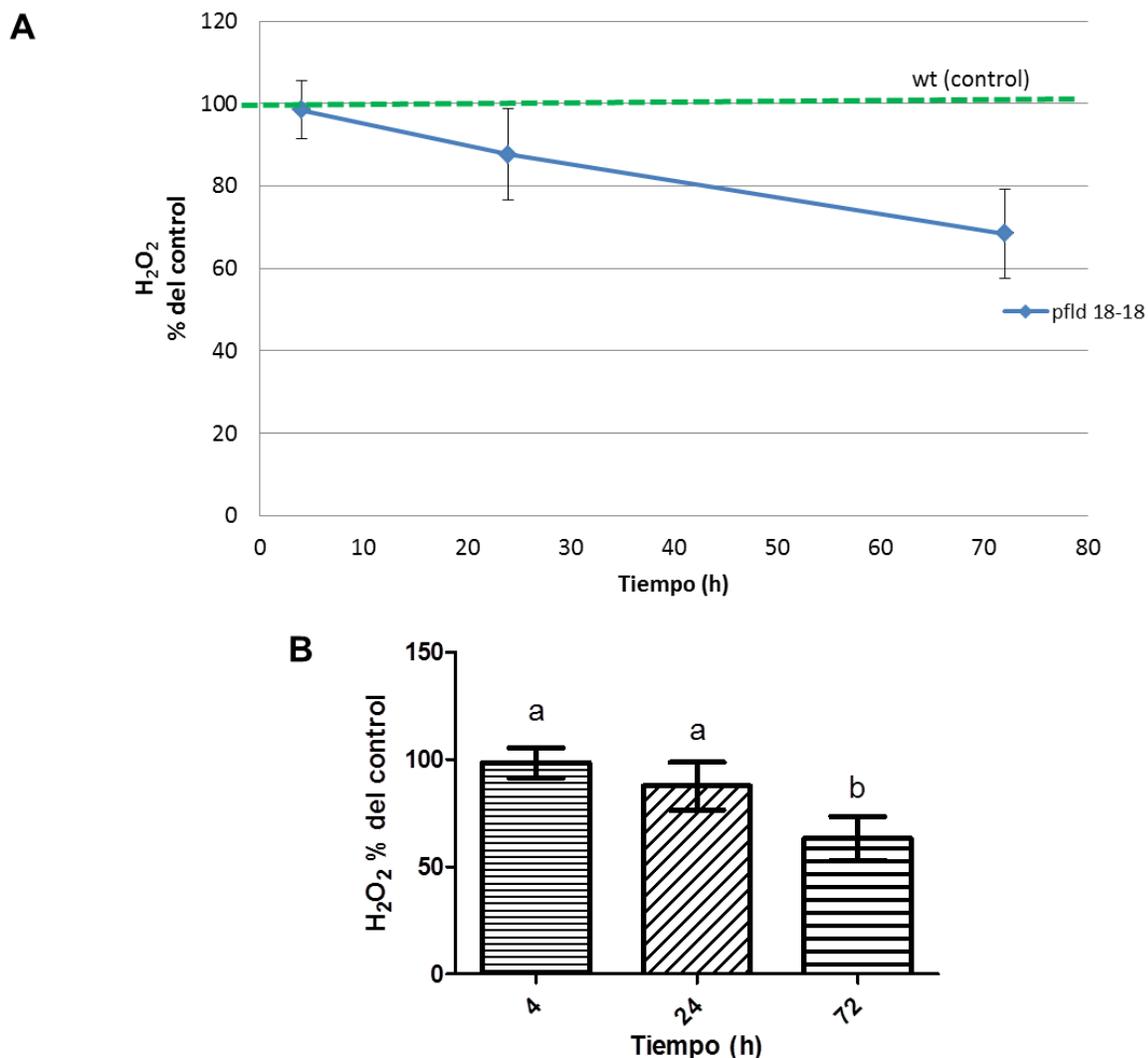


Figura 33. Cuantificación de H₂O₂ en plántulas de la línea mutante *pflid 18-18*, expresado en por ciento con respecto al incremento de H₂O₂ determinado en las plántulas de la línea silvestre, el cual representa el 100%, transcurridas 0, 4, 24 y 72 hpi con FB1 50 μ M. Las barras representan el error estándar del promedio del por ciento del control de 3 experimentos independientes

5.3. Efecto de la exposición de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre (wt) y mutante *pflid 18-18* a la FB1 en la ultraestructura del cloroplasto.

Una vez descrito el efecto de la FB1 en la producción de H₂O₂ en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* transcurridas 72 hpi con FB1 50 μ M, se realizó el análisis ultraestructural de las células de las hojas en esas condiciones.

Se realizó la inducción de las plántulas de *A. thaliana* de la línea silvestre contenidas en una caja de Petri y una caja con plántulas de la línea mutante *pflid 18-18*, se aplicó por aspersión 1 mL de FB1 50 μ M, posteriormente, las cajas con plántulas inducidas y dos cajas con plántulas sin

tratamiento (como control), una con plántulas de la línea silvestre y una con plántulas de la línea mutante *pfl1 18-18*; las cuatro cajas con plántulas se expusieron a un fotoperiodo continuo de luz por 72 h. Transcurrido el tiempo de inducción, se cortaron las hojas, y éstas fueron inmediatamente fijadas para su observación por microscopía electrónica de transmisión (MET).

En la Figura 34 se presentan las micrografías obtenidas por MET. Los paneles A, B, C y D corresponden a las plántulas de la línea silvestre sin tratamiento (control). Los paneles E, F, G y H corresponden a las plántulas de la línea silvestre inducidas con FB1 50 μ M por 72 h.

En el caso de las muestras sin FB1, en el panel A se muestran tres células, cada una contiene una vacuola central (VC), varios cloroplastos (C) distribuidos alrededor de la vacuola central, éstos a su vez contienen gránulos de almidón (GA) en su interior, que se pueden observar como círculos de color blanco dentro de cada cloroplasto. En el panel B se muestra una sola célula, ésta contiene siete cloroplastos distribuidos alrededor de la vacuola central, la mayoría de los cloroplastos contiene al menos cinco gránulos de almidón. En el panel C, se puede observar un cloroplasto, así como los tilacoides (T), cuya membrana se encuentra bien definida y organizada tanto en el apilamiento de los grana como en las conexiones entre los grana. La membrana plasmática presenta algunas invaginaciones, sin embargo se observa claramente definida. En el panel D, se observan los extremos de dos cloroplastos, en los cuales se logran distinguir los tilacoides muy bien ordenados en los grana, nótese que la membrana tilacoidal se observa muy bien definida.

En cuanto a las muestras de plántulas tratadas con FB1, en el panel E se observan tres células, en cada una se distinguen al menos dos cloroplastos que se localizan alrededor de la vacuola central. En el panel F se observa una sola célula, ésta presenta siete cloroplastos localizados en la parte inferior junto a la pared celular. En el panel G se observa el extremo de un cloroplasto; como se puede observar, las membranas tilacoidal y plasmática se observan difusas y poco definidas. La pared celular es gruesa y sus límites se observan difusos. Adicionalmente, se observan dos mitocondrias, cuyas crestas están dispuestas de manera tubular, pero bien la membrana interna está claramente definida. En el panel H se presenta el extremo de un cloroplasto, en él se observan los tilacoides y la membrana tilacoidal, que se observa difusa y desordenada, al igual que la membrana plasmática, que además presenta una gran cantidad de invaginaciones. En esta micrografía también se distingue claramente el retículo endoplásmico rugoso (RER), cuya membrana, en contraste con las membranas plasmática y tilacoidal, se observa claramente definida.

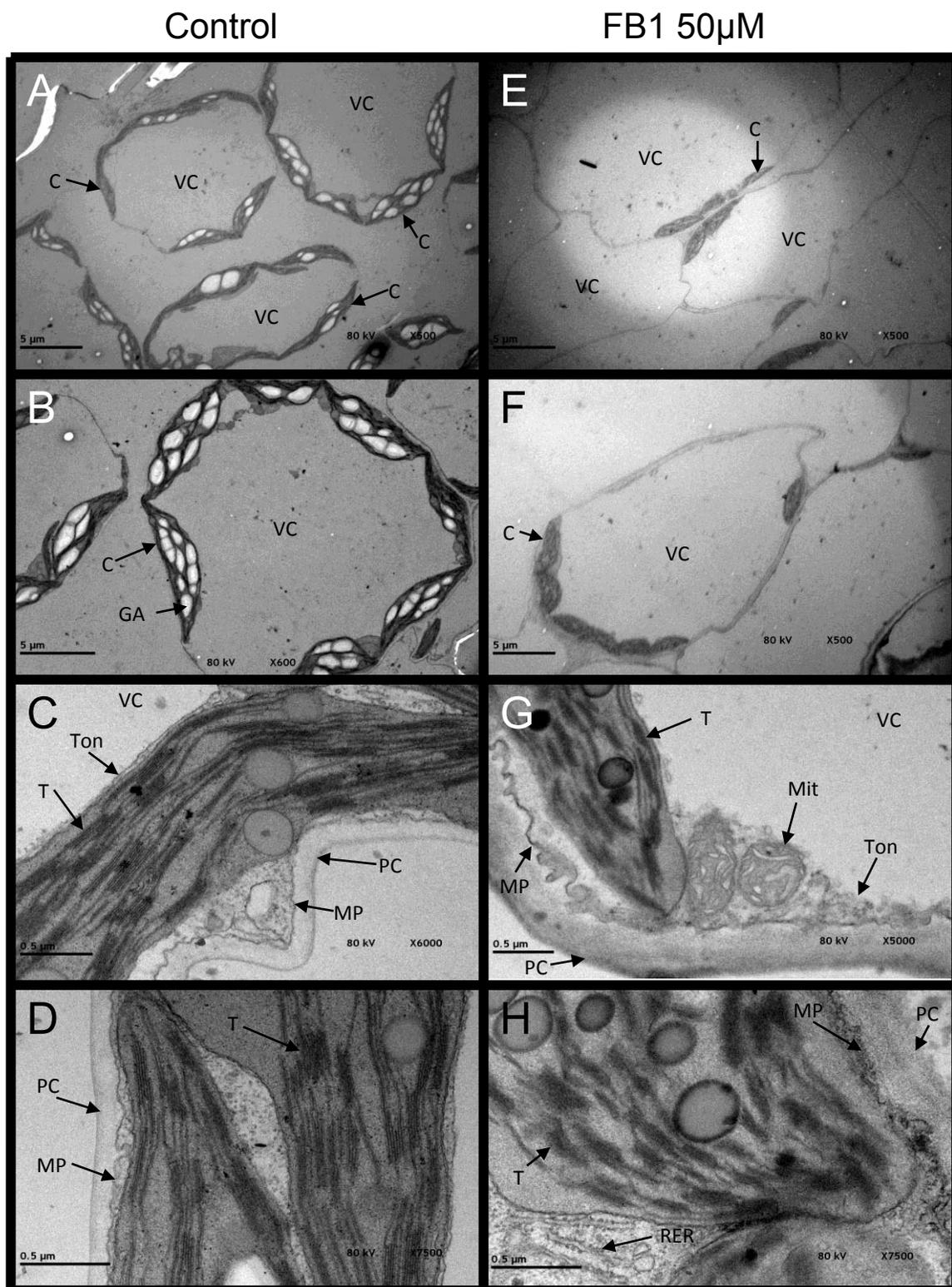


Figura 34. Análisis ultraestructural de las células de plántulas de *A. thaliana* de la línea silvestre (wt). Los paneles A, B, C y D corresponden a plántulas sin tratamiento (control). Los paneles E, F, G y H corresponden a plántulas inducidas con FB1 50 μ M por 72 h. C, Cloroplasto; VC; Vacuola Central; GA, Gránulo de Almidón; T, Tilacoides; PC, Pared Celular; MP, Membrana Plasmática; Mit, Mitocondria; RER, Retículo Endoplásmico Rugoso y Ton, Tonoplasto.

En la Figura 35 se presentan las micrografías obtenidas por MET de las plántulas de la línea mutante *pflD 18-18*. Los paneles A, B, C y D corresponden a las plántulas de la línea mutante sin tratamiento (control). Los paneles E, F, G y H corresponden a las plántulas de la línea mutante inducidas con FB1 50 μ M por 72 h.

En cuanto las muestras de plántulas de la línea mutante *pflD 18-18* sin tratamiento con FB1, en el panel A se muestran varias células, cada una contiene una vacuola central, varios cloroplastos distribuidos alrededor de la vacuola central. Como se puede observar, estos cloroplastos contienen escasos gránulos de almidón en su interior. En el panel B, se presenta una sola célula, ésta contiene nueve cloroplastos de gran tamaño, cuatro de ellos contienen al menos un gránulo de almidón. En el panel C se observa el extremo de un cloroplasto. Se distingue claramente la membrana tilacoidal, ésta se encuentra claramente definida y ordenada en los grana. Se observa una mitocondria con pocas y muy pequeñas crestas tubulares. La pared celular es delgada y sus límites están claramente definidos. La membrana plasmática presenta varias invaginaciones, sin embargo está claramente definida. En el panel D, se presentan con un mayor aumento los tilacoides, como se puede observar, la membrana tilacoidal se encuentra claramente ordenada y bien definida. En el panel E, se presentan varias células, cada una contiene varios cloroplastos con grandes gránulos de almidón alrededor de la vacuola central. En el panel F, se presenta una sola célula, ésta contiene varios cloroplastos de gran tamaño que poseen varios gránulos de almidón. En el panel G, se presenta el extremo de un cloroplasto, en el cual se logra distinguir que la membrana tilacoidal se observa bien definida en la mayoría de los tilacoides, sin embargo, en algunos de ellos se observa difusa y desordenada. Se observa también una mitocondria de gran tamaño cuyas crestas son pequeñas. La membrana plasmática es difusa. La pared celular es ancha y sus límites son difusos. Finalmente, en el panel H, se observa con detalle la membrana tilacoidal, que se observa en su mayoría bien definida y organizada en los tilacoides, que se encuentran distribuidos alrededor de los gránulos de almidón.

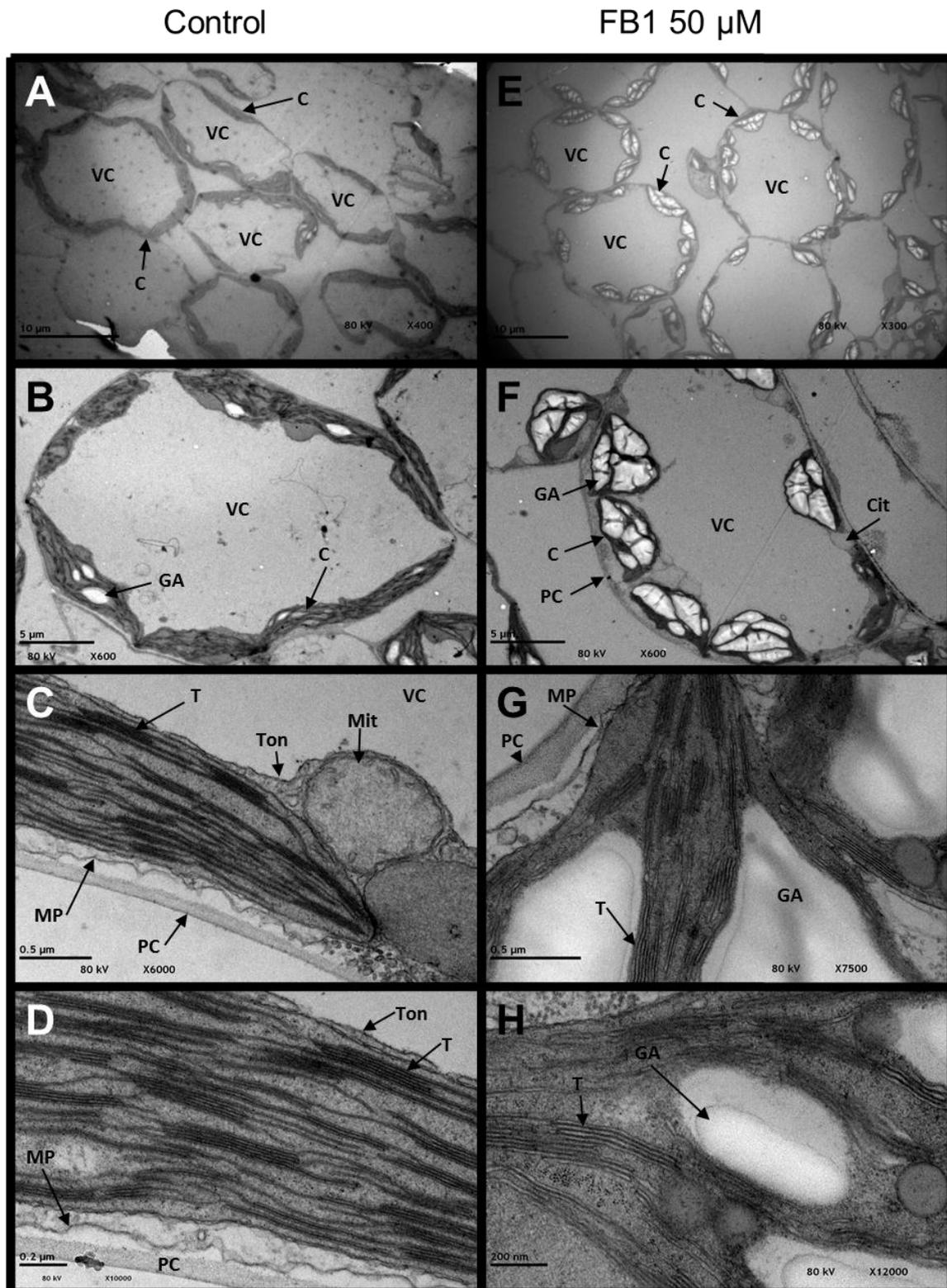
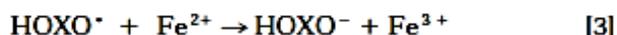
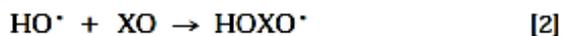
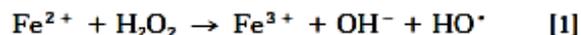


Figura 35. Análisis ultraestructural de las células de plántulas de *A. thaliana* de la línea mutante *pfl1 18-18*. A, B, C y D corresponden a plántulas sin tratamiento (control). E, F, G y H corresponden a plántulas inducidas con FB1 50 μM por 72 h. C, Cloroplasto; VC; Vacuola Central; GA, Gránulo de Almidón; T, Tilacoides; PC, Pared Celular; MP, Membrana Plasmática; Mit, Mitocondria y Ton, Tonoplasto.

IX. DISCUSIÓN

1. La técnica de naranja de xilenol como forma de cuantificar las ERO formadas en la MCP- HR inducida por aumento de BCL endógenas

El método de naranja de xilenol se basa en la formación de radical hidroxilo a partir de H_2O_2 [1] y su posterior reacción con el naranja de xilenol [2], generando un nuevo radical libre que oxida otro ión Fe^{2+} [3], éste método fue descrito por Gray *et al.* (1999) y aplicado en cultivos celulares vegetales por Bindschedler *et al.* (2001).



Para la aplicación de éste método en la cuantificación de ERO en muestras vegetales, se realizó una serie de experimentos para establecer las condiciones para su implementación, así como para verificar que tuviera las características apropiadas que permitieran detectar de manera confiable al H_2O_2 .

Tras la realización de varias curvas estándar se observó que el método es muy sensible, ya que puede detectar H_2O_2 a concentraciones del orden de nmoles y cuantificar cantidades en un intervalo de 0 a 10 nmol de H_2O_2 de forma, sensible, estable, reproducible y confiable.

Posteriormente, la realización de una curva estándar de 0 a 10 nmol y sus lecturas de absorbancia transcurridos 30 a 90 nos permitieron especular acerca de la estabilidad del compuesto colorido formado. De éstos resultados observamos que las lecturas de absorbancia presentaron linealidad y sus pendientes permanecieron muy similares aun transcurridos 90 min, es decir el compuesto colorido es estable y nos permite tener un margen de tiempo muy amplio para realizar las mediciones de las muestras con la seguridad de que los valores que se obtienen siguen siendo confiables.

Adicionalmente, para conocer la capacidad del método de detectar el H_2O_2 que se produce en la planta, tras el procedimiento de obtención de la muestra hasta la obtención del sobrenadante, se realizó la detección de H_2O_2 en diferentes etapas de éste procedimiento. En este experimento, se observó que la menor cantidad de H_2O_2 detectada se presentó tras su infiltración en las hojas de frijol, y la cantidad de H_2O_2 detectada aumenta cuando se aplica en etapas más avanzadas del procesamiento de la muestra; siendo la mayor cantidad de H_2O_2 detectada, la que se obtiene cuando ésta se aplica directamente al material vegetal inmediatamente de su homogenado y re

suspensión. Es decir, con este experimento, se puede concluir que durante el procesamiento que se le realiza a la muestra vegetal para la obtención del sobrenadante, parte del H_2O_2 formado por la acumulación de bases esfingoideas no es detectable por el naranja de xilenol, pero no porque este no tenga la capacidad de hacerlo, sino porque esta especie reactiva es lábil y no perdura hasta el momento en el que se añaden los reactivos para su determinación. Este efecto es consistente con la principal característica de las ERO, que es su alta capacidad oxidante. Es decir un vez que el material vegetal es homogenado, todos los componentes celulares que se ponen en disolución pueden reaccionar con éstas ERO que también se han liberado, permitiéndoles reaccionar entre sí, formando otros productos oxidados y consumiendo las ERO que se produjeron por el aumento de BCL. Dado éste efecto, podemos inferir que los valores que se determinan experimentalmente, son valores subestimados de la producción de ERO de la planta durante la HR, sin embargo con base en la consideración de que éste fenómeno sucede tanto en la muestra control como en la muestra problema, podemos observar comparativamente el efecto debido al tratamiento aplicado (aumento de bases esfingoideas).

Con base en estas evidencias se puede afirmar que el método de naranja de xilenol es un método práctico, sensible y confiable para la detección de H_2O_2 en las muestras vegetales en nuestras condiciones.

Las ERO se producen en gran cantidad en las células durante la HR y éstas contribuyen a la mediación de la MCP, en la que también participan las bases esfingoideas como elementos transductores (Gechev *et al.* 2004) La magnitud de ésa producción de las ERO, así como su localización subcelular son aspectos fundamentales para su función como mediador transduccional (Gechev 2006). Dada la importancia de la producción de ERO, su detección es una necesidad para el conocimiento del mecanismo celular que lleva a la MCP. En la literatura se han reportado varios métodos para determinar ERO, tales como la utilización de reactivos como diaminobencidina (DAB), que forma un precipitado café-rojizo por reacción con H_2O_2 (Thordal-Christensen *et al.* 1997; Torres *et al.* 2002), así como la aplicación de nitro azul de tetrazolio para la detección de radical superóxido (Jabs *et al.* 1996; Hückelhoven & Kogel 1998; Liu *et al.* 2007). Estos reactivos permiten la detección de ERO de manera cualitativa en las hojas de las plantas; si bien existen también reactivos que permiten la cuantificación de H_2O_2 mediante la emisión de fluorescencia como el diacetato de 2', 7' dihidroclorofluoresceína (DAF) (Gerber & Dubery 2003; Gerber *et al.* 2004), que fluoresce en presencia de H_2O_2 , así como la oxidación del luminol, catalizada por la peroxidasa (Keppler *et al.* 1989; Peer *et al.* 2011), entre otros. Estos métodos permiten la cuantificación de

ERO con una alta sensibilidad, sin embargo su aplicación requiere de un fluorómetro, cuyo costo es elevado y la estabilidad de estos compuestos fluorescentes es limitada.

2. Análisis de los fenotipos y la producción de ERO de las hojas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) var. Canario 60.

En la naturaleza, dada la pequeña cantidad de patógeno que puede afectar a una planta, las lesiones que presenta la hoja debido a la MCP son microscópicas, por lo que, para fines prácticos de estudio, experimentalmente se aplican cantidades muy grandes de patógeno o FB1, permitiéndonos estudiar este fenómeno a nivel macroscópico (Parker *et al.* 1996; Agrios 1997).

Adicionalmente, el fenotipo de MCP que se determina tras la inducción de la HR es un indicador de la progresión de la muerte del tejido y por lo tanto es un dato valioso que nos permite observar a nivel macroscópico la temporalidad del desarrollo de la lesión tras la aplicación de las diferentes concentraciones de los inductores de la HR.

2.1. Análisis del efecto de la infiltración de FB1 y *Pst avr* en el fenotipo y la producción de ERO de las hojas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) var. Canario 60.

Se realizó la infiltración de hojas de frijol, con el fin de establecer la magnitud y temporalidad de aparición de las lesiones provocadas por varias concentraciones de inductores que provocan la acumulación de bases esfingoideas y como consecuencia la HR (*Pst avr* y FB1).

Tras la infiltración de concentraciones crecientes de FB1, desde 5, hasta 50 μM de FB1, se observó que las lesiones se presentaron de manera creciente en magnitud al aumentar el tiempo de exposición y la concentración del inductor. Es decir, las lesiones más agudas se presentaron a la concentración de 50 μM tras 7 dpi. Al comparar estos fenotipos con los desarrollados por las hojas de frijol, tras la infiltración de suspensiones crecientes de *Pst avr* (1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC/mL), se observó que la tendencia en la formación de la lesión es similar, sin embargo la magnitud de las lesiones producidas por el patógeno, aún con la mayor concentración utilizada, es menor que la de las lesiones desarrolladas tras la infiltración de FB1 transcurridos los mismos tiempos de inducción. De este experimento se puede concluir que la magnitud de la lesión es dependiente de la concentración de FB1 o *Pst avr* y de su tiempo de exposición, lo cual está de acuerdo a lo que se ha reportado en *Lemna pausicostata* (Abbas *et al.* 1994) y en *Arabidopsis thaliana* (Stone *et al.* 2000).

Posteriormente, tras la cuantificación de H₂O₂, de las hojas de frijol infiltradas con FB1 50 µM se observó un aumento considerable en la producción de H₂O₂ a las 8 hpi, tiempo que coincidió con la aparición de la lesión. Comparando este efecto de la FB1 con la cuantificación de H₂O₂ realizada en las hojas infiltradas con de *Pst avr* a las concentraciones de 1x10⁷, 1 x 10⁸ y 1 x 10⁹ UFC/ mL, se observó que el patrón de la producción de H₂O₂ es muy similar mostrando un aumento considerable a las 8 hpi, sin embargo sólo con la concentración más alta de patógeno el tiempo de aparición de la lesión ocurrió a las 8 hpi y en cambio fué mayor a las concentraciones menores del patógeno.

Por otro lado comparando la temporalidad de la manifestación de la HR descrita anteriormente, con la observada en un trabajo realizado en nuestro laboratorio que precede a este (Palacios-Bahena 2008), en el que se realizó la infiltración de hojas de frijol con concentraciones crecientes de FB1, desde 0.01 hasta 10 µM, se observó que a concentraciones muy bajas de FB1 (0.001, 0.1 y 1.0 µM) la lesión es visible hasta los 7 dpi. Así mismo la magnitud de las lesiones en las hojas infiltradas con las concentraciones de 5 y 10 µM son consistentes a las observadas en este trabajo transcurridos los mismos tiempos de inducción. De acuerdo a todas estas observaciones, la infiltración de altas concentraciones de FB1 ocasiona la manifestación macroscópica de la HR a tiempos más cortos que tras la infiltración de concentraciones bajas de FB1.

Los resultados anteriores en conjunto sugieren que la inducción de la HR con FB1 o *Pst avr* es muy similar, ya que la producción de ERO aumenta considerablemente a las 8 hpi con cualquiera de los tratamientos aplicados, es decir que la señalización mediada por el aumento de bases esfingoideas, ya sea inducidas por FB1 o patógeno, requiere solo determinadas concentraciones de BCL para aumentar los niveles de ERO a las 8 h. A su vez la manifestación macroscópica de la muerte celular del tejido depende de la concentración de inductor, ya que se presenta a tiempos relativamente cortos con las altas concentraciones de FB1 o *Pst avr* y a bajas concentraciones de patógeno, la lesión no se observa a los mismos tiempos.

3. Análisis del efecto de la FB1 20 µM en el fenotipo y la producción de ERO en plántulas de la línea silvestre y mutante *pflD 18-18* de *Arabidopsis thaliana*.

Tras la aplicación de FB1 20 µM a las plántulas de *A. thaliana* de las líneas silvestre y mutante *pflD 18-18*, y del registro fenotípico, se observó que las plántulas de la línea silvestre presentaron clorosis tras 18 hpi, mientras que las plántulas de la línea mutante no presentaron signos de clorosis indicativo de la muerte del tejido.

Posteriormente, se realizó la cuantificación de H_2O_2 en las líneas silvestre y mutante y se pudo observar que la mutante *pflD 18-18* no produjo una cantidad significativamente menor de H_2O_2 comparando la cantidad de H_2O_2 producido por las plántulas de la línea silvestre, lo cual podría atribuírsele a que la cantidad de ERO producidas con esta concentración de FB1 y el tiempo de exposición no fueron suficientes para producir una cantidad de ERO que pudiera ser detectada por el naranja de xilenol tras los tiempos de procesamiento de la muestra, es decir que las cantidades de ERO producidas en ambas líneas a esta concentración, pudieron haber reaccionado durante el procesamiento de la muestra con otras moléculas liberadas, dejando cantidades bajas de ERO en ambas líneas que no permitieron evidenciar posibles diferencias en la producción de ERO entre las líneas.

4. Análisis del efecto de la FB1 50 μ M en el fenotipo y la producción de ERO de *Arabidopsis thaliana* a tiempos tempranos de la inducción de la HR de las líneas silvestre y mutante *pflD 18-18*.

Se indujo la HR aplicando FB1 50 μ M con el objetivo de conocer la temporalidad de producción de ERO a tiempos tempranos de inducción de la HR. Tras la cuantificación de H_2O_2 se observó que la producción de H_2O_2 disminuyó discretamente a los 30 y 150 min post- inducción. Dada la posible señalización mediada por las ERO, se esperaba que las ERO se incrementaran de manera significativa a tiempos tempranos de la inducción de la HR, sin embargo, este experimento no nos permitió detectar dicho incremento. Este resultado puede deberse a dos posibles razones, que la producción de ERO a tiempos tempranos sea muy breve como sucede con otros segundos mensajeros y no logramos encontrar el tiempo adecuado, como es el caso del incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol, cuya concentración es máxima entre los 1-2 min posteriores al tratamiento con d18:0 50 μ M y de 15-20 min en el núcleo (Lachaud *et al.* 2010), o que debido a la probable subestimación en la cuantificación de H_2O_2 durante el procesamiento de la muestra, no logramos encontrar un aumento. En conclusión, la aplicación de un método que permita la detección de H_2O_2 a tiempos muy cortos y que tenga mayor sensibilidad, por ejemplo, la utilización de luminol por Peer *et al.* (2011), así como un sistema de estudio que permitiera un rápido procesamiento de la muestra, en conjunto, estos métodos, permitirían la determinación de dicho aumento teórico súbito y señalizador de ERO.

5. Análisis del efecto de la FB1 50 μ M en el fenotipo y la producción de ERO a tiempos largos de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre y mutante *pflD 18-18*.

Con el objetivo de inducir una mayor producción de ERO en las plántulas de la línea silvestre y mutante *pflD 18-18* y determinar la contribución del cloroplasto en la producción de ERO en estas condiciones, se indujo la HR mediante la exposición de las plántulas a una solución de FB1 50 μ M. Una vez terminada la exposición a la FB1, se realizó el registro fotográfico de las plántulas. Se observó que los signos macroscópicos de muerte celular del tejido fotosintético se presentaron a las 24 y 72 hpi en las plántulas de la línea silvestre, evidenciados por la aparición de clorosis en las hojas de las plántulas. Por otro lado las plántulas de la línea mutante no presentaron clorosis aún transcurridas 72 hpi.

Posteriormente, la comparación del incremento de las cantidades de H_2O_2 producidas por la línea mutante con respecto a la línea silvestre, basada en la cuantificación de H_2O_2 en las plántulas de ambas líneas, reveló que la magnitud del H_2O_2 producido por las plántulas de la línea mutante con respecto a la silvestre fue significativamente menor en un 36.7% a las 72 hpi. Al comparar esta producción de H_2O_2 con los fenotipos de las plántulas, se puede observar que la aparición de los signos de muerte celular podría estar relacionada con la acumulación de ERO en las células, ya que las plántulas de la línea silvestre, que presentaron mayores signos de clorosis son las correspondientes a las 72 hpi, que coincide con una mayor producción de ERO en la línea silvestre, mientras que las plántulas de la línea mutante, con menor producción de ERO no presentaron clorosis, sin embargo la determinación de muerte celular mediante la cuantificación de la conductividad del medio podría ser una determinación más precisa para determinar el efecto de una menor producción de ERO con respecto a la MCP en las plántulas de la línea mutante (Torres *et al.* 2002).

Estos experimentos sugieren que el cloroplasto es un organelo con una contribución significativa en la producción de ERO en la HR a tiempos largos, ya que la expresión de la flavodoxina en las plantas *pflD 18-18*, al cumplir un papel en el transporte de electrones sustituyendo la actividad homóloga de la ferredoxina endógena del Fotosistema I (Tognetti *et al.* 2006; Zurbriggen *et al.* 2008), previno la formación de ERO en un 36.7 % a las 72 hpi.

La magnitud de la producción de ERO es diferente a lo largo de la HR de acuerdo al tipo de inmunidad que se desate en la planta, ya sea en la inmunidad no-hospedero o en la inmunidad gen por gen, observándose una producción de ERO elevada y prolongada a tiempos largos tras la inoculación con el patógeno avirulento *P. syringae* *avr.* (Peer *et al.* 2011). Sin embargo no está bien establecido si las fuentes celulares que generan estas ERO son las mismas a lo largo de los tiempos observados (Saucedo-García *et al.* 2011a).

Es posible que la explosión oxidativa, mediada por bases esfingoideas a tiempos muy tempranos de la HR podría cumplir principalmente un papel en la vía de transducción de señales y que se ha propuesto, está a cargo de la NADPH oxidasa (Torres *et al.* 2002; Lachaud *et al.* 2011) o quizás de enzimas de la pared celular como peroxidasas (Bindschedler *et al.* 2006; Choi *et al.* 2007). Sin embargo, lo anterior no está muy bien definido, ya que Saucedo-García *et al.* (2011a) encontraron que la formación de H₂O₂ a tiempos tempranos no era inhibida por un inhibidor de la NADPH oxidasa.

Por otro lado, a diferencia de las ERO que se producen a tiempos tempranos, las ERO que se producen a tiempos más largos y de manera sostenida podrían estar relacionadas con la contención de los patógenos y la evasión de la enfermedad en esta respuesta de inmunidad. Con base en lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis cobran importancia, ya que con base en la comparación entre las plántulas silvestre y mutante de *Arabidopsis* usadas, al menos el 36.7 % de las ERO producidas a tiempos largos podrían generarse en los cloroplastos de las células.

6. Análisis de la ultraestructura celular de plántulas de las líneas silvestre y mutante *pflD* 18-18 de *Arabidopsis thaliana* tras la inducción de la HR con FB1 50 µM.

Una vez determinada cuantitativamente la contribución del cloroplasto en la formación de H₂O₂ a las 72 hpi de la HR con FB1 50 µM, se realizó el análisis ultraestructural de las plántulas bajo estas condiciones, para relacionar el efecto de una menor producción de ERO en el cloroplasto con su ultraestructura.

Con base en las micrografías obtenidas por MET, hubo varias diferencias muy claras en las células de la línea silvestre tratadas con FB1 50 µM en comparación de las células de la línea silvestre sin tratamiento. Dos de ellas fueron que las células de las plántulas silvestres tratadas con la FB1 presentaron un notable menor contenido de cloroplastos y que éstos a su vez, no presentaron gránulos de almidón. Tras realizar un acercamiento para observar la ultraestructura del cloroplasto, se observó que la membrana tilacoidal de los cloroplastos, así como la membrana plasmática en la cercanía de los cloroplastos de las plántulas silvestres tratadas con FB1 presentó un grado significativo de perturbación y desorganización. Adicionalmente, se observó un aumento en el espesor de la pared celular de las células de las plántulas silvestres tratadas con FB1. Este dato es muy interesante, pues uno de los mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos es la fortificación de la pared celular (Buchanan *et al.* 2000). Ya que se ha reportado que la FB1 induce reacciones de defensa (Stone *et al.* 2000; Asai *et al.* 2000), el engrosamiento observado de la pared celular podría ser resultado de esta acción de la toxina.

Comparando las imágenes de las células de las plántulas de la línea mutante *pfl1 18-18* sin tratamiento, con las de las mutantes con FB1 50 μ M, se observó que las células de estas últimas, en contraste con las células sin FB1, presentaron cloroplastos con grandes gránulos de almidón. Tras realizar un acercamiento, se observó la ultraestructura de la célula y del cloroplasto. Las células de la línea mutante tratadas con FB1 presentaron una pared celular con mayor espesor que la pared de las células de la línea mutante sin tratamiento. Adicionalmente, la membrana tilacoidal de los cloroplastos de las células de la línea mutante tratadas con FB1 conservó su integridad, ya que ésta se observó bien definida y organizada en los tilacoides, que a su vez se presentaron con una disposición ordenada alrededor de los gránulos de almidón.

El efecto de la exposición a FB1 en la ultraestructura de los cloroplastos fue consistente con el efecto en la producción de H_2O_2 observado en las plántulas de la línea mutante *pfl1 18-18*, con respecto a la silvestre tratadas con la toxina. Es decir, dado que en las células de la línea mutante se previene la formación de ERO en el cloroplasto, las membranas tilacoidales conservaron su integridad en contraste con las células de la línea silvestre tratadas con FB1 50 μ M tras 72 hpi.

Por otro lado, la formación de grandes gránulos de almidón en los cloroplastos de las células de la línea mutante tratadas con FB1 resulta muy interesante, ya que en condiciones normales, tanto la síntesis como la degradación de almidón forman un equilibrio entre el almacenamiento y la utilización de las reservas de carbohidratos en respuesta a las necesidades energéticas de la planta. Dada la estrecha relación entre las dos fases de la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos, el conocimiento de los efectos en las vías de síntesis o degradación del almidón, podría esclarecer el papel del cloroplasto como organelo productor de ERO en el desarrollo de la HR. Desafortunadamente, la vía de degradación del almidón, así como los mecanismos de regulación de estas vías aún no son del todo dilucidados. No obstante, se ha reportado que la sobreexpresión de NtMEK^{DD} (una MPKK) en *Nicotiana tabacum* lleva a la activación de las MAP cinasas SIPK, WIPK y Ntf4 produciendo una inhibición de la fijación de CO_2 y generando un exceso de energía de excitación que lleva a la generación de ERO en el cloroplasto (Liu *et al.* 2007); por otro lado, mutación de MPK3 y MPK6 (ortólogos de SIPK y WIPK) en *Arabidopsis thaliana* parece favorecer la fijación de CO_2 , incrementando la síntesis de carbohidratos y la deposición de almidón en los cloroplastos (Saucedo-García *et al.* 2011b).

Por otro lado se ha propuesto también, que la enzima ADP-Glucosa Pirofosforilasa (AGPasa), (formada por 2 subunidades regulatorias, AGPS, 51 kD y 2 subunidades catalíticas más pequeñas, AGPB, 50 kD), es una enzima clave en la biosíntesis de almidón en el cloroplasto y que además su actividad se regula vía redox, mediante la formación/ruptura de un puente disulfuro en la región del C- terminal de las subunidades pequeñas, en la que su activación se lleva a cabo mediante la reducción y ruptura del puente disulfuro, probablemente mediada por el sistema Trx/FTR en el

cloroplasto (Tiessen *et al.* 2002; Zeeman *et al.* 2007). Con base en lo anterior, la formación de los grandes gránulos de almidón en las plántulas mutantes de *A. thaliana pflid 18-18* expuestas a FB1, podría estar atribuida a la flavodoxina que se expresa en los cloroplastos de ésta mutante, ya que al tener una función homologa a la ferredoxina e interactuar productivamente con sus rutas de transporte de electrones, como lo es el sistema Trx/FTR (Tognetti *et al.* 2006), lo anterior podría resultar en una incrementada actividad de la AGPasa y por lo tanto, la acumulación de almidón en los cloroplastos.

Integrando los resultados más importantes obtenidos en este trabajo se obtuvo lo siguiente. En *Phaseolus vulgaris* se detectaron hasta 136.9 % (del control) de H₂O₂ a las 8 hpi con FB1 50 µM (modelo de inducción de la MCP-HR por acumulación de bases esfingoideas) y hasta 131.9% (del control) de H₂O₂ con *Pst avr* (modelo de inmunidad no-hospedero) a la concentración de 1x 10⁷ UFC/mL, consistentemente a las 8 hpi. Por otro lado, los experimentos con las líneas silvestre y mutante *pflid 18-18* de *A. thaliana* sugieren que a tiempos largos (72 hpi), al menos el 36.7 % de las ERO se forman en las reacciones de transferencia de electrones de la fase luminosa de la fotosíntesis realizadas en el cloroplasto y por tanto en una fase tardía de la HR inducida por la acumulación de bases esfingoideas. Estas ERO probablemente están involucradas directamente no con la señalización temprana de la MCP, sino con la contención y muerte de los patógenos y/o en la producción de un daño estructural y funcional irreversible del cloroplasto y con ello con el establecimiento de un punto de control de la MCP a partir del cual la célula no tienen otro camino más que llegar a la muerte (Saucedo-García *et al.* 2011b).

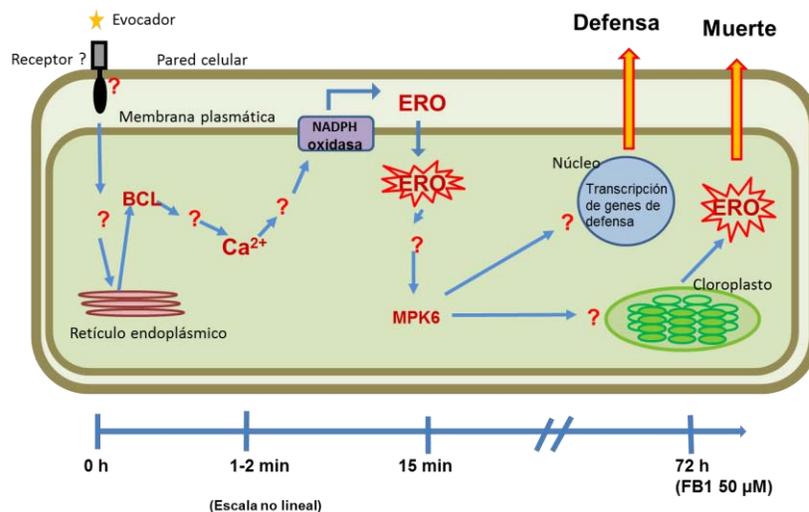


Figura 36. Modelo de la vía de señalización por BCL y los elementos involucrados que llevan a la MCP en la HR. ERO: Especies reactivas de oxígeno, BE: Bases esfingoideas, MPK6, MAP cinasa 6, VC: vacuola central. Este modelo está basado en los datos de la literatura y del presente trabajo (ver texto).

X. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se determinó que el método de naranja de xilenol fue apropiado para la determinación de H_2O_2 , presentando características adecuadas de estabilidad y sensibilidad permitiendo la cuantificación confiable de 1-10 nmol de H_2O_2 .
2. Se determinó la temporalidad de formación de H_2O_2 en las plantas de *Phaseolus vulgaris*, expuestas a la fumonisina B1 y a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1*, observándose un máximo a las 8 hpi en ambos tratamientos.
3. La mutante de *Arabidopsis thaliana pflD 18-18* que expresa a la proteína flavodoxina y que previene la formación de ERO en el cloroplasto, produjo un 36.7 % menos H_2O_2 que las plantas silvestres cuando ambas fueron tratadas con fumonisina B1 50 μ M por 72 h, sugiriendo que el cloroplasto contribuye muy significativamente en la producción de las ERO que se producen a tiempos largos de la HR.
4. La menor producción de ERO en la mutante de *A. thaliana pflD 18-18* inducida por un aumento de bases esfingoideas tuvo un efecto positivo importante en la preservación de la integridad de la membrana tilacoidal y en la acumulación de almidón en los cloroplastos, en contraste con los cloroplastos de las plántulas de la línea silvestre, que mostraron daño considerable en su ultraestructura.

XI. CONCLUSIÓN

La elevación de bases esfingoideas inducida por la fumonisina B1 y un patógeno avirulento produce en las células una generación de ERO a un tiempo posterior al de los eventos tempranos del establecimiento de la HR. Los resultados obtenidos sugieren que el cloroplasto si contribuye de manera importante y significativa a la producción de ERO en las fases avanzadas del establecimiento de la MCP inducida por el aumento de bases esfingoideas en la HR; éstas ERO probablemente cumplan un papel importante en la contención de los patógenos y otras respuestas de defensa, sin embargo, lo anterior conlleva a la pérdida de la integridad del sistema membranal del cloroplasto y su subsecuente destrucción, que posiblemente cumpla la función de hacer irreversible el proceso de muerte celular que caracteriza a la HR.

XII. PERSPECTIVAS

1. Determinar cuantitativamente la producción de ERO en las plántulas de *A. thaliana* de las líneas silvestre y mutante *pflD 18-18* mediante un procedimiento que permita la detección a tiempos muy cortos y que tenga mayor sensibilidad.
2. Verificar visualmente el origen de las ERO en el cloroplasto, detectándolas de manera co-localizada en éste organelo mediante microscopía confocal.
3. Verificar funcionalmente el origen de las ERO dentro del cloroplasto, específicamente, en los fotosistemas de la membrana tilacoidal, midiendo los diferentes parámetros de la fotosíntesis en plantas de *A. thaliana* de las líneas silvestre y mutante *pflD 18-18* a las condiciones de 72 hpi con FB1 50 μ M, en las que la mutante produjo menos ERO.
4. Determinar si el efecto de la formación de grandes gránulos de almidón en los cloroplastos tras la aplicación de FB1 es un efecto secundario de la toxina o consecuencia de la propia HR. utilizando suspensiones del patógeno *Pseudomonas syringae* cepa avirulenta y analizando posteriormente, su ultraestructura.
5. Determinar si el fenotipo de los gránulos de almidón en la mutante *pflD18-18* tratada con FB1, se explica por una mayor síntesis de almidón debida a una regulación positiva de la flavodoxina sobre la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, A. H. Jr. & Riley, R. T. (1994). Fumonisin and AAL toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology* (1994) 106, 1085-1093.
- Adams, W. W., Volk, M., Hoehn, A. & Demmig-Adams, B. (1992) Leaf orientation and the response of the xanthophyll cycle to incident light. *Oecologia*, 90, 404–410.
- Agrios, G. N. (1997) Plant Pathology 4a ed. Academic Press. San Diego, EUA.
- Andersson, B. & Barber, J. (1996) Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. *Photosynthesis and the Environment* (ed. N.R. Baker), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 101–121.
- Andersson, B. & Barber, J. (1996) Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. *Photosynthesis and the Environment*, 101–121.
- Asada, K. (1996) Radical production and scavenging in chloroplasts, in *Photosynthesis and the Environment* (ed. N.R. Baker), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 123–150.
- Asada, K. (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601–639.
- Bindschedler, L. V., Minibayeva, F., Gardner, S. L., Gerrish, C., Davies, D. & Bolwell, G. P. (2001) Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca^{2+} . *New Phytologist*, 151, 185–194.
- Bonfig, K. B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T. & Berger, S. (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*, 225, 1–12.
- Bratt, C. E., Arvidsson, P.-O., Carlsson, M. & Åkerlund, H.-E. (1995) Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynthesis Research*, 45, 169–175.
- Buchanan B.B., Gruissem W. & Jones R. L. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland
- Charles, S. A. & Halliwell, B. (1981) Light activation of fructose biphosphatase in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide. *Planta*, 151, 242–246.
- Chen, M, Cahoon E. B., Saucedo-García, M., Plasencia, J. & Gavilanes-Ruiz, M. (2009) Plant sphingolipids: Structure, synthesis and function. *Lipids in Photosynthesis. Essential and*

- Regulatory Functions. (Wada H and Murata N, Eds.) *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol. 30. Govindjee, Series Ed. Springer, Dordrecht. 77-115.
- Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C. R., Jaworski, J. G. & Cahoon, E. B. (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20, 1862–1878.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S., Chen X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si- Ammour, A., Mauch –Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X. & Zhu, T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 14, 559-574.
- Choi, H. W., Kim, Y. J., Lee, S. C., Hong, J. K. & Hwang, B. K. (2007) hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology*, 145, 890–904.
- Coll, N. S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J. L. & Epple, P. (2010) *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science*, 330, 1393-1396
- Coll, N. S., Epple, P. & Dangl, J. L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation*, 18, 1247–1256.
- Coronel-Román, D. I. (2011) Especies reactivas de oxígeno del cloroplasto en la defensa contra patógenos mediado por bases de cadena larga. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Delledonne, M., Xia, Y. J., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585-88.
- Desikan, R., Hancock, J. T. & Neill, S. J. (2004) Oxidative stress signaling. *Plant Responses to Abiotic Stress* (ed. H. Hirt and K. Shinozaki). *Topics in Current Genetics*, 4, 121–148.
- Devlin, W.S. & Gustine, D.L. (1992). Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant physiology*, 100, 1189-1195.
- Dorey, S. Baillieul, F. Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Friting, B. & Kauffman, S. (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 10, 646-655.
- Flor, H.H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32, 653-669.
- Foote, C.S. (1976) Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. *Free Radicals in Biology*, Vol. 2 (ed. W.A. Pryor), Academic Press, New York, pp. 85–124.

- Frank, H. A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D. & Wasielewski, M. R. (1994) Photophysics of carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis, *Photosynthesis Research*, 41, 389–395.
- Gechev, T. S., Gadjev I. Z. & Hille, J. (2004). An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell and Molecular Life Sciences*, 61, 1185–1197.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., & Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28, 1091–1101.
- Gerber, I. B. & Dubery I. A. (2003) Fluorescence microplate assay for the detection of oxidative burst products in tobacco cell suspensions using 2', 7'-dichlorofluorescein methods. *Cell Science*, 25, 115–122.
- Gerber, I. B., Zeidler, D., Durner, J. & Dubery I. A. (2004) Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta*, 218, 647–657.
- Gilmore, A. M. & Yamamoto, H. Y. (1993a) Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynthesis Research*, 35, 67–78.
- Gilmore, A. M. & Yamamoto, H. Y. (1993b) Biochemistry of xanthophyll-dependent nonradiative energy dissipation. *Photosynthetic Responses to the Environment, Vol. 8: Current Topics in Plant Physiology* (ed. H.Y. Yamamoto and C.M. Smith), American Society of Plant Physiologists, Maryland, pp. 160–165
- Glazener, J. A., Orlandi, E., & Baker, C. J. (1996) The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiology*, 110, 759-763.
- González-Solis, A. (2009) La generación de H₂O₂ en la respuesta de hipersensibilidad mediada por las bases esfingoideas en *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM
- Goodman, R.N. & Novacky, A.J. (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomena. APS Press, St Paul, MN.
- Grace, S., Pace, R. & Wydrzynski, T. (1995) Formation and decay of monodehydroascorbate radicals in illuminated thylakoids as determined by EPR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1229, 155–165.
- Gray J. (2004) Programmed Cell Death in Plants. Blackwell publishing Ltd. UK

- Gray, C., Collins, J. & Gebicki, J. (1999). Hydroperoxide assay with the ferric-xilenol orange complex. *Analytical Biochemistry*, 273, 149-155.
- Halliwell B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312–322.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999) Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Haschke, H-P., Kaiser, G., Martinoia, E., Hammer, U., Teucher, T., Dorne, A. J. & Heinz, E. (1990) Lipid profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO₂-fixation mechanisms. *Botanica Acta*, 103, 32–38.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305, 855–858.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D. I., Petersen, N. H. T., Mattsson, O., Bolt Jørgensen, L., Jones, J. D. G., Mundy, J. & Petersen, M. (2009) Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell*, 137, 773–783.
- Hossain, H. A., Nakano, Y. & Asada, K. (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, *Plant and Cell Physiology*, 25, 385–395.
- Hückelhoven, R. & Kogel, K.-H. (1998) Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible nearisogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis f. sp. hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 292–300.
- Huner, N. P. A., Öquist, G. & Sarhan, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, 3, 224–230.
- Jabs, T., Dietrich, R. A. & Dangl, J. L. (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 273, 1853–1856.
- Keppler, L. D., Baker, C. J. & Atkinson, M. M. (1989) Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology*, 79, 974–978
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S. Q. Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lamb, E. & Silva, H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plants defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97, 8849-8855.
- Koch, W., Wagner, C. & Seitz, H.U. (1998) Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta*, 206, 523-532.

- Kurepa, J., Hérouart, D., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1997) Differential expression of CuZ and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress and hormonal treatments, *Plant and Cell Physiology*, 38, 463–470.
- Lachaud, C., Da Silva, D., Amelot, N., Béziat, C., Brière, C., Cotelle, V., Graziana, A., Grat, S., Mazars, C. & Thuleau, P. (2011) Dihydrosphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Molecular Plant*, 4, 310–318.
- Lachaud, C., Da Silva, D., Cotelle, V., Thuleau, P., Xiong, T. C., Jauneau, A., Brière, C., Graziana, A., Bellec, Y., Faure, J. D., Ranjeva, R. & Mazars, C. (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium*, 47, 92–100.
- Laloi, M., Perret, A.-M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M.-N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J.-M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M.-A. & Moreau, P. (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiology*, 43, 461–472.
- Lamb, C. & Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251-275.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S. & Niyogi, K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 403, 391–395.
- Li, X.-P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D. & Niyogi, K. K. (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 22866–22874.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S. Gassmann, W. & Zhang, S. (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal*, 51, 941–954
- Ma, Y.-Z., Holt, N. E., Li, X.-P., Niyogi, K. K. & Flemming, G. R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 100, 4377–4382.
- Markham, J. E. & Jaworski, J. G. (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1304–1314.
- Mehler, A. H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 33, 65-77.

- Melis, A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plant Science*, 4, 130–135.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490-498.
- Miyake, C. & Asada, K. (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids, *Plant and Cell Physiology*, 33, 541–553
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K. & Shinozaki, K. (1996) A gene encoding a mitogen-activity protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93, 765-769.
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H. & Prats, E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59, 501–520
- Nakagami, H., Kiegerl, S. & Hirt, H. (2004) OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signalling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 26959–26966.
- Niyogi, K. K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 333–359.
- Owens, T. G. (1997) Processing of excitation energy by antenna pigments, Photosynthesis and the Environment (ed. N.R. Baker), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1–23
- Palacios-Bahena, S. (2008). Participación de esfingolípidos membranales en respuestas de defensa de las plantas. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímica), Facultad de Química, UNAM.
- Parker, J. E. Holub, E. B., Frost, L.N., Falk A., Gunn, N. D. & Daniels, M. J. (1996) Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes, *Plant Cell*, 8, 2033-2046.
- Peer, M., Bach, M., Mueller, M. & Waller, F. (2011). Free sphingobases induce RBOHD-dependent reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Letters*, 585, 3006–3010.
- Peer, M., Stegmann, M., Mueller, M.J. and Waller, F. (2010) *Pseudomonas syringae* infection triggers *de novo* synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 584, 4053–4056.

- Polle, A. (1996) Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Botanica Acta*, 10, 984-89.
- Richberg, M.H., Aviv, D.H. & Dangl J.L. (1998) Dead cells do tell tales. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 480-485.
- Rojo, E., Martin, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., Jin, H., Paneque, P., Sánchez-Serrano, J. J., Baker, B., Ausubel, F. M., & Raikhel, N. V. (2004) VPEy exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology*, 14, 1897-1906.
- Rusterucci, C., Stallaert, V., Millat, M. L., Pugin, A., Ricci, P. & Blein J.P. (1996) Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology*, 111, 885-891.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. & Hunt, M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Saucedo-García, M., González-Solís, A., Rodríguez-Mejía, P., Olivera-Flores, T. J., Vázquez-Santana, S., Cahoon, E. B. & Gavilanes-Ruiz, M. (2011a) Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 1616-1619.
- Saucedo-García, M., Guevara-García A., Gonzalez-Solís A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham J. E., Lozano-Rosas, M. G., Dietrich C. R., Ramos-Vega M., Cahoon, E. B. & Gavilanes-Ruiz, M. (2011b) MPK6, sphinganine and the *LCB2a* gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 19, 943-957.
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y.A. & Zuo, J. (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 17, 1030-1040.
- Smirnoff, N. (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants, Blackwell Publishing, UK
- Sperling, P., Franke, S., Luthje, S. & Heinz, E. (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 1031-1038.
- Stone, J. M., Heard, J. E. Asai, T. & Ausubel, F. M. (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *The Plant Cell*, 12, 1811-1822.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A. K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T. & Mueller, M. J. (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal*, 34, 363-375.

- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11, 1187–1194.
- Tiessen, A., Hendriks, J. H. M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E. M. & Peter Geigenberger, P. (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant Cell*, 14, 2191–2213.
- Tognetti, V. B., Palatnik, J. F., Fillat, M. F., Melzer, M., Hajirezaei, M.-R., Valle, E. M., & Carrillo, N. (2006) Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco plants confers broad range stress tolerance. *Plant Cell*, 18, 2035 – 2050.
- Torres, M. A. Dangl, J. L. & Jones J. D. G. (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 99, 517–522
- Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J. F., and Inze, D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161, 405–414.
- Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E. Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A. M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L. A. J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B. & Bozhkov, P. V. (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18, 1241–1246
- Verhoek, B, Haas R, Wrage K, Linscheid M & Heinz E (1983) Lipids and enzymatic activities in vacuolar membranes isolated via protoplasts from oat primary leaves. *Z Naturforsch*, 38c, 770–777.
- Wit, P. J. G. M. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular Molecular Life Sciences*, 64, 2726-2732.
- Xiong, T. C., Coursol, S., Grat, S., Ranjeva, R. & Mazars, C. (2008) Sphingolipid metabolites selectively elicit increases in nuclear calcium concentration in cell suspension cultures and in isolated nuclei of tobacco. *Cell Calcium*, 43, 29–37.
- Yang, Y., Shah, J., & Klessing, D. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development*, 11, 1621-1639.
- Yoshida, S. & Uemura M (1986) Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology*, 82, 807–812.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M. & Smith, A. M. (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal*, 401, 13–28.

- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., Felix, G. & Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagelin perception. *Nature*, 428, 764-767.
- Zurbriggen, M. D., Tognetti, V. B., Fillat, M. F., Hajirezaei M. R., Valle E. M. & Carrillo N. (2008) Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. *Trends in Biotechnology*, 26, 531-537
- Zurbriggen, M. D., Tognetti, V. B. & Carrillo, N. (2007) Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms. The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. *IUBMB Life*, 59 (4 – 5), 355 – 360.

XIV. APÉNDICE**1. Preparación del medio de Gamborg's B-5/agar 1%/sacarosa 1%.**

Pesar las cantidades necesarias del preparado comercial de Gamborg B-5 (Basal Minimum with minimal organics de SIGMA, G5893), agar y sacarosa indicadas a continuación y disolver en 1 L de agua des ionizada.

Medio de Gamborg B-5	3.2 g
Agar	10 g
Sacarosa	10 g

2. Composición del medio Hoagland- Arnon.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
KNO ₃	6 mM	MnCl ₂ . 4H ₂ O	9 nM
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4 mM	H ₃ BO ₃	0.046 mM
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 mM	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.8 nM
1 mL/L de medio(1 g/200 mL)Fe-EDTA pH final 5.2-5.5		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.3 nM
		H ₂ M ₆ O ₄ .H ₂ O	0.1nM

3. Preparación del medio B de King

1) Disolver las cantidades indicadas a continuación en 100 mL de agua des ionizada.

Proteasa peptona	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.15 g
Agar	1.5 g
MgCl ₂ 1M	1 mL
Glicerol	1.2 mL

2) Esterilizar el medio en autoclave y dejar enfriar.

3) En condiciones asépticas, agregar los volúmenes de los siguientes antibióticos al medio estéril y agitar vigorosamente, posteriormente, vaciar el medio en las cajas de petri.

Rifampicina (cf 50 µg/mL, disuelta en DMSO)	100 µL
Tetraciclina (cf 20 µg/mL, disuelta en H ₂ O des ionizada estéril)	100 µL